



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Cristina Moreira Lalau

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (NPAg) SOBRE MACRÓFITAS *Landoltia punctata*.

Florianópolis

2020

Cristina Moreira Lalau

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (NPAg) SOBRE MACRÓFITAS *Landoltia punctata*.

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em Engenharia Ambiental

Orientador: Prof. William Gerson Matias, Dr.

Coorientador: Prof. Rodrigo de Almeida Mohedano, Dr.

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra

Moreira Lalau, Cristina
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA
(NPAg) SOBRE MACRÓFITAS *Landoltia punctata*. / Cristina
Moreira Lalau ; orientador, William Gerson Matias,
coorientador, Rodrigo de Almeida Mohedano, 2020.
107 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. NPAg. 3. *Landoltia punctata*. 4. Alterações morfofuncionais e na fotossíntese. 5. Possível bioacumulação. I. Gerson Matias, William. II. de Almeida Mohedano, Rodrigo. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

Cristina Moreira Lalau

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA (NPAg) SOBRE MACRÓFITAS *Landoltia punctata*.

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Ana Letícia de Oliveira Franco Rossetto, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof.(a) Letícia Flohr, Dr.(a)
Instituição Instituto Federal Catarinense (IFC)

Prof.(a) Luciane Cristina Ouriques, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof.(a) Maria Elisa Magri, Dr.(a)
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Engenharia Ambiental

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof.(a) William Gerson Matias, Dr.(a)
Orientador(a)

Prof.(a) Rodrigo de Almeida Mohedano, Dr.(a)
Coorientador(a)

Florianópolis, 2020.

Este trabalho é dedicado aos meus queridos pais, meus irmãos e
aos meus avós.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradecer imensamente a Deus, que me concedeu o dom da vida duas vezes e iluminou o meu caminho para chegar até aqui.

Aos meus pais Wilson e Kátia, que me repassaram toda a educação e virtudes que foram importantes no meu desenvolvimento pessoal e na conquista de meus objetivos.

Aos meus irmãos e amigos Marcelo, Camila e Maurício, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos de minha vida e sempre me darem muita força em minha caminhada.

Ao meu orientador Prof. Dr. William Gerson Matias, pela orientação, dedicação e conhecimento repassados para suprir as demandas necessárias para a realização da presente pesquisa.

Ao meu coorientador Rodrigo de Almeida Mohedano, por toda orientação prestada, paciência, dedicação e amizade. Além de sempre ter me incentivado para a pesquisa desde a minha iniciação científica fazendo com que eu acreditasse mais no meu potencial tanto para a realização desse trabalho, quanto para a vida inteira.

A toda a equipe do LABTOX (Laboratório de Toxicologia Ambiental – ENS - UFSC) e ao LABCEV (Laboratório de Biologia Celular Vegetal – BEG - UFSC) e ao LCME (Laboratório de Microscopia Eletrônica - UFSC) pelo todo auxílio prestado no decorrer do processo de elaboração do trabalho.

A equipe do CICLOG (Grupo de Pesquisa em Avaliação do Ciclo de Vida) e ao professor Sebastião Roberto Soares por disponibilizar a sala para que o estudo se realizasse.

Aos meus amigos parceiros de caminhada Bianca Oscar, Rodrigo Puerari, Renata Gonçalves e Naiara Justino amigas valiosas que conquistei ao longo do desenvolvimento do trabalho e levarei para a vida, pois sempre me ajudaram e compartilharam bons e maus momentos junto a mim.

Às bolsistas de iniciação científica Anais, Giulia e Mikaelle que no desenvolvimento de seu trabalho de iniciação científica contribuíram de maneira efetiva para a concretização do presente trabalho.

Aos membros da banca Dr^a. Ana Letícia de Oliveira Franco Rossetto, Prof^a Dr^a Letícia Flohr, Prof^a Dr^a Luciane Cristina Ouriques e Prof^a. Dr^a Maria Elisa Magri por terem se disposto a conhecer e avaliar o meu trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina ao PPGEA e a CAPES por disponibilizarem todos os subsídios necessários para que a pesquisa se desenvolvesse.

“A verdadeira medida de um homem não se vê na forma como ele se comporta em momentos de conforto e conveniência, mas em como se mantém em tempos de controvérsia e desafio”. (KING JR, 1966)

RESUMO

No decorrer dos últimos anos é crescente a aplicação de nanoestruturas principalmente nas áreas da ciência e indústria. Dentre as nanopartículas (NP) existentes, uma das que tem se destacado pela alta demanda é a nanopartícula de prata (NPAg), visto que suas propriedades específicas, em principal a biocida, favorecem seu uso em diversos produtos de consumo. Apesar de a NPAg apresentar aplicabilidades e benefícios relevantes, o número de estudos toxicológicos para prever seus potenciais riscos à saúde humana e ao meio ambiente ainda são pouco expressivos. Ademais, a propagação do uso dessas NP pode ampliar a sua dispersão em ambientes naturais, principalmente no ambiente aquático, o que reforça a importância do monitoramento dos seus efeitos adversos. Nesse sentido, a nanotoxicologia surge como uma alternativa para avaliar os efeitos tóxicos das NPAg sobre os ecossistemas e sugerir modelos toxicológicos apropriados. Um exemplo são as plantas, que têm sua representatividade no meio ambiente por serem produtores na teia trófica, participarem de diversas interações biológicas, além de serem essenciais no ciclo biogeoquímico. Neste contexto, o organismo-teste utilizado no presente estudo foi a macrófita *Landoltia punctata* (*L. punctata*), haja vista que estudos demonstram que os efeitos deletérios oriundos da exposição a NPAg, podem vir a causar mudanças significativas no ecossistema decorrente da bioamplificação desses efeitos para outros níveis tróficos. Com base na premissa, essa pesquisa tem como intuito avaliar os efeitos tóxicos globais das NPAg sobre as macrófitas *L. punctata*. Para tanto a metodologia de teste agudo seguiu a normatização ISO/DIS 20079 com algumas adaptações. Caracterizou-se as suspensões de NPAg pelos métodos qualitativos e quantitativos de análise de estabilidade, tamanho e forma utilizando as avaliações de potencial Zeta, diâmetro efetivo e microscopia eletrônica de transmissão. Para os ensaios toxicológicos, o organismo foi cultivado em ambiente laboratorial e exposto a concentrações de 0 (controle); 0,16; 0,32; 0,64; 1,28; 2,56; 5,12 e 10,24 mg.L⁻¹ de suspensões de NPAg. Cada tratamento conteve um total de seis réplicas e o tempo de exposição ao xenobiótico correspondeu a sete dias. A inibição da taxa de crescimento foi medida com base na CE₅₀ (6,84 mg.L⁻¹) e foram avaliadas alterações na morfologia, estruturas celulares e pigmentos fotossintéticos juntamente com a incorporação de NPAg e íons de prata (Ag⁺) na planta. Embora os resultados tenham mostrado baixa inibição do crescimento, quando comparados com outros estudos, danos significativos à ultraestrutura, redução dos pigmentos fotossintéticos e grão de amido, aumento dos compostos fenólicos e alterações fisiológicas, como perda de cor foram observados. Ainda, observou-se o acúmulo de íons de prata nas amostras expostas, o que pode proporcionar riscos em termos de bioamplificação, uma vez que as lemnas pertencem ao primeiro nível da cadeia alimentar. Portanto, o presente demonstrou que a acumulação de NPAg no meio ambiente pode representar riscos em termos de toxicidade, haja vista que essas partículas acumulam no organismo podendo bioamplificar seus efeitos a nível de ecossistema.

Palavras-chave: *Landoltia punctata*. Nanopartícula de Prata. Danos Ultraestruturais. Alterações metabólicas. Incorporação de NPAg.

ABSTRACT

Over the past few years, the application of nanostructures has increased, mainly in the areas of science and industry. Among the existing nanoparticles (NP), one of which has been highlighted by the high demand is the silver nanoparticle (NPAg), since its specific properties, mainly the biocide, favor its use in various consumer products. Although NPAg has relevant applicability and benefits, the number of toxicological studies to predict its potential risks to human health and the environment are still not very significant. In addition, the increase of the use of these NP can increase their dispersion in natural environments, especially in the aquatic environment, which reinforces the importance of monitoring their adverse effects. In this sense, nanotoxicology emerges as an alternative to assess the toxic effects of NPAg on ecosystems and to suggest appropriate toxicological models. An example is the plants, which have representativeness in the environment because they are producers in the trophic web, to participate in several biological interactions, in addition to being essential in the biogeochemical cycle. In this context, the test organism used in the present study was the macrophyte *Landoltia punctata*, given that studies demonstrate that the harmful effects arising from exposure to NPAg, may cause significant changes in the ecosystem due to the bioamplification of these effects to other trophic levels. Based on the premise, this research aims to evaluate the global toxic effects of NPAg on the macrophytes *Landoltia punctata*. For this purpose, the acute test methodology followed the ISO / DIS 20079 standard with some adaptations. The NPAg were characterized by qualitative and quantitative methods of analyzing stability, size and shape using the Zeta potential, effective diameter and transmission electronic microscopy assessments. For toxicological tests, the organism was cultured in a laboratory environment and exposed to concentrations of 0 (control); 0.16; 0.32; 0.64; 1.28; 2.56; 5.12 and 10.24 mg.L⁻¹ of NPAg suspensions. Each treatment contained six replicates and the exposure time to xenobiotics corresponded to seven days. Growth rate inhibition was measured based on the EC50 (6.84 mg.L⁻¹) and changes in morphology, cell structures and photosynthetic pigments were evaluated together with the incorporation of NPAg and silver ions (Ag⁺) in the plant. Although the results showed low growth inhibition, when compared to other studies, significant damage to the ultrastructure, reduction of photosynthetic pigments and starch grain, increase phenolic compounds and physiological changes, such as color loss, were observed. In addition, the accumulation of silver ions in the exposed samples was observed, which could provide risks in terms of bioamplification, since the lemnae belong to the first level of the food chain. Therefore, the present study demonstrated that the accumulation of NPAg in the environment could represent risks in terms of toxicity, since these particles accumulate in the organism and can biamplify their effects at the level of the ecosystem.

Keywords: *Landoltia punctata*. Silver Nanoparticle. Ultrastructural Damage. Metabolic Alteration. NPAg Incorporation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Escalas de comprimento mostrando o contexto de nanômetro.	22
Figura 2: Visão e princípio geral de absorção, transporte e acumulação de material nanoparticulado por plantas.	27
Figura 3: Esquema dos principais efeitos da fitotoxicidade das NPAg.	29
Figura 4: Representação do diâmetro efetivo em suspensões.	35
Figura 5: População de macrófitas lemnáceas.	38
Figura 6: Distribuição da população de lemnas nos continentes.	38
Figura 7: Estrutura das frondes e raiz das macrófitas da espécie <i>Landoltia punctata</i>	41
Figura 8: Imagem da macrófita da espécie <i>Landoltia punctata</i>	41
Figura 9: Esquema ilustrativo referente às etapas desenvolvidas na elaboração da pesquisa.	47
Figura 10: Diluições elaboradas imediatamente após a síntese da NPAg.	49
Figura 11: Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEM-1011 MET – 100KV).	50
Figura 12: Equipamento <i>Zetasizer Nano ZS</i> (Brookhaven, 90 PLUS-PALS).	52
Figura 13: Estrutura piloto montada para o desenvolvimento da cultura e realização de testes com as lemnas.	54
Figura 14: Representação das unidades experimentais utilizadas para procedimento de ensaio de toxicidade com lemnas.	55
Figura 15: Processo de emblocamento da amostra, e teste citoquímico com corante, para posterior seccionamento e visualização registro de imagem por microscopia de luz.	58
Figura 16: Processo de extração de clorofila e carotenoides.	61
Figura 17: Caracterização das suspensões de NPAg por análise por MET. As micrografias apresentam as NPAg diluídas com AOR (a) e meio SIS (b).	64
Figura 18: Curva de concentração resposta do organismo – teste lemna <i>L. punctata</i> , após o período de exposição a NPAg (período de sete dias).	68
Figura 19: Imagens das amostras de lemnas registradas através do estereomicroscópio (lupa).	70
Figura 20: Microscopia de luz das secções das frondes das amostras controle e CE ₅₀ submetidas ao teste citoquímico com os corantes PAS e AT-O.	72
Figura 21: Imagens das frondes das amostras controle e CE ₅₀ , posterior ao período de teste, registradas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).	74
Figura 22: Imagens registradas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das frondes das amostras controle e CE ₅₀ posterior ao período de teste.	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Pesquisas existentes relativas a toxicidade de NPAg.	28
Quadro 2: Detalhes operacionais do ICP-MS.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de concentrações de suspensões de NPAg que se mostraram tóxicas a diferentes espécies de macrófitas lemnáceas.....	49
Tabela 2: Diâmetro médio da partícula obtido por TEM (DM), potencial Zeta (PZ) e diâmetro efetivo (DE), e pH para as suspensões usadas no teste; média \pm SD (n = 3). As letras (a e b) indicam as diferenças significativas de acordo com one-way ANOVA e posterior teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	65
Tabela 3: Resultados de taxa de crescimento das amostras ao final do teste - média \pm DP (n = 3). As letras indicam as diferenças significativas de acordo com a <i>one-way</i> ANOVA e posterior teste de Tukey ($p \leq 0,05$).	66
Tabela 4: Valores de CE ₅₀ baseados nos resultados de pZ, DE e DM.	68
Tabela 5: Conteúdo de pigmentos fotossintéticos ($\mu\text{g.g}^{-1}$ peso úmido) da <i>L. punctata</i> após o período de teste das amostras CE ₅₀ e controle.....	76
Tabela 6: Resultados das concentrações de Ag ⁺ das amostras após o período de teste - média \pm DP (n = 3).	78

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AFA – Área fotossinteticamente ativa
- AOR – Água de osmose reversa
- AT-O – Azul de toluidina
- CE₅₀ – Concentração de efeito em 50% dos organismos-teste
- DE – Diâmetro efetivo
- DLS – Dispersão de luz dinâmica
- DM – Diâmetro médio
- EROs – Espécies reativas de oxigênio
- ICP-MS – Espectrômetro de massa com plasma acoplado
- I* – Percentual de inibição de crescimento
- MET – Microscopia eletrônica de transmissão
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- ML – Microscopia de luz
- NPAg – Nanopartículas de prata
- NPCuO – Nanopartícula de óxido de cobre
- NMs – Nanomateriais
- NP – Nanopartículas
- NT – Nanotecnologia
- OMS – Organização Mundial da Saúde
- PAS – Ácido Periódico de Schiff
- PVA – Poliacetato de vinila – (C₄H₆O₂)_n
- PZ – Potencial Zeta
- r* – Taxa de crescimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	JUSTIFICATIVA	19
1.2	HIPÓTESE	21
1.3	OBJETIVOS	21
1.3.1	Objetivo geral.....	21
1.3.2	Objetivos específicos.....	21
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1	NANOTECNOLOGIA	22
2.2	NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	24
2.2.1	Efeitos tóxicos das nanopartículas de prata	26
2.3	TOXICOLOGIA AMBIENTAL	31
2.3.1	Caracterização de amostras contendo NP_{Ag} para uso em ensaios toxicológicos	33
2.3.2	Ensaio toxicológico	35
2.3.3	Critérios de seleção do organismo teste.....	36
2.3.4	Macrófitas lemnáceas	38
2.4	BIOACUMULAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS	44
2.5	ULTRAESTRUTURAS DE CÉLULAS VEGETAIS	45
3	METODOLOGIA.....	47
3.1	SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA.....	48
3.1.1	Caracterização da nanopartícula de prata.....	49
3.2	INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO.....	52
3.2.1	Pré-cultura.....	53
3.2.2	Ensaio toxicológico.....	54
3.2.3	Estimativa do CE₅₀	56
3.3	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS E ULTRAESTRUTURAIS.....	57

3.3.1	Avaliação da área fotossinteticamente ativa e tamanho da raiz.....	57
3.3.2	Análise dos grãos de amido e compostos fenólicos	58
3.3.3	Efeitos ultraestruturais	59
3.3.4	Análise dos estômatos e tecidos	60
3.4	EFEITOS NA FOTOSSÍNTESE.....	60
3.4.1	Quantificação de clorofilas <i>a</i> e <i>b</i> e carotenoides	61
3.5	ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO DE ÍONS DE PRATA.....	62
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	64
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS	64
4.2	INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO.....	66
4.3	AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS E ULTRAESTRUTURAIS.....	70
4.4	EFEITOS NA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA	76
4.5	ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO DE ÍONS DE PRATA.....	77
5	CONCLUSÃO.....	80
6	RECOMENDAÇÕES.....	82
	REFERÊNCIAS	83
	APÊNDICE A	106
	ANEXO A	107

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia (NT) é uma ciência multidisciplinar que abrange uma vasta e diversificada gama de dispositivos derivados da engenharia, física, química e biologia, e que consiste no desenvolvimento e aplicação de materiais que, contém pelo menos uma de suas dimensões na faixa entre 1-100 nm (10^{-9} m) (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2007; SIEGEL et al., 1999) e alteração em alguma de suas propriedades quando comparadas com a forma em grande volume (*bulk*) (BENKO, 2005). Em nanoescala os materiais têm suas propriedades alteradas de maneira significativa em função de dispor de propriedades de interação diferenciadas e aumento na área superficial relativa (RENN; ROCO, 2006).

A NT tem se destacado pelo seu rápido desenvolvimento nos últimos anos e, por movimentar significativamente a economia das indústrias ao redor do mundo (BOXALL, 2007). Nanopartículas (NP) já compõem os mais variados produtos de vestuário, esportivos, automobilísticos, odontológicos, médicos e de limpeza (CROSERÁ et al., 2009). Dentre a gama de nanomateriais (NMs) com o uso bem difundido em diversas áreas da ciência e da indústria encontra-se a nanopartícula de prata (NPAg).

A NPAg atualmente tem seu uso bem difundido sendo componente de mais de 250 produtos de consumo (VANCE et al., 2015), estando entre as mais usadas no desenvolvimento de novas tecnologias e produtos comerciais, como, por exemplo, em manufaturados têxteis devido as suas características antimicrobianas (BFR, 2010; BLASER et al., 2008). Ademais, estão inseridas na composição de produtos cosméticos, dispositivos de diagnósticos clínicos, indústrias farmacêuticas e tratamento de águas (BOXALL, 2007; PENG et al., 2016; RAI; YADAV; GADE, 2009; THERON; WALKER; CLOETE, 2008). No ano de 2008 foi estimado que cerca de 50 toneladas/ano de NPAg eram produzidas, entretanto esse dado tende a ser mais elevado atualmente (BOXALL, 2007; MUELLER; NOWACK, 2008).

Embora o uso dessas NP atualmente seja bem difundido, elas podem também ser uma classe de contaminantes de preocupação emergente em ecossistemas aquáticos quando dispersas diretamente (no caso de efluentes) ou indiretamente (através da erosão desses materiais aplicados no solo) no meio ambiente (GOTTSCHALK et al., 2009; LOWRY et al., 2012).

As NPAg são elementos que dispõem certo risco uma vez que são utilizadas como bactericidas em diversos produtos comerciais e seus efeitos tóxicos a organismos terrestres e

aquáticos já foram observados em estudos anteriores (NAVARRO et al., 2008; RATTE, 1999; WANG, et al., 2016). Além disso, estudos já demonstram que as NPAg são altamente tóxicas para plantas, peixes, algas, bactérias, seres humanos e outros organismos (ASHARANI et al., 2009; JIANG, et al., 2015; MIAO et al., 2010; PAL; TAK; SONG, 2015). Em plantas, por exemplo, essas NP podem causar redução severa em seu desenvolvimento e taxa de crescimento (TRIPATHI et al., 2017). Por essa NP também já demonstrar efeitos bactericidas significativos incluem-se nessa gama de organismos afetados: *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (PANÁČEK et al., 2006; SHAHVERDI et al., 2007; SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004).

Assim sendo, apesar de apresentar diversas aplicabilidades e benefícios não se conhecem todos os seus potenciais riscos de danos ao meio ambiente. Isso porque as NPAg estão sujeitas a influência do ambiente em que são dispersas podendo sofrer alterações na sua mobilidade, solubilidade e biodisponibilidade, e, conseqüentemente, na sua toxicidade (CORNELIS et al., 2013; LEVARD et al., 2012, 2013; MCGILLICUDDY et al., 2017; REIDY et al., 2013; STARNES et al., 2015).

Nesse contexto, estudos direcionados a elucidar o seu potencial tóxico, bem como os mecanismos de ação tóxica, tanto ao ser humano quanto ao meio ambiente tornam-se essenciais. A nanotoxicologia busca desenvolver e aplicar métodos para avaliar os efeitos tóxicos das NP sobre os ecossistemas, disponibilizando subsídios para uma gestão consciente desta nova tecnologia.

Atualmente os estudos de avaliação toxicológica realizados são aplicações de procedimentos padrões utilizados para outras substâncias, adaptados a materiais em nanoescala. Estes estudos geralmente se baseiam na exposição de organismos-testes aos agentes tóxicos e na observação das alterações metabólicas e morfológicas provocadas (LALAU, 2014). Nesse sentido a seleção do organismo-teste a ser utilizado é uma importante etapa do processo de avaliação toxicológica e requer o atendimento a uma série de requisitos como a sensibilidade e posição na teia trófica, por exemplo, além de atender aos parâmetros requeridos pelas normatizações de testes toxicológicos (KNIE; LOPES, 2004).

Estudos que avaliam a toxicidade de substâncias presentes no meio ambiente a partir dos efeitos provocados sobre as macrófitas lemnáceas vêm se tornando cada vez mais expressivos (GUBBINS; BATTY; LEAD, 2011; LALAU et al., 2015, 2020; PERREAULT et al., 2010; PERREAULT; SAMADANI; DEWEZ, 2014; SASMAZ; OBEK; SASMAZ, 2018; STEGEMEIER et al., 2017; ÜÇÜNCÜ et al., 2014; ZOU et al., 2016), sendo inclusive objeto de normatizações de ensaios toxicológicos (AFNOR, 1996; APHA, 2012; ASTM, 1991; SIS,

1995; ISO/DIS 20079, 2005; OECD, 2007). No entanto, no Brasil os modelos toxicológicos padronizados em norma são: *Daphnia spp* (*Cladocera, Crustacea*) (NBR 12713); *Chlorophyceae* (NBR 12648); *Cyprinidae* e peixes (NBR 15088; 15.499); *Ceriodaphnia spp* (*Crustacea, Cladocera*) (NBR 13373); *Hyaella spp* (*Amphipoda*) (NBR 15470); *Aliivibrio fischeri* (NBR 15411-1; 15411-2; 15411-3); *Echinodermata: Echinoidea* (NBR 15350); anfípodos marinhos e estuarinos (NBR 15638) e misídeos (*Crustacea*) (NBR 15308), ou seja, o uso de lemnas para essas avaliações ainda não é difundido e nem padronizado em território nacional.

As plantas desse grupo vegetal conhecidas popularmente como “*lemnas*”, já são utilizadas em experimentos de morfogenética, ensaios relacionados à fisiologia e na toxicologia, isso devido as suas características de ter desenvolvimento rápido em espaço diminuto (POTT; CERVI, 1999). Além disso, atendem aos requisitos exigidos para que um organismo possa ser utilizado como organismo-teste estabelecidos pelas normatizações de testes toxicológicos tais como: ser de fácil manipulação, ser uma espécie sem estado de extinção, ter sensibilidade adequada para esses tipos de avaliações, entre outros (LALAU et al., 2015). Ademais são organismos importantes no ecossistema, por ocuparem um nível basal na teia trófica, e por sua capacidade de bioacumulação de metais resultando na possibilidade de impactos negativos na cadeia alimentar no caso de bioamplificação (MARTINS, 2014).

Nesse sentido, a escolha do organismo-teste desta pesquisa baseou-se na importância na cadeia alimentar, bem como a sua ampla disseminação local e fácil disponibilidade. O presente estudo tem o intuito de avaliar os efeitos a nível ultraestrutural e consequente alterações no crescimento provocados pela NPAG sobre as macrófitas da espécie *Landoltia punctata*. A toxicidade foi avaliada através de teste agudo (inibição de crescimento), pela estimativa da concentração de efeito em 50% dos organismos (CE₅₀). Também foram realizadas análises de alterações morfológicas, em nível de tecidos e ultraestruturais, observação de pigmentos fotossintéticos e avaliação da bioacumulação de íons de prata.

1.1 JUSTIFICATIVA

A ciência dos NMs vem se destacando mundialmente nos últimos anos pelo rápido e expressivo crescimento em termos de pesquisa, desenvolvimento e aplicações industriais (AITKEN et al., 2006). Dentre os produtos oriundos dessa ciência, as NPAG tem destaque no

desenvolvimento de diversos produtos por disporem de características químicas importantes, sendo seu efeito antimicrobiano uma das principais. É notável que seu desenvolvimento em termos de produção se sobressai sobre pesquisas referentes aos possíveis impactos que essas NP poderão proporcionar aos seres vivos quando dispersas ao meio ambiente (ROSSETTO et al., 2014).

De maneira a preencher essa lacuna concernente a estudos que investiguem os efeitos tóxicos das NP presentes em materiais de consumo ou em processos de produção, as avaliações toxicológicas são indispensáveis no sentido de oferecer maior segurança ambiental, e, mesmo, para a saúde humana.

Nesse viés o presente estudo visa obter informações sobre a toxicidade das NP_{Ag} sobre as macrófitas da espécie *Landoltia punctata*. Para tanto a pesquisa consistiu na análise dos efeitos a nível ultraestrutural e consequentes alterações no crescimento da macrófita lemnácea decorrentes da bioacumulação das NP e íons de prata. Ademais, o estudo demonstra relevância científica e ambiental haja vista que as lemnas são organismos representativos por pertencerem à base da teia alimentar, podendo dispor riscos de bioamplificação dos efeitos observados para níveis superiores da cadeia.

Os resultados obtidos dessa avaliação toxicológica ainda poderão contribuir no desenvolvimento de normativas e legislações específicas concernentes ao uso desses NMs. O organismo já vem sendo um modelo toxicológico bastante utilizado em diversos estudos de nanotoxicologia (mencionados no 9º parágrafo do item 1) por demonstrar boa sensibilidade, rápido crescimento e fácil manipulação por ser de pequeno porte.

Desde o ano de 2009 o Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ano em que foi aprovado pela CAPES o projeto de cooperação internacional denominado “Nanotoxicologia: Métodos toxicológicos, genéticos e epigenéticos como uma estratégia para avaliar o risco da exposição humana e ambiental aos nanomateriais” (PGCI/CAPES nº 017/2010), são desenvolvidas pesquisas importantes na área da nanotoxicologia, dispondo resultados relevantes em termos de efeitos toxicológicos, oxidativos, genéticos e epigenéticos provenientes da exposição de organismos a diferentes NP sendo as mais recentes PERREAULT et al., 2010; ROSSETTO et al., 2014; COSTA et al., 2015; LALAU et al., 2015; PUERARI et al., 2016; GONÇALVES et al., 2018; VICENTINI et al., 2019; LALAU et al., 2020; SCHMIDT et al., 2020.

Dessa forma, esse estudo se justifica nos campos científico, legal e social, pois tem o intuito de contribuir para o desenvolvimento seguro de NTs com o uso das NP_{Ag}. Ainda, a

pesquisa contribui com a formação de recursos humanos junto ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA) da UFSC.

1.2 HIPÓTESE

Seguindo a proposta da presente pesquisa foi elaborada a seguinte hipótese concernente aos efeitos tóxicos das NPAG:

A exposição das *L. punctata* as NPAG, resulta na incorporação dessa substância a nível celular causando danos morfofuncionais e no metabolismo fotossintético.

1.3 OBJETIVOS

De maneira a elucidar a hipótese do presente estudo, foram elencados os objetivos geral e específicos descritos nos tópicos a seguir.

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos tóxicos induzidos pela NPAG sobre a macrófita lemnácea *Landoltia punctata*.

1.3.2 Objetivos específicos

- Analisar as características de tamanho, forma e estabilidade da NPAG;
- Determinar a toxicidade aguda das NPAG sobre a macrófita lemnácea *L. punctata* através da CE₅₀;
- Avaliar alterações morfofuncionais e ultraestruturais da macrófita lemnácea exposta as NPAG;
- Analisar os possíveis efeitos das NPAG no metabolismo fotossintético do organismo exposto;
- Verificar a possível bioacumulação de íons e NPAG sobre o organismo *Landoltia punctata*.

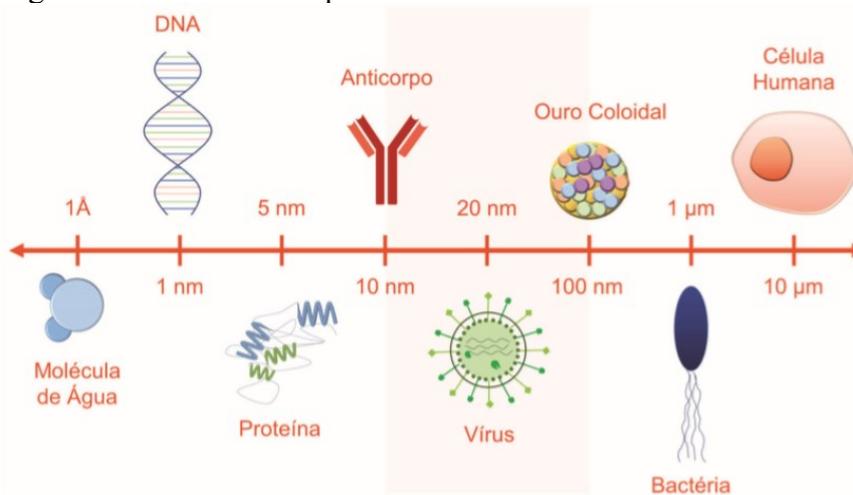
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOTECNOLOGIA

A ciência da NT se caracteriza pela preparação/manipulação de materiais, dispositivos ou processos que envolvam o controle da matéria na escala do bilionésimo do metro (10^{-9} m) (MARTINS; DULLEY; RAMOS, 2011). O desenvolvimento de NP tem como intuito aprofundar conhecimentos dos materiais em nanoescala e dos fenômenos provenientes desses elementos (ARCURI, 2014; MARTINS; DULLEY; RAMOS, 2011).

Sua aplicação tem potencial uso nos mais diversos campos da ciência e tecnologia, estando presente na fabricação de remédios, biosensores e outras aplicações biomédicas (CROSERÁ et al., 2009; ROCO; BAINBRIDGE 2005). Ainda pode-se citar seu uso em protetores solares, cosméticos, têxteis, equipamentos desportivos, eletrônicos, tintas, embalagens de alimentos, catalisadores, antimicrobianos e membranas de tratamento de água (JO et al. 2012; LYDDY, 2009) estendendo-se a aplicações ambientais como descontaminação e despoluição, por exemplo, (LYDDY, 2009). Os NMs são materiais com pelo menos uma de suas dimensões apresentando tamanho entre 1 a 100 nm (COMISSÃO EUROPEIA, 2011). Em escala nano, os materiais podem exibir propriedades físicas, químicas, óticas entre outras, diferentes do material equivalente em escalas maiores (JACOB, 2018). Através da Figura 1 é possível ter noção de tamanho por meio de uma análise comparativa entre alguns elementos.

Figura 1: Escalas de comprimento mostrando o contexto de nanômetro.



Fonte: Apolinário et al., (2020).

O rápido crescimento de pesquisas no viés nanotecnológico é evidente no mundo atual bem como a aplicação destes NMs para os mais variados fins, tal como no campo de biorremediação e biomedicina, uso em antibióticos, materiais de limpeza, produtos de higiene pessoal e indústria têxtil, por exemplo, (BOXALL et al., 2007; CHALOUPKA et al., 2010; KIM et al., 2007; KLAINE et al., 2008; MA et al., 2010; PICCINNO et al., 2012; SUKHANOVA et al., 2018; WIJNHOVEN et al., 2009; WONG; LIU, 2010).

Dentre os diversos materiais utilizados produzidos em escala manométrica, destacam-se os que possuem metais como o Cu, o Zn, o Ti, o Al e a Ag em sua composição, sendo esta última um dos metais mais utilizados pela indústria (KARLSSON et al., 2009; LIN; XING, 2007; NAVARRO et al., 2008; REDDY et al., 2007), além dos óxidos metálicos, como o CuO, o ZnO, o TiO₂ e o AlO₃ (ARUOJA et al., 2009; SIRELKHATIM et al., 2015; WANG; WICK; XING, 2009;).

Outrossim, essa tecnologia além de ser amplamente utilizada, tem considerável relevância no cenário econômico mundial. O mercado europeu de NMs gerou receita de mais de US \$ 2,5 bilhões em 2015 e deve chegar a US \$ 9,1 bilhões em 2022, com uma taxa composta anual de crescimento (¹CAGR - *Compound Annual Growth Rate*) de 20% durante 2016-2022 (AMR, 2016). Em âmbito nacional, o BNDES (Banco Nacional de Desenvolvimento), por exemplo, no ano de 2017, teve como intuito investir em inovações tecnológicas na área de nanotecnologia cerca de 200 milhões de reais para empresas localizadas na região nordeste do Brasil com faturamento de até 16 milhões de reais (ROTTA, 2018). Ademais:

São mais de oito mil produtos feitos em 56 países. Muitas coisas do nosso dia-a-dia têm componentes nano, e esse mercado deve alcançar uma movimentação financeira de US\$5 trilhões até 2020 (ROTTA, 2018, p.01).

Embora as NP disponibilizem uma vasta contribuição em termos de inovações tecnológicas, essas também podem vir a influenciar nas interações entre sistemas biológicos (BfR 2009; DHAWAN; SHARMA; PARMAR, 2009). O uso indiscriminado desses NMs pode resultar em uma maior liberação e acúmulo dessas partículas no ambiente, fator esse que favorece os impactos negativos no meio ambiente (AITKEN et al., 2006; LANDA et al., 2012).

¹ CAGR: Refere-se à taxa de crescimento anual média de um excesso do investimento um o período de tempo especificado (VAN GENUCHTEN; HATTON, 2012).

2.2 NANOPARTÍCULAS DE PRATA

NPAg são partículas finas de prata metálica com dimensão menor que 100 nm (VARNER, 2010). As suspensões de prata, quando em nanoescala, são sistemas particularmente interessantes devido à facilidade com que podem ser preparadas e modificadas quimicamente (MELO JUNIOR et al., 2012). Além disso, apresentam características de maior área superficial, reatividade e alto poder biocida (BfR, 2009).

Existem diversas rotas de síntese das NPAg reportadas na literatura, sendo as metodologias categorizadas conforme o reagente utilizado e as condições da reação. A síntese dessa NP dispõe de métodos químicos, físicos, fotoquímicos e biológicos (HORIKOSHI; SERPONE, 2013). Os métodos químicos, amplamente utilizados, são desenvolvidos através de reações redox, nas quais os valores potenciais de redução (E^0) determinam os pares de reagentes adequados para que a reação química ocorra (LOPES, 2017). A síntese por métodos físicos é comumente mais rápida sendo geralmente realizada através da deposição física de vapor sem o uso de substâncias químicas tóxicas (PACIONI et al., 2015). Na fotoquímica utiliza-se a fotoredução de um precursor, ou de íons de prata, a partir do uso de intermediários ativados fotoquimicamente como um radical, por exemplo (GHORBANI et al., 2011; PACIONI et al., 2015). Ademais, o uso de biomoléculas em substituição de agentes redutores/estabilizadores para preparo das NPAg caracteriza os métodos biológicos de síntese (GHORBANI et al., 2011). Atualmente também se sugerem processos sustentáveis de obtenção da NPAg através de sua eliminação em tratamento de efluentes industriais pelo método de eletrocoagulação (MATIAS et al., 2015).

As NPAg não são uma descoberta recente, esse material já é conhecido a mais de 100 anos (US – FDA, 2020). Referidas antigamente como prata coloidal, eram produzidas através de uma corrente elétrica positiva aplicada em barras de prata pura suspensas em água, resultando em partículas uma faixa de tamanho de 15-500 nm (LINDEMANN, 1997). Os primeiros relatos do uso desse material são reportados como sendo no século IV A.C., em que NP metálicas, incluindo a prata, eram usadas para produzir efeitos coloridos a vidros e cerâmicas (LINDEMANN, 1997). Sendo um exemplo o famoso Cálice de Licurgo (*Lycurgus Cup*), confeccionado na Roma com características de cor esverdeada quando visualizado por reflexão e avermelhada quando observado por transmissão da luz (FELDHEIM; FOSS, 2002). Já em 1928, antes da invenção da penicilina, a prata coloidal era aplicada no tratamento de

muitas infecções e doenças. No ano de 1954, nos Estados Unidos, as NPAg foram registradas como biocida, característica conferida a esse elemento até os dias atuais (VARNER, 2010).

Atualmente as NPAg vêm ganhando considerável espaço com relação ao seu alto poder bactericida por favorecer a segurança alimentar e evitar a ocorrência de doenças por contaminação. Isso por dispor de características como maior estabilidade e área superficial quando comparada a outras nanosuspensões (DONALDSON; POLAND, 2013; KHANNA, 2016). Ainda as NPAg tem as características de alta resistência mecânica, ampla capacidade de deformação, excelente condutividade elétrica, efeitos antibacterianos e antimicrobianos, propriedades ópticas e alta transparência em materiais hidrogéis (CHEN; SCHLUESENER, 2008; MAHDAVINIA et al., 2010; MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010; YALLAPU et al., 2012), além de sua alta liberação de íons de prata que faz com que seu uso seja cada vez mais difundido para os mais diversos produtos de consumo (CHEN; SCHLUESENER, 2008; MARAMBIO-JONES; HOEK, 2010). Ademais, são componentes de mais de 250 produtos de consumo (VANCE et al., 2015). Sendo que muitos desses produtos utilizam essas NP como conservantes (produtos de pele e refrigerantes). Também, estão entre as NP mais usadas no desenvolvimento de novas tecnologias e produtos comerciais (como têxteis, por exemplo) devido as suas propriedades antimicrobianas (BLASER et al., 2008; BfR, 2009). Ainda estão incluídas na composição de cosméticos para o tratamento de manchas e acne; diagnósticos clínicos com o uso de biosensores; bem como, em tecidos de fibras naturais, por conferirem características bactericidas e hidrofóbicas (BOXALL et al., 2007; PENG et al., 2016). O mercado de NPAg para assistência médica registrou mais de US\$ 470 milhões em 2017 (GMI, 2018). Atualmente, a produção mundial de NPAg é estimada em uma faixa de 360 a 450 toneladas por ano (PULIT-PROCIAK; BANACH, 2016).

Entretanto, a variedade de aplicações comerciais da NPAg resulta em um significativo aumento na sua produção e, conseqüentemente, liberação no ambiente (GOTTSCHALK et al., 2009; JUDY; UNRINE; BERTSCH, 2010). Esse potencial risco de descarte descontrolado para o ambiente vem resultando em pesquisas que analisam o fluxo dessas partículas (SUN et al., 2014). Além de que atualmente não existem legislações ambientais referentes a NP, o que existe são legislações que versam sobre o descarte máximo de prata nos efluentes tais como a Resolução CONAMA 430 (0,1 mg.L⁻¹ Ag) e a Lei nº 14675/2009 mais restritiva (0,02 mg.L⁻¹ de prata total). Nesse sentido surgem questionamentos referentes ao uso desenfreado da prata

em nanoescala, tais quais os efeitos que essa partícula pode causar a saúde humana e ao meio ambiente (BfR, 2009).

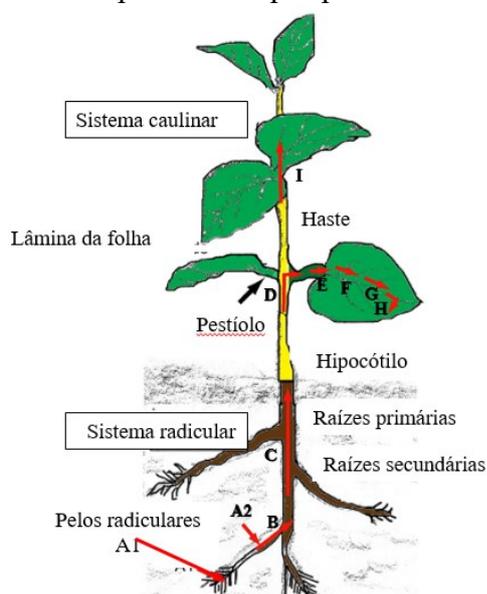
2.2.1 Efeitos tóxicos das nanopartículas de prata

2.2.1.1 Efeitos ambientais

O ciclo de vida das NPAg, compreendendo a síntese, incorporação em produtos, utilização desses produtos com posterior reciclagem e/ou descarte, são algumas das diversas rotas de sua dispersão no meio ambiente (KÖHLER et al., 2008). O descarte inadequado de NPAg pelas mais diversas indústrias pode ocasionar o seu contato direto com o solo, corpos d'água, microrganismos e plantas causando diversos impactos com grande potencial de risco ao ambiente (MA et al., 2010). Outro fator de risco ambiental é por disporem de grande área superficial, boa resistência mecânica e atividade catalítica, uma vez que essas características conferem às NP, quando disseminadas no ambiente, a capacidade de acumular compostos tóxicos em sua superfície. Essa retenção favorece o transporte desses compostos, ou acúmulo, ao longo da cadeia alimentar, na adsorção de biomoléculas resultando em interferências em processos biológicos *in vivo* (QUINA, 2004).

Considerando aspectos ecossistêmicos, os organismos produtores dentro da teia trófica incluem algas, alguns tipos de bactérias e plantas e constituem a base da cadeia alimentar. Em virtude disso, caracterizam-se por acumularem, deslocarem e removerem NPAg durante o seu desenvolvimento (MONICA; CREMONINI, 2009). As NP, quando dispersas no meio podem interferir no ciclo de vida e/ou metabolismo desses organismos podendo ter interação direta com o meio ambiente, uma vez que os produtores se caracterizam como um componente básico para os ecossistemas. Dessa maneira, suas interações, absorção e acumulação na biomassa como exemplo nas plantas, por exemplo (Figura 2), poderão afetar consideravelmente o destino e transporte das NPAg no meio ambiente (MA et al., 2010). Na Figura 2 esse transporte da NPAg iniciando pelas raízes primárias (A2) ou raízes laterais (A1 e depois B) que posteriormente são deslocadas para a raiz (C) e através do caule (D e I) para a folha (representadas pelas letras E, F, G, H). Também poderão ficar adsorvidas na superfície das raízes.

Figura 2: Visão e princípio geral de absorção, transporte e acumulação de material nanoparticulado por plantas.



Fonte: Modificado de Ma et al., (2010).

Ademais, estimar a produção e coeficientes de liberação e fluxo dessas NP para o ambiente é extremamente difícil, haja vista que não há inventário completo de NM contido em produtos e pouca informação sobre seu transporte (MUELLER; NOWACK, 2008). Entretanto, o crescente uso de nanotecnologias de prata, pode provocar aumento das concentrações de prata na natureza a nível local e regional para concentrações iguais ou superiores ao pico de concentrações desse metal existentes em águas contaminadas (LUOMA, 2008). Essa possibilidade leva a uma maior apreensão referente aos riscos ecotoxicológicos (FABREGA et al., 2011).

Ademais seu tamanho nanométrico facilita sua difusão e transporte na atmosfera, em águas e em solos, ao passo que dificulta sua remoção por técnicas usuais de filtração (QUINA, 2004). Assim, estudos relacionados aos efeitos tóxicos ocasionados por esses materiais são essenciais para compreender suas interações com os organismos e prever seus possíveis impactos.

2.2.1.2 Efeitos tóxicos

A toxicidade das NPAg está relacionada com as suas propriedades específicas, como tamanho diminuto e grande área superficial, e a liberação de seus íons quando em suspensão, fator que lhe confere propriedade biocida (TRIPATHI et al, 2017, WIJNHOVEN et al., 2009).

Existem diversos estudos em que se verificam a alta toxicidade dessa substância para plantas, peixes, algas, bactérias, e outros organismos (Quadro 1).

Quadro 1: Pesquisas existentes relativas a toxicidade de NPAg.

Organismo	Referência	Impactos
Bactéria <i>E. coli</i>	(PAL; TAK; SONG, 2007)	Alterações nas membranas/lise celular.
Peixe <i>Danio rerio</i>	(ASHARANI et al., 2009)	Mortalidade, edema no pericárdio, alterações na frequência cardíaca.
Ratos sprague-dawley	(KIM et al., 2008)	Danos no fígado.
Células humanas: fibroblásticas pulmonares (IMR-90) glioblastoma (U251)	(ASHARANI et al., 2009)	Danos na mitocôndria, aumento da produção de espécies reativas de O ₂ (EROs), danos no DNA.
Planta <i>Arabidopsis thaliana</i>	(QIAN et al., 2013)	Danos em estruturas celulares, inibição no crescimento da raiz.
Microcrustáceos <i>Artemia salina</i> ; <i>Daphnia similis</i> e alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	(BECARO et al., 2015)	Imobilidade e inibição de crescimento.
Minhoca <i>Aporrectodea caliginosa</i>	(KHALIL, 2015)	Redução da biomassa e níveis celulares.
Planta <i>Triticum aestivum</i> e bactéria <i>Pseudomonas putida</i>	(LI et al., 2016)	Decréscimo do conteúdo de malonaldeído (MDA) e peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂).

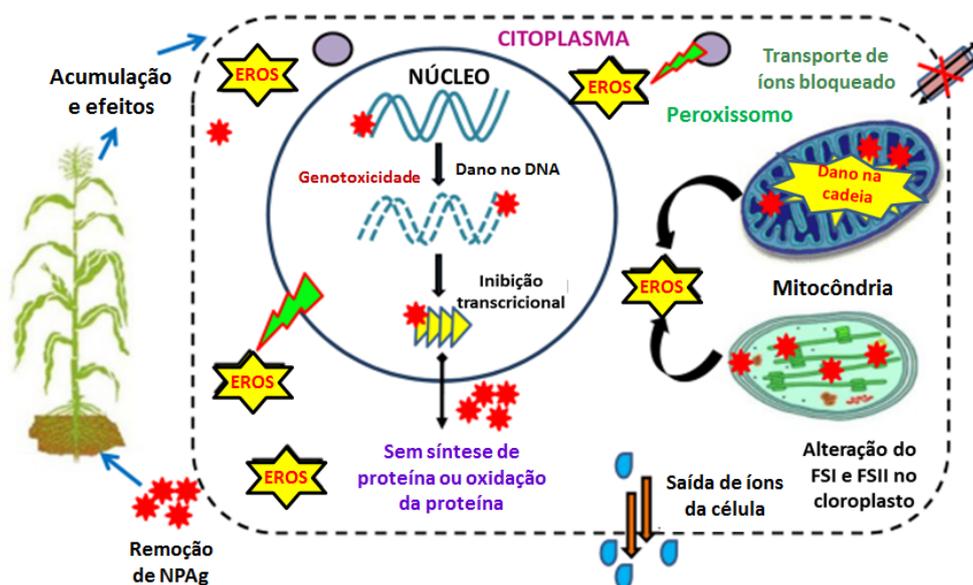
Fonte: Autora, (2020).

O funcionamento dos ecossistemas depende de uma variedade de organismos e, em particular, as plantas localizadas na base da cadeia alimentar, são uma parte vital do ecossistema, pois atuam como produtores primários (LALAU, 2014). Como tal, quaisquer efeitos negativos das NP no crescimento e metabolismo desses organismos podem causar mudanças significativas no ecossistema, podendo causar danos irreversíveis (GUBBINS et al., 2011). Por serem plantas de pequeno porte as lemnas também fazem parte do nível basal da teia trófica.

Com relação ao transporte na parte interior da planta, as paredes celulares desses organismos são compostas principalmente por celulose atuando como uma camada

semipermeável que permite a entrada apenas de partículas pequenas e inibindo as maiores. O principal caminho através do qual a NPAg penetra na célula da planta é através da parede celular das células da raiz (Figura 3). Posteriormente essas NP adentram na parede celular e membrana plasmática da camada epitelial das raízes, e então ingressam no tecido vascular da planta. Através desse tecido, as NPAg são transportadas para o interior da planta através da remoção de água e outros solutos. As mesmas são deslocadas para a haste e posteriormente para as folhas (Figura 3) (TRIPATHI et al, 2017). As paredes celulares das células vegetais têm como principal componente a celulose. Essa irá atuar como uma camada semipermeável que permite a entrada de menores partículas e inibe a penetração de partículas as maiores (Figura 3). NPAg menores transitam pelos poros e entram em membrana plasmática enquanto os NPAg mais aglomeradas são retidas. Essas são posteriormente translocadas para as hastes e, em seguida, para as folhas. Às vezes, as NPAg influenciam a criação de novos poros que permitem a sua internalização, quando aglomerada, através parede celular.

Figura 3: Esquema dos principais efeitos da fitotoxicidade das NPAg.



Fonte: Modificado de Tripathi et al. (2017).

Existem estudos que já demonstram os mais variados impactos das NPAg sobre esses organismos. Os efeitos tóxicos verificados incluem alterações fitológicas, na taxa de crescimento da planta, bem como alterações na ultraestrutura (COX et al., 2016; GUBBINS; BATTY; LEAD, 2011; KHALIL, 2016; OUKARROUM et al., 2013; QIAN et al., 2013; STEGEMEIER et al., 2017).

No momento em que as NPAg penetram no interior das células e subcélulas, elas promovem alterações biológicas e elementos microbióticos essenciais, como as proteínas, podem ser afetados (GRIFFITT et al., 2009; PHAM et al., 2012). Essas NP também estimulam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), por ocasionar um distúrbio metabólico quando no interior da célula (MIAO et al., 2010; OUKARROUM et al., 2014). Isso acontece por conta de o sistema biomolecular de células vegetais conter muitos grupos funcionais como: hidroxila, carboxilato, imidazol, sulfidril, fosfato e amina estarem associados a muitos sítios ativos de interação da NPAg (CAO; LIU, 2010). Como resposta a bioquímica dos processos celulares serão afetadas, bem como, podem ocasionar danos ao DNA (KIM et al., 2013; MIAO et al., 2010; ROH et al., 2010). Ademais as NPAg quando internalizam nas células dos organismos agem como uma fonte interna de liberação de Ag^+ potencializando os danos, efeito esse denominado como “*cavalo de tróia*” (HSIAO et al., 2015).

2.2.1.3 Efeitos sobre as lemnas

As macrófitas lemnáceas possuem alto potencial de acumulação de metais, inclusive de íons de prata (Ag^+), tanto que são amplamente utilizadas em pesquisas com enfoque no potencial de fitorremediação de plantas (STEGEMEIER et al., 2017; UÇUNCU et al., 2014). Seu uso na remoção de metais de efluentes, por exemplo, melhora significativamente a qualidade das águas residuais com relação à demanda química de oxigênio, demanda biológica de oxigênio, nitrogênio total, fósforo total, sais suspensos totais, condutividade elétrica e sólidos dissolvidos totais (ALI et al., 2016). Embora sejam utilizadas para o fim supracitado, o excesso de metais em sua estrutura também pode atingir quantidades que pode provocar danos, sendo o mais característico a redução de seu crescimento (LANDESMAN et al., 2010).

Alguns metais, metais pesados, ou elementos relacionados que podem ser dissolvidos (como sais iônicos) ou suspensos (como NP) podem ser tóxicos para as plantas aquáticas quando dissolvidos em água (ZIEGLER; SREE; APPENROTH, 2018). Romero-Hernández et al., (2016) ao comparar a tolerância de quatro macrófitas de diferentes espécies expostas (*Typha latifolia*, *Lemna minor*, *Eichhornia crassipes* e *Myriophyllum aquaticum*) a quatro tipos de metais pesados, demonstraram que a lemna foi mais sensível dentre as demais macrófitas analisadas. Ainda se tratando desses impactos, Brain; Cedergreen (2009) descreveram numerosos distúrbios fisiológicos e bioquímicos nas macrófitas lemnáceas decorrentes de sua exposição a metais.

Com relação às NPAg, a maior parte dos estudos observou alterações expressivas com relação ao crescimento das lemnas (GUBBINS et al., 2011; JIANG et al., 2012; LEVARD et al., 2013; MINNOGIANIS et al., 2019; PEREIRA et al., 2018; UÇUNCU et al., 2014). Ademais, efeitos na emissão de fluorescência clorofiliana, aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e nas atividades das enzimas antioxidantes também já foram identificados (DEWEZ et al., 2018; JIANG et al., 2014; OUKARROM et al., 2013; PERREAULT et al., 2010).

Assim, para uma melhor compreensão dos efeitos oriundos desses NMs sobre a espécie de macrófita *Landoltia punctata*, é essencial a aplicação dos conceitos e elementos relacionados às avaliações toxicológicas.

2.3 TOXICOLOGIA AMBIENTAL

A toxicologia é uma ciência interdisciplinar que tem como intuito avaliar os efeitos nocivos das substâncias sobre os organismos através dos mecanismos de ação tóxica em escala molecular, celular e em organismos inteiros (MATIAS, 2018). A avaliação é feita através de ensaios que permitem conferir o nível de toxicidade oferecido pela substância em questão, caso se observe o efeito tóxico (MATIAS, 2018).

A ciência em questão tem importância em termos de avaliações e diagnósticos ambientais, por permitir disponibilizar a concentração química dos elementos que possam vir a prejudicar os ecossistemas (LALAU, 2015). Assim, esta já é requerida como indicador de poluição em termos de legislação (RESOLUÇÃO CONAMA 357, 2005; RESOLUÇÃO CONAMA 430, 2011). O artigo 8º do capítulo III da resolução CONAMA 357 preconiza que:

§ 3º A qualidade dos ambientes aquáticos poderá ser avaliada por indicadores biológicos, quando apropriado, utilizando-se organismos e/ou comunidades aquáticas.
§ 4º As possíveis interações entre as substâncias e a presença de contaminantes não listados nesta Resolução, passíveis de causar danos aos seres vivos, deverão ser investigadas utilizando-se ensaios ecotoxicológicos, toxicológicos, ou outros métodos cientificamente reconhecidos (RESOLUÇÃO CONAMA nº357, 2005, p.263).

A mesma normatização ainda estabelece que os efeitos tóxicos são levados em consideração com relação aos parâmetros de qualidade ambiental, afirmando que:

Art. 34. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedeçam as condições e padrões previstos neste artigo, resguardadas outras exigências cabíveis: § 1º O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

§ 2º Os critérios de toxicidade previstos no § 1º devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos, e realizados no efluente (RESOLUÇÃO CONAMA nº357, 2005, p.279).

O capítulo II artigo 18º da resolução CONAMA 430/11 se reporta aos ensaios de toxicidade como importante parâmetro em termos de qualidade ambiental.

§ 1º Os critérios de ecotoxicidade previstos no caput deste artigo devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos aceitos pelo órgão ambiental, realizados no efluente, utilizando organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos diferentes. (RESOLUÇÃO CONAMA nº430, 2011, p.05).

Igualmente, um programa de testes de toxicidade pode vir a corrigir limitações muitas vezes encontradas em análises químicas ambientais, visto que as concentrações no meio podem ser menores que os valores detectáveis por métodos analíticos, ou difíceis de serem analisados (MESSIAS, 2008). Esses ensaios tem como intuito principal avaliar em quais dimensões as substâncias químicas (isoladas ou misturadas) manifestam seus efeitos, bem como, seu nível de periculosidade para o ser vivo (KNIE; LOPES, 2004).

Vale ressaltar que, dentre as legislações voltadas ao tema, no estado de Santa Catarina existe legislação específica do órgão ambiental competente (Portaria 017/2002 FATMA) que estabelece padrões toxicológicos de lançamento de efluentes em corpos hídricos. Entretanto, a portaria faz referência somente a ensaios de toxicidade com os organismos *Daphnia magna* e *Aliivibrio fischeri*, negligenciando possíveis efeitos tóxicos que podem ser causados em plantas. Esses organismos podem ser um modelo toxicológico importante e representativo em termos de ecossistemas já que são organismos produtores e pertencente ao nível basal da teia trófica (LALAU, 2014). Além de já serem modelos, conforme mencionado anteriormente, utilizados na ciência da nanotoxicologia que se trata da avaliação das propriedades toxicológicas das NP com a intenção de determinar se (e em que medida) representam uma ameaça ambiental ou social. Propriedades inerentes das NP (incluindo tamanho, forma, área de superfície, carga superficial, estrutura de cristal, revestimento e solubilidade/dissolução), bem como fatores ambientais (como temperatura, pH, força iônica, salinidade e matéria orgânica) influenciam coletivamente o seu comportamento, destino e transporte e, em última instância, toxicidade (WALTERS; POOL; SOMERSET, 2016).

2.3.1 Caracterização de amostras contendo NPAg para uso em ensaios toxicológicos

Com o intuito de facilitar a compreensão das particularidades intrínsecas das suspensões de NPAg que irão influenciar na toxicidade, torna-se fundamental a realização do procedimento de caracterização.

Parâmetros como a forma e o estado de aglomeração nos quais as NP se apresentam no ambiente influenciam diretamente no seu nível de toxicidade. Isso por poderem sofrer alterações quando em contato com os seres vivos e com o meio ambiente (LALAU, 2015; LEVARD et al., 2012; REIDY et al., 2013), reforçando a necessidade do conhecimento de suas características quando dispersas.

A caracterização inclui as medidas de tamanho, forma, distribuição, características morfológicas (cristalinidade, porosidade, rugosidade e superfície) características químicas, solubilidade, área superficial, estado físico de dispersão, características químicas da superfície (POWERS et al., 2006), entre outras. Porém, os parâmetros comumente analisados em estudos de avaliações toxicológicas são o diâmetro efetivo, tamanho, forma, estado de aglomeração e estabilidade (BECARO et al., 2015; GUBBINS; BATTY; LEAD, 2011; KAEGI et al., 2011).

2.3.1.1 Estabilidade das nanopartículas

Similar as partículas em geral, as NP adquirem carga elétrica em sua superfície quando em solução. Essas são geradas a partir da teoria do DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) que sugere que a geração de uma força proveniente das superfícies carregadas quando em processo de interação com o meio líquido (ROSSETTO, 2012). Esse fundamento define que a estabilidade de uma suspensão é dependente do número de interações que resultam tanto das forças de Van der Waals como das forças eletrostáticas. Dessa maneira o potencial Zeta trata-se do potencial eletrocinético das moléculas e íons do diluente incluso em seu plano de cisalhamento quando sob ação de um potencial elétrico.

Essa grandeza mede o plano de cisalhamento da NP o que está intimamente ligado com a estabilidade da suspensão, bem como, morfologia da superfície (LALAU, 2014). Quanto maior o valor desse parâmetro em módulo, maior será a carga superficial da partícula. Isso representa maior estabilidade da suspensão, ou seja, menor probabilidade de formação de

aglomerados de partículas. Em contrapartida valores de potencial Zeta mais baixos representam a tendência de maior capacidade de aglomeração das partículas (METCALF; EDDY, 2003).

NP com potencial Zeta entre -10 e +10 mV são consideradas aproximadamente neutras, enquanto NP com potencial Zeta maior que +30 mV ou menor que -30 mV são consideradas fortemente catiônicas e fortemente aniônicas, respectivamente (CLOGSTON; PATRI, 2010).

O parâmetro potencial Zeta é amplamente utilizado nos estudos de estabilidade do das suspensões de NP e na investigação da sua superfície de adsorção (XU, 2008).

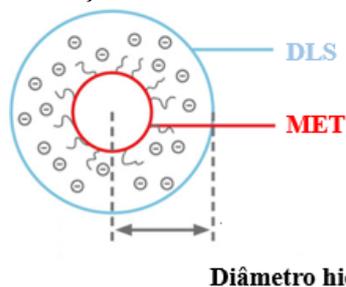
A análise do potencial Zeta possibilita determinar o quão estável era a suspensão a partir do valor obtido desse parâmetro, bem como, observar os tamanhos dos aglomerados formados na solução. Quanto mais dispersas as NP no meio, melhor será a interação NP – organismo, proporcionando um maior potencial de geração de efeitos tóxicos. Ademais, como a maioria das membranas celulares é carregada negativamente, o potencial Zeta pode atestar a tendência de uma NP em permear membranas com partículas catiônicas geralmente exibindo mais toxicidade associada à ruptura da parede celular (CLOGSTON; PATRI, 2010). Dessa maneira, o potencial Zeta é um parâmetro importante de análise após a exposição das macrófitas as suspensões de NPAg.

2.3.1.2 Forma e estado de aglomeração

As principais técnicas que fornecem informações referentes ao tamanho, morfologia das NP e estado de aglomeração são a microscopia eletrônica de transmissão e a quantificação do diâmetro efetivo (POWERS et al., 2006).

Quando uma partícula dispersa se move através de um meio líquido, uma camada fina de dipolo elétrico se adere a sua superfície. Uma vez que esta camada influencia o movimento da partícula, ela passa a denominar-se como diâmetro da partícula hidrodinâmica com dispersão de luz dinâmica (DLS) também chamado de diâmetro efetivo (Figura 4).

Figura 4: Representação do diâmetro efetivo em suspensões.



Fonte: Modificado de Crolly, (2018).

Conforme Padilha, (2011), o microscópio eletrônico de transmissão consiste em um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam esse feixe, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão de cerca de 10^{-5} mm Hg.

Análoga a microscopia óptica de transmissão, na microscopia eletrônica de transmissão a imagem é obtida por um canhão de elétrons, cuja localização é no topo da coluna do microscópio enquanto o sistema de gravação encontra-se ao fundo (filme fotográfico ou tela fluorescente) (ROSSETTO, 2016). Essa técnica permite avaliar, através de imagem, o tamanho, a morfologia e composição das NP. Já o diâmetro efetivo pode ser mensurado com o uso do mesmo equipamento que quantifica o potencial Zeta.

A caracterização da NP é um procedimento fundamental para elucidar os mecanismos de ação dos efeitos tóxicos e para melhor compreender esses efeitos também se faz importante o embasamento teórico de conceitos e elementos relacionados às avaliações de toxicidade.

2.3.2 Ensaios toxicológicos

Para Rand; Wells; Mccarty (1995), os efeitos tóxicos dependerão da concentração e das propriedades da substância química em que o organismo é exposto, bem como do período de exposição às mesmas. Essas avaliações podem ser realizadas em escala laboratorial ou em campo, permitindo identificar efeito crônico ou agudo.

Testes agudos: Possibilitam a identificação dos efeitos imediatos e irreparáveis causado ao organismo quando exposto a substância testada (KNIE; LOPES, 2004), em que a resposta mais comum é a morte (FUZINATTO, 2009).

Testes crônicos: São observados efeitos subletais provocados que poderão atingir o desenvolvimento e o ciclo reprodutivo dos organismos testados (FUZINATTO, 2009).

O resultado proveniente dos referidos ensaios deverá ter uma confiabilidade estatística além de ser coerente e representativo, dessa maneira uma análise mais aprofundada é fundamental. Assim, é necessário que essas respostas sejam apresentadas graficamente ou através de tabelas com os dados de desvio padrão e valores médios e com o uso de grandezas estatísticas adequadas (KNIE; LOPES, 2004).

Recomenda-se que ao menos cinco concentrações de amostras sejam testadas, sendo ao menos duas com mais de 50% de efeito sendo esses 20 e 80% do valor do efeito. Knie; Lopes, (2004) definem os termos utilizados no âmbito da ciência da toxicologia que são usados para quantificar o nível de toxicidade da substância analisada.

- CEO: Concentração de efeito observado – Menor concentração do agente tóxico na qual o efeito é observado no decorrer do período de teste;
- CE20: Concentração efetiva média – Concentração que causa efeito agudo (tal como imobilidade) em 20% dos organismos nas condições e período de teste sendo essa calculada estatisticamente;
- CE50: Concentração efetiva média – Concentração que causa efeito agudo (tal como imobilidade) em 50% dos organismos nas condições e período de teste sendo essa calculada estatisticamente;
- CE100: Menor concentração que causa efeito a 100% dos organismos, sendo que esses valores não entram no cálculo, pois não refletem de maneira precisa o efeito zero ou o efeito 100%;
- CL50: Concentração letal média – Concentração da amostra que causa a mortalidade de 50% dos organismos nas condições e período de teste sendo essa calculada estatisticamente;
- CENO: Concentração de efeito não observado – maior concentração da amostra que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos nas condições e período de teste.

As metodologias previamente descritas auxiliam na estimativa dos efeitos nocivos provocados ao organismo pela substância tóxica avaliada. Todavia, para tanto é necessário que o organismo apresente os requisitos necessários para o seu uso no ensaio e avaliação toxicológica.

2.3.3 Critérios de seleção do organismo teste

Apesar das avaliações toxicológicas serem consideradas uma importante ferramenta de avaliação no escopo do cenário das análises ambientais, nem todos os organismos poderão ser utilizados nos testes de toxicidade. Isso ocorre por motivo de as espécies terem diferentes suscetibilidades aos agentes químicos (RAND; WELLS; MCCARTY, 1995).

Com base na premissa descrita acima, de maneira a padronizar as espécies utilizadas nos testes, existe a necessidade de que o organismo utilizado para essa finalidade atenda aos parâmetros de seleção requeridos pelas normatizações (KNIE; LOPES, 2004).

Dentre os principais requisitos necessários encontram-se: a disponibilidade e abundância do organismo no ambiente, a facilidade de cultivo em laboratório, o conhecimento da biologia da espécie. Além de essas espécies terem sensibilidade adequada para exposição ao teste e, de preferência, que sejam espécies autóctones (BOHRER, 1995).

Ainda o conhecimento prévio das características da espécie a ser utilizada faz-se necessário, tanto para cultivar quanto para desenvolver o teste. Dentre essas características destacam-se: comportamento, reprodução, hábitos alimentares, fisiologia, facilidade de manuseio, importância na cadeia alimentar, ampla disseminação e fácil disponibilidade. O uso de espécies de ciclo de vida não muito longo e de pequeno porte mostra-se como ideal para os estudos ecotoxicológicos em escala laboratorial (KNIE; LOPES, 2004; DOMINGUES E BERTOLETTI, 2006). Ainda para uma melhor interpretação de resultados Costa et al. (2008), afirmam que se faz necessário o uso de espécie nas quais a fisiologia, comportamento e genética sejam bem conhecidos.

Entre todos os parâmetros anteriormente descritos, um dos principais fatores levados em conta para o organismo a ser submetido aos ensaios toxicológicos é a sensibilidade (LALAU, 2014). Assim, há necessidade da apresentação de um elevado grau de sensibilidade a uma vasta gama de agentes químicos, sendo também fundamental que esse parâmetro de sensibilidade seja constante, pois possibilitará a obtenção de uma maior precisão dos resultados elevando o grau de confiabilidade do ensaio realizado.

Nessa perspectiva as macrófitas lemnáceas mostram-se como um modelo toxicológico adequado para uso em ensaios visto que, contemplam fatores anteriormente descritos quanto por ser de pequeno porte e fácil manuseio, ter crescimento rápido e demonstrar considerável sensibilidade a elementos tóxicos (POTT; POTT, 2002).

2.3.4 Macrófitas lemnáceas

2.3.4.1 Características gerais

As macrófitas lemnáceas são as menores angiospermas do mundo com mais rápido crescimento, podendo atingir até no máximo 0,3 mm na fase adulta (CROSS, 2014; ZIEGLER et al., 2014). São plantas flutuantes (

Figura 5) que crescem em ²ambientes lênticos de água doce ao redor do mundo, excetuando-se regiões congeladas, tais como polos e picos montanhosos (Figura 6) (LANDOLT, 1986).

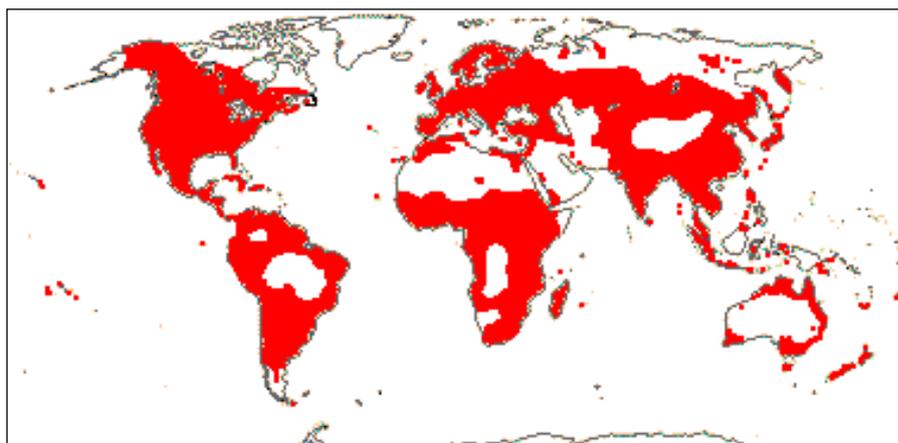
Figura 5: População de macrófitas lemnáceas.



Fonte: LALAU^(a), (2014).

Figura 6: Distribuição da população de lemnas nos continentes.

² Ambientes lênticos: são ambientes aquáticos de água parada, como por exemplo, lagoas, lagos, pântano, etc. É classificado como um importante distribuidor de biodiversidade por apresentar uma região resultante do contato entre dois ou mais biomas fronteiros bem definidos (ANA, 2020)



Fonte: CROSS, (2014). Legenda: A cor vermelha representa os locais em que há ocorrência de lemnas.

A nomenclatura da planta como “*Lemna*” originou-se da proposição *limnus*, cujo significado em latim é lago, o qual está relacionado ao habitat natural dessas macrófitas (SKILLICORN; SPIRA; JOURNEY, 1993).

De acordo com o APGIII (*Angiosperm Phylogeny Group III*) a subfamília *Lemnoideae*, que pertence à família Aráceae, é composta por cinco gêneros (*Landoltia*, *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* e *Wolffiella*) contendo cerca de 40 espécies, sendo todas de ambientes aquáticos. Já no Brasil sua determinação não é tão evidente devido ao tamanho diminuto e rara visualização de flores (POTT; POTT, 2002).

Em relação à teia trófica essas macrófitas apresentam-se como produtores primários, servindo de alimentos para pequenos animais, peixes e aves aquáticas (LALAU, 2014). Ademais, estas macrófitas tem considerável relevância dentro da teia trófica por fixar carbono atmosférico dissolvido produzindo biomassa de excelente qualidade nutricional (DROST, MATZKE, BACKHAUS, 2006).

Estas plantas também já vêm sendo foco de pesquisas nas mais diversas áreas, como na remoção de nutrientes de efluentes, produção de biocombustíveis, produção de biogás, sequestro de CO₂, em dietas alimentares, produção de vacina, remediação de ambientes poluídos, remoção de metais entre outros (AXTELL; STERNBERG; CLAUSSEN, 2003; FIRSOV et al., 2018; GE et al., 2012; GÖNEN, 2017; KHELLAF; ZERDAOUI, 2010; MOHEDANO et al., 2012; SHARMA; GAUR, 1994; YILMAZ, 2006; VELICHKOVA et al., 2017; VERMA; SUTHAR, 2013; YADAV et al., 2017; YIN et al., 2015; ZHAO et al., 2014, 2015).

As macrófitas são modelos vegetais empregados, já de forma consolidada, na área da nanotoxicologia (GUBBINS; BATTY; LEAD, 2011; LALAU et. al.,2014; OUKARROUM et.al., 2013; PERREAULT; POPOVIC; DEWEZ, 2014; SIDDIQI; HUSEN, 2017; ZHAO et. al., 2018; SONG et. al., 2016; STEGEMEIER, et al., 2017). Entre as espécies de lemnas conhecidas encontra-se a *Landoltia punctata*, utilizada para o desenvolvimento da presente pesquisa.

2.3.4.2 Espécie *Landoltia punctata*

Estudos existentes relativos a dados morfológicos, bioquímicos e moleculares revelam diferenças taxonômicas das lemnas *Spirodella punctata* quando comparada à outras espécies de macrófitas aquáticas (LES; CRAWNFORD, 1999). Apesar de a espécie citada ter maior semelhança com a lemna do que com a *Spirodella*, essas foram classificadas em um novo gênero *Landoltia*, homenageando o estudioso a nível mundial de lemnas Elias Landolt. A classificação taxonômica da espécie de estudo é descrita por:

Reino: *Plantae*

Divisão: *Angiospermae*

Classe: *Monocotyledoneae*

Ordem: *Arales*

Família: *Araceae (Lemnaceae)*

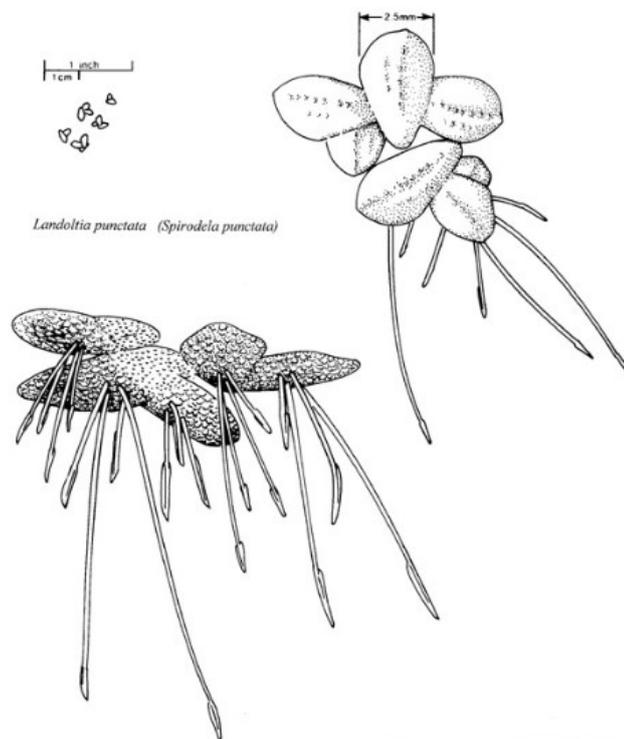
Sub-família: *Lemnoideae*

Gênero: *Landoltia*

Espécie: *Landoltia punctata*

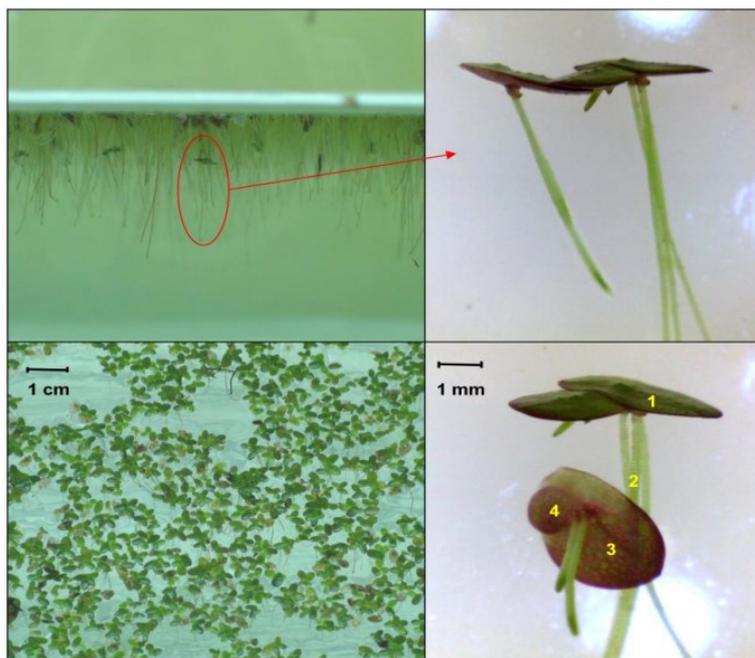
Essas macrófitas caracterizam-se por serem pequenas plantas flutuantes compostas de frondes individuais que produzem raízes finas (FigurasFigura 7 eFigura 8). As frondes não são folhas, mas sim uma forma reduzida de tronco ou broto (LES; CRAWNFORD, 1999). As macrófitas lemnáceas tem a estrutura das frondes maduras de 2 a 1,5 vezes mais longas do que larga e a medida de largura está entre 1 e 5 mm, com coloração verde intenso. O número de raízes é de 2 a 4 podendo variar até no máximo sete (FigurasFigura 7 eFigura 8).

Figura 7: Estrutura das frondes e raiz das macrófitas da espécie *Landoltia punctata*.



Fonte: Wunderlin, (2003).

Figura 8: Imagem da macrófita da espécie *Landoltia punctata*.



Fonte: Mohedano, (2010). Legenda: 1-fronde; 2-raízes; 3-vista inferior da fronde; 4-fronde filha.

Essa espécie de macrófita se reproduz principalmente através do brotamento vegetativo de duas frondes filhas na base da fronde. As frondes filhas geralmente ficam presas às frondes mãe por um estipe curto, de maneira que as plantas geralmente aparecem como um agrupamento de várias frondes. A *Landoltia punctata* ocasionalmente se reproduz sexualmente, por semente (POTT; POTT, 2002).

Ainda se diferencia das demais espécies por possuir os bordos da fronde geralmente arroxeados (POTT; POTT, 2002). Essa espécie já é encontrada na Mata Atlântica ocorrendo desde o Rio de Janeiro até Santa Catarina (POTT; POTT, 2002).

Suas características favorecem seu uso como modelo biológico em ensaios de toxicidade.

2.3.4.3 Características que favorecem seu uso como organismo-teste

As características físicas e morfológicas das lemnas favorecem seu uso na avaliação de bioensaios sob condições espaciais limitadas e em curto espaço de tempo, o que a qualifica como um modelo de organismo de laboratório (FORNI; TOMMASI, 2016). Drost, Matzke, Backhaus, 2006; afirmam que as lemnas são uma espécie atrativa como modelo toxicológico, não somente por suas importantes funções ecológicas, mas também por suas características de fácil manuseio, elevada taxa de crescimento em condições de laboratório e sensibilidade a

diferentes poluentes. Ademais pela facilidade de cultivo são preferencialmente utilizadas em testes de toxicidade (SHI et al., 2011).

Esses organismos são potencialmente adequados no uso de ensaios toxicológicos de poluição do ambiente aquático por herbicidas, poluição em geral de rios e lagos, toxicidade de sedimentos e similares, principalmente para a ecotoxicidade de xenobióticos (WANG, 1990; ALIFERIS et al., 2009). Já sendo foco de normatização em diversos países pelo mundo (AFNOR, 1996; APHA, 1992; ASTM, 1991; ISO/DIS 20079, 2005; OECD, 2002; SIS, 1995) apesar de no Brasil ainda não ser consolidada.

Ademais, as plantas são um importante modelo toxicológico por representarem a base da cadeia alimentar (produtores) (LALAU, 2014). Característica essa que possibilita demonstrar a toxicidade da substância e, ainda, reproduzir possíveis riscos ao ecossistema pela bioamplificação dos seus efeitos (MARTINS, 2014).

Cox et al., (2016) salienta que, devido sua elevada toxicidade, uma maior atenção deve ser direcionada aos efeitos das NPAG sobre as plantas e o meio ambiente propiciando um melhor entendimento dos reais efeitos sobre os ecossistemas. Diversos estudos voltados a avaliação toxicológica; em geral tendo como parâmetros de observação a taxa de crescimento, formação de espécies reativas de oxigênio e alterações no fotossistema II; da exposição das lemnas as NPAG já vem sendo desenvolvidos (DEWEZ et al., 2018; GUBBINS; BATTY; LEAD et al., 2011; MINOGIANNIS et al., 2019; OUKARROM et al., 2013; PEREIRA et al., 2018; PERREAULT et al., 2010; RADIC et al., 2019; UÇUNCU et al., 2014; VARGA et al., 2019; ZOU et al., 2016). Pereira et al., (2018), por exemplo, observou efeitos significativos na taxa de crescimento das *L. minor* a concentrações de NPAG de mostrando efeitos significativos até 0,05 mg.L⁻¹. Já Dewez et al., (2018), concluíram que as NPAG induzem a inibição dos processos fotossintéticos na *L. gibba* por provocar alterações no fotossistema desses organismos.

Apesar dessas análises referentes aos efeitos das NPAG avançarem nos últimos anos, ainda existem lacunas concernentes aos danos a nível intracelular e metabólico que resultam em alterações na taxa de crescimento desses organismos, bem como, os efeitos na espécie *Landoltia punctata*. Essas informações são fundamentais na avaliação dos riscos ao ecossistema local, uma vez que, as lemnas são organismos com capacidade de acumular metais (VERMA; SUTHAR, 2015), podendo conduzir esse material ao longo da teia trófica.

2.4 BIOACUMULAÇÃO DE ÍONS METÁLICOS

A capacidade dos organismos em integrar variações das concentrações de poluentes ao longo do tempo conceitua-se em bioacumulação (TREVIZANI, 2014). Sendo essa o resultado do balanço de três mecanismos: taxa de entrada pela dieta, taxa de entrada por formas diversas e taxa de perdas pelo organismo (LUOMA; RAINBOW, 2005). Uma das consequências decorrentes do processo anteriormente mencionado é a acumulação de uma substância específica em toda a extensão da cadeia alimentar através da alimentação (biomplificação) (JONES et al., 2004). Ainda, Ratte, (1999) define bioacumulação como a absorção de substâncias através das superfícies corporais (bioconcentração) e através da absorção de alimentos (biomagnificação).

NP metálicas quando em suspensão, devido a processos químicos liberam íons; esta liberação não ocorre apenas se forem compostos totalmente insolúveis (CHERNOUSOVA; EPPLE, 2012). Este fator pode vir a influenciar no grau de toxicidade das NP. Estudos demonstraram que organismos expostos a suspensões de NP podem sofrer a ação tóxica devido ao aumento de íons do metal existentes nessas amostras (KITTLER et al., 2010; LALAU et al., 2015).

Conforme Rossetto, (2016), os íons de cobre dispersos nas suspensões de NPCuO, por exemplo, podem induzir o aumento de espécies reativas de oxigênio, podem inativar proteínas funcionais e perturbar a homeostase celular.

Tratando-se de NPAg, é observado que o efeito biocida é proporcional à concentração de íons de Ag⁺ que são liberados quando ela se encontra em suspensão (GARCIA, 2011). Dessa maneira, quanto maior a concentração desses íons, maior o efeito antimicrobiano da suspensão (SCHIERHOLZ et al, 1999).

Ainda conforme Baker et al., (2005), à medida que o diâmetro da NP de prata diminui sua toxicidade aumenta. Isso porque essas NP terem maior superfície de liberação de íons Ag⁺ e maior facilidade de passagem através dos poros de membranas de células (PAL; TAK; SONG, 2007).

Há estudos que atribuem a toxicidade proveniente das NPAg aos íons liberados nas suspensões (NAVARRO et al., 2008; XIU et al., 2012). Em seu estudo, Navarro et al. (2008), por exemplo, verificaram efeitos tóxicos de íons Ag⁺ em algas expostas a diferentes concentrações de NPAg assim como a bioacumulação desses íons pelas algas expostas a suspensão.

As plantas são um componente básico essencial de todos os ecossistemas e possuem um papel fundamental no destino e no transporte das NP Ag no ambiente através da absorção e bioacumulação (MONICA; CREMONINI, 2009). Premissa essa que reforça a necessidade de uma melhor compreensão da magnitude dos efeitos tóxicos proporcionados por essas suspensões a partir de avaliações dos efeitos, em especial, a nível intracelular. Isso por as células serem estruturas fortemente atuantes na dinâmica dos processos vitais dos organismos.

2.5 ULTRAESTRUTURAS DE CÉLULAS VEGETAIS

Ultraestruturas tratam-se do detalhamento geral de uma estrutura biológica como órgão, tecido ou célula que possa ser visualizado com técnicas de microscopia eletrônica (PARFREY et al., 2006).

Considerando aspectos toxicológicos, dependendo do grau tóxico da substância, essa poderá vir a alterar ou provocar danos nessas ultraestruturas. Esses danos podem ocasionar alterações no metabolismo e até mesmo morte do organismo quando em grandes proporções como demonstrado nos estudos de Costa, (2014); Costa et al., (2015); Schmidt et al., (2009); Simioni et al., (2014).

Schmidt et al., (2009), por exemplo, verificou em seus estudos que a exposição da macroalga *Kappaphycus alvarezii* a radiação ultravioleta B ocasionou alterações na ultraestrutura das células corticais e subcorticais sendo essas: aumento no número de plastoglobulos e parede celular, destruição da organização interna dos cloroplastos, alteração do contorno das células, diminuição no número de grãos de amido. O que veio a afetar a atividade fotossintética e o desenvolvimento do organismo.

Estudos já demonstram que a exposição de organismos a suspensões de NP também causa danos ultraestruturais (GOMES et al., 2007; ORIS, 2010; SANTO et al., 2014; YANG; EDELMANN). Alguns estudos ainda se remetem a danos em nível de ultraestrutura em organismos vegetais (LALAU et al., 2015; HONG et al., 2014; QIAN et al., 2013; SERVIN et al., 2012).

Já Lalau et al, (2015), verificou através de análises microscópicas alterações na ultraestrutura provenientes da exposição da macrófita da espécie *Landoltia punctata* as nanopartículas de óxido de cobre (NPCuO) sendo essas: diminuição dos grãos de amido, aumento do número de plastoglobulos, dilatação dos cloroplastos, desorganização dos

cloroplastos e danos nas mitocôndrias. Essas alterações provocaram alterações na taxa de crescimento da planta e morte quando exposta a concentração mais alta da suspensão de NPCuO.

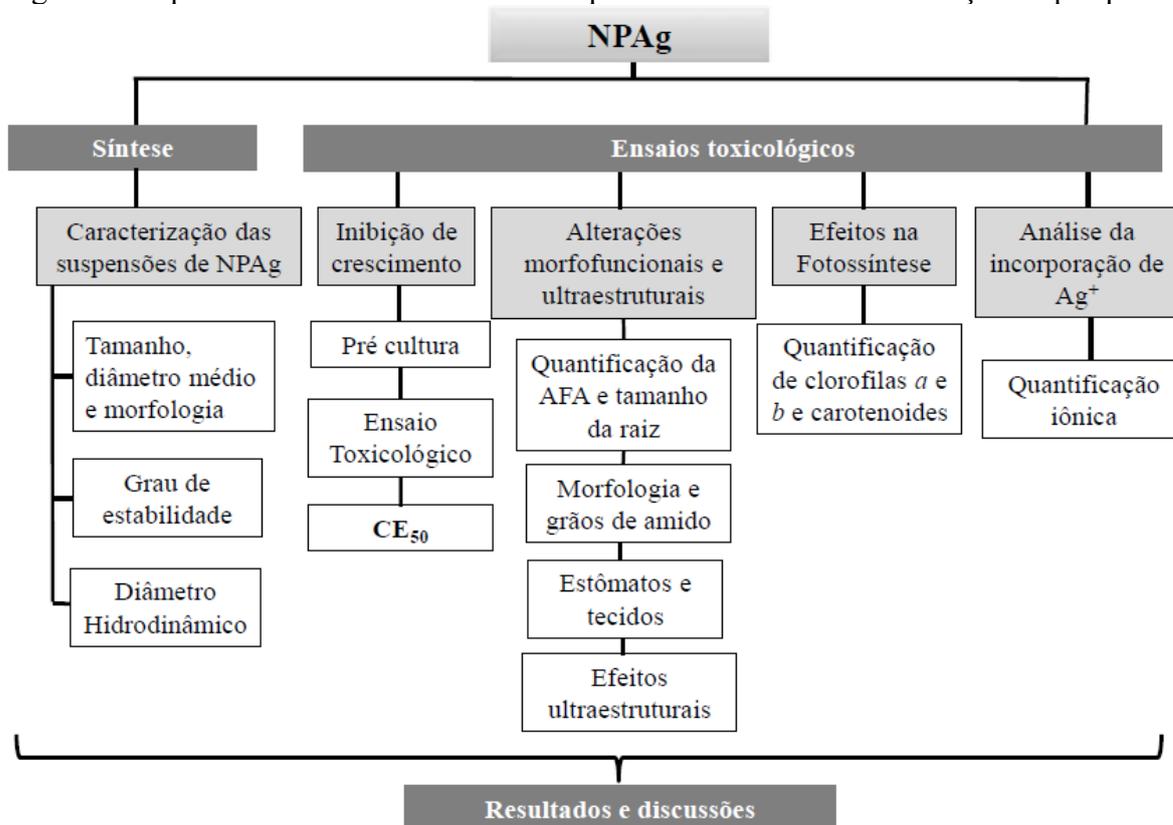
Embora as NP possam penetrar nas células pelos poros da parede celular e pelo processo de permeabilidade seletiva da membrana, não se pode descartar os efeitos provenientes dos íons liberados pela NP quando em suspensão. Portanto, o estudo das alterações em seu crescimento, bem como, bioacumulação desses íons nos organismos é fundamental para uma melhor compreensão dos mecanismos de ação tóxica dessas suspensões.

3 METODOLOGIA

Conforme a normatização ISO/DIS 20079 os efeitos sobre o organismo se caracterizam como tóxicos quando observados efeitos de inibição de crescimento, bem como, danos de clorose e necrose. No presente estudo análises mais aprofundadas foram realizadas a fim de observar se os danos oriundos da exposição à NPAg poderiam se originar de possíveis efeitos ultraestruturais e na atividade fotossintética da planta. As análises supracitadas foram realizadas com o intuito de se obter uma melhor compreensão desses efeitos tóxicos. Efeitos esses direcionados tanto aos fatores que podem ter induzido a inibição de crescimento (tal como efeitos estruturais e ultraestruturais) quanto à perda de coloração da planta (através da avaliação dos pigmentos atuantes na atividade fotossintética).

De maneira a proporcionar um melhor entendimento sobre os procedimentos desenvolvidos para o alcance dos objetivos da presente pesquisa a metodologia seguiu as etapas apresentadas na Figura 9.

Figura 9: Esquema ilustrativo referente às etapas desenvolvidas na elaboração da pesquisa.



Fonte: A autora, (2020).

O desenvolvimento das etapas iniciou-se com os procedimentos de síntese e caracterização das suspensões de NPAg.

3.1 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS DE PRATA

O procedimento de síntese das NPAg foi realizado no Laboratório de Toxicologia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (LABTOX – ENS – UFSC). A metodologia seguiu os procedimentos descritos por Lee; Meisel (1982); a qual se utilizou o borohidreto de sódio (NaBH_4) e o PVA [poliacetato de vinila – $(\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2)_n$] como agente redutor e estabilizante, respectivamente. O agente estabilizante foi utilizado com o intuito de se obter uma solução coloidal estável, já que a NPAg tem como característica limitadora a imediata agregação. Dessa maneira, o estabilizante ao se adsorver sobre a superfície das NP formadas, resultou em uma camada que impediu sua rápida coalescência. A reação para a preparação de NPAg foi desenvolvida a partir da síntese química de redução do nitrato de prata (AgNO_3) com o borohidreto de sódio na presença do agente estabilizante (PVA), conforme o exposto na Equação 1.



O método iniciou com a solubilização de 2% em massa de PVA em água de osmose reversa (AOR) sob agitação e aquecimento ($100\text{ }^\circ\text{C}$) até solubilizar. Posteriormente, a solução de PVA foi mantida sob refrigeração até atingir a temperatura de $4\text{ }^\circ\text{C}$. Paralelamente, foram resfriados 500 mL de AOR e, na sequência, a solução de PVA e a água resfriada foram misturados em um único frasco sob agitação em um banho de gelo. A este frasco foi adicionado 25 mL da solução de borohidreto (0,009 g; 0,238 mmol). Nesta etapa, a temperatura da mistura foi monitorada até estabilizar a $3\text{ }^\circ\text{C}$. Então, 25 mL da solução de nitrato de prata (0,02 g; 0,12 mmol) foram adicionados, gota a gota (1 gota/s), na mistura resfriada. Por fim, o meio reacional foi mantido sob agitação durante 5 min para completa homogeneização e armazenado na geladeira. Essa suspensão de NP obtida na síntese foi diluída e armazenada a temperatura de $4\text{ }^\circ\text{C}$.

As concentrações das suspensões de NP para a realização do teste foram selecionadas com base na faixa de valores encontrados em bibliografias (Tabela 1) que trabalharam com a toxicidade de NPAg sobre macrófitas lemnáceas. O estudo prévio foi realizado com o intuito

de selecionar faixas de valores de concentrações, em que o valor de CE_{50} fosse mais facilmente encontrado.

Como as espécies utilizadas nas bibliografias revisadas eram diferentes da espécie de lemna da presente pesquisa (*Landoltia punctata*), a realização de ensaios prévios foi necessária para encontrar com precisão a faixa de valores de concentrações em que fosse obtido a CE_{50} da espécie em questão. Dessa forma, as concentrações selecionadas para o presente estudo foram 0,16; 0,32; 0,64; 1,28; 2,56; 5,12 e 10,24 $mg.L^{-1}$.

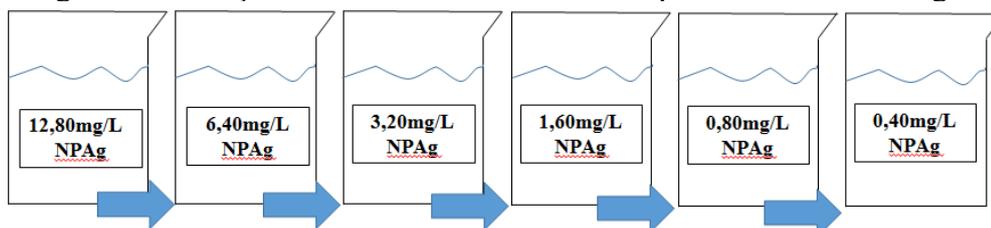
Tabela 1 – Valores de concentrações de suspensões de NPAg que se mostraram tóxicas a diferentes espécies de macrófitas lemnáceas.

Espécie de macrófita lemnácea	Referência	Faixa de concentrações de NPAg utilizadas
<i>Lemna minor</i>	GUBBINS; BATTY; LEAD et al., 2011	0, 5, 10, 20, 40, 80 e 160 $\mu g.L^{-1}$
<i>Lemna minor</i>	UÇUNCU et al., 2014	0, 8, 16, 32, 96 e 128 $\mu g.L^{-1}$
<i>Wolffia globosa</i>	ZOU et al., 2016	0, 1, 2, 5, 8 e 10 $mg.L^{-1}$
<i>Lemna minor</i>	PEREIRA et al., 2018	0.05–2 $mg.L^{-1}$

Fonte: Autora, (2020).

O procedimento de diluição consistiu, primeiramente, na obtenção de suspensões com fator de diluição igual a 2 a partir de uma solução mãe de NP com concentração igual a 12,80 $mg.L^{-1}$ (Figura 10).

Figura 10: Diluições elaboradas imediatamente após a síntese da NPAg.



Fonte: Autora, (2020).

A partir dessas diluições foram então elaboradas as concentrações selecionadas para o presente estudo e utilizadas nos ensaios (0,16; 0,32; 0,64; 1,28; 2,56; 5,12 e 10,24 $mg.L^{-1}$).

3.1.1 Caracterização da nanopartícula de prata

Para uma melhor compreensão do comportamento físico-químico resultante da interação entre as NPAg e o meio de cultura (SIS), utilizado para o cultivo da macrófita, foi necessário o procedimento de caracterização da amostra. O procedimento foi importante na avaliação e observação do tamanho da NP e dos possíveis aglomerados formados, uma vez que, as características de morfologia, estado de aglomeração e estabilidade podem influenciar no nível de toxicidade. Para a avaliação dos parâmetros supracitados foram desenvolvidas técnicas para a caracterização através de:

- Observação dos aglomerados, tamanho e diâmetro médio das suspensões de NPAg por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET);
- Análise da estabilidade das suspensões de NPAg pela verificação do potencial Zeta através do equipamento *Zetasizer Nano ZS*;
- Apreciação do diâmetro efetivo através da técnica de espalhamento de luz dinâmica.

Os procedimentos seguiram os requisitos padronizados pela normatização ISO/TR 13014:2012. Todas essas análises foram realizadas utilizando uma suspensão com concentração de $2,56 \text{ mg.L}^{-1}$, isso por motivo de ser uma concentração intermediária do teste de toxicidade. Essa concentração também propiciou uma melhor visualização da NP através do microscópio. Isso porque em altas concentrações a grade de carbono absorvia excesso de PVA da amostra dificultando a sua observação e em baixas concentrações as NPAg ficavam muito dispersas impossibilitando sua identificação quando observadas.

3.1.1.1 Análise do tamanho, diâmetro médio e morfologia preferencial

Imagens de microscopia eletrônica de transmissão (JEM-1011 MET – 100KV) foram registradas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC (Figura 11). A análise teve como intuito a observação do tamanho dos aglomerados, diâmetro médio e a morfologia preferencial das NPAg sintetizadas.

Figura 11: Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEM-1011 MET – 100KV).



Fonte: PROPESQ/UFSC, (2020).

O preparo da amostra para a microscopia contou com o gotejamento da suspensão de NPAg sobre uma grade de cobre (*Grid*) com filme de carbono (malha de 300 *meshs*) imediatamente após sua síntese. As grades passaram pelo processo de secagem com o uso de um dissecador a vácuo permanecendo por um período de 24 horas à temperatura ambiente. A medição dos diâmetros dos aglomerados de NPAg nas soluções foi realizada com o uso do *plugin software* ImageJ (1.52a; Java 1.8.0).

3.1.1.2 Grau de estabilidade das suspensões

A estabilidade da suspensão de NPAg foi avaliada através da análise de espalhamento de luz (PALS) o uso do equipamento *Zetasizer Nano ZS* (Brookhaven, 90 PLUS-PALS) localizado no Laboratório de toxicologia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (LABTOX/UFSC) (Figura 12). Para mensurar o potencial Zeta (PZ), foram utilizadas duas suspensões de NP: uma com a NPAg diluída em solução-teste (meio de cultura SIS) e a segunda com NPAg diluída somente em AOR.

Figura 12: Equipamento *Zetasizer Nano ZS* (Brookhaven, 90 PLUS-PALS).



Autora, (2020).

As análises foram realizadas imediatamente após a síntese da NPAg para uma maior confiabilidade dos resultados. Realizaram-se três leituras pelo equipamento e o resultado do potencial Zeta foi obtido pelo valor da média dos resultados. A análise foi realizada com o intuito de avaliar a estabilidade das suspensões.

3.1.1.3 Diâmetro efetivo

O diâmetro efetivo (DE), que corresponde ao diâmetro da NP em suspensão, foi avaliado através da técnica de espalhamento de luz dinâmica *Dynamic light scattering* (DLS). A referida verificação contou com o uso do equipamento *Zetasizer Nano ZS* (Brookhaven, 90 PLUS-PALS) localizado no LABTOX na UFSC.

Conforme a metodologia anteriormente descrita, foram analisadas as mesmas amostras submetidas a análise do potencial Zeta, já que o equipamento de análise era o mesmo. Os resultados também foram obtidos do valor da média de três leituras. O objetivo da análise foi de observar o diâmetro efetivo das suspensões com o intuito de verificar possível tendência à agregação e sedimentação das NP dispersas no meio.

3.2 INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO

No presente estudo a análise de inibição de crescimento seguiu os protocolos das normatizações ISO/DIS 20079, (2005) e da OECD, (2002), cujo parâmetro de observação

baseia-se na taxa de crescimento. Para tanto a metodologia foi realizada conforme as etapas posteriormente descritas.

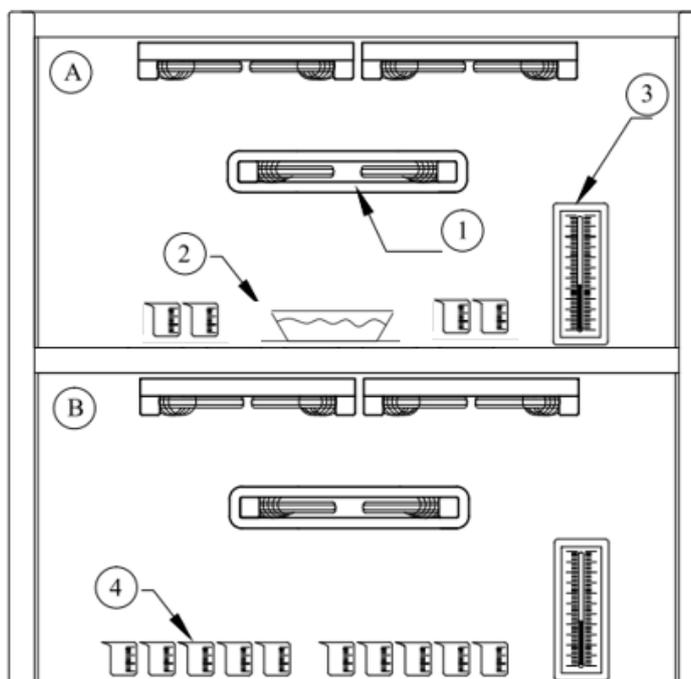
3.2.1 Pré-cultura

A pré-cultura trata-se da adaptação do organismo às condições de teste (temperatura e luminosidade), bem como seu desenvolvimento antes de ser exposto a substância tóxica.

A inserção da pré-cultura consistiu da coleta da espécie de lemna *Landoltia punctata* do ambiente natural e posterior adaptação às condições de laboratório conforme normatização (ISO/DIS 20079, 2005). Essas condições consistiram em uma luminosidade de 8.800 lux (fotoperíodo 16 h luz; 8 h escuro), temperatura de $25^{\circ}\pm 2$ e pH do meio de cultura SIS no valor de 6,5. A pré-cultura, bem como os testes, foram desenvolvidos nas instalações do LABTOX localizado na UFSC. Para a obtenção das condições requeridas pela normatização ISO/DIS 20079 foram utilizadas seis lâmpadas fluorescentes de 25 Watts, paredes laterais de cor prata e um termômetro para regulagem da temperatura (Figura 13).

As macrófitas lemnáceas foram mantidas em frascos de vidro (Beckers) de 50mL contendo o meio de cultura SIS. Essa solução foi elaborada com a dissolução dos sais (APÊNDICE A) em AOR seguindo a normatização utilizada no presente estudo. Após a inserção e estabelecimento da pré-cultura prosseguiu-se com o ensaio de toxicidade proposto para esta pesquisa.

Figura 13: Estrutura piloto montada para o desenvolvimento da cultura e realização de testes com as lemnas.



Fonte: Autora, (2020). Legenda: A) – Local de cultivo das lemnas, B) – Local de desenvolvimento dos testes de toxicidade, 1) Lâmpadas incandescentes de 25 Watts, 2) Recipientes para alocação das lemnas durante o cultivo, 3) Termômetro para controle da temperatura, 4) Bécker para alocação das lemnas durante o teste.

3.2.2 Ensaio toxicológico

De maneira a avaliar os efeitos tóxicos das NPAg utilizaram-se os procedimentos constantes na ISO/DIS 20079, (2005) e OECD, (2002). O ensaio constitui-se na exposição do organismo-teste às concentrações 0 (controle); 0,16; 0,32; 0,64; 1,28; 2,56; 5,12 e 10,24 mg.L⁻¹ que partiram de uma solução mãe de 12,80 mg.L⁻¹ da NPAg.

Não foi realizado um teste com um controle positivo haja vista que os reagentes utilizados, nas concentrações utilizadas no presente estudo, não são tóxicos para esse organismo (ECB, 2005; SCHREINER; REED, 1908; STUMPE, 1960; WONG; PARASRAMPURIA, 1996).

Os testes desenvolvidos tiveram como intuito possibilitar um melhor entendimento dos efeitos observados através da estimativa da CE₅₀, sendo o parâmetro de observação avaliado através da inibição de crescimento das frondes da macrófita.

Durante o ensaio com a NPAg, o organismo permaneceu exposto à substância de NP por um período total de sete dias. Cada amostra foi replicada seis vezes para a obtenção de resultados representativos e com confiabilidade estatística. Em cada uma das amostras foram inseridos um total de 10 frondes saudáveis da espécie *L. punctata* formado de colônias de 2 e 3

frondes. Os frascos contendo o organismo foram dispostos no local de teste de maneira randômica (Figura 14). Após o término do período de teste foi quantificado e registrado o número de frondes em cada uma das amostras para posterior cálculo da taxa de inibição de crescimento.

Figura 14: Representação das unidades experimentais utilizadas para procedimento de ensaio de toxicidade com lemnas.



Fonte: Autora, (2020).

3.2.2.1 Taxa de crescimento e valores de inibição

A determinação desse parâmetro segundo a normatização ISO/DIS 20079, (2005) pode ser tanto com base na observação do crescimento das frondes quanto na análise dos pesos seco e úmido. No presente estudo a determinação da taxa de crescimento e valores de inibição foi realizada com base no parâmetro de crescimento das frondes.

Dessa forma, em posse dos valores dos parâmetros de crescimento (valores esses obtidos no início e no final do teste), foi calculada a taxa de crescimento (r) posterior ao período de exposição, através dos procedimentos recomendados pela normatização da ISO/DIS 20079 (2005) (Equação 2).

$$r = \frac{\ln x_{t_2} - \ln x_{t_1}}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

Onde:

r = Taxa de crescimento;

t_1 = Tempo do início do teste;

t_2 = Tempo de fim do teste;

x_{t1} = Número de frondes do início do teste;

x_{t2} = Número de frondes ao fim do teste.

Sendo que a taxa de crescimento foi estimada para cada uma das replicações das amostras controle e tratamentos separadamente. Ao final o percentual de inibição da taxa de crescimento (I) dos grupos controle e tratamento foi estimado através da Equação 3.

$$I = \frac{(\mu_c - \mu_T)}{\mu_c} \times 100 \quad (3)$$

Onde:

I = Percentual de inibição de crescimento;

μ_c = Valor significativo de μ no controle;

μ_T = Valor significativo de μ no grupo tratamento.

Com os resultados foram elaborados os gráficos que apresentaram as curvas da concentração resposta para a obtenção da CE_{50} .

3.2.3 Estimativa do CE_{50}

Os valores de CE_{50} foram estimados através do método de regressão linear das curvas de concentração-resposta construídas com os dados de crescimento, conforme o recomendado pela normatização ISO/DIS 20079, (2005).

Os erros indicados foram erros padrão da média ou percentagem do intervalo de confiança (nível 95%). Os dados encontrados foram tratados estatisticamente para maior confiabilidade dos resultados.

3.2.3.1 Análise estatística dos dados

De maneira a dispor uma maior confiabilidade dos resultados, os dados foram submetidos a tratamento estatístico.

Os experimentos foram realizados com um total de seis réplicas para todas as amostras. As médias e os desvios padrão foram estimados para cada um dos parâmetros das amostras (taxa de crescimento e taxa de inibição de crescimento). As diferenças significativas foram

determinadas com o uso da análise de variância de acordo com diferenças significativas do teste de Tukey Highly ($p < 0,05$) sendo a análise comparativa entre os tratamentos e controle realizada com o uso do teste ANOVA *one way* ($p < 0,05$). O procedimento foi realizado com o uso do software *Statistica* (2016).

3.3 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS E ULTRAESTRUTURAIS

Em plantas os danos estruturais e ultraestruturais configuram possíveis interferências no metabolismo fotossintético da planta (LALAU et al. 2015; 2020). Como o crescimento da planta está atrelado a sua capacidade metabólica, a análise desses parâmetros morfológicos é de fundamental importância para a compreensão da toxicidade e seu mecanismo de ação. Dessa maneira após a estimativa do valor de CE_{50} realizou-se um novo ensaio com a exposição das lemnas a suspensão controle e a suspensão com a concentração CE_{50} . Após o período do teste as amostras de lemnas foram coletadas e submetidas a análises microscópicas.

3.3.1 Avaliação da área fotossinteticamente ativa e tamanho da raiz

A área fotossinteticamente ativa (AFA) está relacionada com a porção verde da planta (HOLBEN et al, 1980) enquanto a clorose é caracterizada pela perda de pigmentação (amarelamento da fronde) (ISO/DIS 20079, 2005). Dessa maneira, no presente trabalho optou-se em observar essas alterações, através de registro pelo estereomicroscópio (lupa), e posterior medição das AFA e das raízes através do *software* ImageJ.

Para tanto, das amostras submetidas ao teste foram selecionadas as que apresentaram características mais semelhantes entre si ($n=8$). Essas foram posteriormente lavadas com AOR e alocadas individualmente em placas de Petri para posterior visualização e registro das imagens no estereomicroscópio (Lupa Olympus SZX16).

Com base nas imagens obtidas a AFA e o tamanho da raiz foram mensurados através do *software* ImageJ (1.52a; Java 1.8.0). Os resultados do AFA foram apresentados através da relação entre a área fotossinteticamente ativa e a área total da planta.

3.3.2 Análise dos grãos de amido e compostos fenólicos

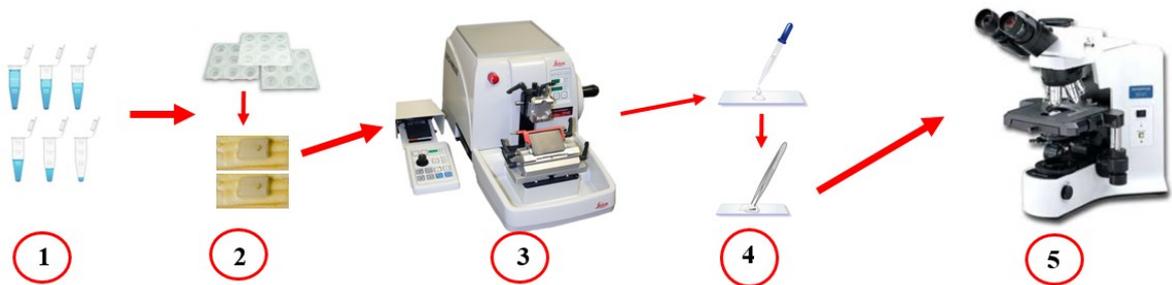
Com o objetivo de verificar possíveis alterações decorrentes do *stress* da exposição das plantas as NPAg, foram avaliados o conteúdo de grão de amido e compostos fenólicos nas amostras. Essas foram realizadas por métodos de microscopia de luz. Sendo essa verificação realizada por motivo dessas alterações poderem estar relacionadas a alterações na atividade fotossintética da planta (LALAU et al., 2015; 2020).

O desenvolvimento das análises citoquímicas e morfológicas contou com o procedimento de corte das frondes das amostras controle e CE₅₀ em fragmentos de aproximadamente 5mm. As amostras então foram fixadas em uma solução de paraformaldeído 2.5% em tampão fosfato 0.1M, pH 7.2, por 24 horas (SCHMIDT et al., 2009). Depois de fixadas as amostras foram lavadas duas vezes com tampão fosfato, sob temperatura ambiente, por um período de 10 minutos (BOUZON, 1993).

Posteriormente as amostras passaram por um processo de desidratação em série de concentrações crescentes de etanol (30, 50, 70, 90, 100%) (Figura 15-1). A infiltração preliminar do material foi realizada com historesina glicolmetacrilato (GMA) e etanol 100% na proporção 1:1 e então foi infiltrada em resina pura (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha) (Figura 15-2).

Após o processo de polimerização as amostras foram seccionadas em um micrótomo manual de parafina (Leica RM 2135), sendo que os cortes foram realizados com navalha de tungstênio resultando em uma espessura de 5 μ m (Figura 15-3). Os cortes resultantes foram corados com diferentes testes citoquímicos (citados a seguir) (Figura 15-4) e observados com auxílio de um microscópio Epifluorescent (Olympus BX 41) (Figura 15-5). Sendo esse equipado com o sistema de captura de imagem Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, EUA).

Figura 15: Processo de emblocamento da amostra, e teste citoquímico com corante, para posterior seccionamento e visualização registro de imagem por microscopia de luz.



Fonte: Autora, (2020).

3.3.2.1 Testes citoquímicos

Os testes citoquímicos foram realizados a fim de observar os grãos de amido e a formação de compostos fenólicos no interior do tecido do organismo. As amostras controle e CE50 foram submetidas aos seguintes testes citoquímicos: Ácido Periódico de Schiff (PAS) com o objetivo de identificar a presença de polissacarídeos neutros (amido e celulose) (GAHAN, 1984). Azul de toluidina (AT-O) 0,05%, com o pH 6,5, para identificar polissacarídeos ácidos através da reação metacromática (GORDON; McCCANDLES, 1973; McCULLY, 1970).

Os materiais corados foram analisados e fotografados com o uso do microscópio de luz Epifluorescente (Olympus BX 41).

3.3.3 Efeitos ultraestruturais

O estudo dos efeitos em nível de ultraestrutura foi realizado através da observação dos danos provocados em estruturas e organelas celulares, bem como internalização das NPAg, através da observação de imagens obtidas das análises microscópicas. A análise foi realizada a fim de se obter uma melhor compreensão dos possíveis mecanismos de ação que levaram a inibição do crescimento da planta, ademais, os impactos da incorporação desse material no interior da planta.

Para a análise por MET as amostras de macrófitas expostas a solução controle e CE₅₀, com aproximadamente 5mm de espessura, foram fixadas em uma solução de glutaraldeído 2.5%, sacarose 2.0%, tamponadas com cacodilato 0.1 M (pH 7.2), pós fixadas em 1% tetróxido

de ósmio por 4 horas e desidratadas em uma série de concentrações crescentes de acetona (SCHMIDT et al., 2009).

Após a desidratação o material foi infiltrado em resina Spurr (SPURR, 1969). Posteriormente, os cortes ultrafinos foram feitos com navalha de diamante em ultramicrotomo para tecidos biológicos (Power Tone XL / RMC e EM UC 7 / LEICA) e, posteriormente, contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo conforme os procedimentos descritos por Reynolds (1963).

As amostras foram analisadas e registradas através de fotos em um microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol (JEM) 1011 (JEOL Ltda., Tóquio, Japão, a 80kV), pertencente ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

3.3.4 Análise dos estômatos e tecidos

No metabolismo da planta o fechamento dos estômatos pode ser indicativo de alterações ou danos na atividade fotossintética das plantas (COSTA et al., 2007). Nessa perspectiva, para o presente estudo essa avaliação foi essencial para uma melhor compreensão dos efeitos adversos das NPAg sobre as lemnas, assim como as alterações nos tecidos provocadas do contato direto com a suspensão de NPAg.

Para a análise das amostras controle e CE₅₀, por microscopia eletrônica de varredura (MEV), as mesmas foram processadas e fixadas com a mesma metodologia utilizada para análise por MET. Contudo a desidratação foi realizada em séries etanólicas (30, 50, 70, 90, 100%) e secas em ponto crítico EM-CPD-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha).

Após, as amostras foram colocadas em suportes metálicos (*stubs*) e recobertos com uma camada ultrafina de ouro (Metalizador Blatec, CED 030) e posteriormente observadas e as imagens capturadas no MEV JEOL 6390 LV (JEOL Ltda, Tokio, Japão, a 20kV) localizado no LCME – UFSC.

Através das imagens coletadas verificou-se o nível de abertura dos estômatos das amostras CE₅₀, comparando com a amostra controle, bem como, a rugosidade dos tecidos na parte abaxial da fronde região essa diretamente em contato com a suspensão de NPAg.

3.4 EFEITOS NA FOTOSSÍNTESE

A clorofila *a* e os pigmentos fotossintéticos são parâmetros importantes para avaliar o desempenho da fotossíntese, em termos de captação de energia luminosa, de plantas sob *stress* abiótico e monitorar seu desenvolvimento (LALAU et al., 2015; SHU et al., 2013). Dessa forma, a análise foi realizada nesta pesquisa para avaliar o dano fotossintético com base nestes indicadores. O procedimento de quantificação consistiu na extração de clorofila *a*, *b* e clorofila total (HISCOX; ISRAELSTAM, 1979). Essa avaliação foi realizada para observação da ocorrência de efeitos na fotossíntese da planta, uma vez que os pigmentos fotossintéticos de clorofila *a* e *b* e carotenóides são componentes diretamente relacionados com a atividade fotossintética da planta.

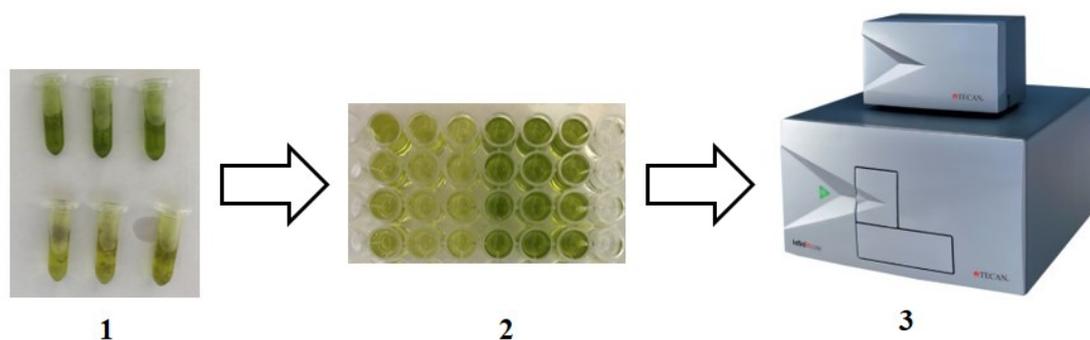
3.4.1 Quantificação de clorofilas *a* e *b* e carotenoides

Para a análise em questão a clorofila *a*, *b* e total, foram extraídas de aproximadamente 0,500 g de peso úmido (8 amostras) em 3 mL de dimetilsulfoxido a temperatura de 40°C durante 30 minutos com o uso de um homogeneizador de tecido de vidro (imagem 1 da Figura 16) (HISCOX; ISRAELSTAM 1979; SCHMIDT et al. 2011). Sendo que o procedimento foi realizado uma vez para a amostra da planta exposta a suspensão controle e outra vez para a CE₅₀. O cálculo e quantificação dos pigmentos foram realizados espectrofotometricamente de acordo com Wellburn (1994).

Os carotenoides totais foram extraídos por extração exaustiva de 0,500 g de peso úmido de 8 amostras controle e 8 CE₅₀ inseridas em 3 mL de metanol puro. O extrato metanólico bruto foi evaporado a fim de concentrar os extratos. A absorvância específica foi determinada com uma microplaca espectrométrica Tecan (imagens 2 e 3 da Figura 16) (Infinite® M200 PRO, Männedorf, Switzerland) a 450 nm. A concentração total de carotenoides foi calculada com base na norma da curva β -carotene ($1 - 300 \mu\text{g mL}^{-1}$; $y = 0,00365x$; $r^2 = 0,999$) (SCHMIDT, 2011).

Através dos resultados dos valores de pigmentos encontrados, as concentrações da amostra CE₅₀ foram comparadas com as da amostra controle. O procedimento possibilitou visualizar a ocorrência de inibição da concentração desses parâmetros na amostra CE₅₀.

Figura 16: Processo de extração de clorofila e carotenoides.



Fonte: Autora, (2020).

3.5 ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO DE ÍONS DE PRATA

Com o intuito de avaliar a absorção de prata pelas *L. punctata* durante os testes, bem como a acumulação de prata, foram realizadas análises de quantificação desse metal nas amostras de lemnas submetidas a todas as concentrações das suspensões de NPAg utilizadas no teste.

Para tanto as amostras foram lavadas com lavadas três vezes com 10 mM de EDTA e secas a temperatura de 100 °C *overnight* e posteriormente digeridas com ácido nítrico (HNO₃) (LABSYNT Ltd., Diadema, Brazil) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) com o uso de micro-ondas digestor (Milestone, model MLS 1200, Sorisole, Italy). Posteriormente as amostras foram diluídas com 50 mL de água deionizada.

Ao final a concentração de prata total das amostras foi analisada e quantificada por um Espectrômetro de Massa com Plasma Acoplado (ICP-MS) (Perkin Elmer, model NexION 300 D, Shelton, USA). Os resultados foram expressos como mg de Ag⁺ por quilo de massa vegetal. Sendo que para a análise em questão o equipamento foi ajustado com os parâmetros conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2: Detalhes operacionais do ICP-MS

Parâmetros ICP-MS	Valores
RF Power:	1150 W
Gas flow rate (L.min ⁻¹):	1.04
Auxiliary:	1.0
Carrier:	1.09
Signal measurement:	Peak Hopping
Sweeps per reading:	50
Reading/Replicate:	2
Replicates:	3
Dwell Time:	50 ms

Parâmetros ICP-MS	Valores
Auto Lens mode:	On
Detector operation mode:	Dual

Fonte: A autora, (2020).

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

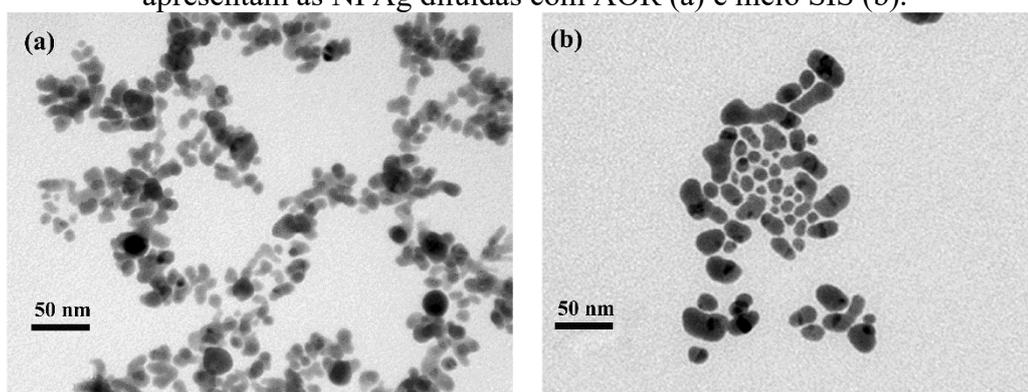
Este tópico abordará os resultados obtidos das análises realizadas na perspectiva do alcance dos objetivos elencados neste trabalho, sendo que os principais resultados foram publicados na revista “*Science of the total environment*” (LALAU et al., 2020).

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

As técnicas utilizadas para caracterizar as suspensões de NPAG permitiram identificar as propriedades físico-químicas dessas quando dissolvidas no meio de cultivo das lemnas (meio de cultura SIS). O procedimento foi essencial uma vez que possibilitou uma melhor compreensão dos processos de interação físico-química entre a NPAG e os sais utilizados no meio.

Os resultados obtidos da análise por microscopia eletrônica de transmissão e a distribuição de tamanho das NPAG demonstraram partículas esféricas com um diâmetro médio de $27,21 \pm 28,70$ nm para a diluição com o meio de cultura SIS e $19,80 \pm 18,90$ nm para a suspensão diluída com AOR (Figura 17 (b) e (a), respectivamente). Também pode se observar que as NPAG, em sua maioria, não estavam isoladas, apresentando características de aglomeração.

Figura 17: Caracterização das suspensões de NPAG por análise por MET. As micrografias apresentam as NPAG diluídas com AOR (a) e meio SIS (b).



Fonte: A autora, (2020).

Os valores de PZ obtidos na presente pesquisa (Tabela 2) são característicos de soluções estáveis. Embora não tenha sido observada diferença significativa nos resultados,

nota-se que a suspensão diluída em AOR demonstrou maior estabilidade quando em relação a diluída no meio de cultura SIS.

Tabela 2: Diâmetro médio da partícula obtido por TEM (DM), potencial Zeta (PZ) e diâmetro efetivo (DE), e pH para as suspensões usadas no teste; média \pm SD (n = 3). As letras (a e b) indicam as diferenças significativas de acordo com one-way ANOVA e posterior teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Diluentes	DM \pm DP (nm)	PZ \pm DP (mV)	DE \pm DP (nm)	pH \pm DP
Meio SIS	27,21 \pm 28,70 ^a	-38,22 \pm 0,25 ^a	110,76 \pm 1,17 ^a	6,45 \pm 0,20 ^a
AOR	19,80 \pm 18,90 ^a	-38,52 \pm 0,20 ^a	27,33 \pm 0,97 ^b	5,70 \pm 0,11 ^b

Fonte: A autora, (2020).

Baixos valores de potencial Zeta indicam que as forças de atração entre as partículas superam as de repulsão e as partículas tendem a se aproximar aumentando a probabilidade de uma colisão. Esse efeito favorece a aglomeração e floculação das NP em suspensão (GOUVÊA e MURAD, 2001; METCALF e EDDY, 2003).

O estado de aglomeração é dependente de características como o pH e da força iônica do meio em que a partícula está suspensa (OUKARROUM et al., 2010). O resultado obtido no presente estudo apresentou aglomeração entre as NP o que corrobora com as micrografias obtidas (Figura 17 b). Esse processo pode ter ocorrido por motivo de o meio de cultura SIS possuir diferentes sais em sua composição, o que influenciou diretamente na força iônica da suspensão analisada.

Apesar de as NP, incluindo as NPAg, serem geralmente caracterizadas com dimensões inferiores a 100 nm, essas tendem a se aglomerar. Conquanto o tamanho da partícula primária possa ser inferior a 100 nm, os efeitos da aglomeração resultam em agregados com diâmetros maiores que 100 nm (COX et al., 2016). Os resultados referentes a medida do DE das NPAg foram de 110,76 \pm 1,17 nm para a suspensão contendo o meio de cultura SIS e de 27,33 \pm 0,97 nm para a suspensão contendo AOR (Tabela 2), os valores demonstraram homogeneidade entre as réplicas de cada amostra pelos baixos valores de desvio padrão.

O valor observado do diâmetro efetivo da NPAg diluída em AOR foi similar ao DM obtido da análise por MET, diferente do DE da solução com o meio de cultura SIS que se apresentou maior do que o DM. Esses resultados provavelmente estão relacionados à presença de elétrons existentes no recobrimento de PVA na superfície da NPAg que não são capturados na análise por MET (STEGEMEIER et al., 2017). As características supracitadas podem afetar o coeficiente de difusão utilizado no método de determinação através de DLS e assim o DE. A premissa fortalece a hipótese de que as características do meio de cultura SIS favoreceram a

aglomeração das partículas de NPAg, uma vez que o resultado de DE para esse meio demonstrou-se elevado, quando comparado a solução de OR. Os diferentes resultados de DM e DE para a amostra de NPAg diluída no meio SIS ainda pode ter relação com o espaço de tempo decorrido entre o preparo das amostras para análise uma vez que, no preparo da amostra para a análise do DM a amostra foi inserida no *Grid* imediatamente após a síntese. Esse intervalo de tempo decorrido a inserção no *Grid* e encaminhamento da amostra para verificação do DE no equipamento *Zetasizer Nano ZS* (Brookhaven, 90 PLUS-PALS), pode ter favorecido uma tendência a aglomeração das partículas.

Os demais resultados como o de PZ e de MET demonstraram maior grau de aglomeração para a suspensão diluída com meio de cultura SIS, quando comparada à diluída com água RO.

4.2 INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO

Os resultados obtidos da taxa de crescimento das plantas expostas demonstraram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras expostas a de maior concentração de NPAg (Tabela 3). Apesar de não ter sido observada diferença significativa, na taxa de crescimento, entre as demais amostras a amostra controle ainda foi a que demonstrou uma maior taxa de crescimento dentre todas analisadas (Tabela 3).

Tabela 3: Resultados de taxa de crescimento das amostras ao final do teste - média \pm DP (n = 3). As letras indicam as diferenças significativas de acordo com a *one-way* ANOVA e posterior teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Concentrações de NPAg (mg.L ⁻¹)	Taxa de crescimento (adimensional) (r) \pm DP
Controle	0,13 \pm 0,010 ^b
0,16	0,11 \pm 0,007 ^b
0,32	0,12 \pm 0,006 ^b
0,64	0,11 \pm 0,021 ^b
1,28	0,10 \pm 0,023 ^b
2,56	0,09 \pm 0,016 ^b
5,12	0,09 \pm 0,021 ^b
10,24	0,01 \pm 0,015 ^a

Fonte: A autora, (2020).

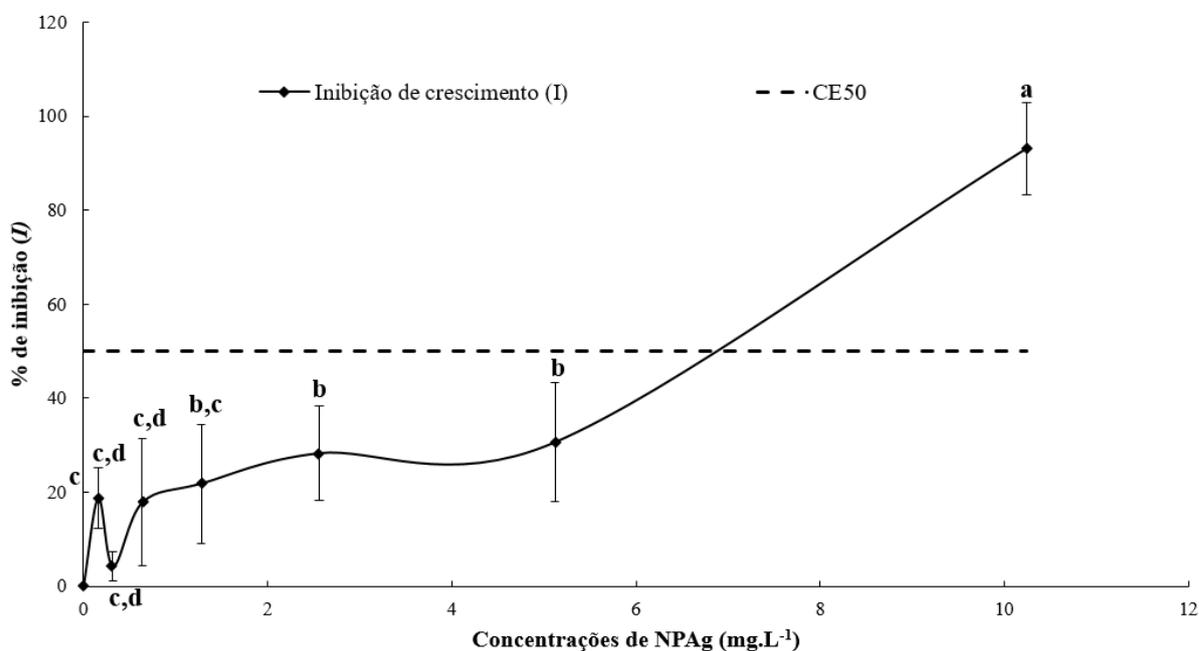
Na concentração mais alta (10,24 mg.L⁻¹) ocorreu uma brusca redução na taxa de crescimento com diferença significativa em relação a amostra controle. Também se observou a alteração gradativa na coloração da planta de verde para amarelada e, na concentração mais alta, a planta apresentou coloração branca, o que representa a sua morte, durante a realização

de ensaio. Isso pode ter relação com possíveis impactos no metabolismo fotossintético da macrófita uma vez que efeitos de clorose são decorrentes de perda de pigmentos e alterações no processo de fotossíntese (LALAU et al., 2015). Ademais, na concentração mais alta pode ter ocorrido a limitação de elementos necessários para o metabolismo e desenvolvimento da planta, como as fontes energéticas de pigmentos fotossintéticos e uso total da reserva energética de grãos de amido.

A redução no número de frondes da pesquisa é significativamente baixa comparada com outros estudos que demonstraram redução significativa em concentrações menores de NPAG (GUBBINS et al., 2011; MINOGIANNIS et al., 2019; ÜÇÜNCÜ et al., 2014). No entanto, é importante ressaltar, que os estudos supracitados utilizaram diferentes metodologias de síntese de NPAG além terem utilizado como organismo-teste a espécie *Lemna minor*. Minogiannis et al., (2019) e Unçuncu et al., (2014) utilizaram o método de ablação a laser para a síntese de NPAG, já Gubbins et al., (2011), utilizou método químico clássico, com o uso de borohidreto e citrato de sódio como agentes redutor e estabilizante. Isso demonstra que a toxicidade das NPAG pode ter variações conforme as características de sensibilidade da espécie da macrófita, bem como, as características intrínsecas das NPAG e procedimentos e reagentes utilizados em sua síntese. A partir dos resultados obtidos e da comparação com a literatura, supõe-se que a espécie de *L. punctata* é menos sensível aos efeitos tóxicos decorrentes da exposição de NPAG. Contudo, mais análises são necessárias para confirmar essa hipótese, uma vez que a metodologia de síntese utilizada também pode ter contribuído para a diferença de toxicidade observada entre este estudo com as literaturas mencionadas.

O gráfico que demonstra o comportamento da inibição de crescimento através da curva de concentração resposta conforme a exposição às diferentes concentrações de NPAG é apresentado na Figura 18. Os resultados utilizados para a elaboração da curva são baseados no percentual de inibição de crescimento e as letras representam as diferenças significativas de acordo com o teste ANOVA – *one way* – com posterior teste de Tukey. O valor de CE_{50} estimado, através da realização do método de regressão não linear da curva de crescimento obtida, foi de $6,84 \text{ mg.L}^{-1}$.

Figura 18: Curva de concentração resposta do organismo – teste lemna *L. punctata*, após o período de exposição a NPAG (período de sete dias).



Fonte: A autora, (2020).

O percentual de inibição de crescimento para a amostra de maior concentração de NPAG ao final do período de teste foi de 93% (Tabela 4), isso por motivo de nessa concentração as plantas já se encontrarem mortas. Estudos que reportam as avaliações toxicológicas das NPAG sobre as lemnas em que foi observada uma maior toxicidade (Tabela 4) demonstraram uma suspensão mais estável de NPAG e um menor diâmetro médio e DE. Já há estudos que relatam que quanto maiores valores de DE das suspensões de NPAG, menor sua área superficial e assim menor a sua reatividade (OUKARROM et al., 2013) o que pode ser observado comparando os resultados da presente pesquisa com outros estudos similares utilizando espécies diferentes de lemnas, sendo esse outro parâmetro comparativo utilizado no confronto dos resultados de CE₅₀ (Tabela 4).

Tabela 4: Valores de CE₅₀ baseados nos resultados de pZ, DE e DM.

	Autora (2020)	Oukarrom et al. (2013)	Gubbins et al. (2011)		Uçücu et al. (2014)
	NPAG	NPago	NPAG_{G1}	NPAG_{G2}	NPAG_U
CE₅₀ (mg.L⁻¹)	6,84	9,36	0,14	0,12	0,026
pZ±DP (mV)	-38,50±0,3	-34,70±2,1	-42,20±2,0	42,20±2,0	-34,90
DE±DP (nm)	110,76±1,1	-	15,90±2,1	84,10±11,8	84,97

	Autora (2020)	Oukarrom et al. (2013)	Gubbins et al. (2011)		Uçucu et al. (2014)
	NPAg	NPAgo	NPAgG1	NPAgG2	NPAgU
DM±DP (nm)	27,21±0,3	240	29,20±10,9	93,52±48,6	20-50
Espécies de lemna	<i>L. punctata</i>	<i>Lemna gibba</i>	<i>Lemna minor L</i>	<i>Lemna minor L</i>	<i>Lemna minor</i>

Fonte: A autora, (2020).

Através da Tabela 4 é possível notar que apesar de a NPAg utilizada no presente estudo apresentar um diâmetro médio de 27,21±0,3, a CE₅₀ encontrada ficou menor apenas do que no estudo de Oukarrom et al., (2013). No estudo de Oukarrom et al., (2013), o DM da NPAgo investigada foi muito maior do que o DM encontrado para a NPAg do presente estudo. O resultado de DM dessa pesquisa ficou entre a faixa de valores encontrados por Uçucu et al., (2014) (NPAg_U na Tabela 4). Entretanto a CE₅₀ de Uçucu et al., (2014) ficou bem abaixo do valor encontrado neste trabalho, demonstrando-se mais tóxica. Observa-se que a NPAg obtida no estudo de Uçucu et al., (2014), resultou em um valor de DE mais baixo, quando comparado ao resultado obtido nesta pesquisa, isso pode estar relacionado com a velocidade de aglomeração das partículas no meio de cultivo, conforme a metodologia de síntese utilizada.

Sugere-se que quanto maior o estado de aglomeração das partículas menor será a toxicidade e o contrário quanto menor o tamanho da NPAg (BAE et al., 2010). Os resultados comparativos constantes na Tabela 4, demonstram que nos resultados obtidos nesta pesquisa e no estudo de Oukarrom, (2013) a toxicidade se mostrou atenuada. Neste estudo também foi observada aglomeração através da análise por MET e essa tendência foi corroborada pelas análises de PZ e DE.

Os diferentes níveis de toxicidade da NPAg observados pelos diferentes autores (Tabela 4) podem estar relacionados as diferentes espécies desses organismos utilizadas, às variações na quantidade de íons Ag⁺ tóxicos liberados na solução de teste (DEWEZ et al., 2018) e aos diferentes métodos de síntese ou tipos/formas de NPAg utilizadas para cada estudo. Outrossim, as suspensões resultantes podem mostrar diferentes níveis de estabilidade e tamanhos de aglomerados.

Os resultados obtidos no presente estudo propõem que efeitos no crescimento podem ser reflexo de alterações no metabolismo bioquímico da planta decorrentes da exposição as NPAg. Isso porque alterações significativas a níveis histoquímico e bioquímico relacionadas a

efeitos no crescimento do organismo de estudo já foram observadas (LALAU et al., 2015; 2020; ZEZULKA et al., 2013).

4.3 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOFUNCIONAIS E ULTRAESTRUTURAIS

Alterações em processos bioquímicos e fisiológicos de plantas proveniente da exposição a xenobióticos, podem ocasionar alterações estruturais e ultraestruturais (PEDROSO, 2009). Estudos já reportam efeitos adversos ocasionados pelo agente tóxico em plantas em nível macroscópico através de danos como clorose e necrose e na superfície adaxial da planta (KRUPA et al., 2001; NOVAK et al., 2003), bem como, a nível intracelular (CASTAGNA et al., 2007; FAORO; IRITI, 2009; GRAVANO et al., 2003; LALAU et al., 2015; 2020; SCHMIDT et al., 2009). Nesse sentido, a avaliação dos parâmetros estruturais e ultraestruturais possibilitou uma melhor compreensão dos efeitos adversos oriundos da exposição do organismo teste a suspensão de NPAg.

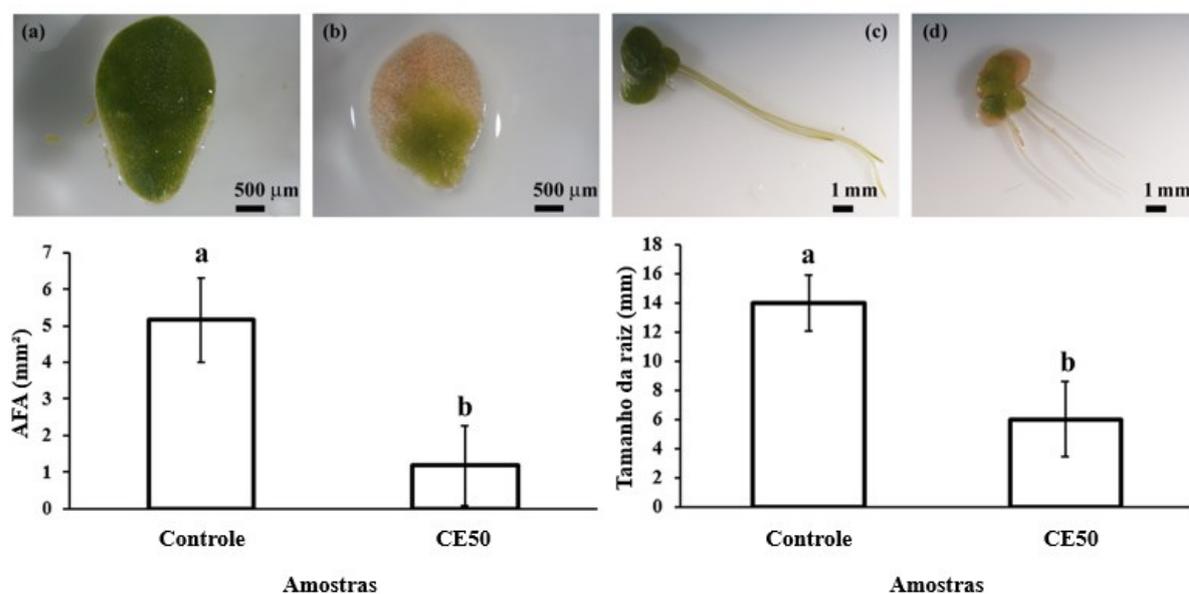
4.3.1.1 Morfologia

- **AFA e tamanho da raiz**

As imagens das folhas e raízes dos organismos expostos à amostra controle e à amostra com a concentração CE_{50} , bem como a AFA e o tamanho da raiz podem ser visualizadas na Figura 19. Nas imagens as letras (a) e (b) representam as áreas fotossinteticamente ativas das amostras controle e CE_{50} , respectivamente. As letras (c) e (d), representam as raízes das amostras controle e CE_{50} respectivamente. Nos gráficos as letras representam as diferenças significativas de acordo com o teste ANOVA – *one way* – com posterior teste de Tukey.

Observando o tamanho das raízes (14,00 mm para a amostra controle e 5,99 mm para a amostra exposta a CE_{50}) e a APA (100% para a amostra controle e 26% para a amostra exposta a CE_{50}) é possível visualizar uma considerável redução no resultado dos parâmetros supracitados da amostra exposta a concentração CE_{50} quando comparada ao controle (Figura 19). Outrossim, observou-se perda expressiva de coloração da amostra exposta a CE_{50} comparada com a controle (Figura 19).

Figura 19: Imagens das amostras de lemnas registradas através do estereomicroscópio (lupa).



Fonte: A autora, (2020).

Perda de coloração sugere possíveis danos no metabolismo fotossintético da planta (YE et al, 2019). Ademais alguns estudos preliminares sobre a efeitos das NP no crescimento de espécies vegetais indicaram inibição no comprimento da raiz (YANG; WATTS, 2005). Portanto a clorose observada pode ser um indicador da escassez de pigmentos fotossintéticos, uma vez que as plantas expostas às NPAg eram saudáveis apresentando intensa coloração verde. Esse efeito pode ser atribuído a uma diminuição acentuada na densidade do cloroplasto causada por danos nessa estrutura e alterações no tamanho da célula, sugerindo que o agente tóxico interferiu na replicação do cloroplasto e na divisão celular (BARYLA et al., 2001). Além de danos intracelulares decorrentes do *stress* oxidativo oriundos do aumento de EROs, que afetam diretamente estruturas e organelas celulares (LALAU et al., 2015).

A hipótese de que os efeitos observados foram causados pelas NPAg é reforçada pelo fato de que as plantas expostas à CE₅₀ foram mantidas sob as mesmas condições de laboratório (temperatura, nutrientes e luz etc.) que as amostras controle que, praticamente não alteraram a sua coloração durante o período de teste diferentemente das plantas expostas que tiveram sinais de clorose. Ademais, efeitos de perda de coloração oriundos da exposição das lemnas a NP já foram observados em outros estudos (LALAU et al., 2015; 2020).

Perda de coloração representa perda de pigmentos que são a principal fonte de energia da planta e seu baixo suprimento leva ao consumo da reserva energética composta por grãos de amido e formação de compostos fenólicos indicando condições de *stress* da planta (LALAU et al., 2015). Portanto essa diminuição no conteúdo de clorofila está, provavelmente, associada ao

processo degenerativo da biossíntese de pigmentos como um mecanismo de compensação para manter a disponibilidade de compostos de carbono para a síntese de compostos antioxidantes, conforme o geralmente observado em plantas (HOLZINGER; LÜTZ, 2006).

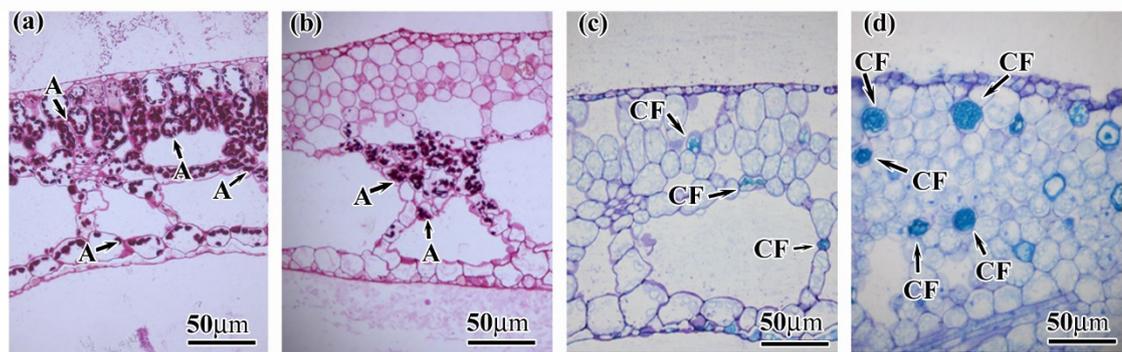
Essa resposta foi observada nos resultados encontrados uma vez que, as lemnas, mesmo com clorose, ainda continuaram crescendo, ou seja, reforçando a hipótese de que mesmo com a escassez de pigmentos o *déficit* energético foi suprido pelos grãos de amido.

4.3.1.1.1 Grãos de amido e compostos fenólicos

As imagens das secções das frondes das plantas registradas através de microscopia de luz posteriormente ao teste citoquímico com os corantes PAS e AT-O são representadas na Figura 20. Na Figura 20, (a) e (b) representam as secções das frondes das amostras controle e CE₅₀ (respectivamente) coradas com PAS. As setas indicam a localização dos grãos de amido, indicados como “A”. As letras (c) e (d) representam as secções das frondes das amostras controle e CE₅₀ (respectivamente) coradas com AT-O. As setas indicam a localização dos compostos fenólicos representados como “CF”.

As secções transversais das amostras controle (Figura 20a) e as expostas a CE₅₀ (Figura 20b) da *L. punctata* demonstraram reação com o corante PAS em suas paredes celulares e no citoplasma. A reação positiva de PAS no citoplasma evidenciou a abundância de grãos de amido nas células da amostra controle (Figura 20a). Diferentemente a amostra de plantas expostas a CE₅₀ apresentou um número menor de grãos de amido e de pequena dimensão (Figura 20b). Já a reação positiva das amostras com o corante AT-O indicou presença de compostos fenólicos no organismo (Figura 20c e d). Além de apresentar quantidade expressiva de compostos fenólicos quando comparado à amostra controle (Figura 20d).

Figura 20: Microscopia de luz das secções das frondes das amostras controle e CE₅₀ submetidas ao teste citoquímico com os corantes PAS e AT-O.



Fonte: A autora, (2020).

Os grãos de amido constituem uma reserva de energia quando há pouco suprimento de pigmentos fotossintéticos (LALAU et al., 2015;2020). Outrossim, já existem dados da relação entre a diminuição de grãos de amido e alterações ultraestruturais como a diminuição de organelas celulares (SCHMIDT et al., 2009). Os resultados encontrados reforçam a hipótese de que a exposição das macrófitas à suspensão de NPAg ocasionou os efeitos verificados nas respostas do teste citoquímico PAS.

Um decréscimo no número de grãos de amido combinado com o aumento de compostos fenólicos indica que a planta se encontra em condições de *stress* em conjunto com efeitos de alterações metabólicas (GOUVEIA et al., 2013). Essa resposta foi observada nos resultados dos testes citoquímicos AT-O e PAS das lemnas expostas a CE₅₀, reforçando o pressuposto do uso dos grãos de amido como fonte energética para suprir a escassez dos pigmentos fotossintéticos. Tanto que as macrófitas expostas que apresentaram clorose continuaram crescendo conforme o mencionado no tópico 4.3.1.1. Apesar de neste estudo os danos na taxa de crescimento terem sido desproporcionais quando comparados aos danos a nível de ultraestrutura, provavelmente os efeitos na taxa de crescimento seriam potencializados, ou até mesmo, limitados caso o período de teste fosse maior. Isso por motivo de elementos essenciais para o metabolismo e desenvolvimento do organismo terem sido afetados negativamente de maneira significativa.

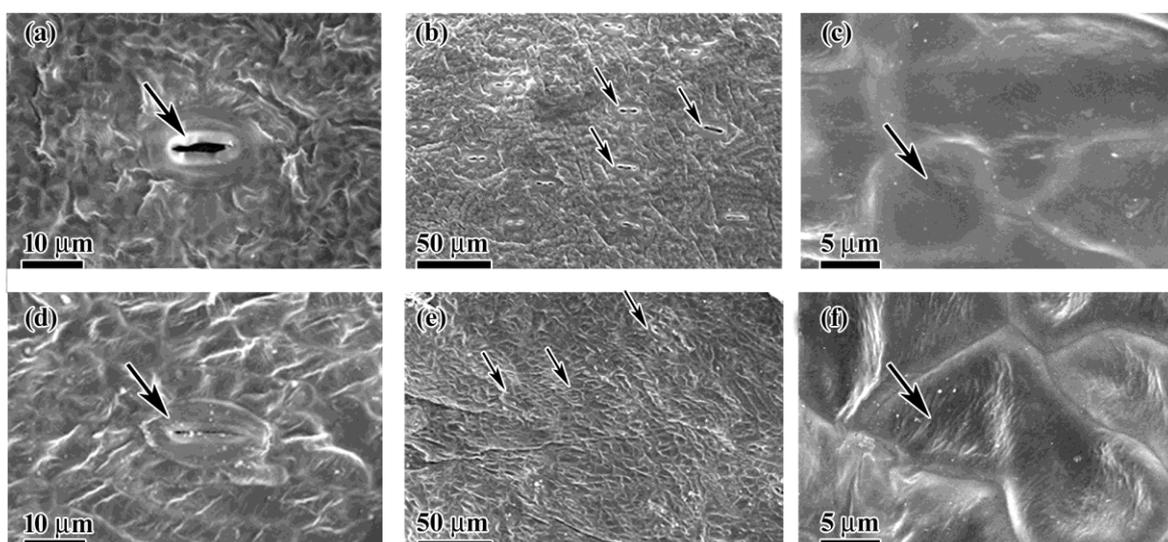
4.3.1.2 Estômatos e tecidos

As imagens da superfície abaxial e adaxial das amostras analisadas são apresentadas na Figura 21. A figura demonstra em (a), (b) e (c) o estômato, as secções adaxial e abaxial da fronde da amostra controle. Em (d), (e) e (f) demonstram o estômato, as secções adaxial e abaxial da fronde da amostra CE₅₀. As setas representam indicam a posição dos estômatos (letras (a); (b); (d) e (e)) e a característica do tecido da planta (letras (c) e (f)).

Nas imagens da superfície adaxial das amostras das frondes da lemna posterior ao período de teste foi observada a presença de estômatos em ambas amostras (indicados pelas setas na Figura 21 (a), (b), (d) e (e)). Nas imagens referentes à amostra exposta a CE₅₀ o fechamento dos estômatos pôde ser observado (indicados pelas setas na Figura 21 (d) e (e)).

Com relação à superfície abaxial das amostras analisadas notaram-se ondulações leves na topografia da superfície da amostra controle (Figura 21 (c)) enquanto na amostra CE₅₀ as imagens demonstraram uma superfície com forma irregular indicando um aspecto de aspereza (Figura 21 (f)), aparentemente resultante da exposição à NPAg.

Figura 21: Imagens das frondes das amostras controle e CE₅₀, posterior ao período de teste, registradas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).



Fonte: A autora, (2020).

Distúrbios nas trocas gasosas através dos estômatos afetam a eficiência da atividade fotossintética das plantas (SANDALIO et al., 2001). Severi e Fornasiero (1982; 1983b) observaram o fechamento dos estômatos da mesma espécie das macrófitas do presente estudo durante o ressecamento provocado da exposição ao xenobiótico foco do estudo (inibidores metabólicos e ionofóros). Neste estudo, observou-se que as NPAg estimularam o fechamento dos estômatos e, portanto, a taxa de transpiração foliar pode ter sido significativamente afetada na amostra exposta a CE₅₀. Esse efeito também já foi observado na exposição da mesma espécie de lemna à NPCuO (LALAU et al., 2015), o que pode ser um indício de que os nanomateriais podem induzir a esse dano.

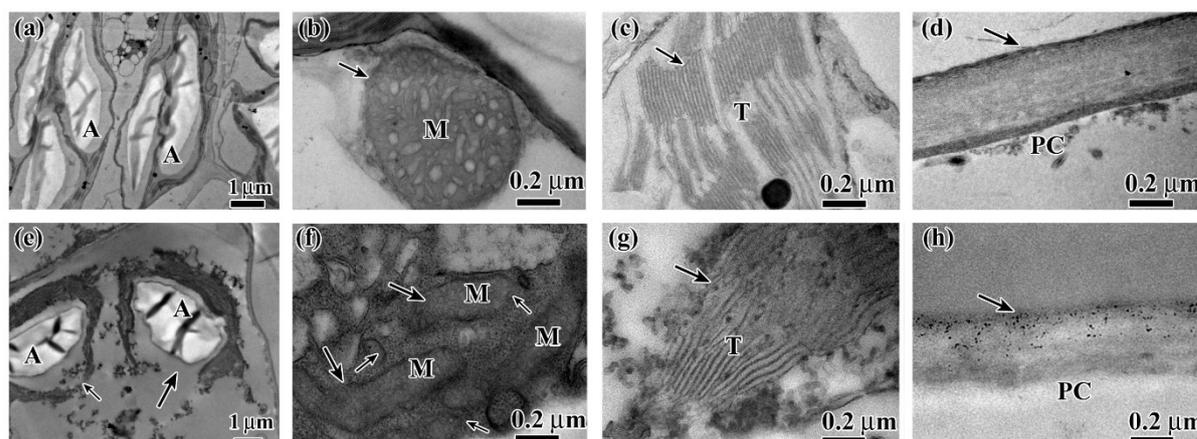
4.3.1.3 Ultraestruturas

As imagens das ultraestruturas das amostras controle e expostas a CE₅₀ são demonstradas na Figura 22. Na imagem da Figura 22 (a) são demonstrados os amiloplastos da amostra controle onde pode-se visualizar os de grãos de amido (A). Já na imagem da Figura 22 (b) é demonstrada a mitocôndria (M) e cristas mitocondriais da fronde da amostra controle. Na imagem da Figura 22 (c) observa-se o detalhe do cloroplasto com estroma e tilacóides (T) preservados (indicação por setas) nas células controle. A imagem apresentada na Figura 22 (d) refere-se à parede celular (PC) da amostra controle. Em 22 (e) são demonstrados os amiloplastos da amostra CE₅₀ onde podem ser visualizadas rupturas (indicadas pelas setas) e pequenos grãos de amido (A) em menor quantidade. Na Figura 22 (f) observam-se as mitocôndrias da amostra EC₅₀ são visualizadas rupturas em sua estrutura. Em 22 (g) observa-se o detalhe do cloroplasto que apresenta desorganização nos estromas tilacóides (indicado pelas setas) e, em (h) visualiza-se a parede celular (PC) das secções da fronde CE₅₀. Pode-se observar uma pequena quantidade de um elemento que não caracteriza qualquer organela celular e se assemelha a NPAG (indicado pela seta).

As imagens obtidas por MET da amostra controle demonstraram que as organelas, tais como amiloplastos (Figura 22a), mitocôndrias (Figura 22b) e tilacóides (Figura 22c), continuaram preservados após a duração do teste. No entanto, as amostras CE₅₀ apresentaram ruptura e baixa quantidade de grãos de amidos no amiloplasto (Figura 22 (e)), rompimento da mitocôndria (Figura 22 (f)) e significativa desordem das estruturas tilacóides (Figura 22 (g)).

Também foi possível observar que nas amostras controle, após o período de teste (Figura 22 (g)), a parede celular se manteve preservada, enquanto na amostras CE₅₀ a parede celular sofreu alterações além de serem identificados sinais da presença de NP através da existência de elementos não visualizados na parede celular da amostra controle (Figura 22 (h)).

Figura 22: Imagens registradas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das frondes das amostras controle e CE₅₀ posterior ao período de teste.



Fonte: A autora, (2020).

Interações químicas provenientes da exposição das plantas as NP resultam na produção de EROs, distúrbios da atividade de transporte de íons da membrana celular, danos oxidativos e peroxidação lipídica. Isso porque os íons metálicos gerados das as NP reagem com os grupos sulfidríla e carboxila alterando a atividade proteica da planta (AUFFAN et al., 2008; FOLEY et al., 2002; HOSSAIN et al., 2015; KAMAT et al., 2000). Ademais as NP provocam danos na ultraestrutura dos cloroplastos afetando os níveis de pigmentos fotossintéticos (TKALEC et al., 2008).

4.4 EFEITOS NA ATIVIDADE FOTOSSINTÉTICA

Os resultados da concentração dos pigmentos fotossintéticos das amostras analisadas são demonstrados na Tabela 5. Na tabela são representados os valores das médias \pm desvio padrão (DP) (n=9). Sendo que as letras representam as diferenças significativas de acordo com a análise *one-way* ANOVA e posterior teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Nota-se que a amostra exposta a CE_{50} apresenta perda significativa dos níveis de clorofila *a*, *b* e total quando comparada a amostra controle. Assim como o decréscimo de carotenoides (Tabela 5). Os sinais de clorose observados na Figura 19 podem ser reflexo da expressiva perda de pigmentos da planta exposta a NPAg.

Tabela 5: Conteúdo de pigmentos fotossintéticos ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ peso úmido) da *L. punctata* após o período de teste das amostras CE_{50} e controle.

Componentes	Controle \pm DP	CE_{50} (6,84 mg.L ⁻¹) \pm DP
Clorofila <i>a</i>	201,80 \pm 23,4 ^a	58,33 \pm 14,2 ^b

Clorofila <i>b</i>	62,85 ± 5,90 ^a	26,11 ± 5,17 ^b
Clorofila total	264,65 ^a	84,44 ^b
Carotenoides totais	61,31 ± 5,10 ^a	20,99 ± 5,70 ^b

Fonte: Autora, (2020).

Os danos celulares provocados refletem no desenvolvimento da planta através de alterações no metabolismo fotossintético. Isso por motivo das organelas afetadas pelas NP serem responsáveis pelo transporte de metabólitos no processo de fotossíntese. Uma vez que na via fotorrespiratória várias organelas (mitocôndrias e peroxissomos) do interior dos cloroplastos estão envolvidas no metabolismo fotossintético do carbono (LEEGOOD et al., 2000).

O declínio nos pigmentos fotossintéticos nas amostras das lemnas expostas às NP junto com os danos as estruturas tilacóide demonstram que as NPAg prejudicaram consideravelmente a integridade estrutural e funcional dos cloroplastos, dano já observado quando esse mesmo organismo foi exposto ao Cádmium (Cd) (TKALEC et al., 2008). Assim, os efeitos observados no interior celular podem ter resultado em danos no metabolismo fotossintético, uma vez que o teor de clorofila é um biomarcador significativo que reflete o *status* do desenvolvimento das plantas.

Perdas significativas de pigmentos já foram observadas em decorrência da exposição de espécies de plantas (*Pisum sativum*) a NPAg (TRIPATHI et al., 2017). Com relação à espécie de planta do presente estudo, já foi observada alterações de pigmentos quando expostas as NPCuO (LALAU et al., 2015; PERREAULT et al., 2014; RADIC et al., 2019).

Um declínio nos pigmentos fotossintéticos, como o teor total de clorofilas *a*, *b* e total e o teor de carotenóides, indica bloqueio da cadeia de transporte de elétrons (CTE), o que pode levar a uma inibição significativa da fotossíntese (KHAN et al., 2019). Esses efeitos afetam as condições de desenvolvimento da planta (NAIDU et al., 2003).

Essas alterações fisiológicas também podem estar associadas ao acúmulo excessivo de íons de prata pela planta, haja vista que a NPAg quando em suspensão tende a liberar íons de prata na amostra. Ademais, podem liberar íons nos tecidos e ultraestruturas do organismo quando internalizadas.

4.5 ANÁLISE DA INCORPORAÇÃO DE ÍONS DE PRATA

Com relação aos resultados obtidos da quantificação de íons de prata são apresentados na Tabela 6. As letras indicam as diferenças significativas de acordo com a *one-way* ANOVA e posterior teste de Tukey ($p \leq 0,05$).

Tabela 6: Resultados das concentrações de Ag^+ das amostras após o período de teste - média \pm DP (n = 3).

NPAg (mg.L⁻¹)	Ag⁺ (mg Kg⁻¹) \pm DP
Controle	0 \pm 0,00 ^h
0,16	2289 \pm 9,40 ^g
0,32	5606 \pm 7,30 ^f
0,64	8983 \pm 5,10 ^e
1,28	21223 \pm 2,17 ^d
2,56	23284 \pm 1,90 ^c
5,12	44155 \pm 5,50 ^b
10,24	47869 \pm 3,60 ^a

Observa-se que nas amostras houve um aumento gradativo conforme o aumentou a concentração de NPAg das suspensões (Tabela 6). A alta absorção de prata pela lemna pode estar relacionada à sua forte tendência de acumular metais, o que é observado pelos resultados do presente estudo que apresentou valores bastante significativos de acúmulo de prata com o aumento das concentrações das suspensões de NPAg. Devido a essa propensão a acumulação de metais, essa planta já tem sido objeto de vários estudos (STOUT et al., 2010; LALAU et al., 2015; STEGEMEIER et al., 2017). Os resultados observados reforçam o conceito de que as lemnas possuem alta capacidade de acumular metais, ademais são utilizadas inclusive em processos de remoção de metais para remediação ambientes aquáticos impactados ou até para polimento de efluentes (SASMAZ; OBEK, 2012). O fato de as NPAg penetrarem na parede celular da planta pode ter levado à liberação de íons que se adicionaram aos íons de prata adsorvidos que estavam presentes na suspensão de NPAg potencializando a absorção desse metal. Com isso a incorporação desses íons na planta se intensifica, fator esse preocupante, uma vez que ela permanecerá acumulando esse material e possivelmente transferindo esses efeitos para outros organismos. Dessa maneira essa alta acumulação de metais pode representar riscos em termos de impactos ao meio ambiente e ecossistemas. Apesar de ser observado acumulação de Ag^+ nas macrófitas, a taxa de crescimento se manteve pouca alterada na maior partes das concentrações expostas (excetuando a concentração de 10,24 mg.L⁻¹), isso indica que mesmo com altas concentrações de prata no seu interior, as plantas continuaram se desenvolvendo,

mesmo que de maneira mais atenuada, podendo ser consumidas bioamplificando esse metal na teia trófica, uma vez que, estarão biodisponíveis com altas doses de prata no seu interior.

Conforme a OMS o limite máximo permitido da concentração de prata na água potável é de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$, já em território nacional a Resolução CONAMA 430 e a Lei nº 14675/2009 de Santa Catarina estabelecem limites máximos em efluentes de $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$ e $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ respectivamente, convertendo para unidade de medida a unidade de medida para mg.L^{-1} , os resultados obtidos demonstraram concentrações superiores aos valores preconizados. A premissa reforça um apontamento importante relacionado aos resultados do estudo, uma vez que as NPAG dispersas em corpos d'água podem potencializar o aumento de Ag^+ nos mananciais utilizados para consumo humano e manutenção dos ecossistemas. Ratifica-se que os resultados desta pesquisa demonstraram que todos os tratamentos, apresentaram concentrações de prata superiores ao limite estabelecido pelas legislações supracitadas.

Como a *L. punctata* é um produtor primário dentro da teia trófica, o acúmulo observado de prata pode levar a uma possível bioamplificação para organismos pertencentes aos níveis posteriores da teia trófica. Nesse cenário o encaminhamento da contaminação por prata poderá vir a afetar não apenas os organismos consumidores, mas o ecossistema como um todo.

5 CONCLUSÃO

O estudo permitiu elucidar os efeitos adversos decorrentes da exposição das *L. punctata* às NPAG que ocasionaram a diminuição da taxa de crescimento na planta bem como a perda de coloração. A análise possibilitou observar a resposta do organismo exposto a NPAG a nível morfo e citológico e de metabolismo fotossintético. Os resultados permitiram descobertas importantes com relação ao estudo realizado. Além disso, confirmaram a hipótese de que exposição das *L. punctata* as NPAG, resulta na incorporação dessa substância a nível celular causando danos morfofuncionais e no metabolismo fotossintético.

Os dados obtidos da caracterização das suspensões de NPAG demonstraram uma maior propensão a aglomeração desse elemento quando diluído em meio de cultura SIS o que pode estar relacionado a interação química com os sais existentes no meio. Apesar do tamanho e diâmetro observados serem maiores quando comparados à literatura, a característica da suspensão, cujo estado físico é líquido, pode ter favorecido a internalização da NP na parede celular da planta. A caracterização das NP foi um procedimento essencial para esse estudo, pois permitiu uma melhor compreensão dos efeitos tóxicos no organismo testado. Ademais possibilitou observar que as características da suspensão podem influenciar a toxicidade, uma vez que quanto menor o diâmetro das NP a tendência é que sua área superficial seja maior, isso é um parâmetro-chave em relação às suas características de reatividade. Ainda através desses resultados foi possível observar que a síntese da NPAG foi bem sucedida.

A exposição das lemnas às NPAG na faixa de concentrações entre 0,16 – 10,49 mg.L⁻¹ demonstrou gradual nos valores da taxa de inibição de crescimento da planta, sendo o maior efeito observado na concentração de 10,49 mg.L⁻¹. Embora os maiores efeitos em termos de inibição de crescimento tenham sido observados na maior concentração da amostra de NPAG, na concentração CE₅₀ (6,84 mg.L⁻¹) foram observados efeitos significativos em termos de metabolismo e fisiologia da lemna.

Observou-se redução da área fotossinteticamente ativa (em torno de 70%), tamanho da raiz (7 mm), pigmentos fotossintéticos (em torno de 41,5%), grãos de amido, bem como, fechamento dos estômatos na amostra de lemna exposta a CE₅₀. Os resultados também sugerem a ocorrência de danos no aparato fotossintético.

Finalmente os resultados demonstraram que somente o teste para avaliar a taxa de crescimento não garante uma avaliação toxicológica precisa uma vez que, os resultados apontaram que a taxa de crescimento, na grande maioria das concentrações, permaneceu

estatisticamente semelhante à das plantas expostas à condição controle. Contudo, os efeitos ultraestruturais foram relevantes, indicando que mesmo que a planta tenha uma taxa de crescimento considerável quando comparada as amostras controle, as alterações provocadas pela exposição a NPAG são evidentes. Danos em mitocôndrias, tilacóides, redução de clorofila *a*, *b*, totais, carotenoides, grãos de amido, AFA e fechamento de estômatos são fatores que não podem ser negligenciados.

Pode-se concluir que as NPAG podem representar um risco quando dispersas no ambiente aquático, uma vez que podem penetrar nos organismos, atingindo estruturas vitais para seu desenvolvimento. A propensão da *L. punctata* a acumular prata representa um risco em termos de toxicidade, uma vez que esta planta é um organismo produtor pertencente ao primeiro nível da cadeia alimentar podendo propiciar bioamplificação desse agente tóxico no ecossistema.

6 RECOMENDAÇÕES

Com vistas a aprofundar os conhecimentos resultados obtidos na presente pesquisa em termos de atividade fotossintética e funções metabólicas do organismo, recomenda-se:

- Avaliar e quantificar a emissão de fluorescência clorofiliana;
- Analisar a atividade enzimática da planta posterior a exposição;
- Quantificar a geração de EROs na macrófita após a exposição a NPAg;
- Analisar a bioamplificação decorrentes da evolução toxicidade para organismos pertencentes aos níveis mais altos dentro da teia trófica cuja fonte de nutrição são as lemnas.

REFERÊNCIAS

AFNOR. **Determination of the inhibitory effect on the growth of *L. minor***, 1996.

AITKEN, R. J. et al. Manufacture and use of nanomaterials: Current status in the UK and global trends. **Occupational medicine**, v. 56, n. 5, p. 300–306, 2006.

ALI, Z. et al. Duckweed. **Plant metal interaction**, [S.I.], p. 411-429, 2016. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-803158-2.00016-3>.

ALIFERIS, K. A. et al. *Lemna minor L.* as a model organism for ecotoxicological studies performing H NMR fingerprinting. **Chemosphere**, Canadá, p. 967-973. 13 maio 2009. Disponível em: Acesso em: 30 nov. 2012.

ALLIED MARKET RESEARCH (AMR). **Europe Nanomaterials Market by Type of Material, by End User - Opportunity Analysis and Industry Forecast**. 2016. Disponível em: <<https://www.researchandmarkets.com/reports/3976206/europe-nanomaterials-market-by-type-of-material>>. Acesso em: 04 fev. 2020

APHA. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 22nd. ed. Washington D.C.: American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation, 2012.

APOLINÁRIO, Alexandra et al. Abrindo a caixa de Pandora dos nanomedicamentos: há realmente muito mais lá embaixo. **Química Nova**, [s.l.], p. 1-14, 20 fev. 2020. Sociedade Brasileira de Química (SBQ). <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170481>.

ARCURI, A. Nanotecnologia e segurança do trabalho: impactos toxicológicos e psicológicos. p. 10, 2014.

ARUOJA, V. et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Science of the total environment**, [s.l.], v. 407, n. 4, p.1461-1468, fev. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.053>.

ASHARANI, P. V et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver. **ACS Nano**, v. 3, n. 2, p. 279–290, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 12648: **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (*Chlorophyceae*)**: Referências. Rio de Janeiro, 07 março 2018. p. 27.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 12713: **Ecotoxicologia Aquática — Toxicidade Aguda — Método de ensaio com *Daphnia Spp* (*Crustacea, Cladocera*)**: Referências. Rio de Janeiro, RJ, 19 maio 2016. p. 27.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 13373:

Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia spp* (*Crustacea, Cladocera*): Referências. Rio de Janeiro, RJ, 28 março 2017. p. 20.
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 15088:
Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com peixes (*Cyprinidae*): Referências. Rio de Janeiro, RJ, 13 dezembro 2016. p. 25.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 15308:
Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com misídeos (*Crustacea*): Referências. Rio de Janeiro, RJ, 26 maio 2017. p. 20.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15350: **Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica de curta duração — Método de ensaio com ouriço-do-mar (*Echinodermata: Echinoidea*):** Referências. Rio de Janeiro, 18 agosto 2020. p. 31.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15411-1: **Ecotoxicologia aquática — Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de *Allivibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente):** Referências. Rio de Janeiro, 22 novembro 2012. p. 23.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15411-2: **Ecotoxicologia aquática — Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão de luz de *Allivibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente)**
Parte 2: Método utilizando bactérias desidratadas: Referências. Rio de Janeiro, 22 novembro 2012. p. 21.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 15411-3: **Ecotoxicologia aquática — Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de *Allivibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente)**
Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas: Referências. Rio de Janeiro, 22 novembro 2012. p. 23.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 15470:
Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda e crônica — Método de ensaio com *Hyalella spp* (*Amphipoda*) em sedimentos: Referências. Rio de Janeiro, RJ, 25 novembro 2013. p. 21.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 15499:
Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes: Referências. Rio de Janeiro, RJ, 08 abril 2016. p. 2.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). NBR 15638:
Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com anfípodos marinhos e estuarinos em sedimentos: Referências. Rio de Janeiro, RJ, 11 abril 2016. p. 19.

ASTM. Conducting Static Toxicity Tests with *Lemna gibba*. In: **Annual book of ASTM Standards**. Philadelphia: [s.n.]. p. 1415–1491.

AUFFAN, M.; ACHOUAK, W.; ROSE, J.; RONCATO, Marie-Anne; CHANÉAC, C.; WAITE, D. T.; MASON, A.; WOICIK, J. C.; WIESNER, M. R.; BOTTERO, Jean-Yves.

Relation between the redox state of iron-based nanoparticles and their cytotoxicity toward *Escherichia coli*. **Environmental science & technology**, [S.L.], v. 42, n. 17, p. 6730-6735, set. 2008. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es800086f>.

AXTELL, N. R.; STERNBERG, S. P. K.; CLAUSSEN, K. Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*. **Bioresource technology**, Estados Unidos, p. 41-48. 10 jan. 2003.

AZIZ, N. et al. Facile algae-derived route to biogenic silver nanoparticles: synthesis, antibacterial, and photocatalytic properties. **Langmuir**, [s.l.], v. 31, n. 42, p.11605-11612, 16 out. 2015. American chemical society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/acs.langmuir.5b03081>.

AZIZ, N. et al. Leveraging the attributes of mucor hiemalis-derived silver nanoparticles for a synergistic broad-spectrum antimicrobial platform. **Frontiers in microbiology**, [s.l.], v. 7, p.1-11, 15 dez. 2016. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2016.01984>.

BAE, E. et al. Bacterial cytotoxicity of the silver nanoparticle related to physicochemical metrics and agglomeration properties. **Environmental toxicology and chemistry**, [S.L.], v. 29, n. 10, p. 2154-2160, 19 ago. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.278>.

BAKER, C. et al. Synthesis and antibacterial properties of silver nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.244-249, 1 fev. 2005. American Scientific Publishers. <http://dx.doi.org/10.1166/jnn.2005.034>.

BARYLA, A., et al. Leaf chlorosis in oilseed rape plants (*Brassica napus*) grown on cadmium-polluted soil: causes and consequences for photosynthesis and growth. **Planta**, [S.L.], v. 212, n. 5-6, p. 696-709, 12 abr. 2001. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s004250000439>.

BECARO, A. A. et al. Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. **Environmental nanotechnology, monitoring & management**, [s.l.], v. 3, p.22-29, maio 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enmm.2014.11.002>.

BENKO, H. ISO Technical Committee 229 Nanotechnologies. **Metrology and standardization of nanotechnology**, [S.L.], p. 259-268, 20 jan. 2017. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. <http://dx.doi.org/10.1002/9783527800308.ch14>.

BFR. BfR recommends that nano-silver is not used in foods and everyday products. n. 024, p. 2010–2010, 2010.

BLASER, S. A. et al. Estimation of cumulative aquatic exposure and risk due to silver: Contribution of nano-functionalized plastics and textiles. **Science of the total environment**, v. 390, n. 2–3, p. 396–409, 2008.

BOLWELL, G. P.; WOJTASZEK, P. Mechanisms for the generation of reactive oxygen species in plant defence – a broad perspective: Review Article. **Physiological and molecular plant pathology**. [s.i.], p. 347-366. 10 out. 1997.

BOHRER, M. B. **Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário do sistema de tratamento dos efluentes líquidos industriais (SITEL) do pólo petroquímico do sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplancônica.** 1995. 469p. Tese (Doutorado em Ciências) - UFSCar, São Paulo.1995.

BOUZON, Z. L. **Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales-Rhodophyta).** 1993. 66 f. Dissertação (Mestrado) - UFPR, Curitiba, 1993.

BOXALL, A. Current and Future Predicted Environmental Exposure To Engineered Nanoparticles. **Environment**, p. 89, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, [s.l.], v. 72, n. 1-2, p.248-254, maio 1976. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

BRAIN, R. A.; CEDERGREEN, N. Biomarkers in aquatic plants: selection and utility. In: WHITACRE, D. M. **Reviews of environmental contamination and toxicology.** [S.L.]: Springer Science, 2009. p. 49-110.

CAO, H.; LIU, X. Silver nanoparticles-modified films versus biomedical device-associated infections. **Wiley interdisciplinary reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [s.l.], v. 2, n. 6, p.670-684, 20 ago. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/wnan.113>.

CASTAGNA, A.; EDERLI, L.; PASQUALINI, S.; MENSUALI-SODI, A.; BALDAN, B.; DONNINI, S.; RANIERI, A.. The tomato ethylene receptor LE-ETR3 (NR) is not involved in mediating ozone sensitivity: causal relationships among ethylene emission, oxidative burst and tissue damage. **New phytologist**, [S.L.], v. 174, n. 2, p. 342-356, abr. 2007. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02010.x>.

CHALOUPKA, K.; MALAM, Y.; SEIFALIAN, A. M.. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. **Trends in biotechnology**, [s.l.], v. 28, n. 11, p. 580-588, nov. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.07.006>.

CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J.. Nanosilver: A nanoparticle in medical application. **Toxicology letters**, [s.l.], v. 176, n. 1, p.1-12, jan. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.10.004>

CHERNOUSOVA, S.; EPPLE, M.. Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal. **Angewandte chemie international edition**, [s.l.], v. 52, n. 6, p.1636-1653, 17 dez. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.201205923>.

CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K.. Zeta Potential Measurement. **Methods in molecular biology**, [s.l.], p. 63-70, 19 out. 2010. Humana press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6.

COMISSÃO EUROPEIA. **Recomendação da comissão de 18 de Outubro de 2011 sobre a**

definição de nanomaterial. 2011. Jornal Oficial da União Europeia. Disponível em: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:275:0038:0040:pt:PDF>. Acesso em: 14 maio 2020.

CONAMA. Resolução nº 357, de 14 de março de 2005. **Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências.** Brasília, 17 p. 58-63.

CONAMA. Resolução nº 430, de 13 de maio de 2011. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a resolução no 357, de 17 de Março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA.** Brasília.

CORNELIS, G. et al. Transport of silver nanoparticles in saturated columns of natural soils. **Science of the total environment**, v. 463–464, p. 120–130, 2013.

COSTA, C. H. da. **Avaliação toxicológica da nanopartícula de óxido de cromo III através de ensaios in vivo e in vitro.** 2014. 197 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

COSTA, C. H. da et al. Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Science of the total environment**, v. 565, p. 951–960, 2015.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim. nova**, São Paulo, p. 1820-1830. 24 set. 2008.

COSTA, G. F. da et al. Fotossíntese, condutância estomática e potencial hídrico foliar em árvores jovens de andiroba (*Carapa guianensis*). **Acta amazonica**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 229-234, jun. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0044-59672007000200008>.

COX, A. et al. Silver and titanium dioxide nanoparticle toxicity in plants: A review of current research. **Plant physiology and biochemistry**, [s.l.], v. 107, p.147-163, out. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.022>.

CROLLY, G.. **Hydrodynamic diameter.** 2018. Disponível em: <<https://www.fritsch-international.com/particle-sizing/fritsch-knowledge/hydrodynamic-diameter/>>. Acesso em: 23 jul. 2018.

CROSER, M. et al. Nanoparticle dermal absorption and toxicity: A review of the literature. **International archives of occupational and environmental health**, v. 82, n. 9, p. 1043–1055, 2009.

CROSS, J. W. **The charms of duckweed.** 2014. Disponível em: <<http://www.mobot.org/jwccross/duckweed/duckweed.htm>>. Acesso em: 18 jun. 2019.

DEWEZ, D. et al. Inhibitory effects of silver nanoparticles on photosystem II performance in

Lemna gibba probed by chlorophyll fluorescence. **Current plant biology**, [S.L.], v. 16, p. 15-21, dez. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cpb.2018.11.006>.

DHAWAN, A.; SHARMA, V.; PARMAR, D. **Nanomaterials: A challenge for toxicologists**. **Nanotoxicology**, Índia, p. 1-9. 11 jan. 2009. Disponível em: . Acesso em: 13 jan. 2018.

DOMINGUES, D.F. e BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos Aquáticos. Cap. 7, p: 153-184. 2006. In: ZAGATO, P.A. e BERTOLETTI, E. 2006. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. ZAGATTO e BERTOLETTI (org.) São Carlos: Rima; 2006.

DONALDSON, K.; A POLAND, C. Nanotoxicity: challenging the myth of nano-specific toxicity. **Current opinion in biotechnology**, [s.l.], v. 24, n. 4, p.724-734, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2013.05.003>.

DROST, W.; MATZKE, M.; BACKHAUS, T. Heavy metal toxicity to Lemna minor: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. **Chemosphere**, Alemanha, p. 36-43. 08 dez. 2006.

EUROPEAN CHEMICALS BUREAU (ECB). **Toxicology Data Network**. 2005. Disponível em: <<http://esis.jrc.ec.europa.eu/>>. Acesso em: 04 fev. 2020

FABREGA, Julia et al. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. **Environment international**, [S.L.], v. 37, n. 2, p. 517-531, fev. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2010.10.012>.

FAORO, F.; IRITI, M. Plant cell death and cellular alterations induced by ozone: key studies in mediterranean conditions. **Environmental pollution**, [S.L.], v. 157, n. 5, p. 1470-1477, maio 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.09.026>.

FELDHEIM, D.L.; FOSS C.A., **Metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications**. 2002, Nova York: Marcel Dekker. ix, 338 p.

FIRSOV, A. et al. Expression and immunogenicity of M₂e ieptide of *Avian influenza virus* H₅N₁ fused to ricin toxin B chain produced in duckweed plants. **Frontiers in chemistry**, [s.l.], v. 6, p.1-11, 13 fev. 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fchem.2018.00022>.

FOLEY, S.; CROWLEY, C.; SMAIHI, M.; BONFILS, C.; ERLANGER, B. F; SETA, P.; LARROQUE, C.. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. **Biochemical and biophysical research communications**, [S.L.], v. 294, n. 1, p. 116-119, maio 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x\(02\)00445-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0006-291x(02)00445-x).

FORNI, C.; TOMMASI, F. Duckweed: a tool for ecotoxicology and a candidate for phytoremediation. **Current biotechnology**. S.i., p. 2-10. 12 out. 2016.

FUZINATTO, C. F. **Avaliação toxicológica em peixes da espécie *Oreochromis niloticus* expostos às águas do Rio Cubatão do Sul/SC: Estudo genotóxico, epigenético e de**

estresse oxidativo. 2013. 149 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

GAHAN, E. **Plant histochemmistry and cytochemestry: An introduction.** 1984. London: Academic Press.

GARCIA, M. V. D. **Síntese, caracterização e estabilização de nanopartículas de prata para aplicações bactericidas em têxteis.** 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

GE, X. et al. Growing *Lemna minor* in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to ethanol. **Bioresource technology.**.. EUA, p. 485-488. 19 ago. 2012.

GLOBAL MARKET INSIGHTS (GMI). **Silver Nanoparticles Market Size By Application (Healthcare & Lifesciences, Textiles, Electronics & IT, Food & Beverage), Industry Analysis Report, Regional Outlook (U.S., Canada, Germany, UK, France, Italy, Spain, Poland, Russia, Netherlands, China, India, Japan, South Korea, Australia, Indonesia, Malaysia, Brazil, Argentina, Mexico, Saudi Arabia, UAE, South Africa), Growth Potential, Price Trends, Competitive Market Share & Forecast, 2018 - 2024.** 2018. Disponível em: <<https://www.giiresearch.com/report/gmi555348-silver-nanoparticles-market-size-by-application.html>>. Acesso em: 04 fev. 2020.

GOMES, A.J. et al. Evaluation of nanoparticles loaded with benzopsoralen in rat peritoneal exudate cells. **International journal of pharmaceutics**, [s.l.], v. 332, n. 1-2, p.153-160, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.09.035>.

GONÇALVES, R. A. et al. Comparative assessment of toxicity of ZnO and amine-functionalized ZnO nanorods toward *Daphnia magna* in acute and chronic multigenerational tests. **Aquatic toxicology**, v. 197, n. February, p. 32–40, 2018.

GÖNEN, Ç. Enhancing Bioconversion Potential of Duckweed by Acid and Hydrogen Peroxide Pretreatment Methods to Improve Biofuel Productivity. **Sugar tech**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.474-481, 16 out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12355-017-0558-y>.

GHORBANI, H. R. et al., Biological and non-biological methods for silver nanoparticles synthesis. **Chemical biochemical engineering**, v.25, n. 3, p. 317–326, 2011.

GORDON, E. M., McCANDLESS, E. L.: Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. **Proc. Nova Scot. Inst. Sci.**, in press (1973).

GOTTSCHALK, F. et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. **Environmental science and technology**, v. 43, n. 24, p. 9216–9222, 2009.

GOUVÊA, D., MURAD, B.B.S. Dispersão e empacotamento de partículas - Princípios e aplicações em processamento cerâmico. **Cerâmica**, [S.L.], v. 47, n. 301, p. 66-66, mar. 2001. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0366-69132001000100010>.

GOUVEIA, C.; KREUSCH, M.; SCHMIDT, É. C.; FELIX, M. R. de L.; OSORIO, L. K.P.; PEREIRA, D. T.; SANTOS, R. dos; OURIQUES, L. C.; MARTINS, R. de P.; LATINI, Al. The Effects of Lead and Copper on the Cellular Architecture and Metabolism of the Red Alga *Gracilaria domingensis*. **Microscopy and microanalysis**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 513-524, 3 abr. 2013. Cambridge University Press (CUP).
<http://dx.doi.org/10.1017/s1431927613000317>.

GRAVANO, E.; GIULIETTI, V.; DESOTGIU, R.; BUSSOTTI, F.; GROSSONI, P.; GEROSA, G.; TANI, C.. Foliar response of an *Ailanthus altissima* clone in two sites with different levels of ozone-pollution. **Environmental pollution**, [S.L.], v. 121, n. 1, p. 137-146, jan. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0269-7491\(02\)00180-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0269-7491(02)00180-x).

GRIFFITT, R. J. et al. Comparison of molecular and histological changes in Zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles. **Toxicological sciences**, [s.l.], v. 107, n. 2, p.404-415, 10 dez. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfn256>.

GUBBINS, E. J.; BATTY, L. C.; LEAD, J. R. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. **Environmental pollution**, v. 159, n. 6, p. 1551–1559, 2011.

HISCOX, J. D. & ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian journal botany**, 57: 1332-1334. 1979.

HOLBEN, B. N.; TUCKER, C. J.; FAN, C. J. Spectral assessment of soybean leaf area and leaf biomass. **Photogrammetric engineering & remote sensing**. S.I, p. 651-656. 1980.

HOLZINGER, A. et al. Algae and UV irradiation: effects on ultrastructure and related metabolic functions. **Micron**, [S.L.], v. 37, n. 3, p. 190-207, abr. 2006. Elsevier BV.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.micron.2005.10.015>.

HONG, Jeong-Sup et al. Combined repeated-dose toxicity study of silver nanoparticles with the reproduction/developmental toxicity screening test. **Nanotoxicology**, [s.l.], v. 8, n. 4, p.349-362, 19 mar. 2013. Informa UK Limited.
<http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2013.780108>.

HORIKOSHI, S.; SERPONE, N. Introduction to nanoparticles. In: HORIKOSHI, S.; SERPONE, N. **Microwaves in nanoparticle synthesis: fundamentals and applications**. [S.L.]: Wiley Online Library, 2013. p. 1-23.

HOSSAIN, M. A.; BHATTACHARJEE, S.; ARMIN, Saed-Moucheshi; QIAN, P.; XIN, W.; LI, Hong-Yu; BURRITT, D. J.; FUJITA, M.; TRAN, Lam-Son P.. Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. **Frontiers in plant science**, [S.L.], v. 6, p. 1-19, 16 jun. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fpls.2015.00420>.

HSIAO, I-Lun et al. Trojan-horse mechanism in the cellular uptake of silver nanoparticles verified by direct intra- and extracellular silver speciation analysis. **Environmental science & technology**, [S.L.], v. 49, n. 6, p. 3813-3821, 27 fev. 2015. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es504705p>.

ISO/DIS 20079. International Organization for Standardization/Draft International Standard. **Water quality-Determination of toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*)-Duckweed growth inhibition test**, n. ISO/TC 147/SC 5, p. 1–23, 2005.

JACOB, Claus. Inspired by Nature: antioxidants and nanotechnology. : Antioxidants and nanotechnology. **Antioxidants**, [s.l.], v. 7, n. 8, p. 101-103, 29 jul. 2018. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/antiox7080101>.

JIANG, Hong-Sheng et al. Physiological analysis of silver nanoparticles and AgNO₃ toxicity to *Spirodela polyrhiza*. **Environmental toxicology and chemistry**, [S.L.], v. 31, n. 8, p. 1880-1886, 29 jun. 2012. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.1899>.

JIANG, Hong-Sheng et al. Silver nanoparticles induced accumulation of reactive oxygen species and alteration of antioxidant systems in the aquatic plant *Spirodela polyrhiza*. **Environmental toxicology and chemistry**, [S.L.], v. 33, n. 6, p. 1398-1405, 16 abr. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2577>.

JIANG, X. et al. Fast intracellular dissolution and persistent cellular uptake of silver nanoparticles in CHO-K1 cells: implication for cytotoxicity. **Nanotoxicology**, n. 9:2, p. 181–189, 2015.

JO, E. et al. Exposure to zinc oxide nanoparticles affects reproductive development and biodistribution in offspring rats. **The journal of toxicological sciences**, [s.l.], v. 38, n. 4, p.525-530, 2013. Japanese Society of Toxicology. <http://dx.doi.org/10.2131/jts.38.525>.

JONES, O. A. H. et al. Potential Ecological and Human Health Risks Associated With the Presence of Pharmaceutically Active Compounds in the Aquatic Environment. **Critical reviews in toxicology**, [S.L.], v. 34, n. 4, p. 335-350, jan. 2004. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/10408440490464697>.

JUDY, J. D.; UNRINE, J. M.; BERTSCH, P. M. Evidence for biomagnification of gold nanoparticles within a terrestrial food chain. **Environmental science & technology**, [s.l.], v. 45, n. 2, p.776-781, 15 jan. 2011. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es103031a>.

KAEGI, R. et al. Fate and transformation of silver nanoparticles in urban wastewater systems. **Water Research**, [s.l.], v. 47, n. 12, p.3866-3877, ago. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.060>.

KAMAT, J. Reactive oxygen species mediated membrane damage induced by fullerene derivatives and its possible biological implications. **Toxicology**, [S.L.], v. 155, n. 1-3, p. 55-61, 30 nov. 2000. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0300-483x\(00\)00277-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0300-483x(00)00277-8).

KARLSSON, H. L. et al. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—A comparison between nano- and micrometer size. **Toxicology letters**, [s.l.], v. 188, n. 2, p.112-118, jul. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.03.014>.

KHALIL, A. M. Physiological and genotoxic responses of the earthworm *Aporrectodea caliginosa* exposed to sublethal concentrations of AgNP. **The journal of basic & applied zoology**, [s.l.], v. 74, p.8-15, mar. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobaz.2015.12.004>.

KHAN; RAZA; KHALID; AWAN; RAJA; ZHANG; MIN; HASSAN; HUANG. Physiological and biochemical responses of pearl millet (*Pennisetum glaucum L.*) Seedlings exposed to silver nitrate (AgNO₃) and silver nanoparticles (AgNP). **International journal of environmental research and public health**, [S.L.], v. 16, n. 13, p. 2261, 26 jun. 2019. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph16132261>.

KHANNA, V. K. Nanomaterials and Their Properties. **Nanoscience and technology**, [s.l.], p. 25-41, 2016. Springer India. http://dx.doi.org/10.1007/978-81-322-3625-2_3

KHELLAF, N.; ZERDAOUI, M. Growth response of the duckweed *Lemna gibba L.* to copper and nickel phytoaccumulation. **Ecotoxicology**, Algeria, p. 1363-1368. 01 ago. 2010

KIM, J. S. et al. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, [s.l.], v. 3, n. 1, p.95-101, mar. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2006.12.001>.

KIM, Y. S. et al. Twenty-eight-day oral toxicity, genotoxicity, and gender-related tissue distribution of silver nanoparticles in sprague-dawley rats. **Inhalation toxicology**, [s.l.], v. 20, n. 6, p.575-583, jan. 2008. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/08958370701874663>.

KIM, Ki-tae et al. Silver nanoparticle toxicity in the embryonic zebrafish is governed by particle dispersion and ionic environment. **Nanotechnology**, [s.l.], v. 24, n. 11, p. 115101, 28 fev. 2013. IOP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/24/11/115101>.

KITTLER, S. et al. Toxicity of silver nanoparticles increases during storage because of slow dissolution under release of silver ions. **Chemistry of materials**, [s.l.], v. 22, n. 16, p.4548-4554, 24 ago. 2010. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/cm100023p>.

KLAINÉ, Stephen J. et al. Critical review nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. : Behavior, fate, bioavailability, and effects. **Environmental toxicology and chemistry**. [si], p. 1825-1851. 14 maio 2008.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B.. **Testes toxicológicos - Métodos, técnicas e aplicações**. 2ª Florianópolis: Agência Alemã de Cooperação Técnica - Gtz, 2004. 288 p.

KÖHLER, A. R. et al. Studying the potential release of carbon nanotubes throughout the application life cycle. **Journal of cleaner production**, [S.L.], v. 16, n. 8-9, p. 927-937, maio 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jclepro.2007.04.007>.

KRUPA, S.; MCGRATH, M. T.; ANDERSEN, C. P.; BOOKER, F. L.; BURKEY, K. O.; CHAPPELKA, A. H.; CHEVONE, B. I.; PELL, E. J.; ZILINSKAS, B. A. Ambient Ozone

and Plant Health. **Plant disease**, [S.L.], v. 85, n. 1, p. 4-12, jan. 2001. Scientific societies. <http://dx.doi.org/10.1094/pdis.2001.85.1.4>.

LALAU, C. M. **Avaliação da toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre através de macrófitas da espécie *Landoltia punctata***. 2014. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

LALAU, C. M. et al. Toxicological effects of copper oxide nanoparticles on the growth rate, photosynthetic pigment content, and cell morphology of the duckweed *Landoltia punctata*. **Protoplasma**, v. 252, n. 1, p. 221–229, 2015.

LALAU, C. M. et al. Toxicological effects of AgNP on duckweed (*Landoltia punctata*). **Science of the total environment**, [s.l.], v. 710, p. 136318, mar. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136318>.

LANDA, P. et al. Nanoparticle-specific changes in *Arabidopsis thaliana* gene expression after exposure to ZnO, TiO₂, and fullerene soot. **Journal of hazardous materials**, [s.l.], v. 241-242, p.55-62, nov. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.08.059>.

LANDESMAN, L. et al. Plant Nutrient Phytoremediation Using Duckweed. **Eutrophication: causes, consequences and control**, [S.L.], p. 341-354, 2010. Springer Netherlands. http://dx.doi.org/10.1007/978-90-481-9625-8_17.

LANDOLT, E. 1986. Biosystematic investigations in the family of duckweeds (*Lemnaceae*) - **The family of lemnaceae: a monographic study** v.1. Veröff. geobot. Inst., Zürich 71:1-566.

LEE, P. C.; MEISEL, D. Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. **The journal of physical chemistry**, [s.l.], v. 86, n. 17, p.3391-3395, ago. 1982. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/j100214a025>.

LEEGOOD, R. C. *et al.* **An overview of pathways and mechanisms, in: photosynthesis: physiology and metabolism**. Illinois: Kluwer Academic Publishers, 2000. 625 p.

LES, D. H.; CRAWFORD, D. J. *Landoltia (Lemnaceae)*, a new genus of duckweeds. **Novon**, [s.l.], v. 9, n. 4, p.530-533, 1999. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/3392157>.

LEVAR, C. et al. Environmental transformations of silver nanoparticles: Impact on stability and toxicity. **Environmental science and technology**, v. 46, n. 13, p. 6900–6914, 2012.

LEVAR, C. et al. Sulfidation of silver nanoparticles: Natural antidote to their toxicity. **Environmental science and technology**, v. 47, n. 23, p. 13440–13448, 2013.

LI, C.-cheng et al. Mechanistic understanding of reduced AgNP phytotoxicity induced by extracellular polymeric substances. **Journal of hazardous materials**, [s.l.], v. 308, p.21-28, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.036>.

LIN, D.; XING, B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root

growth. **Environmental pollution**, [s.l.], v. 150, n. 2, p.243-250, nov. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2007.01.016>.

LINDEMANN, P. A. **Colloidal silver: a closer look**. A closer look. 1997. Disponível em: http://www.free-energy.ws/pdf/cs_closer_look.pdf. Acesso em: 26 jun. 2020.

LOPES, J. R. **Síntese de nanopartículas de prata (NP_{Ag}) em soluções aquosas de fibroína de seda e gelatina**. 2017. 115 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Mecânica, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2017.

LOWRY, G. V. et al. Transformations of nanomaterials in the environment. **Environmental science and technology**, v. 46, n. 13, p. 6893–6899, 2012.

LYDDY, R. Nanotechnology. **Information Resources In Toxicology**, [s.l.], p.321-328, 2009. Elsevier. <http://dx.doi.org/10.1016/b978-0-12-373593-5.00036-7>.

LUOMA, S. M. **Silver nanotechnologies and the environment: old problems and new challenges?** [S.I.]: Woodrow Wilson international center for scholars or the pew charitable trusts, 2008. 72 p.

LUOMA, S. M.; RAINBOW, P. S. Why is Metal Bioaccumulation so Variable? Biodynamics as a Unifying Concept. **Environmental Science and Technology**, v. 39, n. 7, p. 1921-1931, 2005.

MA, X. et al. Interactions between engineered nanoparticles (ENP) and plants: Phytotoxicity, uptake and accumulation. **Science of the total environment**, [s.l.], v. 408, n. 16, p.3053-3061, 15 jul. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2010.03.031>.

MANDI, U. et al. Mesoporous polyacrylic acid supported silver nanoparticles as an efficient catalyst for reductive coupling of nitrobenzenes and alcohols using glycerol as hydrogen source. **Journal of colloid and interface science**, v. 472, p. 202–209, 2016.

MAHDAVINIA, G. R. et al. Semi-IPN carrageenan-based nanocomposite hydrogels: synthesis and swelling behavior. : Synthesis and swelling behavior. **Journal of applied polymer science**, [s.l.], v. 118, n. 5, p. 2989-2997, 1 jul. 2010. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/app.32700>.

MARAMBIO-JONES, C.; HOEK, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. **Journal of nanoparticle research**, [s.l.], v. 12, n. 5, p.1531-1551, 23 mar. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-010-9900-y>.

MARTINS, M. C. **Avaliação genotóxica em hortaliças cultivadas em áreas de exploração de carvão: Potencial mutagênico e riscos a saúde humana**. [s.l.] University of Extrem South Catariense, 2014.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico. **Quim. Nova**. S.i., p. 1434-1446. 15 jun. 2012.

MATIAS, M.S. et al. Synthetic wastewaters treatment by electrocoagulation to remove silver nanoparticles produced by different routes. **Journal of environmental management**, [S.L.], v. 159, p. 147-157, ago. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2015.05.006>.

MARTINS, P.; DULLEY, R.; RAMOS, S. **Nanotecnologias na indústria de alimentos**. p. 1–15, 2011.

MATIAS, W. G. **Apostila de toxicologia ambiental**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. 2018.

McCULLY, M.E. 1970. The histologia localization of the structural polysaccharides of seaweeds. **Ann. N. Y. Sci.** 175;702-711.

MCGILLICUDDY, E. et al. Silver nanoparticles in the environment: Sources, detection and ecotoxicology. **Science of the total environment**, v. 575, p. 231–246, 2017.

MELO JUNIOR, Maurício Alves et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, [S.L.], v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2012. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422012000900030>.

MESSIAS, T. G. **Influência da toxicidade da água e do sedimento dos rios São Joaquim e Ribeirão Claro na Bacia do Corumbataí**. 2008. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Centro de Energia Nuclear Na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

METCALF, L.; EDDY, H. P., 2003. **Wastewater engineering: Treatment and reuse**. 4^a ed., editora. McGraw Hill College, New York, 2003.

MIAO, A. J. et al. Intracellular uptake: A possible mechanism for silver engineered nanoparticle toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica*. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. 6–13, 2010.

MINOGIANNIS, P. et al. Toxicity of pure silver nanoparticles produced by spark ablation on the aquatic plant *Lemna minor*. **Journal of aerosol science**, [S.L.], v. 128, p. 17-21, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaerosci.2018.11.003>.

MOHEDANO, R. A. **Uso de macrófitas lemnáceas (*Landoltia punctata*) no polimento e valorização do efluente de suinocultura e na fixação de carbono**. 2010. 270 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MOHEDANO, R. A. et al. High nutrient removal rate from swine wastes and protein biomass production by full-scale duckweed ponds. **Bioresource technology**. Florianópolis, p. 98-104. 01 maio 2012.

MONICA, R. C.; CREMONINI, R. Nanoparticles and higher plants. **Caryologia**, [s.l.], v. 62, n. 2, p.161-165, jan. 2009. Informa UK Limited.

<http://dx.doi.org/10.1080/00087114.2004.10589681>.

MUELLER, N. C.; NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. Supporting information. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 12, p. 4447–4453, 2008.

NAIDU, S. L.; MOOSE, S. P.; AL-SHOAIBI, A. K.; RAINES, C. A.; LONG, . P.. Cold tolerance of C4 photosynthesis in *Miscanthus × giganteus*: adaptation in amounts and sequence of c4 photosynthetic enzymes. **Plant physiology**, [S.L.], v. 132, n. 3, p. 1688-1697, 19 jun. 2003. American Society of Plant Biologists (ASPB).
<http://dx.doi.org/10.1104/pp.103.021790>.

NAVARRO, E. et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 372–386, 2008.

NOVAK, K.; SKELLY, J. M.; SCHAUB, M.; KRÄUCHI, N.; HUG, C.; LANDOLT, W.; BLEULER, P. Ozone air pollution and foliar injury development on native plants of Switzerland. **Environmental pollution**, [S.L.], v. 125, n. 1, p. 41-52, set. 2003. Elsevier BV.
[http://dx.doi.org/10.1016/s0269-7491\(03\)00085-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0269-7491(03)00085-x).

OECD. **OECD Guidelines for the testing of chemicals. Introduction Test**, 2007.

OUKARROUM, A. et al. Silver nanoparticle toxicity effect on growth and cellular viability of the aquatic plant *Lemna gibba*. **Environmental toxicology and chemistry**, [s.l.], v. 32, n. 4, p.902-907, 27 fev. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2131>.

PACIONI, N. L. et al. Synthetic routes for the preparation of silver nanoparticles: a mechanistic perspective. In: ALARCON, E. I. **Silver nanoparticle applications, engineering materials**. [S.I.]: Springer international publishing, 2015. p. 13-46.

PADILHA, A. F. **Microscopia Eletrônica de Transmissão**. Engenharia Metalúrgica e de Materiais da EPUSP. Disponível em:
<http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_3_MET_PMI-2201.pdf>. Acesso em: 14 fev. 2020.

PAL, S.; TAK, Y. K.; SONG, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. **Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 42, p. 1712–1720, 2015.

PANÁČEK, A. et al. Silver colloid nanoparticles: Synthesis, characterization, and their antibacterial activity. **Journal of physical chemistry B**, v. 110, n. 33, p. 16248–16253, 2006.

PARFREY, L. W.; LAHR, D. J. G.; KATZ, L. A. The dynamic nature of eukaryotic genomes. **Molecular biology and evolution**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.787-794, 14 fev. 2008. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/molbev/msn032>.

PEDROSO, A. N. V. **Alterações estruturais, ultraestruturais e histoquímicas em folhas de *Nicotiana tabacum* "Bel-W3" (Solanaceae)**. 2009. 88 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia, Instituto de Botânica, São Paulo, 2009.

- PENG, L. et al. Microwave-assisted deposition of silver nanoparticles on bamboo pulp fabric through dopamine functionalization. **Applied surface science**, v. 386, p. 151–159, 2016.
- PEREIRA, S. P. P. et al. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor*: Surface coating and exposure period-related effects. **Science of the total environment**, [s.l.], v. 618, p.1389-1399, mar. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.09.275>.
- PERREAULT, F. et al. Evaluation of copper oxide nanoparticles toxicity using chlorophyll *a* fluorescence imaging in *Lemna gibba*. **Journal of botany**, [S.L.], v. 2010, p. 1-9, 20 set. 2010. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2010/763142>.
- PERREAULT, F.; POPOVIC, R.; DEWEZ, D. Different toxicity mechanisms between bare and polymer-coated copper oxide nanoparticles in *Lemna gibba*. **Environmental pollution**, [s.l.], v. 185, p.219-227, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.027>.
- PERREAULT, F.; SAMADANI, M.; DEWEZ, D. Effect of soluble copper released from copper oxide nanoparticles solubilisation on growth and photosynthetic processes of *Lemna gibba* L. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 4, p. 374–382, 2014.
- PHAM, Q.T. et al. Enhancement of critical heat flux using nano-fluids for In vessel Retention– External Vessel Cooling. **Applied thermal engineering**, [s.l.], v. 35, p.157-165, mar. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.applthermaleng.2011.10.017>.
- PICCINNO, F. et al. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. **Journal of nanoparticle research**, [s.l.], v. 14, n. 9, p.1-11, 19 ago. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-012-1109-9>.
- PORTER, A. L.; YOUTIE, J.. How interdisciplinary is nanotechnology? **Journal of nanoparticle research**, [s.l.], v. 11, n. 5, p. 1023-1041, 6 mar. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-009-9607-0>.
- POTT, J. V.; CERVI, A. C. A família Lemnaceae Gray no Pantanal (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul), Brasil 1 plantas , é uma família problemática e de difícil distribuição geográfica (Landolt 1980). Apresenta são tropical e subtropical na América do Sul . No Brasil , a fa. **Revista brasileira de biociências**, v. 22, n. 2, p. 153–174, 1999.
- POTT, V. J.; POTT, A. **Potencial de uso das plantas aquáticas na despoluição da água**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002.
- POWERS, K. W. et al. Forum series: Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation. **Toxicological sciences**, Estados Unidos, p. 292-303. 11 jan. 2006.
- PROPESQ/UFSC, Pró Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina. **Galeria de convênio**. 2020. Disponível em: <https://propesq.ufsc.br/galeria-convenio-01-10-0603-03/>. Acesso em: 05 abr. 2020.

PUERARI, R. C. et al. Synthesis, characterization and toxicological evaluation of Cr₂O₃ nanoparticles using *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 128, p. 36–43, 2016.

PULIT-PROCIAK, J.; BANACH, M.. Silver nanoparticles – a material of the future...? **Open chemistry**, [s.l.], v. 14, n. 1, p. 76-91, 1 jan. 2016. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/chem-2016-0005>.

QIAN, H. et al. Comparison of the toxicity of silver nanoparticles and silver ions on the growth of terrestrial plant model *Arabidopsis thaliana*. **Journal of environmental sciences**, [s.l.], v. 25, n. 9, p.1947-1956, set. 2013. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1001-0742\(12\)60301-5](http://dx.doi.org/10.1016/s1001-0742(12)60301-5).

QIU, G. et al. Effect of titanium dioxide nanoparticles on system performance and microbial community dynamics in a sequencing batch reactor. **Journal of cleaner production**, v. 130, p. 1–14, 2015.

QUINA, F. H.. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, [S.L.], v. 27, n. 6, p. 1028-1029, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-40422004000600031>.

RADIĆ, S. et al. Toxicity of nanosilver and fumonisin B1 and their interactions on duckweed (*Lemna minor L.*). **Chemosphere**, [S.L.], v. 229, p. 86-93, ago. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.004>.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology advances**, v. 27, n. 1, p. 76–83, 2009.

RAND, G. M.; WELLS, P. G. & MCCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G.M. (ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment**. 2nd edition. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis. p. 1.125, 1995

RATTE, H. T. Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 18, n. 1, p. 89–108, 1999.

REDDY, K. M. et al. Selective toxicity of zinc oxide nanoparticles to prokaryotic and eukaryotic systems. **Applied physics letters**, [s.l.], v. 90, n. 21, p.213902-2139023, 21 maio 2007. AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.2742324>.

REIDY, B. et al. Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications. **Materials**, v. 6, n. 6, p. 2295–2350, 2013.

RENN, O.; ROCO, M. C. Nanotechnology and the need for risk governance. **Journal of nanoparticle research**, v. 8, n. 2, p. 153–191, 2006.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy. 1963. **Journal cell biology**, 17: 208-212.

ROCO, M. C.; BAINBRIDGE, W. S. Societal implications of nanoscience and nanotechnology: Maximizing human benefit. **Journal of nanoparticle research**, v. 7, p. 1–13, 2005.

ROH, Ji-y. et al. Ecotoxicological investigation of CeO₂ and TiO₂ nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using gene expression, growth, fertility, and survival as endpoints. **Environmental toxicology and pharmacology**, [s.l.], v. 29, n. 2, p.167-172, mar. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2009.12.003>.

ROMERO-HERNÁNDEZ, J. A. et al. Tolerance and hyperaccumulation of a mixture of heavy metals (Cu, Pb, Hg, and Zn) by four aquatic macrophytes. **International journal of phytoremediation**, [S.L.], v. 19, n. 3, p. 239-245, 11 ago. 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2016.1207610>.

ROSSETTO, A. L. de O. F. **Estudo comparativo entre os efeitos tóxicos agudos e crônicos do óxido de cobre na forma de nanopartícula e micropartícula**. 2012. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

ROSSETTO, A. L. DE O. F. et al. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. **Science of the total environment**, v. 490, p. 807–814, 2014.

ROSSETTO, A. L. de O. F. **Avaliação dos efeitos tóxicos da nanopartícula e micropartícula de óxido de cobre em diferentes organismos aquáticos**. 2016. 166 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

ROSSI, V. S. Mecanismo antioxidante em plantas. In: AMOSTRA ACADÊMICA UNIMEP, 10., 2012, Piracicaba. **Anais**. Piracicaba: Unimep, 2012. p. 1 - 4. Disponível em: <<http://www.unimep.br/phpg/mostraacademica/anais/10mostra/4/31.pdf>>. Acesso em: 01 fev. 2020.

ROTTA, F. **Empresa baiana aumenta as vendas em 30% graças à nanotecnologia: A introdução de tecnologia nano em uma indústria de cosméticos garantiu um aumento de 30% nas vendas**. 2018. Disponível em: <<https://abdi.com.br/postagem/empresa-baiana-aumenta-as-vendas-em-30-gracas-a-nanotecnologia>>. Acesso em: 30 jan. 2020.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, biology, and medicine**, v. 3, n. 1, p. 20–31, 2007.

SANDALIO, L.M.; DALURZO, H.C.; GÓMEZ, M.; ROMERO-PUERTAS, M.C.; RÍO, L.A. del. Cadmium-induced changes in the growth and oxidative metabolism of pea plants. **Journal of experimental botany**, [S.L.], v. 52, n. 364, p. 2115-2126, 1 nov. 2001. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/jexbot/52.364.2115>.

SANTA CATARINA. Constituição (2009). Lei nº 14675, de 14 de abril de 2009. **Institui o**

código estadual do meio ambiente e estabelece outras providências. Florianópolis, SC, 14 abr. 2009.

SANTA CATARINA. Fundação do Meio Ambiente (FATMA) (2002). Portaria nº 017, de 18 de abril de 2002. **Estabelece os Limites Máximos de Toxicidade Aguda para efluentes de diferentes origens e dá outras providências.** Florianópolis, SC, 18 abr. 2002.

SANTO, N. et al. Toxic effects and ultrastructural damages to *Daphnia magna* of two differently sized ZnO nanoparticles: Does size matter?. **Water research**, [s.l.], v. 53, p.339-350, abr. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.036>.

SASMAZ, M.; OBEK, E.; SASMAZ, A. The accumulation of La , Ce and Y by *Lemna minor* and *Lemna gibba* in the Keban gallery water, Elazig Turkey. v. 32, n. 1996, p. 75–83, 2018.

SASMAZ, A; OBEK, E. The accumulation of silver and gold in *Lemna gibba* L. exposed to secondary effluents. **Geochemistry**, [S.L.], v. 72, n. 2, p. 149-152, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemer.2011.11.007>.

SCHIERHOLZ, J. M. et al. Silver-Containing Polymers. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 43, n. 11, p.2819-2821, 1 nov. 1999. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/aac.43.11.2819>.

SCHMIDT, E.C., SCARIOT, L.A., ROVER, T. & BOUZON, Z.L. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. 2009. **Micron**, 40: 860-869.

SCHMIDT, E. C.. **Respostas biológicas de macroalgas vermelhas submetidas à radiação ultravioleta-B: Análises bioquímicas, celulares e fisiológicas.** 2011. 180 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia, Departamento de CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SCHMIDT, J. R. A. et al. Probabilistic model for assessing occupational risk during the handling of nanomaterials. **Nanotoxicology**, [S.L.], v. 14, n. 9, p. 1258-1270, 10 set. 2020. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17435390.2020.1815094>.

SCHREINER, O.; REED, H. S. The power of sodium nitrate and calcium carbonate to decrease toxicity in conjunction with plants growing in solution cultures. **Journal of the american chemical society**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.85-97, jan. 1908. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/ja01943a013>.

SIS, 1995. Water quality – **Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor***, Duckweed SS 02 82 13. Swedish Institute of Standards, Stockholm, Sweden.

SERVIN, A. D. et al. Synchrotron micro-XRF and micro-XANES confirmation of the uptake and translocation of TiO₂ nanoparticles in cucumber (*Cucumis sativus*) plants. **Environmental science & technology**, [s.l.], v. 46, n. 14, p.7637-7643, 5 jul. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/es300955b>.

SEVERI A., FORNASIERO R. B. Preliminary SEM observations of stomatal apparatus in *Spirodela oligorrhiza* (Kurz) Hegelm: in darkness and in light. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Alemanha, p. 400-401. 1982.

SEVERI A., FORNASIERO R. B. Effects of metabolic inhibitors and inophores on the stomatal apparatus in *Spirodela oligorrhiza* (Kurz) Hegelm. and *Lemna minor*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Alemanha, p. 39-46. 1983b.

SHAHVERDI, A. R. et al. Synthesis and effect of silver nanoparticles on the antibacterial activity of different antibiotics against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Nanomedicine: Nanotechnology, biology, and medicine**, v. 3, n. 2, p. 168–171, 2007.

SHARMA, S. S.; R, J.P. GAUR. Potential of *Lemna polyrrhiza* for removal of heavy metals. **Ecological engineering**, India, p. 37-43. 23 ago. 1994.

SHI, J. et al. To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution. **Environmental pollution**, [s.l.], v. 159, n. 5, p.1277-1282, maio 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2011.01.028>.

SHU, S. et al. Effects of exogenous spermine on chlorophyll fluorescence, antioxidant system and ultrastructure of chloroplasts in *Cucumis sativus* L. under salt stress. **Plant physiology and biochemistry**, [S.L.], v. 63, p. 209-216, fev. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.11.028>.

SIDDIQI, K. S.; HUSEN, A. Plant response to engineered metal oxide nanoparticles. **Nanoscale research letters**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.1-18, 6 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s11671-017-1861-y>.

SIEGEL, R. et al. **Nanostructure science and technology. A worldwide study. Prepared under the guidance of the IWGN, NSTC. WTEC**, 1999. Disponível em: <https://apps.dtic.mil/docs/citations/ADA418342>

SIMIONI, C. et al. Effects of Ultraviolet Radiation (UVA+UVB) on Young Gametophytes of *Gelidium floridanum*: Growth Rate, photosynthetic pigments, carotenoids, photosynthetic performance, and ultrastructure. **Photochemistry and photobiology**, [s.l.], p.1050-1060, jun. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/php.12296>.

SIRELKHATIM, A. et al. Review on zinc oxide nanoparticles: Antibacterial activity and toxicity mechanism. **Nano-micro letters**, [s.l.], v. 7, n. 3, p.219-242, 19 abr. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s40820-015-0040-x>

SKILLICORN, P. W.; SPIRA, W; JOURNEY, W.. **Duckweed aquaculture, a new aquatic farming system for developing countries**. The World Bank, Washington, D.C.1993.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **Journal of colloid and interface science**, v. 275, n. 1, p. 177–182, 2004.

SONG, G. et al. Effects of CuO nanoparticles on *Lemna minor*. **Botanical studies**, [s.l.], v. 57, n. 1, p.1-8, 27 jan. 2016. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40529-016-0118-x>.

SONGSHAN WANG, JITAO LV, JINGYUAN MA, S. Z. Cellular internalization and intracellular biotransformation of silver nanoparticles in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Nanotoxicology**, n. 10:8, p. 1129–1135, 2016.

SPURR, A. R. A low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. 1969. **Journal ultrastructure research**, 26: 31-43.

STARNEs, D. L. et al. Impact of sulfidation on the bioavailability and toxicity of silver nanoparticles to *Caenorhabditis elegans*. **Environmental pollution**, v. 196, p. 239–246, 2015.

STEGEMEIER, J. P. et al. Uptake and Distribution of Silver in the Aquatic Plant *Landoltia punctata* (Duckweed) Exposed to Silver and Silver Sul fi de Nanoparticles. 2017.

STOUT, L. M.; DODOVA, E. N.; TYSON, J. F.; NÜSSLEIN, K.. Phytoprotective influence of bacteria on growth and cadmium accumulation in the aquatic plant *Lemna minor*. **Water research**, [S.L.], v. 44, n. 17, p. 4970-4979, set. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2010.07.073>.

STUMPE, A R. Toxicity of diborane in high concentrations. **Ama Arch Ind Health**. [S. I.], p. 519-524. 12 nov. 1960.

SUKHANOVA, A. et al. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. **Nanoscale research letters**, [s.l.], v. 13, n. 1, p.1-21, 7 fev. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s11671-018-2457-x>.

SUN, T. Y. et al. Comprehensive probabilistic modelling of environmental emissions of engineered nanomaterials. **Environmental pollution**, [s.l.], v. 185, p.69-76, fev. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.004>.

TKALEC, M.; PREBEG, T.; ROJE, V.; PEVALEK-KOZLINA, B.; LJUBEĹIĆ, N.. Cadmium-induced responses in duckweed *Lemna minor* L. **Acta physiologiae plantarum**, [S.L.], v. 30, n. 6, p. 881-890, 1 jul. 2008. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-008-0194-y>.

THERON, J.; WALKER, J. A.; CLOETE, T. E. Nanotechnology and water treatment: Applications and emerging opportunities. **Critical reviews in microbiology**, v. 34, n. 1, p. 43–69, 2008.

TREVIZANI, T. H. **Bioacumulação de metais pesados e avaliação da biomagnificação na biota da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica**. 2014. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Oceanografia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

TRIPATHI, D. K. et al. Uptake , Accumulation and Toxicity of Silver Nanoparticle in Autotrophic Plants , and Heterotrophic Microbes : A Concentric Review. v. 8, n. January, p.

1–16, 2017.

ÜÇÜNCÜ, E. et al. Chemosphere Effects of laser ablated silver nanoparticles on *Lemna minor*. v. 108, p. 251–257, 2014.

US - FDA (US FOOD & DRUG). **Nanotechnology Programs at FDA**. 2020. Disponível em: <https://www.fda.gov/science-research/science-and-research-special-topics/nanotechnology-programs-fda>. Acesso em: 02 ago. 2020.

VAN GENUCHTEN, M.; HATTON, L. Compound annual growth rate for software. **Ieee software**, [S.L.], v. 29, n. 4, p. 19-21, jul. 2012. Institute of electrical and electronics engineers (IEEE). <http://dx.doi.org/10.1109/ms.2012.79>.

VANCE, M. E. et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein journal of nanotechnology**, v. 6, n. 1, p. 1769–1780, 2015.

VARGA, M. et al. Physiological and biochemical effect of silver on the aquatic plant *Lemna gibba L.*: evaluation of commercially available product containing colloidal silver. **Aquatic toxicology**, [S.L.], v. 207, p. 52-62, fev. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.11.018>.

VARNER, K. **State of the science literature review: everything nanosilver and more**. 2010. Disponível em: <https://www.epa.gov/chemical-research/research-nanomaterials>. Acesso em: 26 jul. 2020.

VELICHKOVA, K. et al. **Bioaccumulation and protein content of lemna *Minuta kunth* and lemna *Valdiviana phil.* In Bulgarian water reservoirs**. 2017. Disponível em: <<http://landreclamationjournal.usamv.ro/pdf/2017/Art18.pdf>>. Acesso em: 02 fev. 2020.

VERMA, R.; SUTHAR, S.. Synchronized urban wastewater treatment and biomass production using duckweed *Lemna gibba L.* **Ecological engineering**. India, p. 337-343. 29 dez. 2013.

VERMA, R.; SUTHAR, S. Lead and cadmium removal from water using duckweed – *Lemna gibba L.*: impact of ph and initial metal load. **Alexandria engineering journal**, [S.L.], v. 54, n. 4, p. 1297-1304, dez. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aej.2015.09.014>.

VICENTINI, D. S. *et al.* Toxicological Evaluation and Quantification of Ingested Metal-Core Nanoplastic by *Daphnia magna* Through Fluorescence and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Methods. **Environmental toxicology and chemistry**, [S.L.], v. 38, n. 10, p. 2101-2110, 6 ago. 2019. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.4528>.

WALTERS, C.; POOL, E.; SOMERSET, V. Nanotoxicology: a review. **Toxicology - New aspects to this scientific conundrum**, [S.L.], p. 1-40, 26 out. 2016. InTech. <http://dx.doi.org/10.5772/64754>.

WANG, W. Literature review on duckweed toxicity testing. **Environmental research**, [s.l.],

v. 52, n. 1, p.7-22, jun. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0013-9351\(05\)80147-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0013-9351(05)80147-1).

WANG, H.; WICK, R. L.; XING, B. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al₂O₃ and TiO₂ to the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental pollution**, [s.l.], v. 157, n. 4, p.1171-1177, abr. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2008.11.004>.

WANG, S. et al. Cellular internalization and intracellular biotransformation of silver nanoparticles in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Nanotoxicology**, [s.l.], v. 10, n. 8, p.1129-1135, 16 maio 2016. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17435390.2016.1179809>.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophyll *a* and chlorophyll *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of plant physiology**, p. 307-313. 1994.

WIJNHOVEN, Susan W.p. et al. Nano-silver – a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. **Nanotoxicology**, [s.l.], v. 3, n. 2, p.109-138, jan. 2009. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/17435390902725914>.

WONG, K. K. Y.; LIU, X. Silver nanoparticles—the real “silver bullet” in clinical medicine? **Medchemcomm**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.125-131, 2010. Royal Society of Chemistry (RSC). <http://dx.doi.org/10.1039/c0md00069h>.

WONG, D.; PARASRAMPURIA, J. Polyvinyl Alcohol. **Analytical profiles of drug substances and excipients**, [s.l.], p.397-441, 1996. Elsevier. [http://dx.doi.org/10.1016/s0099-5428\(08\)60699-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0099-5428(08)60699-1).

XIU, Zong-ming et al. Negligible particle-specific antibacterial activity of silver nanoparticles. **Nano letters**, [s.l.], v. 12, n. 8, p.4271-4275, 9 jul. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/nl301934w>.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.112-115, abr. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.partic.2007.12.002>.

YADAV, Dipti et al. An assessment of duckweed as a potential lignocellulosic feedstock for biogas production. **International biodeterioration & biodegradation**, [s.l.], v. 119, p.253-259, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2016.09.007>.

YANG, X.Y.; EDELMANN, R.E.; ORIS, J.T. Suspended C60 nanoparticles protect against short-term UV and fluoranthene photo-induced toxicity, but cause long-term cellular damage in *Daphnia magna*. **Aquatic toxicology**, [s.l.], v. 100, n. 2, p.202-210, out. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.08.011>.

YANG, L.; WATTS, D. J. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. **Toxicology letters**, [s.l.], v. 158, n. 2, p.122-132, 14 ago. 2005. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.03.003>.

YE, X. et al. Physiological characterization and transcriptome analysis of a chlorosis mutant in pak choi. **Acta physiologiae plantarum**, [s.l.], v. 41, n. 7, p.1-13, 11 jun. 2019. Springer

Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11738-019-2907-9>.

YILMAZ, D. D.. Effects of salinity on growth and nickel accumulation capacity of *Lemna gibba* (Lemnaceae). **Journal of hazardous materials**. Turquia, p. 74-77. 27 dez. 2006.

YIN, Y. et al. The influence of light intensity and photoperiod on duckweed biomass and starch accumulation for bioethanol production. **Bioresource technology**, [s.l.], v. 187, p.84-90, jul. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.03.097>.

ZEZULKA, Š.; KUMMEROVÁ, M.; BABULA, P.; VÁŇOVÁ, L. Lemna minor exposed to fluoranthene: growth, biochemical, physiological and histochemical changes. **Aquatic Toxicology**, [S.L.], v. 140-141, p. 37-47, set. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.05.011>.

ZHAO, Y. et al. Potential of duckweed in the conversion of wastewater nutrients to valuable biomass: A pilot-scale comparison with water hyacinth. **Bioresource technology**, [s.l.], v. 163, p.82-91, jul. 2014. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.018>.

ZHAO, X. et al. Simultaneous saccharification and fermentation of steam exploded duckweed: Improvement of the ethanol yield by increasing yeast titre. **Bioresource technology**, [s.l.], v. 194, p.263-269, out. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2015.06.131>.

ZHAO, Z. et al. Duckweed diversity decreases heavy metal toxicity by altering the metabolic function of associated microbial communities. **Chemosphere**, [s.l.], v. 203, p.76-82, jul. 2018. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.03.175>.

ZIEGLER, P. et al. Relative in vitro growth rates of duckweeds (Lemnaceae) - the most rapidly growing higher plants. **Plant Biology**, [s.l.], v. 17, p.33-41, 6 maio 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/plb.12184>.

ZIEGLER, P.; SREE, K. S.; APPENROTH, Klaus-J. Duckweed biomarkers for identifying toxic water contaminants? **Environmental science and pollution research**, [S.L.], v. 26, n. 15, p. 14797-14822, 5 nov. 2018. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-018-3427-7>.

ZOU, X. et al. The different response mechanisms of *Wolffia globosa*: Light-induced silver nanoparticle toxicity. **Aquatic toxicology**, v. 176, p. 97–105, 2016.

APÊNDICE A
MEIO SIS USADO PELA OECD, (2002).

Substance	Concentration		Element	Stock solution
	Stock solution g/l	Medium ^a mg/l		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	15	75	NI ^b	II
NaNO ₃	8,5	85	NI	I
CaCl ₂ · 2H ₂ O	7,2	36	NI	III
Na ₂ CO ₃	4,0	20	NI	IV
KH ₂ PO ₄	1,34	13,4	NI	I
H ₃ BO ₃	1,0	1,0	NI	V
MnCl ₂ · 4H ₂ O	0,2	0,2	NI	V
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,010	0,010	NI	V
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0,050	0,050	NI	V
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,005	0,005	NI	V
Co(NO ₃) ₂ · 6H ₂ O	0,010	0,010	NI	V
Na ₂ EDTA	0,28	1,4	NI	VI ^c
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,168	0,84	NI	VI ^c
MOPS (buffer) ^d	490	490	NI	VII ^c
pH adjustment	Adjust to 6,5 ± 0,2 by addition of NaOH solution (6.4) or HCl (6.5).			
Sterilization	Sterilize stock solutions I to V by autoclaving (121 °C, 15 min) or by membrane filtration (pore diameter 0,2 µm) ; stock solutions VI (and optional VII) are sterilised by membrane filtration only (i.e. these should not be autoclaved).			
^a Concentration of substance in medium. ^b NI = Not indicated. ^c Added after autoclaving. ^d MOPS buffer is only required when pH control of the test medium is particularly important (e.g., when testing metals or substances which are hydrolytically unstable).				

ANEXO A
ENDEREÇOS ELETRÔNICOS DAS NORMATIZAÇÕES DE TESTES
TOXICOLÓGICOS COM LEMNA.

As normatizações apresentadas neste trabalho podem ser encontradas nos endereços eletrônicos a seguir:

ISO 20079, (2005)

<https://www.iso.org/standard/34074.html>

OECD, (2002)

http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-221-lemna-sp-growth-inhabitation-test_9789264016194-en