



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE MATERIAIS

SUELI TAVARES DE SOUZA SILVA

**CONCENTRADORES VIVOS PARA DETECÇÃO DE TRAÇOS DE  
NANOCONTAMINANTES EM ECOSISTEMAS HÍDRICOS**

Recife  
2020

SUELI TAVARES DE SOUZA SILVA

**CONCENTRADORES VIVOS PARA DETECÇÃO DE TRAÇOS DE  
NANOCONTAMINANTES EM ECOSSISTEMAS HÍDRICOS**

Tese de Doutorado apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciência de Materiais junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco.

Área de concentração: Materiais não metálicos

Orientador: Prof. Dr. Petrus d'Amorim Santa-Cruz Oliveira.

Coorientador Interno: Prof. Dr. Eduardo Henrique Lago Falcão.

Orientadora Externa: Profa. Dr<sup>a</sup> Fálba Bernadete Ramos dos Anjos.

Coorientadoras Externas:

Dr<sup>a</sup> Elaine Cavalcanti Rodrigues Vaz.

Dr<sup>a</sup> Lizeth Carolina Mojica Sánchez.

Recife  
2020

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Mariana de Souza Alves CRB4-2105

S586c Silva, Sueli Tavares de Souza

Concentradores vivos para detecção de traços de nanocontaminantes em ecossistemas hídricos / Sueli Tavares de Souza Silva. – 2020.

213f.: il., fig., tab.

Orientador: Petrus d'Amorim Santa-Cruz Oliveira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Ciência de Materiais, Recife, 2020.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Materiais não metálicos. 2. Artêmia. 3. Microcrustáceos. 4. Concentradores vivos. I. Oliveira, Petrus d'Amorim Santa-Cruz. (orientador) II. Título.

620.19

CDD (22. ed.)

UFPE-CCEN 2020-197

SUELI TAVARES DE SOUZA SILVA

**CONCENTRADORES VIVOS PARA DETECÇÃO DE TRAÇOS DE  
NANOCONTAMINANTES EM ECOSISTEMAS HÍDRICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Materiais da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciência de Materiais.

Aprovada em: 12/03/2020.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Petrus D'Amorim Santa Cruz Oliveira (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Antônio Carlos Pavão (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>o</sup>. Dr. Ricardo Oliveira da Silva (Examinador Externo)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Silveira Paim (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sigrid Neumann Leitão (Examinadora Externa)  
Universidade Federal de Pernambuco

**Deus**, meu alicerce espiritual, pelo êxito de mais uma etapa em minha vida,  
para sua honra e glória.

Minha genitora **Marilda do Nascimento Souza**, minha mais fiel incentivadora e responsável pelo êxito desta jornada, seus conselhos, a sua forma de agir sempre de acordo com a moral e os bons costumes e o acreditar na minha capacidade foram à força que me motivou a não desistir, meu eterno amor, carinho e respeito.

A meu filho, **João Paulo**, pela paciência e carinho durante todos os momentos desta pesquisa.

*In memoriam* ao meu pai **João Tavares de Souza**, pelos ensinamentos e valores éticos e morais os quais contribuíram para tornar o ser humano que sou.

*In memoriam* ao professor **Petrônio Alves Coelho**, por ter sido o responsável por ter me incentivado o interesse pela pesquisa e o gosto pela descoberta, por ter me mostrado o fascinante mundo da pesquisa.

Aos inúmeros microcrustáceos **Artêmias**, objeto de estudo desta pesquisa, que tiveram que ser sacrificados em prol da Ciência.

Todos os **seres humanos** que colaboraram para que este sonho se materializasse, minha eterna gratidão.

Dedico

## AGRADECIMENTOS

A **Deus** por ter fortalecido minha fé, segurando as minhas mãos e conduzido os meus passos em direção a finalização de mais uma etapa em minha vida. Gratidão pelo êxito alcançado e pelas novas amizades que conquistei ao longo desse período.

À Rede **LARnano/UFPE (SisNANO/MCTI)** e à **FINEP** pela ajuda financeira concedida que possibilitaram a aquisição de *primers* utilizados em análise taxonômica molecular.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciência de Materiais (PGMTR/UFPE) nas pessoas dos coordenadores Dr. **Armando Juan Navarro Vázquez** e Dr. **Ricardo Luiz Longo**, dos professores pela atenção e ensinamentos e da equipe administrativa da secretaria: **Ingrid Vanessa Almeida da Silva**, **Luana Lucena** e **Renata Bezerra**, pelo carinho e paciência com que sempre nos receberam e explicaram os procedimentos para os trâmites de documentos.

Ao Departamento de Química Fundamental (DQF) – UFPE, nas pessoas da atual chefia professores Dr.<sup>a</sup> **Rosa Maria Souto Maior** e Dr. **Ricardo Oliveira da Silva**, pela disponibilização de equipamentos para realização de análises.

Ao setor de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – UFPE, nas pessoas dos professores Dr. **Fábio André Brayner dos Santos** e Dr. **Luiz Carlos Alves** por disponibilizar a infraestrutura do laboratório imprescindível para a realização das análises por microscopia de fluorescência e eletrônica e, especialmente pela atenção e respeito com que me ouviram e me trataram. Os meus mais sinceros agradecimentos.

Ao Centro de Tecnologia Estratégicas do Nordeste (CETENE) pela realização de análises por microscopia de fluorescência.

Ao Instituto de Criminalística Professor Armando Samico (ICPAS/PE), na pessoa da Gerente da polícia científica de Pernambuco e amiga, Dr.<sup>a</sup> **Sandra Santos**, por consentir o uso de equipamentos na caracterização de amostras biológicas por espectroscopia Raman e pela amizade dispensada.

Ao Laboratório de Genética Aplicada (LAGA), do Departamento de Engenharia de Pesca-UFRPE, na pessoa da professora Dr.<sup>a</sup> **Maria Raquel Moura Coimbra** por disponibilizar reagentes e equipamentos e por consentir que o estudante de Iniciação Científica **Gênison Carneiro da Silva**, auxiliasse na análise molecular.

Às Secretarias de Educação do Estado de Pernambuco e do Município do Jaboatão dos Guararapes, por agilizar o processo para afastamento das atividades profissionais e pelo incentivo concedido.

A minha mãe, **Marilda do Nascimento Souza** e ao meu filho, **João Paulo Tavares da Silva**, pela compreensão, carinho, apoio e paciência em momentos de aflição e tensão nessa caminhada.

Aos meus irmãos **Saulo Tavares de Souza**, **Sôny Tavares de Souza** e **Sérgio Tavares de Souza** e a minha tia **Marilene Silva do Nascimento** pelos momentos felizes convvidos em família, incentivos e pelo laço fraterno que nos une.

Ao Orientador professor **Petrus d'Amorim Santa Cruz Oliveira**, pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa e por compartilhar suas ideias inovadoras e experiência científica. Meu respeito e admiração por ter aberto espaço para o mundo “micro” de horizonte “macro” dimensionado no desenvolvimento do projeto que foi um grande aprendizado.

Ao Coorientador professor **Eduardo Henrique Lago Falcão**, pelos ensinamentos e sugestões preciosas.

À Orientadora e amiga professora **Fálba Bernadete Ramos dos Anjos** pelos ensinamentos e principalmente, pela forma gentil com que sempre me orientou, ouviu e aconselhou diante dos momentos de incertezas e dificuldades ao longo dessa trajetória.

À Coorientadora e amiga **Lizeth Carolina Mojica Sánchez**, pela incansável colaboração na realização dos planejamentos e das atividades experimentais e pelas conversas e desabafos durante os cafés e almoços. A sua dedicação e disciplina pela investigação científica e gosto pelos experimentos, me estimularam

pelas atividades experimentais e mostraram a importância dessas, no desenvolvimento desse estudo.

À Coorientadora professora **Elaine Cavalcanti Rodrigues Vaz**, por sua atenção, amizade e paciência. Suas sugestões didáticas e contribuições científicas foram importantes para a apresentação e conclusão dessa pesquisa.

À professora **Ana Paula Silveira Paim**, pela forma respeitosa e gentil como sempre se dirigiu a minha pessoa, por compartilhar seus conhecimentos e seu tempo e, sobretudo, por seu apoio, correções, paciência e conduta ilibada na orientação dispensada, durante a realização dessa pesquisa, os meus mais sinceros agradecimentos.

À professora **Raquel Francicleide de Queiroz Fidelis**, por apoiar e incentivar a continuação de minha formação acadêmica, tendo dado seu parecer favorável à liberação das minhas atividades profissionais, quando a frente da GEPEM. Sua forma de conduzir os trâmites do processo de afastamento e de gerir outras ações revelou a sua reputação exemplarmente ética e moral. Por isso, sou-lhe grata.

Ao professor **José Licarion Pinto Segundo Neto**, pela análise estatística dos resultados obtidos pela Espectrometria de Emissão Ótica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) e valiosas sugestões.

Aos professores **Antônio Carlos Pavão, Ricardo Oliveira da Silva e Sigrid Neumann Leitão**, por terem aceitado o convite para compor a Banca de Doutorado dessa tese e contribuído com os conhecimentos e valiosas sugestões.

Aos responsáveis iniciais pelo caminho rumo ao Doutorado: Ao professor **Severino Alves Júnior**, pela amizade, por estar sempre solícito a ensinar, compartilhar e trocar conhecimentos científicos e a professora **Ivone Antônia de Souza**, por acreditar no meu êxito ao final desse percurso. A atenção e o incentivo dispensado foram os estímulos que reacenderam a chama pela descoberta e conseqüentemente, a inscrição na seleção para o curso de doutorado, a ambos meu reconhecimento e agradecimento.

À mestranda **Karen Isabelle Santos d'Amorim**, pela amizade, paciência, sugestões e colaboração na realização da apresentação desse estudo. Meus sinceros agradecimentos.

Ao técnico **Rafael Padilha** do setor de Microscopia Eletrônica do LIKA – UFPE, por partilhar seu vasto conhecimento sobre preparação e tratamento de amostras biológicas, bem como pelas imagens obtidas pelas análises de microscopia eletrônica de varredura e ao Dr. **Olávio Campos Júnior**, na época doutorando, pelas imagens obtidas por microscopia de fluorescência.

Ao técnico **Sérgio dos Santos Silva**, do Laboratório de Microscopia do Departamento de Física (DF), pelas análises e imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura.

Ao Pesquisador **André Braz**, pelas análises e imagens de amostras por Espectroscopia Raman.

À Pesquisadora do Museu de Oceanografia – UFPE, **Xiomara Franchesca García Díaz**, pelas micrografias óticas realizadas.

À Bióloga **Roberta Silfrônio** pela doação de água do mar descontaminada para a realização das atividades experimentais.

Ao amigo **Felipe Leon do Nascimento Sousa** pelas sugestões e apoio na realização de atividades experimentais, bem como pelos conhecimentos partilhados.

À doutoranda **Taciana Holanda Kunst** pela ajuda na análise dos resultados obtidos por ICP OES e por explicar e partilhar seus conhecimentos em Química Analítica.

Aos colegas do Laboratório de Eletrossíntese Orgânica **Brenand** e **Richardson** respectivamente, pelos desenhos e síntese dos *quantuns dots* utilizados nessa pesquisa.

À Professora **Áurea Rocha**, pelas sugestões na elaboração da escrita do documento e críticas construtivas.

À Professora **Maria Ijaci Gomes Correia** pelo carinho e dedicação na revisão ortográfica e gramatical do trabalho de Qualificação e desse documento.

A minha irmã afetiva **Mônica Coelho** e ao amigo **Antônio Soares**, pelas palavras motivadoras, que em momentos difíceis me impulsionaram a seguir em frente.

Às amigas, **Marilena Porto**, **Josivete Pinheiro** e **Tâmara Almeida** pelas palavras de apoio e pelo companheirismo.

Ao senhor **Paulo Sergio da Silva** pelo incentivo e pela confecção de um instrumento para incubação e eclosão dos cistos de artêmias.

Aos funcionários do Departamento de Química Fundamental (DQF) da UFPE, lotados na Central Analítica: **Abene Ribeiro**, **Conceição Pereira**, **Dayse Andrade**, **Elaine Patrícia Silva**, **Elias Silva**, **Eliete Barros**, **Ihasmym Nunes**, **Natália de Sant'ana**, **Pablo Rodrigues** e **Severino Leite** e nas Secretarias: **Fátima Peixoto** e **Patrícia Santana Rosa** pelo carinho e profissionalismo como sempre me atenderam.

Aos companheiros do LANDFOTON: **José Lúcio Bezerra Jr. (Abissal)**, **Bruna Marinho**, **Daniela Nadvorny**, **Elibe Souza**, **Fátima Souza**, **Francielly Gonçalves**, **Karina Silva** e **Rosely Queiroz** pelos momentos de estudos e descontração, vivências e convivências amigáveis, o que tornou mais leve essa caminhada.

Aos colegas da turma 2015.1 de Doutorado do Programa de Ciência de Materiais (PGMTR), particularmente, a **Evanísia Araújo**, **Josinete Paz** e **Moara Targino**, pelos momentos de estudos, de descontração e pela superação dos momentos desafiadores.

Aos colegas da Gerência de Políticas Educacionais do Ensino Médio (GPEM) da SEE/PE e aos colegas da Coordenação do Ensino Fundamental, da SE/PMJG, pelo incentivo.

Aos amigos **Alcides Cintra, Janilson Ferreira e Ivaldo Araújo**, pelo apoio e pelos momentos de trocas e discussões científicas, que resultaram em informações significativas para esse estudo.

Às amigas: **Andréa Freitas, Alessandra Ramalho, Maria Yassen e Marília Silva** pela amizade e momentos de vitórias compartilhados ao longo dessa etapa de minha vida.

As Professoras e amigas **Dilosa Carvalho de Alencar Barbosa e Marlene Carvalho de Alencar Barbosa**, pelas palavras de incentivo durante as nossas caminhadas matinais e pelos votos de sucessos ao término desse trabalho.

Aos senhores **Edgar e Gaspar**, pelas palavras de incentivo e pela alegria contagiante quando os encontrava nas caminhadas matinais.

Enfim, a todas as pessoas que ajudaram direta e indiretamente na conclusão desse estudo.

## RESUMO

A detecção rápida e eficiente de traços de nanocontaminantes em Ecossistemas Aquáticos tem sido um dos desafios da atualidade, diante do crescente volume de efluentes industriais e subprodutos da industrialização, com novas classes de contaminantes antropogênicos, como nanopartículas metálicas utilizadas em produtos e processos nanotecnológicos. Para se ir além dos limites de detecção disponíveis, a pré-concentração de analitos é uma das alternativas em análises quali-quantitativas, mas ainda é considerada o "calcanhar de Aquiles" de muitos procedimentos analíticos. A presente pesquisa objetivou comprovar que microcrustáceos do gênero *Artemia* podem funcionar como concentradores vivos de nanocontaminantes presentes em ambientes aquáticos, facilitando a posterior detecção a partir de técnicas analíticas. Como Prova de Conceito (PoC), foi utilizada a *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906), identificada molecularmente e os micropoluentes modelo: nanopartículas de prata (NPs Ag), nanotubos de carbono (NTC) e *quantum dots* (QDs), e como métodos de análises a espectrometria de absorção na região UV-Visível (UV-Vis), espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES), a espectroscopia Raman (ER), a espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) além das microscopias de fluorescência (MF), ótica (MO) e a eletrônica de varredura (MEV). A PoC para verificação da capacidade de filtração e concentração de micropoluentes foi obtida a partir de bioensaios nos quais os náuplios foram expostos a nanomateriais. Através de medidas por espectrometria molecular UV-Vis do filtrado, determinou-se a relação entre o tempo de exposição das larvas naupliares e sua capacidade filtradora não seletiva, a partir da diminuição em função do tempo da banda de absorção de ressonância plasmônica das NPs Ag, resultado da retenção nos microcrustáceos. O protocolo de digestão de amostras mostrou-se eficiente, possibilitando a decomposição total da amostra. Para NTC, o monitoramento da atividade concentradora dos náuplios foi feita pela identificação das três bandas características no espectro Raman deste nanomaterial no interior dos microcrustáceos. Para os QDs, a atividade filtradora foi monitorada pela fluorescência emitida ao longo do tubo intestinal das larvas naupliares. Utilizando-se a prata como micropolvente modelo para a determinação de uma função de correlação entre a concentração nominal medida pela espectrometria UV-Vis e a concentração real do analito, um dispositivo pré-concentrador, utilizando microcrustáceos como motores filtradores vivos, foi desenvolvido e patentado. Esse dispositivo pode ser usado como ferramenta analítica para a detecção de traços desses poluentes quando as concentrações estão abaixo dos limites confiáveis de detecção, produto final desta pesquisa.

**Palavras-chave:** Artêmia. Microcrustáceos. Concentradores vivos. Sondas vivas. Micropoluentes. Nanocontaminantes.

## ABSTRACT

The early and efficient detection of traces of nano-pollutants in Aquatic Ecosystems has been one of the current challenges, given the growing volume of industrial effluents and by-products of industrialization, with new classes of anthropogenic contaminants, such as nanoparticles used in nanotechnology products and processes. To go beyond the available detection limits, pre-concentration of analytes has emerged as one of the most promising alternatives in qualitative and quantitative analysis, but it is still considered the "Achilles' heel" of many analytical procedures because it involves the use of expensive equipment and reagents, steps with long periods and complex pre-treatments. This research aimed to prove that microcrustaceans of the *Artemia* genus can function as living concentrators of nano-pollutants present in aquatic environments, facilitating subsequent detection through analytical techniques. In a Proof of Concept (PoC), the *Artemia franciscana* (Kellogg, 1906), which was molecularly identified, was used with the following nano-pollutants model: silver nanoparticles (NPs Ag), carbon nanotubes (NTC) and quantum dots (QDs), and as methods of analysis, the absorption spectrometry in the UV-Visible region (UV-Vis), optical emission spectrometry with inductively coupled plasma (ICP OES), the Raman spectroscopy (ER), the energy dispersive X-Ray spectroscopy (EDS) and also the microscopies of fluorescence (MF), optics (MO) and scanning electron (SEM). A PoC to verify the filtration capacity and concentration of micropollutants was achieved from bioassays in which nauplii were exposed to nanomaterials. Through measurements by molecular spectrometry of filtered, was determined the ratio between the time of exposure of nauplii larvae and their non-selective filtering capacity, based on the decrease as a function of time of the plasmon resonance absorption band of Np Ag, as the result of retention inside the microcrustaceans. The sample digestion protocol proved to be efficient, allowing a total sample decomposition. For NTC, the monitoring of the nauplii concentrating activity was done by identifying the three characteristic bands in the Raman spectrum of this nanomaterial inside the microcrustaceans. For QDs, the filtering activity was monitored by the fluorescence emitted along the intestinal tube of naupliar larvae. Using silver as a micropollutant model for the determination of a correlation function between the nominal concentration measured by the UV-Vis spectrometry and the actual analyte concentration, a pre-concentrator device using microcrustaceans as live filter motors was developed and patented. This device can be used as an analytical tool for the detection of traces of these pollutants when concentrations are below reliable detection limits, being the final product of this research.

**Keywords:** *Artemia*. Microcrustaceans. Living concentrators. Living probes. Micropollutants. Nano-pollutants.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Níveis de maturidade tecnológica	26
Figura 2 –	Número de Teses e Dissertações envolvendo artêmias produzidas entre 2014-2018	30
Figura 3 –	Percentuais de produções acadêmicas envolvendo artêmias entre o período de 2014 a 2018	31
Figura 4 –	Ilustrações da <i>Artemia salina</i> publicadas pioneiramente em 1756	38
Figura 5 –	Síntese de nanomateriais pelas abordagens <i>Top-Down</i> e <i>Bottom-Up</i>	46
Figura 6 –	Esquema simplificado do ciclo de vida de nanomaterial manufaturado, adaptado de Som et al., 2010	47
Figura 7 –	Estrutura esquemática de nanotubos de parede simples (à esquerda) e de paredes múltiplas (à direita)	48
Figura 8 –	Esquema com as etapas de formação das nanopartículas: 1. Precursor metálico; 2. Redução do precursor; 3. Formação dos primeiros <i>clusters</i> ; 4. Formação de nanopartículas	53
Figura 9 –	Nanopartículas isotrópicas (esféricas); Nanopartículas anisotrópicas (formas de nanofios, nanoplacas, nanocubos)	54
Figura 10 –	Cores da prata coloidal em diferentes estágios de agregação	55
Figura 11 –	Desenho esquemático das possíveis interações das nanopartículas de prata no ambiente	56
Figura 12 –	Quantum dots com as suas estruturas morfológicas: A= núcleo; B= casca; C= revestimento bioativo, modificado de Hardman (2006)	59
Figura 13 –	ICP OES Perkin Elmer® Optima™ 7000 DV (Central Analítica, DQF)	62
Figura 14 –	Esquema padrão de processo de análise instrumental da ( <i>Eurachem</i> ), modificado por (VAZ Jr, 2010)	63
Figura 15 –	Etapas do desenvolvimento do microcrustáceo Artêmia, (DREWES, 2006) modificado	69
Figura 16 –	Larva naupliar Ínstar I de artêmias	70
Figura 17 –	Larva naupliar Ínstar II de artêmia com as seguintes estruturas: A - Olho naupliar; B – Antênula; C – Mandíbula; D - Antena; E - Sistema Digestório	71
Figura 18 –	Espécimens de indivíduos adultos de <i>Artemia franciscana</i> (A = indivíduo macho e B = indivíduo fêmea)	71
Figura 19 –	Detalhe da cabeça do macho exibindo o Cláster, estruturas em forma de pinça - 40x	72
Figura 20 –	Detalhe da cabeça da fêmea mostrando atrofiamento do 2º par de antenas - 40x	73

Figura 21 –	A: Espécime masculino exibindo detalhe do órgão copulador; B: Espécimen feminino exibindo detalhe de saco ovífero	73
Figura 22 –	Representação esquemática dos estágios de desenvolvimento. A) Pré-náuplio – estágio I; B) Pré-náuplio – estágio II; C) Larva naupliar I ou Ínstar I; D) Larva naupliar V ou Ínstar V	75
Figura 23 –	Estágios morfológicos de desenvolvimento da <i>Artemia franciscana</i>	76
Figura 24 –	Ciclo de vida da <i>Artemia franciscana</i>	77
Figura 25 –	Distribuição geográfica mundial das diferentes espécies de artêmias, (BAXEVANIS, et al. 2006) modificado	79
Figura 26 –	Padrão eletroforético em gel de agarose dos produtos amplificados do DNA das amostras de artêmias adultas, por PCR (1 primer: L2510F, H3080 R; 2: ANO-LCOF, PAR-HCO R)	82
Figura 27 –	Representação gráfica dos Bioensaios como concentrador vivo para incorporação dos micropoluentes modelo	83
Figura 28 –	Fluxograma das etapas desenvolvidas para determinação do elemento prata (Ag) nas amostras pela ICP OES	89
Figura 29 –	Fluxograma com as três etapas experimentais	93
Figura 30 –	Fluxograma contendo os micropoluentes e as técnicas utilizadas nos bioensaios com as larvas naupliares	95
Figura 31 –	Ínstares naupliares II e III expostos (A= Água salina apenas com NaCl; B= Água do mar descontaminada; C= NPs Ag; D= NTC)	97
Figura 32 –	Indivíduos naupliares sem alimentação durante 13 dias	98
Figura 33 –	Microalga da espécie <i>Nannochloropsis oculata</i>	99
Figura 34 –	Clássper da <i>Artemia franciscana</i>	100
Figura 35 –	Morfologia da furca da <i>Artemia franciscana</i>	100
Figura 36 –	Morfologia dos sacos ovíferos da <i>Artemia franciscana</i>	101
Figura 37 –	Cistos de artêmias desidratados	102
Figura 38 –	Cistos de artêmias hidratados	102
Figura 39 –	Espectro de absorção UV-Vis das NP Ag	103
Figura 40 –	Espectros de absorção UV-Vis para as NP Ag do Sistema 5	104
Figura 41 –	Espectros de absorção UV-Vis da filtração das NPs Ag (900 µL) em função do tempo	104
Figura 42 –	Espectros de Absorção UV-Vis antes e após 60 minutos de filtração por 50 náuplios no: (A) Sistema 1; (B) Sistema 2; (C) Sistema 3; (D) Sistema 4; (E) Sistema 5	106
Figura 43 –	Diferenças dos espectros de absorção UV-Vis (A-As) antes de depois da filtragem por 50 náuplios por 60 minutos para cada amostra de concentração Cn	111
Figura 44 –	Curva da concentração de NP Ag em água (C) em função da massa efetiva filtrada pelas artêmias ( $m_{fE}$ )	112
Figura 45 –	Curva analítica obtida por ICP OES para prata	114

Figura 46 –	Diagrama de Pareto indicando os efeitos padronizado para concentração de prata	117
Figura 47 –	Efeitos individuais médios das variáveis independentes sobre a concentração de prata disponível após digestão dos náuplios	118
Figura 48 –	Efeito da média das interações entre as variáveis e a concentração de prata	119
Figura 49 –	Efeito da média das interações entre as variáveis e a concentração de prata dos efeitos de interação inversa ao da Figura 45	120
Figura 50 –	Condição de digestão mais eficiente para obtenção de prata	120
Figura 51 –	Condição de digestão menos eficiente para obtenção de prata	121
Figura 52 –	Aumento da quantidade de prata mediante a condição de 8 mol L <sup>-1</sup> de HNO <sub>3</sub> e 3 mL de volume de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	122
Figura 53 –	A: Micrografia de espécimen naupliar, com aumento de 774 x; B: Detalhe do espécime naupliar, com aumento de 2510 x	123
Figura 54 –	Ponto das cerdas do espécimen naupliar onde foi realizada a medida de EDS	123
Figura 55 –	Espectro EDS da área apontada na figura 54, com identificação de traços de Ag	124
Figura 56 –	Imagens de Microscopia eletrônica de transmissão das NPs Ag	125
Figura 57 –	Distribuição de tamanhos das NPs Ag obtido por DLS	125
Figura 58 –	Espectros Raman de amostras com náuplios expostos a microalgas e/ou NTC	127
Figura 59 –	Náuplios (A e D: grupo controle; B; C; E; F: grupo expostos a NPs Ag)	128
Figura 60 –	Náuplios (A e D: grupo controle; B; C; E; F: grupo expostos a NTC)	129
Figura 61 –	Micrografias de fluorescência de larvas controle: (A) com o filtro Dp (365 nm), (B) com o filtro AF (488 nm), (C) com filtro A (546 nm); larvas expostas ao QDs de Zn com filtro Dp (D), (E), (F); (G) com os três filtros juntos (Dp, AF e A), (H) com o filtro AF e (I) com o filtro A	130

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Mapa das produções científicas (Teses e Dissertações) no Brasil envolvendo artêmias durante o período de 2014 a 2018	30
Tabela 2 –	Quadro geral de Dissertações utilizando artêmias entre 2014 e 2018, com os seus títulos e objetivos	33
Tabela 3 –	Quadro geral de Teses utilizando artêmias entre 2014 e 2018, com os seus títulos e objetivos	35
Tabela 4 –	Sistemas formados por soluções teste	84
Tabela 5 –	Resumo das condições do Bioensaio com larvas naupliares de <i>Artemia franciscana</i> expostas a NP Ag	86
Tabela 6 –	Condições de digestão de amostras	87
Tabela 7 –	Variáveis e níveis empregados no planejamento fatorial 2 <sup>2</sup>	88
Tabela 8 –	Matriz do planejamento experimental utilizando o planejamento fatorial 2 <sup>2</sup> com repetição de dois pontos centrais	88
Tabela 9 –	Condições de Operação no equipamento de ICP OES	88
Tabela 10 –	Sistemas de exposição com os componentes das soluções testes	90
Tabela 11 –	Resumo das condições experimentais do Bioensaio de exposição de náuplios a NTC	91
Tabela 12 –	Resumo das condições experimentais do Bioensaio de exposição de náuplios a QDs	92
Tabela 13 –	Resumo das condições experimentais do protocolo de exposição do fármaco OLZ aos náuplios	95
Tabela 14 –	Sistemas de NP Ag em água preparados com 5 mL	105
Tabela 15 –	Valores das massas efetivas filtradas por 50 náuplios para cada concentração de NP Ag na amostra	111
Tabela 16 –	Massa total de prata obtida nos náuplios digeridos estimada para cada concentração de prata na amostra, calculada a partir da medida de ICP OES com a solução mais concentrada (900 µL de solução estoque de NP Ag)	116
Tabela 17 –	Elementos químicos identificados por EDS, com destaque para a Prata	124

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BEN	Biotério de Espécies Nanoestruturadas
CETENE	Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste
DF	Departamento de Física
DHE	Departamento de Histologia e Embriologia
DO	Departamento de Oceanografia
DQF	Departamento de Química Fundamental
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICPAS	Instituto de Criminalística Professor Armando Samico
LACE	Laboratório de Cultivo e Ecotoxicologia
LAGA	Laboratório de Genética Aplicada
LANDFOTON	Laboratório de Arquitetura de Nanodispositivos Fotônicos e Bioinspirados
LES	Laboratório de Eletrossíntese
LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
LTCC	Laboratório de Toxicidade e Comunicação Celular
NASA	National Aeronautics and Space Administration
NIT	Núcleo de Inovação Tecnológica
OMPI	Organização Mundial da Propriedade Intelectual
SIBRATEC	Sistema Brasileiro de Tecnologia
TRL	Technology Readiness Level (índice de maturidade tecnológica)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
UFRPE	Universidade Federal Rural de Pernambuco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>21</b>
1.1	JUSTIFICATIVA.....	27
1.2	TESES E DISSERTAÇÕES RECENTES ENVOLVENDO ARTÊMIAS.....	29
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>36</b>
2.1	GERAL.....	36
2.2	ESPECÍFICOS.....	36
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	<b>38</b>
3.1	MICROCRUSTÁCEO ARTÊMIA.....	38
3.2	NANOMATERIAIS (NM).....	44
<b>3.2.1</b>	<b>Nanotubos de Carbono (NTC)</b> .....	<b>48</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Nanopartículas de Prata (NPs Ag)</b> .....	<b>52</b>
<b>3.2.3</b>	<b>Quantum Dots (QDs)</b> .....	<b>58</b>
3.3	ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP OES).....	62
3.4	DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO MICROCRUSTÁCEO ARTÊMIA.....	67
<b>3.4.1</b>	<b>Classificação Taxonômica</b> .....	<b>68</b>
<b>3.4.2</b>	<b>Aspectos Morfológicos</b> .....	<b>68</b>
<b>3.4.3</b>	<b>Aspectos Biológicos</b> .....	<b>73</b>
<b>3.4.4</b>	<b>Ciclo Vital e Ciclo Reprodutivo</b> .....	<b>75</b>
<b>3.4.5</b>	<b>Distribuição Geográfica</b> .....	<b>77</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>80</b>
4.1	ANÁLISE TAXONÔMICA MORFOLÓGICA E MOLECULAR.....	81
4.2	BIOENSAIOS COM ARTÊMIAS COMO CONCENTRADORES VIVOS PARA INCORPORAÇÃO DE MICROPOLUENTES MODELO.....	83
<b>4.2.1</b>	<b>Protocolo de exposição de larvas naupliares da <i>Artemia franciscana</i> a Nanopartículas de prata</b> .....	<b>84</b>
4.2.1.1	Análises por Espectrometria de Absorção na Região do Ultravioleta Visível (UV-Vis).....	85
4.2.1.2	Análises por Espectrometria de Emissão Ótica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES).....	87

4.2.1.3	Análises por Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS) .....	89
<b>4.2.2</b>	<b>Protocolo de Exposição das larvas naupliares da <i>Artemia franciscana</i> Kellog, 1906 a nanotubos de carbono (NTC) .....</b>	<b>90</b>
4.2.2.1	Análises por Espectroscopia Raman (ER) .....	91
4.2.2.2	Análises por Microscopia Ótica .....	92
<b>4.2.3</b>	<b>Protocolo de Exposição das larvas naupliares da <i>Artemia franciscana</i> Kellog, 1906 a <i>Quantum dots</i> (QDs) .....</b>	<b>92</b>
4.2.3.1	Análises por Microscopia de Fluorescência .....	93
<b>4.2.4</b>	<b>Protocolo de Exposição das larvas naupliares da <i>Artemia franciscana</i> Kellog, 1906 ao fármaco Olanzapina .....</b>	<b>93</b>
4.2.4.1	Análises por Espectrometria de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta Visível (UV-Vis) .....	94
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES.....</b>	<b>96</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Diagnose do Gênero .....</b>	<b>96</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA MORFOLÓGICA .....	96
5.2	CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA MOLECULAR.....	102
5.3	CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS COM CONCENTRADOR VIVO.....	102
<b>5.3.1</b>	<b>Bioensaios empregando NP Ag.....</b>	<b>102</b>
5.3.1.1	Espectrometria de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta Visível (UV-Vis) .....	103
5.3.1.1.1	<i>Determinação de curva analítica e função de correlação .....</i>	<i>109</i>
5.3.1.1.2	<i>Medida da concentração em amostra pré-concentrada .....</i>	<i>112</i>
5.3.1.2	Espectrometria de Emissão Ótica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) .....	114
5.3.1.3	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS) .....	122
5.3.1.4	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM).....	125
<b>5.3.2</b>	<b>Bioensaios empregando NTC .....</b>	<b>126</b>
5.3.2.1	Espectroscopia Raman .....	126
5.3.2.2	Microscopia Ótica (MO).....	128
<b>5.3.3</b>	<b>Bioensaios empregando QDs .....</b>	<b>129</b>
5.3.3.1	Microscopia de Fluorescência (MF) .....	130

6	CONCLUSÕES.....	132
7	PERSPECTIVAS .....	134
	REFERÊNCIAS.....	135
	APÊNDICE A - PROTOCOLO DE DESCONTAMINAÇÃO DA ÁGUA DO MAR.....	165
	APÊNDICE B - SEQUÊNCIA DIDÁTICA: NANOTECNOLOGIA A TRANSPOSIÇÃO DO SABER ACADÊMICO AO SABER ESCOLAR .....	166
	ANEXO A - ETAPA DE ECLOSÃO E EXPERIMENTO DE SOBREVIVÊNCIA .....	187
	ANEXO B - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA .....	192
	ANEXO C - PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR COM EXO/SAP PARA SEQUENCIAMENTO .....	194
	ANEXO D - ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS DO SISTEMA H <sub>2</sub> O D + NP AG. E ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS DO SISTEMA H <sub>2</sub> O [NaCl] + NP AG. ....	197
	ANEXO E - PROTOCOLO DE SÍNTESE DE NP AG.....	198
	ANEXO F - PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO DE AMOSTRA BIOLÓGICA PARA ANÁLISE EM ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (EDS).....	199
	ANEXO G - PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO DE AMOSTRA BIOLÓGICA PARA ANÁLISE EM ESPECTROSCOPIA RAMAN.....	201
	ANEXO H - PROTOCOLO DE SÍNTESE DE CDZNTE .....	203
	ANEXO I - EXPERIMENTO PARALELO: BIOENSAIO EMPREGANDO FÁRMACO OLANZAPINA (OLZ).....	205

## 1 INTRODUÇÃO

Os Ecossistemas Aquáticos (EA), representados por lagos, rios, mares e oceanos, ao longo de décadas vêm sendo alvo contínuo da introdução de substâncias xenobióticas emergentes, provenientes de diferentes fontes de emissão. Resultantes de diferentes atividades antrópicas, essas substâncias, representam compostos químicos estranhos ao organismo ou ao sistema biológico, tais como medicamentos, produtos industriais, alimentos, pesticidas, cosméticos, poluentes, entre outros (GONÇALVES et al., 2014).

Descartados muitas vezes de forma inadequada nas matrizes aquáticas, esses compostos estão entre os principais agentes de contaminação desses ambientes e conseqüentemente podem causar desequilíbrio nos mesmos (RATTNER; HEATH, 2002; BEAN; RATTNER, 2018; AL-MAADHEED et al., 2019).

A contaminação ambiental nos EA é decorrente, principalmente do lançamento de esgotos domésticos e efluentes industriais, do processamento de drenagem agrícola e de derrames acidentais de resíduos químicos, bem como, de atividades relacionadas ao turismo, recreação e lazer nesses ambientes, sendo, portanto, considerada a principal via de acesso para a entrada de xenobióticos (ARIAS et al., 2007).

O aumento no número de registros de poluentes emergentes nas matrizes aquáticas tem preocupado a comunidade científica e estimulado a investida em diferentes áreas de conhecimento a desenvolverem estratégias tecnológicas, voltadas para a detecção rápida e eficiente de diferentes substâncias nestes ambientes.

Para detecção elementar em ambientes aquáticos, destacam-se aqui técnicas como as de espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) (ARANTES DE CARVALHO et al., 2016; SANTOS et al., 2017; HU et al., 2018; MILAČIČ et al., 2019).

Para a detecção de poluentes por reconhecimento molecular, os polímeros impressos molecularmente (MIPs), usados como ferramentas ambientais na

identificação de moléculas específicas (MAHONY et al., 2005; CANTARELLA et al., 2019), também foram objetos de estudo e projeto de tese em nosso grupo de pesquisa: Mojica - Sánchez (2018) desenvolveu um sistema híbrido para reconhecimento molecular de cafeína como rastreador de esgotos domésticos em efluentes hídricos, baseado em MIPs. O dispositivo que foi desenvolvido para aplicação em monitoramento ambiental, contém como inovação uma parte nanoestruturada opticamente ativa, semelhante a um transdutor fotônico, com patente depositada.

O conhecimento das interações que os analitos possam estabelecer com a água e com a biota local, juntamente com as estratégias que possam detectá-los em matrizes aquáticas tem possibilitado a obtenção de informações que permitam identificar e quantificar os contaminantes nesses ambientes, de forma isolada. Contudo, este procedimento não representa uma estratégia eficiente na obtenção de respostas, sobretudo, dos impactos adversos destes sobre os seres vivos (MONSERRAT et al., 2003; MONSERRAT et al., 2007). Desta forma, a implementação de investigações ecotoxicológicas integradas às análises químicas, vem contribuindo para que se obtenha um retrato fiel desses impactos (SVENSSON et al., 2005).

Uma das formas de se conhecer a situação real em que se encontra a parte biótica e abiótica dos EA é através de monitoramento ambiental. Produtos tecnológicos constituídos de materiais poliméricos (DUXSON et al., 2007), metálicos (COLLINS et al., 2016), cerâmicos (SALLENAVE et al., 2016), semicondutores (LIGNOS et al., 2017), biomateriais (WILLIAMS, 2009) ou da junção de dois desses ou mais, como por exemplo os compósitos polímeros com fibras vegetais (MARINELLI et al., 2008), o compósito polimérico com nanotubos de carbono (NTC) e lantanídeos (MOJICA-SÁNCHEZ, 2017) ou ainda compósito metálico constituído por fibras compostas por NTC (ZHANG et al., 2019) podem atuar em partes ativas de novos dispositivos para monitoramento ambiental *in situ*.

Com o avanço das nanotecnologias, novas classes de contaminantes antropogênicos surgiram no início deste século como, por exemplo, nanotubo de carbono (NTC) com suas diversas configurações e quiralidades, fulerenos, quantum

dots e nanopartículas metálicas, em uso crescente em produtos e processos nanotecnológicos.

As tecnologias manufaturadas constituídas de nanomateriais ou da junção de dois ou mais desses têm resultado no desenvolvimento de novos produtos tecnológicos com alta performance e eficiência, possibilitando a melhoria da qualidade de vida e a sustentabilidade ambiental (KAKANI, 2014). No entanto, ainda se conhece pouco sobre os tipos de interações que possam estabelecer com a biota e o ambiente e dos efeitos que possam ocasionar. Como resultados, são realizados debates e pesquisas a respeito de possíveis impactos que estes materiais possam causar à saúde humana e particularmente, ao ambiente, quando descartados de forma inadequada (SEATON; DONALDSON, 2005).

LOVERN et al. (2007) e FORTNER et al. (2005) mencionaram que o aumento da disponibilidade desses materiais no ambiente está relacionado à presença de nanomateriais na composição de novos produtos tecnológicos de consumo do dia-a-dia, tais como eletrônicos, cosméticos, têxteis, medicamentos, além do emprego desses produtos na remediação de resíduos, em aplicações agrícolas, entre outros.

Segundo Paschoalino et al. (2010) a produção anual estimada de materiais que contêm substâncias em nanoescala quintuplicou em seis anos, chegando a 5.000 t, com a perspectiva de que a marca de 100.000 t seja atingida na década atual, o que torna ainda mais importante o aprimoramento de técnicas de monitoramento desses novos materiais no meio ambiente.

Outra estratégia de monitoramento ambiental, seguida neste trabalho, é o desenvolvimento de novas tecnologias de coleta, para detecção *ex situ*, em particular, de baixíssimas concentrações (traços), no qual se podem identificar de forma precoce problemas ambientais.

A exposição de organismos vivos a diferentes tipos de estresses tem sido uma ferramenta utilizada por pesquisadores desde a antiguidade para avaliar a qualidade do ambiente. Aristóteles (384-322 a.C.), submeteu peixes de água doce à água do mar para estudar suas reações. O primeiro registro de análise da toxicidade ambiental, foi realizado em 1816, com insetos aquáticos, em ambiente aquífero (BUIKEMAN; VOSHELL, 1993).

Nas últimas décadas, os ambientes aquáticos vêm sendo objeto de preocupação, principalmente pela introdução cada vez maior de substâncias xenobióticas. As concentrações, duração, descargas intermitentes ou contínuas e as interações estabelecidas entre as propriedades físicas e químicas dessas substâncias com a água, origina produtos que impactam ainda mais o meio ambiente (RAND et al., 1995).

De acordo com Khallil; Abdel-Sater (1992), nesses ambientes, onde a biota estabelece interações complexas com os componentes abióticos e com substâncias xenobióticas, os processos biológicos dos organismos podem ser afetados, principalmente pelas modificações das propriedades físicas e químicas, podendo trazer graves consequências ecológicas e efeitos deletérios na fauna e flora local. Percebe-se que apenas as análises químicas, mesmo que quantitativas não são eficientes para se detectar os riscos em amostras ambientais, uma vez que estas expressam valores nominais, e não o percentual de contaminantes disponível para organismos vivos, nem tão pouco o efeito deles, sob interação (AIT-AISSA et al., 2003).

Grupos de pesquisa em nanotecnologias ambientais têm investido no desenvolvimento de metodologias e/ou dispositivos que possam identificar as condições ambientais, avaliar com mais rigor a qualidade da saúde desses ambientes e conseqüentemente, propor medidas mitigadoras, que possam minimizar esses impactos, a partir da detecção de traços de nanomateriais (PATIL et al., 2016).

Costa (2004), Rodriguez-Mozaz et al. (2004), desenvolveram e aplicaram dispositivos artificiais para detecção de concentrações de poluentes em nível de traço. Por outro lado, a pesquisa de Wang et al. (2009) tornou-se relevante por desenvolver metodologias que permitiam a constatação prévia, a partir do uso de organismos vivos, para medição e ações proativas.

Lijteroff; Lima; Prieri (2008) indicaram que alguns espécimes de plantas vasculares, briófitas, algas, invertebrados e vertebrados podem servir como dispositivos simples na detecção de poluentes.

Apesar da natureza ser constituída por organismos, considerados nanossistemas intrincados e de alta complexidade quando comparados aos sistemas

artificiais (LUNDSTRÖM; SVENSSON, 2002), esforços estão sempre sendo realizados para imitar ou usar esses sistemas no desenvolvimento de novos dispositivos, como sensores bioinspirados ou biomiméticos para diversas aplicações.

Em nosso Grupo de pesquisa, Sousa (2017) desenvolveu em seu projeto de mestrado superfícies superhidrofóbicas bioinspiradas em estruturas hierárquicas de superfície de folhas da Caatinga. Segundo o autor, as estruturas das folhas desse Bioma podem atuar como parte ativa de potenciais dispositivos para quantificação de poluentes em sistemas aquosos. O sistema é baseado na alteração do ângulo de contato em função da modificação da tensão superficial dos líquidos. O trabalho resultou em depósito de patente de um dispositivo bioinspirado para monitoramento de parâmetros de potabilidade da água.

Corrêa; Penafort (2011) mencionaram que as artêmias, conhecidas popularmente como “camarão-de-salmoura”, “drosophila aquática” e “camarão-duende”, são os organismos aquáticos mais estudados até os dias de hoje, como também apresentam o maior número de estudos do ponto de vista molecular. Esses animais são filtradores obrigatórios, não seletivos, contínuos, de ciclo de vida curto, aproximadamente 21 dias, com cistos de fácil obtenção (PROVASOLI et al., 1959).

O microcrustáceo artêmia, já foram utilizados em testes de ecotoxicidade em que se mostraram altamente sensíveis a poluentes, a toxinas e a perturbações do meio, ou como alertas de desequilíbrio ambiental (BAGLIANO, 2012).

Entre as vantagens do emprego das artêmias, tem-se a rapidez de filtração de diversos compostos e o baixo custo dos experimentos (eclosão dos cistos, condições de sobrevivência dos náuplios), e ainda a possibilidade do uso de um número mínimo de amostras e o estabelecimento de rotinas em diversos estudos. Em análises preliminares de toxicidade geral, o emprego desses organismos não necessita de equipamentos sofisticados e nem de procedimentos assépticos (MEYER et al., 1982; CAVALCANTE et al., 2000; PIMENTA et al., 2003; LUNA et al., 2005).

O presente estudo é uma prova de conceito da exploração da capacidade filtradora do microcrustáceo artêmia, no qual se propõe a sua utilização como um pré-concentrador vivo de micropoluentes em ambientes aquáticos em nível de traços, em virtude da sua possível capacidade em concentrar elementos ou

substâncias, de forma não seletiva, permitindo aumentar a sensibilidade de detecção de concentrações nominais nos limites críticos de detecção por técnicas convencionais, através da pré-concentração dos analitos *in vivo*, seguido de uma correção para a concentração real, em função de parâmetros como o tempo de filtração, a partir da definição de uma função de correlação.

O nosso grupo de pesquisa tem se caracterizado por projetos que se iniciam com um baixo índice de maturidade tecnológica (TRL, *Technology Readiness Level*), e finalizam com o aumento da TRL, em geral associada a um novo produto tecnológico com características inovadoras. No presente caso, objetivou-se configurar uma ferramenta analítica patenteável, com aplicação na área ambiental, no qual a filtração não seletiva e contínua desempenhada naturalmente pelas artêmias é explorada para detecção de traços de micro e nanopoluentes em ecossistemas aquáticos.

A evolução da maturidade tecnológica da inovação proposta pode ser acompanhada através dos níveis de TRL em uma escala que, proposta inicialmente pela NASA nos anos 1970, passou a ser utilizada também no Brasil, em instituições como a Embrapa, ou em programas do SIBRATEC. A figura 1 mostra a escala utilizada na Embrapa agroenergia, e a descrição de cada nível pode ser encontrada no site do Programa SibratecNano do MCTIC (<https://bit.ly/2vcaAO4>). As etapas geralmente desenvolvidas na academia encontram-se entre TRL 1 a 5, enquanto que, partir do TRL 6, que envolve produção de protótipo em escala demonstrativa e simulação em ambiente industrial, consideram-se etapas a serem desenvolvidas na indústria interessada em produção ou licenciamento da inovação.

Figura 1 – Níveis de maturidade tecnológica.



Fonte: <https://www.embrapa.br/agroenergia/vitrine>.

Partiu-se de um estágio entre TRL 1 e TRL 2, em que foram obtidas informações iniciais a respeito da filtração não seletiva dos microcrustáceos, e a partir da exposição de grupo de larvas naupliares a diferentes micropoluentes, no nível TRL 3 (apresentado no exame de qualificação do doutorado), foi constatado por medida indireta dos filtrados, que as larvas naupliares conseguiram filtrar o micropoluente (NP Ag) retendo-as em seu interior, com resposta medida em função do tempo de filtração, monitorada a partir da banda de absorção associada à ressonância plasmônica da NP Ag.

Na conclusão deste projeto, entre o nível TRL 4 e TRL 5, em que as artêmias se comportaram como motores filtradores e exploradas em concentradores vivos de micropoluentes, novos resultados foram alcançados a partir do procedimento de digestão dos náuplios submetidos em diferentes volumes de NPs Ag e da análise destas amostras pela Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado – ICP OES, além da absorção UV-Vis.

O final deste nível de maturidade tecnológica culminou com a elaboração de uma função correlacional para determinação da concentração de NP Ag em uma amostra desconhecida. Foi usada a espectroscopia na região UV-Vis para verificar o concentrado preparado a partir dos náuplios expostos por 1 h para filtração, seguido de procedimento de digestão e redispersão concentrada, com dispositivo e processo patenteado, a ser aplicado como uma nova estratégia na detecção de traços de poluentes, particularmente NP metálicas em ecossistemas aquáticos.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Produtos manufaturados contendo nanomateriais estão presentes no cotidiano, tornando-se praticamente inevitável a presença desses nos Ecossistemas. Embora esses produtos nanotecnológicos passem por avaliações rigorosas de segurança antes de serem liberados no mercado, muitas vezes, não se conhece totalmente os impactos e efeitos resultantes da exposição desses, a longo prazo, à biota aquática e até mesmo ao homem (MOORE, 2006).

As atividades antrópicas tais como o lançamento de esgotos não tratados, aplicação de pesticidas em lavouras, descarte inadequado do lixo, entre outras

atividades, vem contribuindo para a entrada de micropoluentes nos ambientes aquáticos, principalmente a partir do carreamento pelos rios (TRIASI et al., 2015; RODRIGUEZ-NARVAEZ et al., 2017).

A presença de traços de nanomateriais nos EA é comprometida quando se atinge o limite de detecção das análises utilizadas. A proposta deste trabalho consiste na utilização da artêmia como um concentrador vivo de micropoluentes pelas características a seguir:

- ❖ por serem habitantes naturais de Ecossistemas Aquáticos salinos, cujo papel determinado na rede trófica é ímpar e totalmente compatível, não apresentando limitações de desempenho, como poderia ser observado em dispositivos manufaturados. Apresentam-se altamente tolerantes a variações de salinidade, sendo perfeitamente compatíveis com ensaios em água doce no período de tempo necessário para atuarem como filtradores vivos;
- ❖ apresentam estabilidade genética em gerar populações uniformes, assegurando uma uniformidade de resposta rápida às alterações ambientais (do tipo fisiológica, bioquímica, genética, comportamental, entre outras) e a sua representatividade ecológica (BOHRER, 1995);
- ❖ são seres aquáticos filtradores obrigatórios, não seletivos e contínuo (Provasoli et al., 1959), podendo ser passíveis a acúmulo de poluente em seu sistema (LARCHER, 2000);
- ❖ têm características biológicas bem conhecidas e um ciclo de vida curto, de aproximadamente de 2 a 4 meses (IGARASHI, 2008) ou, segundo Santos (2008), vivem mais de 6 meses quando as condições do ambiente são ideais para o seu desenvolvimento;
- ❖ são amplamente empregadas em pesquisas toxicológicas (SILVA, 2008) e nestes tipos de pesquisa são utilizadas em pequenas quantidades de exemplares por experimento, com baixíssimos custos, não necessitando de equipamentos sofisticados e nem de procedimentos assépticos (CAVALCANTE et al., 2000; LUNA et al., 2005; MEYER et al., 1982; PIMENTA et al., 2003);
- ❖ são organismos de fácil manipulação em laboratório, boa reprodutibilidade (Agência de Proteção Ambiental dos EUA, 2002) e são animais abundantes na natureza, podendo ser adquiridos em forma de cistos em lojas de aquaristas,

facilmente armazenados por longo período, e eclodidos apenas para o uso ou “ativação” dos “motores vivos”.

Por fim, considerando que este microcrustáceo é utilizado como organismo modelo em várias pesquisas e por não existir na literatura nada que mencione o seu uso como pré-concentrador vivo de traços de micropoluentes em Ecossistemas Aquáticos, quer em sua fase larval, quer em sua fase adulta, o presente estudo é uma prova de conceito da exploração da capacidade filtradora do microcrustáceo artêmia na detecção de traços desses materiais nesses ambientes. O procedimento é feito a partir da maceração dos microcrustáceos com os nanomateriais concentrados no interior do corpo em função de parâmetros estabelecidos na filtragem, seguido da aplicação de uma função de correlação estabelecida para esses parâmetros, fornecendo a concentração real do analito presente na amostra de água analisada a partir da concentração nominal do concentrado. A função de correlação para detecção de traços de NP Ag pela técnica de absorção UV-Vis é apresentada em patente depositada de dispositivo concentrador vivo e respectivo processo de funcionamento (BR102020003546-0), resultado da presente pesquisa.

## 1.2 TESES E DISSERTAÇÕES RECENTES ENVOLVENDO ARTÊMIAS

Para identificação da produção acadêmica que usou microcrustáceo artêmia recentemente no país, foi feito um levantamento bibliográfico de dissertações e teses (DTs) defendidas em Programas de Pós-Graduação brasileiros durante o período de 2014 a 2018. A análise dessa produção acadêmica representa um indicador de estudos recentes nas Instituições de Ensino Superior, que resultam em artigos e patentes.

A pesquisa bibliográfica foi realizada no banco de dados da CAPES e da Biblioteca Digital Brasileira de Teses e Dissertações (BDTD) que “integra e dissemina, em um só portal de busca, os textos completos das DTs (defendidas nas instituições brasileiras de ensino e pesquisa”.

O levantamento bibliográfico das DTs se baseou na identificação de seus resumos e títulos que consideraram as artêmias em suas pesquisas. A coleta de informações e as análises foi realizada sobre todos os resumos e/ou títulos que

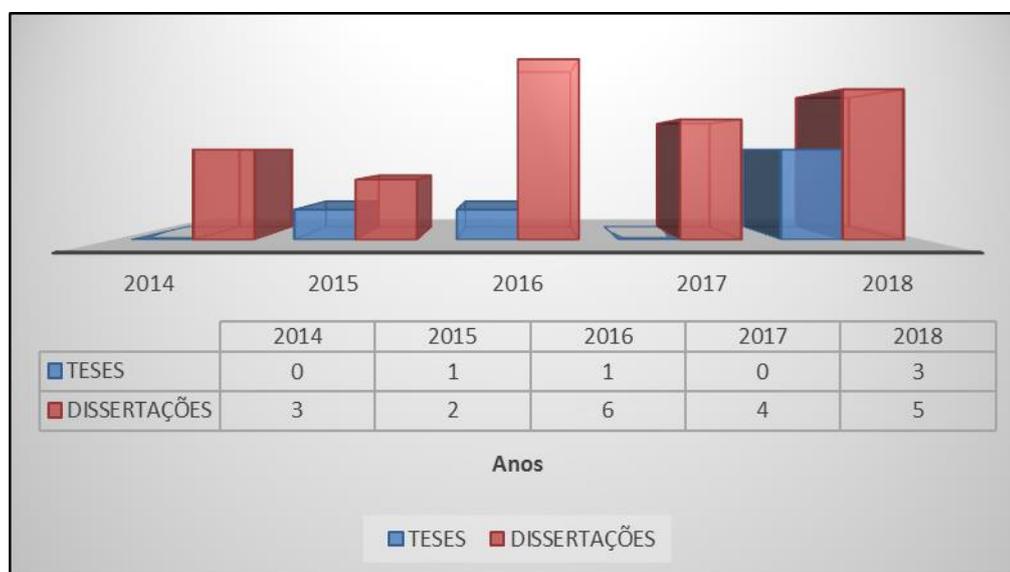
apresentavam o termo “artêmias”. Foram identificadas 25 produções acadêmicas dentre as quais, cinco (5) são Teses, e vinte (20) são Dissertações, conforme mostrado na Tabela 1, representada na Figura 2.

Tabela 1– Mapa das produções científicas (Teses e Dissertações) no Brasil envolvendo artêmias durante o período de 2014 a 2018.

PERÍODOS	TESES	DISSERTAÇÕES	TOTAL
2014	0	3	3
2015	1	2	3
2016	1	6	7
2017	0	4	4
2018	3	5	8
<b>TOTAL</b>	<b>5</b>	<b>20</b>	<b>25</b>

Fonte: AUTORA (2020).

Figura 2 - Número de Teses e Dissertações envolvendo artêmias produzidas entre 2014-2018.

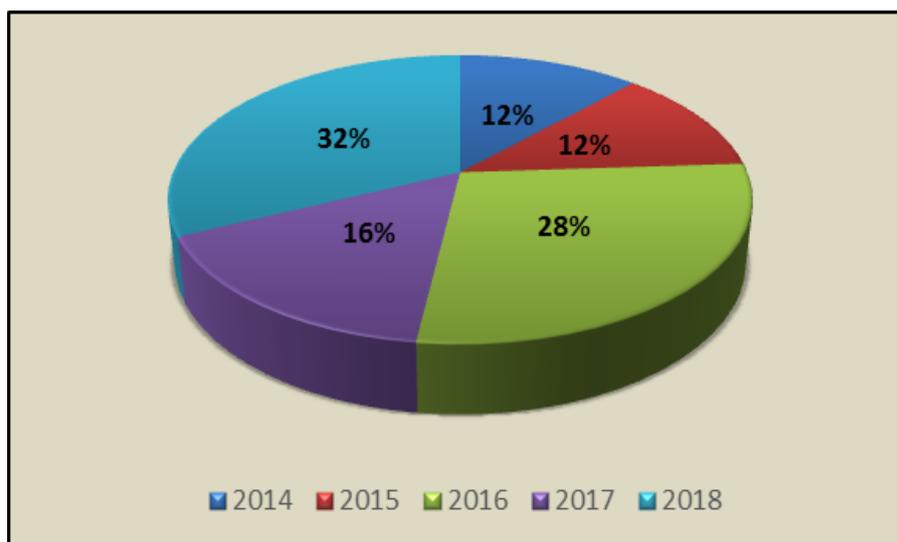


Fonte: AUTORA (2020).

Do total de 25 trabalhos envolvendo artêmias, 80 % são dissertações e 20 % de teses, observando-se uma tendência de aumento de produção no tema, em particular em relação a teses. A distribuição temporal revelou que nos anos de 2016 e 2018 foram os períodos que apresentaram os maiores percentuais de produções

acadêmicas no tema, tendo registrado, respectivamente 28 % e 32 % do total de trabalhos no período, conforme mostrado na Figura 3.

Figura 3 - Percentuais de produções acadêmicas envolvendo artêmias entre o período de 2014 a 2018.



Fonte: AUTORA (2020).

Dos 25 documentos científicos destacados, apenas quatro, correspondendo a 16 % do total, continham o termo “artêmia” em seu título. Apesar de todas as teses e dissertações terem desenvolvido estudos com os microcrustáceos artêmias, os seus objetivos, contudo, se restringiram ao uso destes como organismo modelo, em análises toxicológicas, diferente do fim apresentado neste documento (Tabelas 2 e 3).

Para o desenvolvimento de um produto tecnológico, uma pesquisa de anterioridade internacional foi feita a partir de bases de dados associadas à Organização Mundial da Propriedade Intelectual (OMPI), permitindo ao NIT da UFPE (Positiva) o depósito de uma patente de produto e processo com base no presente estudo. O estudo teve como objetivo inicial uma prova de conceito do uso da capacidade filtradora do microcrustáceo artêmia para aplicação como “motores vivos” em concentradores para detecção de traços de micropoluentes em EA, a partir de função de correlação em função do tempo de filtragem, aplicada às análises do concentrado obtido após digestão dos indivíduos, resultando na determinação da

concentração do micropolvente na amostra de água analisada, em casos em que os limites de detecção comprometem a análise da amostra não concentrada. Dessa forma, as artêmias podem ser utilizadas como parte ativa de dispositivos concentradores vivos de micropoluentes em ambientes aquáticos, e esta aplicação se diferencia e singulariza este trabalho em relação aos outros, relacionados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2- Quadro geral de Dissertações utilizando artêmias entre 2014 e 2018, com os seus títulos e objetivos.

DISSERTAÇÕES		
PERÍODO	TÍTULO	OBJETIVO
2014	Ocorrência de pesticidas em efluentes oriundos da produção de uva: tratamento por fotólise e avaliação da toxicidade, Almir Costa Amorim Júnior.	Caracterizar estes efluentes para propor o tratamento mais adequado, e avaliar o efeito da fotólise na degradação dos agrotóxicos.
	Aspectos ecotoxicológicos relacionados à formação de agregados óleo-material particulado em suspensão (OSAs) em sedimentos de manguezal, Ana Carina Matos Silva.	Verificar a resposta toxicológica do copépode harpacticóide <i>Nitokra</i> sp. e do microcrustáceo <i>Artemia salina</i> em testes de avaliação de toxicidade aguda relacionados à formação do OSA em simulação de ecossistema de manguezal a nível de microescala em comparação com a exposição ao óleo cru.
	Desenvolvimento de micropartículas de xilana utilizando reticulante não tóxico visando a liberação cólon-específica, Silvana Cartaxo da Costa.	Desenvolver micropartículas de xilana utilizando reticulante não tóxico (TSTP) visando a liberação cólon-específica.
2015	Potencial Antibiótico, Antioxidante e Teste de Letalidade frente a <i>Artemia salina</i> de extratos de <i>Gracilaria</i> (Rhodophyta, Gracilariales), Patrícia Soares dos Santos.	Avaliar o potencial biológico dos extratos de Macroalgas Marinhas do gênero <i>Gracilaria</i> (Rhodophyta, Gracilariales), bem como, realizar teste de letalidade dos extratos etanólicos para o gênero em questão.
	Toxicidade e atividade moluscicida do extrato etéreo, da atranorina e do ácido praesorediósico de <i>Parmotrema praesorediosum</i> (Nyl.) Hale, Alessandra Nascimento de Carvalho.	Avaliar o efeito moluscicida do extrato etéreo e das substâncias purificadas de <i>Parmotrema praesorediosum</i> sobre embriões e moluscos da espécie <i>Biomphalaria glabrata</i> e o ensaio de letalidade com as larvas do microcrustáceo <i>Artemia salina</i> .
2016	Construção de microrreatores nanoestruturados para a degradação de diclofenaco sódico mediante fotocatalise heterogênea, José Vinícius Oliveira Carneiro.	Apresentar um processo tecnológico para tratamento de CEs em águas residuais, oferecendo um fotocatalisador nanoestruturado baseado em microrreatores sintetizados a partir de titânio (Ti), nanotubos de dióxido de titânio (TiO <sub>2</sub> ) e com adição de nanopartículas metálicas como sensibilizantes.
	Avaliações toxicológicas da zootoxina de <i>Philodryas patagoniensis</i> (Serpente: Dipsadidae), Marcio Tavares Costa.	Avaliar os efeitos toxicológicos gerado pela peçonha de <i>P. patagoniensis</i> sobre leucócitos humanos in vitro - citotoxicidade e genotoxicidade - e sobre <i>Artemia salina</i> in vivo.
	Avaliação das atividades moluscicida, cercaricida e artemicida do extrato bruto de <i>Myracrodruon urundeuva</i> alemão e <i>schinus terebinthifolius</i> Raddi e suas frações acetato de etila, José Luís Ferreira Sá.	Avaliar a atividade moluscicida do extrato bruto e fração acetato de etila das folhas de <i>M. urundeuva</i> e casca de <i>S. terebinthifolius</i> .
	Toxicidade, toxicocinética e bioacumulação de cádmio e mercúrio nos microcrustáceos marinhos <i>Artemia</i> sp. e <i>Mysidopsis juniae</i> , Évila Pinheiro Damasceno.	Avaliar a toxicidade, toxicocinética e bioacumulação de cádmio e mercúrio nos microcrustáceos marinhos <i>Artemia</i> sp. e <i>Mysidopsis juniae</i> .
	Remoção de corantes têxteis em efluentes simulados por coagulação e avaliação de toxicidade, Artur Blikstad Mauro.	Aprimorar os métodos de remoção de corante Acid Red 114 e Acid Blue 40 do efluente de indústrias têxteis por tratamentos físicoquímicos utilizando coagulantes e comparação de toxicidade microbiológica e de sementes do efluente tratado e não tratado.
	Caracterização química e testes de atividade biológica in vitro em abacaxizeiros silvestres, Juliana Azevedo da Paixão.	Conhecer a composição química e as atividades biológicas de acessos e híbridos de diferentes variedades botânicas do gênero <i>Ananas</i> , em parceria com (EMBRAPA).

Fonte: AUTORA (2020).

Tabela 2- Quadro geral de Dissertações utilizando artêmias entre 2014 e 2018, com os seus títulos e objetivos (continuação).

DISSERTAÇÕES		
PERÍODO	TÍTULO	OBJETIVO
2017	Efeito do uso de probiótico e diferentes enriquecedores na artemia sp. no cultivo de juvenis de cavalo-marinho <i>Hippocampus reidi</i> , Daner Rosskamp Ferreira.	Aprimorar o cultivo de cavalo-marinho <i>H. reidi</i> na fase juvenil, a partir da avaliação de diferentes enriquecedores e uso de probiótico no enriquecimento da <i>Artemia</i> sp. ofertada como alimento exclusivo aos animais a partir de 30 dias após o nascimento.
	Avaliação ecotoxicológica do antibiótico amoxicilina considerando sua presença no ambiente aquático, Lara Barroso Brito.	Avaliar o impacto ambiental da amoxicilina, em diferentes organismos de um ecossistema, considerando a sua presença nos recursos hídricos, utilizando o microcrustáceo <i>Artemia salina</i> na avaliação da ecotoxicidade.
	Estudo da toxicidade de garrafada de uso popular, Denise Michelle Indras.	Verificar a correlação entre o uso de múltiplas plantas medicinais com as alterações hepáticas, renais e hematológicas encontradas em um paciente que fez uso de garrafada, composta por equinácea, graviola, ipê roxo, sucupira e unha de gato e quais os possíveis mecanismos de toxicidade apresentados pelos diferentes tipos de plantas encontradas na garrafada - Citotoxicidade com <i>Artemia salina</i> .
	Estudo químico e histoquímico das folhas de <i>Duroia longiflora</i> Ducke (Rubiaceae), Fabiele Souza da Cruz.	Realizar o estudo fitoquímico e da atividade biológica dos extratos das folhas de <i>Duroia longiflora</i> , bem como o estudo histoquímico e anatômico das folhas, usando a <i>Artemia salina</i> indicador de toxicidade em bioensaios.
2018	Adsorção de azul de metileno em óxido de grafeno magnético e avaliação toxicológica do adsorvente em peixes zebra (danio rerio) e em artêmias salinas, Daiene Dorfey.	Estudar a adsorção do azul de metileno em óxido de grafeno magnetizado com ferrita de zinco, disperso em meio aquoso, bem como estudar a toxicidade desse composto em peixes zebra ( <i>Danio rerio</i> ) e artêmias salinas.
	Estudos de síntese, toxicidade e relação estrutura-atividade de derivados indólicos 3-substituídos em <i>Aedes aegypti</i> (Diptera: Culicidae) e <i>Artemia</i> sp. (Artemidae), Thaysnara Batista Brito.	Realizar estudo de síntese e Relação entre a Estrutura e a Atividade (REA) e de Toxicidade de novos derivados do ind 3-substituídos frente ao <i>Aedes aegypti</i> e <i>Artemia</i> sp.
	Avaliação da toxicidade de misturas: Irgarol e contaminantes ambientais comumente observados em áreas costeiras, Guacira de Figueiredo Eufrasio Pauly.	Avaliar a toxicidade de misturas binárias do biocida Irgarol com amônia e surfactante Alquil. Benzeno Sulfonado Linear - LAS, além das toxicidades dessas substâncias isoladas.
	Caracterização integral de frutos tamarindo ( <i>Tamarindus indica</i> L.) do cerrado de Goiás, Brasil e aplicação em produtos drageados, Karen Carvalho Ferreira.	Caracterizar e avaliar polpa, casca e sementes de tamarindo ( <i>Tamarindus indica</i> L.), desenvolver drageados salgados utilizando as farinhas dos subprodutos cascas e sementes, além de avaliar a qualidade nutricional e sensorial dos drageados produzidos.
	Avaliação dos efeitos tóxicos individuais e associados de herbicidas a base de glifosato e imazetapir sobre organismos não-alvo, Gessyca Gonçalves Costa.	Avaliar os efeitos induzidos pelas formulações comerciais Glifosato Atanor (ATN) e Imazetapir (IMZT) isolados e associados (M1, M2 e M3) sobre organismos não-alvo, através de ensaios de toxicidade aguda com semente de <i>Cucumis sativus</i> , microcrustáceo <i>Artemia salina</i> e os estágios embrio-larvais de zebrafish, incluindo a análise da citotoxicidade.

Fonte: AUTORA (2020).

Tabela 3- Quadro geral de Teses utilizando artêmias entre 2014 e 2018, com os seus títulos e objetivos.

TESES		
PERÍODO	TÍTULO	OBJETIVO
2015	Compostos de ferro de interesse farmacológico: avaliação da estabilidade, toxicidade em organismos aquáticos, transporte em células e capacidade de gerar reservatórios de ferro lábil, Hector Aguilar Vitorino.	Avaliar a estabilidade dos diferentes compostos de ferro por métodos de fluorescência, frente a ligantes fluorescentes de diferente natureza e de grande afinidade pelo ferro (DFO. CAL. Tf), em diferentes meios biologicamente relevantes, como soro sanguíneo (humano) e água do mar (crustáceos). Determinar a capacidade oxidante desses compostos, tanto em solução como em animais inteiros. Avaliar a toxicidade dos compostos de ferro em um biomodelo de toxicidade aquática ( <i>Artemia salina</i> ) através da mortalidade (LC 50). Determinar, a nível celular, a quantidade de ferro transportado em linhagens de hepatopâncreas de caranguejo, <i>Ucides cordatus</i> em diferentes estágios de desenvolvimento (E, R, F e B).
2016	Estudo da degradação de herbicidas triazínicos por <i>Pleurotus ostreatus</i> INCQS 40310, Aline Ramalho Brandão Pereira.	Avaliar a tolerância e capacidade de degradação de atrazina nas concentrações de 10 e 20 mg/L e propazina a 10 mg/L, separadamente e em conjunto (10 mg/L de cada herbicida), pelo fungo ligninolítico <i>Pleurotus ostreatus</i> INCQS 40310, bem como o papel de suas enzimas intracelulares e extracelulares no processo de degradação. Em adição, avaliar a toxicidade dos herbicidas ao bioindicador <i>Artemia salina</i> .
2018	Desenvolvimento, caracterização, estudos de estabilidade, genotoxicidade, citotoxicidade e ecotoxicidade de sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de gengibre ou trans-anetol, Cláudia Grigolo Pinto.	Produzir e caracterizar sistemas nanoestruturados contendo óleo essencial de gengibre ou trans-anetol e avaliar sua estabilidade sobre parâmetros físico-químicos, analisar os parâmetros de cito, geno e ecotoxicidade, in vitro e, in vivo utilizando <i>Artemia salina</i> comparando com as formas livres do óleo essencial de gengibre e do trans-anetol.
	Estudo ecotoxicológico de corante têxtil e remediação por Fenton e Fenton-like, Neemias Cintra Fernandes.	Avaliar a ecotoxicidade e otimizar as condições de decomposição do azo corante têxtil DR343 utilizando reações do tipo Fenton e Fenton-like.
	Propriedade fotocatalítica de SrSnO <sub>3</sub> e derivados: Eficiência na degradação de corantes, otimização nos parâmetros de reação e avaliação toxicológica, Luzia Maria Castro Honório.	Sintetizar as perovskitas de estannatos de estrôncio (SrSnO <sub>3</sub> ) dopado com cobre (10% - Cu <sup>2+</sup> ) e suportados em dióxido de zircônio (ZrO <sub>2</sub> ) para aplicação fotocatalítica na degradação de corantes sintéticos. Além disso, investigar os fotoprodutos de degradação dessas moléculas poluentes por meio da espectrometria de massas via LC-MS e avaliar a toxicidade dos fotoprodutos gerados através de testes utilizando <i>artemia salina</i> e MTT ([3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]).

Fonte: AUTORA (2020).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- Realizar a prova de conceito de que os microcrustáceos do gênero *Artemia* podem funcionar como concentradores vivos de nanocontaminantes presentes em ecossistemas aquáticos, para facilitar a detecção *ex situ* de traços desses poluentes a partir de técnicas analíticas utilizando amostras pré-concentradas em função do tempo de filtração não seletiva desses animais, utilizados como sonda viva.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Classificar por taxonomia morfológica e molecular o microcrustáceo;
- expor as larvas naupliares à microalga *Nannochloropsis oculata* como alimento natural e a nanocontaminantes modelo (nanopartículas de prata, nanotubos de carbono e pontos quânticos);
- explorar a capacidade filtradora não seletiva das artêmias na fase larval na presença do alimento natural e micropoluentes modelo;
- avaliar a capacidade filtradora das larvas naupliares da *Artemia franciscana* em concentrar micropoluentes em função do tempo de filtragem, por intermédio de análise por: Espectroscopia de Absorção na Região do Ultravioleta Visível (UV-Vis), Espectrometria de Emissão Ótica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES), Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS), Espectroscopia Raman e Microscopia de Fluorescência.
- aplicar método de digestão de amostras em náuplios expostos a NPs Ag para obtenção do micropolvente filtrado e em seguida submeter o material digerido à análise por Espectrometria de Emissão Ótica em Plasma Indutivamente

- Acoplado (ICP OES) para detecção e quantificação *ex situ* do material concentrado por biofiltração;
- elaborar uma tabela correlacionando o tempo de filtragem do microcrustáceo com a concentração real de prata no ambiente estudado;
  - determinar a presença de NPs Ag em larvas naupliares expostas a soluções teste de NPs Ag a partir da Espectroscopia de raios X por dispersão de energia (EDS) associada à Microscopia Eletrônica de Varredura;
  - Avaliar nanotubos de carbono (NTC) como nanocontaminantes modelo para avaliar a influência da razão de aspecto do material nanoestruturado na concentração acumulada nas larvas naupliares;
  - Avaliar o desenvolvimento de um dispositivo pré-concentrador de poluentes em água contendo artêmias, para pelo menos uma classe de nanocontaminante e técnica analítica.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

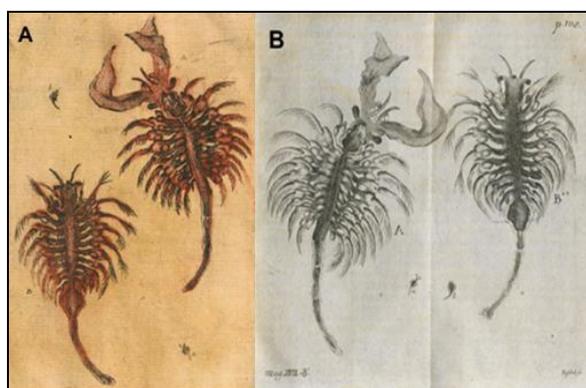
Informações sobre a taxonomia, a ecotoxicologia, a biodiversidade, a filogenia e a biogeografia relacionadas às artêmias como organismo modelo podem ajudar na interpretação dos resultados desta pesquisa, cujos aspectos originais referem-se à aplicação desses microcrustáceos, particularmente em sua fase naupliar, como pré-concentradores vivos de traços de micropoluentes em ambientes aquáticos, em função do tempo de filtração não seletiva desses animais, atuando como sondas vivas.

#### 3.1 MICROCRUSTÁCEO ARTÊMIA

As artêmias são animais conhecidos pelo homem desde o século XVIII. Com mais de 500 registros (ABATZOPOULOS et al., 2002), são consideradas um dos organismos mais pesquisados em todo o mundo (ASEM, 2008).

A primeira descrição documentada em periódico científico relativa à sua existência é atribuída a Schlösser, em carta publicada em 1755 no *Journal Britanique*, como um novo "gênero de insetos" e as ilustrou com desenhos em placa de cobre realizados por Mateus Maty a partir de imagens de microscópio de um macho e uma fêmea. As imagens não foram incluídas no *Journal Britanique*, mas foram publicadas no ano seguinte em tradução para um periódico francês (Figura 4-A), e alemão (Figura 4-B), as mesmas imagens de macho e fêmea, mas invertidas e reposicionadas.

Figura 4 - Ilustrações da *Artemia salina* publicadas pioneiramente em 1756.



Fonte: ENGELMANN; SLIGGERS (2015).

De acordo com Schlösser, elas correspondiam a uma população existente nas salinas de Lymington (Inglaterra), atualmente extinta (ENGELMANN; SLIGGERS, 2015).

Jensen (1918) comentou que a *Artemia gracilis*, o camarão-de-salmoura do Great Salt Lake, Utah-USA, foi referida nas anotações realizadas pelo Capitão Bonneville durante suas explorações ao longo das margens do Great Salt Lake em 1831-1833. Ele descreveu que havia presença de pequenos animais na água, onde provavelmente se referia ao camarão-de-salmoura.

Asem (2008), no entanto, destaca que o primeiro registro científico a respeito da existência das artêmias data do ano de 982, proveniente do Lago Urmia, no Irã e pertencia a um geógrafo de origem iraniana. Segundo esse autor, este dado está documentado no livro “*The Limits of The World from The East to The West*”, a partir da citação sobre um “*verme* que pode viver na água salgada do lago”. O “*verme* de salmoura” é outro nome atribuído às artêmias (SORGELOOS, 1980).

A taxonomia deste gênero vem evoluindo desde a segunda metade do século XX até os dias atuais. O apoio de técnicas moleculares modernas tem contribuído consideravelmente para a identificação dos organismos a nível de espécie. Apesar da análise molecular ser hoje em dia mais acessível, é ainda comum encontrar trabalhos na literatura que identifiquem equivocadamente diferentes espécies de artêmias como *A. salina* (ACEY et al., 2002; TAYLOR et al., 2005).

Outros aspectos relacionados a taxonomia têm sido registrados em estudos, como o de Kellog (1906) que descreveu a *A. franciscana* como uma nova espécie para ciência a partir da análise de suas características morfológicas e de suas condições de vida. Por outro lado, Ruebhart et al. (2008) em sua pesquisa, ressalta que a correta identificação taxonômica da espécie de artêmia (Anostraca), usada em diferentes estudos, é um parâmetro importante para assegurar a validade dos resultados do ensaio. Parâmetros como ausência ou presença de estruturas, ou como tamanho e coloração são aspectos levados em consideração na sistemática.

Triantaphyllidis et al. (1997), através da análise filogenética dos caracteres morfológicos e moleculares de populações de artêmias do Mediterrâneo, descobriram que todas encontradas nessa Região pertenciam a uma mesma espécie e que há conspecificidade entre *A. salina* de Lymington e as artêmias

bissexuais da bacia do Mediterrâneo. Em relação a diferenciação dos caracteres sexuais, Mura; Brecciaroli (2004) verificaram que a morfologia dos botões frontais do macho e a presença ou ausência de projeção semelhante a espinho na parte basal do pênis são caracteres parcialmente eficientes para distinguir espécies.

Zheng; Sun (2008) estudando a morfologia do botão frontal e do gonópodo de oito populações bissexuais de artêmias da China, mostraram que o botão frontal apresentava um número de espinhos bem superior aos das espécies não encontradas na região da China, e que os gonópodos dessas populações são mais longos do que dessas quatro espécies não chinesas, indicando que as espécies diferem de acordo com o local de origem.

Os efeitos resultantes da combinação entre parâmetros abióticos, salinidade e temperatura, têm sido investigados nas artêmias. Engel; Angelovic (1968) revelaram que existe diminuição das taxas de respiração das larvas naupliares do lago Great Salt mediante o aumento da salinidade em cinco temperaturas testadas. Vanhaecke et al. (1984) por outro lado, desenvolveram um procedimento padronizado que permitiu a identificação simultânea de preferências e tolerâncias de temperatura e salinidade para diferentes linhagens, com aplicações em aquicultura. Browne; Wanigasekera (2000) constataram que o efeito combinado entre a temperatura e salinidade promove interações significativas para a sobrevivência e confere características reprodutivas.

Em estudos envolvendo análises toxicológicas, esses microcrustáceos apresentaram reduzida variabilidade genética e elevada resistência ou adaptação a condições abióticas em bioensaios. Neste sentido, um dos primeiros trabalhos a utilizarem as artêmias como organismo-teste foi o realizado por Michael et al. (1956), que investigaram o efeito de inseticidas em suas fases larval e adulta, no qual elas se mostraram sensíveis nestas duas fases respectivamente.

Pretti et al. (2014), estudando a ecotoxicidade do grafeno pristino para organismos marinhos, não evidenciaram toxicidade aguda, apesar dos biomarcadores de estresse oxidativo terem revelado um padrão alterado e um certo nível de dano, que foi considerado um sinal de alerta precoce em níveis mais altos de organização biológica. O sulfato de cobre pentahidratado ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ), dodecil Sulfato de Sódio (SDS) e o composto orgânico dietilenoglicol (DEG) foram usadas

em artêmias e foi evidenciado efeitos letais e subletais de preocupação ecotoxicológica, pois foi afetado a velocidade de natação comparável à taxa de eclosão, se refletindo ainda na incubação que mostrou ser preferíveis à mortalidade (MANFRA et al., 2016).

Comeche et al. (2017) analisaram que a exposição aguda do metilparabeno (MeP) na *A. franciscana* foi prejudicial nesta condição, contudo, a exposição crônica nas concentrações subletais testadas não afetou a sobrevivência e o crescimento desta espécie. Observaram que o MeP interferiu na atividade da enzima catalase, após 48 h de exposição em ambas as concentrações testadas, provocando uma diminuição de sua ação e acarretando estresse oxidativo.

O efeito de microplásticos de poliestireno nas artêmias tem sido descrito em vários trabalhos. A influência de nanopartículas de poliestireno no tamanho, na alimentação, no comportamento e na fisiologia de larvas de *A. franciscana*, foram estudados por Bergami et al. (2016). Os resultados sugeriram que as nanopartículas de poliestireno presentes nas concentrações testadas podem representar um risco para zooplâncton marinho. O estudo também sugere que o tamanho das nanopartículas de poliestireno pode prejudicar a captação de alimentos, a motilidade, bem como interferir na muda das larvas naupliares da *A. franciscana*, podendo acarretar consequências negativas não só a nível de organismo e população, mas a nível de Ecossistema, uma vez que ela é fundamental para a cadeia trófica marinha.

Wang et al. (2019) investigando as ações das microesferas de poliestireno ingeridas pela *A. parthenogenetica*, durante 14 ou 24 dias, observaram que a exposição causou toxicidade significativa, o que repercutiu na sobrevivência, crescimento ou desenvolvimento das larvas naupliares e em todas as concentrações testadas, exceto nas concentrações ambientalmente relevantes. No entanto, foram descobertas alterações ultra estruturais nas células epiteliais que revestem o trato digestivo, tais como microvilosidades menores e desordenadas, maior número de mitocôndrias e aparecimento de autofagossomo.

Em artêmias, os iniciadores do gene mitocondrial citocromo C oxidase, subunidade 1 (COI) geram sequências informativas para análises filogenéticas nas espécies e níveis taxonômicos mais elevados (FOLMER et al., 1994). Moorad et al.

(1997), descreveram um método para a extração rápida do ácido desoxirribonucleico (DNA) a partir de cistos, originando molde de DNA polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) para análise em reação em cadeia da polimerase (PCR). Por conseguinte, Tizol-Corrêa (2006) comenta que houve um aumento sucessivo de pesquisas envolvendo o desenvolvimento de novas técnicas moleculares propondo o surgimento de novas linhagens genéticas a partir da reavaliação taxonômica do gênero.

Ogello et al. (2014) revelaram a partir da análise da sequência do DNA mitocondrial e da proteína de choque térmico 70 (Hsp70) que existem evidências moleculares da coexistência da linhagem de artêmias procedentes da Baía de São Francisco com a linhagem de artêmias das salinas de Fundisha, no qual as cepas desta localidade apresentaram uma maior diversidade haplotípica e a existência de um novo haplótipo. Sendo assim, observou-se uma evidência molecular de uma diferenciação genética sistemática, embora de maneira insignificante.

O uso de artêmias na aquicultura tem sido assinalado em diversos estudos. Lavens et al. (1989); Lavens; Sorgeloos (1996) Treece (2000) ressaltaram as *Artemia* sp, como os alimentos vivos mais utilizados no cultivo de peixes e crustáceos. Bengtson et al. (1991) destacaram que estes animais poderiam ser melhorados como alimentos do ponto de vista nutricional, distinguindo as principais técnicas de enriquecimento. Sorgeloos et al. (2001), relataram que esses microcrustáceos podem bioencapsular nutrientes essenciais, tornando-se alimentos mais enriquecidos do ponto de vista nutricional. Igarashi (2008) destaca que estes organismos podem ser encontrados na forma comercial de cistos, biomassa congelada e liofilizada.

A vetorização de vírus e bactérias na aquicultura por intermédio de artêmias tem sido motivo de preocupação e de vários estudos. Haché; Plante (2011) avaliaram a possibilidade das artêmias funcionarem como estratégias de enriquecimento de rotíferos e constaram que elas podem se configurar como uma opção na composição nutricional e como carga bacteriana do alimento vivo. Em relação a suscetibilidade e o papel como vetor da *A. franciscana* na transmissão horizontal do vírus da *Infectious myonecrosis virus* (IMNV) para o camarão *Litopenaeus vannamei*, foi evidenciado infecção desta espécie pelo vírus, no qual

ela se comportou como vetor transmitindo para este vírus nas condições experimentais examinadas (Da SILVA et al., 2015).

No tocante à biogeografia, Câmara (1996) ressalva que as populações desse microcrustáceo são encontradas em todos os continentes, com exceção da Antártica. Na revisão do gênero *Artemia* realizada por Triantaphyllidis et al. (1997) informações sobre os habitats das artêmias no mundo, sobre a classificação taxonômica das várias populações estudadas, bem como sobre os problemas que dificultam as caracterizações de novas populações e o papel na cadeia trófica foram abordados. Por sua vez, Gajardo; Beardmore (2012) destacam que a artêmia é o único macro-planctônico habitante de lagos salgados. Dhont et al. (2013) mencionam que o gênero *Artemia* (Leach,1819) está constituído de espécies bissexuais, encontradas no velho e novo mundo e por populações partenogenéticas com diferentes níveis de ploidias endêmicas da Europa, África, Ásia e também registradas na Austrália, todas reconhecidas por *A. parthenogenetica* (Muñoz et al.2010).

Zheng; Sun (2013) mencionam que a biogeografia das artêmias na China apresenta uma ampla variedade de locais, cerca de 274 habitats, dos quais, 66 são salinas costeiras e 208 são lagos salgados e uma rica diversidade de espécies. A distribuição geográfica da *A. franciscana* também é abordada nos estudos de Green et al. (2008), Muñoz et al. (2013), Sánchez et al. (2013), Muñoz et al. (2014). Nestes trabalhos, a ampliação da distribuição geográfica é atribuída as aves, que desempenham o papel de vetores ajudando na disseminação desta espécie.

Sheir et al. (2018) utilizaram de análise morfológica e molecular para ampliar a distribuição geográfica da *A. franciscana*, encontrada no lago Qaroun, registrando-a no Egito pela primeira vez. Os resultados das análises filogeográficas genéticas demonstraram que as cepas encontradas no lago Qaroun, apresentaram maior proximidade com as cepas latino-americanas do que com as norte-americanas e que a presença deste organismo neste Ecossistema pode ser atribuída provavelmente às aves migratórias, uma vez que não há registro de atividade ligada a aquicultura marinha desenvolvida neste lago.

### 3.2 NANOMATERIAIS (NM)

De acordo com a Comissão Europeia (2011), os nanomateriais são definidos como “material natural, incidental ou manufaturado contendo partículas não ligadas entre si ou em agregados ou formando aglomerados nos quais a distribuição de tamanho apresenta 50 % ou mais dessas partículas com uma ou mais dimensões externas no intervalo entre 1 nm e 100 nm”. Como exemplo de nanomaterial de duas dimensões temos uma folha de grafeno, de uma dimensão temos o nanotubo de carbono, e de dimensão zero uma nanopartícula metálica, um *quantum dot* ou um fulereno.

O objetivo deste trabalho é de melhorar a detecção dos nanomateriais antropogênicos na natureza, e serão considerados nanocontaminantes.

A utilização de materiais manufaturados em escala manométrica já vem sendo empregada, e as nanotecnologias exploram as propriedades desses materiais associadas ao tamanho. Novas propriedades, exploradas em produtos e processos nanotecnológicos, geralmente estão associadas a efeitos quânticos como o de confinamento de elétrons e à grande relação superfície/volume dessas nanoestruturas, afetando diversas propriedades, que vão desde as elétricas e mecânicas, até a cor, passando a depender da dimensão.

Os primeiros registros sistemáticos do uso tecnológico de nanomateriais é atribuído aos vidraceiros da Idade Média, que se utilizaram de um procedimento simples em Ciência de Materiais e Química, para obter vidros com cores variadas. Segundo Liz-Marzan (2004) esses profissionais dispersavam clusters de NPs Ag e NPs Au em vidros de forma a provocar fenômenos de transmissão e refração quando a luz incidia sobre objetos, gerando cores vivas. Mas, mesmo antes da queda do Império Romano, que delimita o fim da idade antiga, há identificação do uso de nanopartículas metálicas de ouro e prata em vidros, como no caso do “Cálice de Licurgo”, datado do século IV, e que se encontra em exposição no Museu Britânico. Devido às nanopartículas de ouro e prata dispersas no vidro, apresenta cor vermelha se iluminado por transmissão, com a fonte de luz atravessando o vidro, e passa a ter cor verde jade quando é iluminado pela frente, por reflexão da luz.

O desenvolvimento de novas instrumentações e procedimentos técnicos tem possibilitado avanços das nanotecnologias. Atualmente, nanomateriais podem ser modelados inclusive computacionalmente com finalidades específicas (PITKETHLY, 2004). Essas evoluções podem proporcionar em diversas áreas, e também na Medicina e ao monitoramento do Meio Ambiente, novas possibilidades de aplicações, explorando-se novas propriedades associadas à escala nanométrica (RATTNER, 2004).

Uma das estratégias de aplicações das nanotecnologias no desenvolvimento de nanodispositivos é a exploração de estruturas em dimensões abaixo de 100 nm, no quais as propriedades físicas, elétricas e químicas, apresentam especificidades diferentes daquelas exibidas pelos mesmos materiais em escala macroscópica (MELO, 2004). Esses materiais apresentam uma maior relação entre a área superficial e o volume, conferindo novas propriedades, e de um modo geral, maior reatividade quando comparados aos mesmos materiais, mas com dimensões superiores (MOORE, 2006).

O tamanho, o aumento da razão entre a área de superfície e o volume do nanomaterial são efeitos de superfície e de confinamento quântico, que conferem características incomuns e assim, novos interesses e aplicações diversificadas. Na Nanomedicina, por exemplo, o diagnóstico precoce, o tratamento e teranóstica de doenças autoimunes, é realizado a partir do emprego de nanopartículas multifuncionais, na Nanobiotecnologia, os nanofármacos, na Nanoeletrônica, a gravação e leitura magnética (CAMPOS, 2005; FERREIRA; RANGEL, 2009; LÓPEZ, 2017).

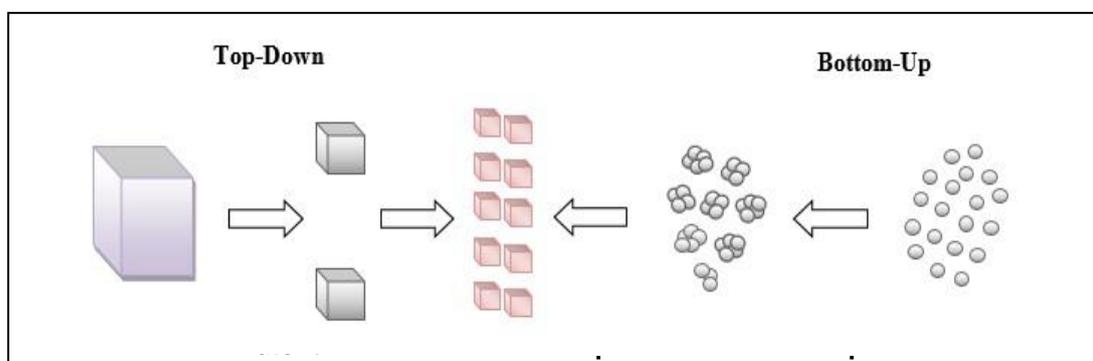
Desta maneira, as diferentes formas de aplicação dos NM desenvolvidos com propriedades otimizadas particularmente nas Ciências da Natureza e Saúde a partir da Nanociência e Nanotecnologia (N&N), têm motivado grupos de pesquisa a investirem em nanociência para conhecer mais sobre que técnicas e procedimentos nanotecnológicos podem ser aplicados nestas áreas de conhecimento (CHAN, 1998; MA et al., 2003).

O grupo de “Arquitetura de Nanodispositivos Fotônicos e Bioinspirados”, em que o presente projeto de pesquisa foi desenvolvido, foi criado em 1996 no DQF-UFPE, e cadastrado desde a primeira edição do Diretório de Grupos de Pesquisa do

Brasil (CNPq) e homologado pela instituição. No LandFoton, laboratório de base do Grupo, que também integra o Biotério de Espécies Nanoestruturadas (BEN) e o Ponto Quântico Nanodispositivos, hub de inovação instalado na Positiva, NIT da UFPE, são desenvolvidas pesquisas acadêmicas no campo da nanociência e da nanotecnologia, caracterizadas por resultarem em aumento de maturidade tecnológica durante a execução, em temas alinhados com as atuais ondas de inovação tecnológica. Com base na cronologia dessas ondas de inovação tecnológica, entre 1996 e 2006, os estudos envolveram principalmente o desenvolvimento de nanodispositivos moleculares 2D, de 2006 a 2016 nanocompósitos híbridos 1D/0D, resultando na produção de três Dissertações e cinco Teses envolvendo N&N, e a partir de 2016 até os dias atuais, as pesquisas estão voltadas para o desenvolvimento de nanodispositivos imprimíveis e bioinspirados, em fase com a 6ª Onda de Inovação, já tendo resultado na defesa de duas Dissertações, uma Tese.

Os nanomateriais manufacturados incluem nanopartículas, nanocristais, nanotubos, nanofibras, nanofios, nanobastões, nanofilmes, entre outros. Esses materiais, segundo Faria-Tischer; Tischer (2012) podem ser produzidos em dimensões nanométricas por rotas químicas, normalmente por processos *Bottom-Up* (de baixo para cima) onde o material é sintetizado a partir de átomos ou moléculas individuais, ou por processos físicos, *Top-Down* (de cima para baixo) (Figura 5), no qual os materiais em nanoescala são produzidos a partir de outros de maior tamanho e de técnicas como, por exemplo, de litografia ou ablação a laser (NGÔ; VAN DE VOORDE, 2014).

Figura 5 - Síntese de nanomateriais pelas abordagens *Top-Down* e *Bottom-Up*.



Fonte: PANDEY et al. (2016).

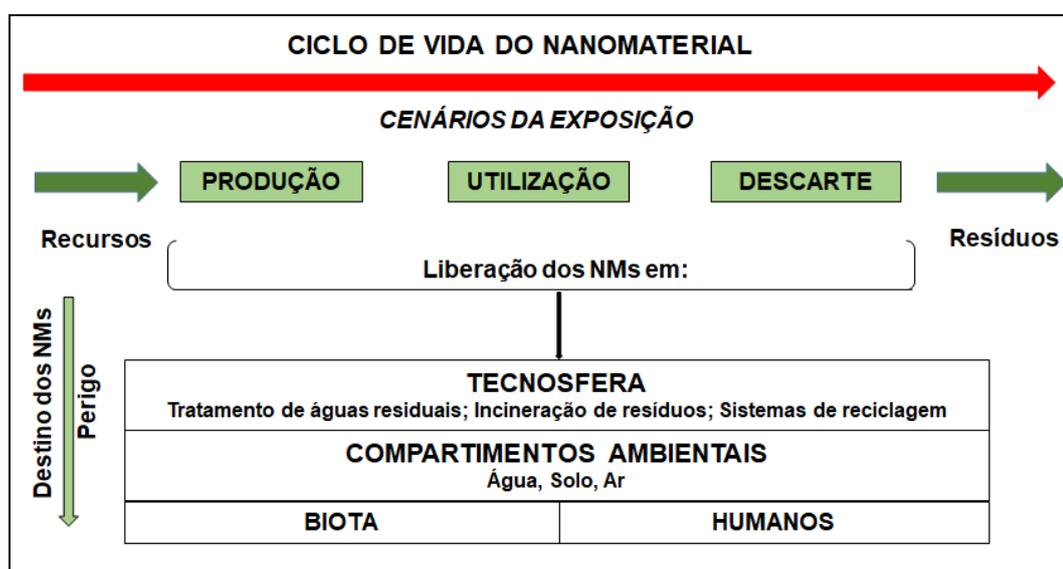
Conforme Scheidt (2008), apesar de NM serem utilizados como matéria-prima, no processo de micro-fabricação e bioengenharia de dispositivos manufaturados, torna-se relevante monitorar as interações que esses possam vir a estabelecer com o ambiente e a biota.

Risco de contaminação ambiental, dadas às características intrínsecas desses materiais, como tamanho, área superficial e capacidade de aglomeração/dispersão, pode facilitar o deslocamento desses pelos compartimentos ambientais e ocasionar, de forma acumulativa, danos à cadeia alimentar e à saúde (PASCHOALINO et al., 2010).

Estudos para a avaliação de riscos causados pelos impactos dos NM manufaturados sobre o ambiente e à saúde humana têm despertado interesse da comunidade científica, principalmente pela produção em grande escala de produtos e subprodutos pelas indústrias de nanotecnologias, tornando-se inevitável sua penetração no ambiente aquático (MOORE et al., 2004; MOORE, 2006).

Oomen et al. (2018) ressaltaram que os NM de formas diferentes podem exibir comportamentos específicos tanto em seu destino quanto na toxicocinética e, portanto, serem perigos ao ambiente. OECD (2012); Gottardo et al. (2017) revelaram que durante o ciclo de vida dos NM (Figura 6), as mudanças nas propriedades físico-químicas, podem também representar fatores relevantes para seu potencial de risco.

Figura 6 - Esquema simplificado do ciclo de vida de nanomaterial manufaturado, adaptado de SOM et al., 2010.



Fonte: GOTTARDO et al. (2017).

Portanto, fazem-se necessários estudos sobre as possíveis interações desses materiais com o ambiente, tendo como exemplo, a evidência de traços em corpos aquíferos, bem como a disponibilidade e degradabilidade (JU-NAM; LEAD et al., 2008).

Em ambientes aquáticos, o número de registros de NM manufacturados tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, principalmente relacionados com os NTC e NP Ag, essas últimas, principalmente pela exploração em massa de suas propriedades bactericidas. Zhang et al. (2012) e Avant et al. (2019) relataram a presença de NTC, já os estudos como os de Sikder et al. (2018) e Wimmer et al. (2019) assinalaram a presença de NPs Ag.

A abordagem dos nanocontaminantes será iniciada com os NTC, em seguida nanopartículas de prata (NPs Ag) e por fim, *quantum dots* (QDs).

### **3.2.1 Nanotubos de Carbono (NTC)**

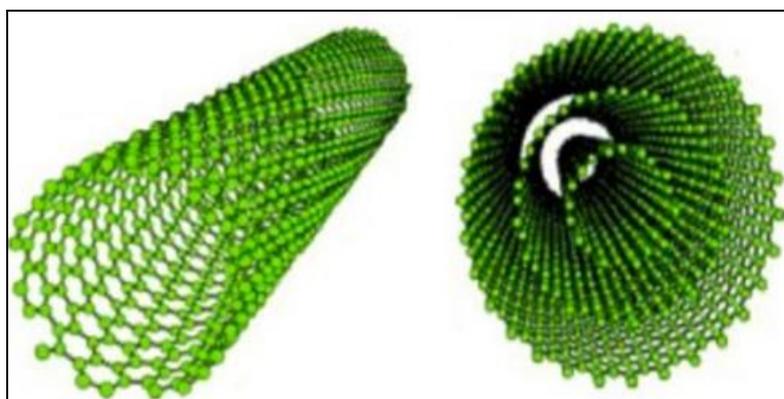
Os NTC são estruturas cilíndricas de carbono dispostas na forma de uma ou mais por folhas de grafeno enroladas em forma de tubos com diâmetro nanométrico e comprimento da ordem de microns, levando a grandes razões comprimento/diâmetro (DONALDSON et al., 2006; WU et al., 2010). Não ocorrem na natureza, e apesar da descrição fazer referência a folhas de grafeno enroladas, forma com a qual se apresentam, sua síntese ocorre longitudinalmente pela dição de átomos de carbono, resultando nas estruturas equivalentes às folhas de grafeno enroladas.

Destacados como um dos NM de carbono mais estudados e utilizados (BHUSHAN, 2004; MEDINA et al., 2007), os NTC correspondem a uma das principais classes de materiais modelo para a N&N (SOUZA FILHO; FAGAN, 2007). Podem ser agrupados em duas categorias: os NTC de paredes simples e os de paredes múltiplas (Figura 7). Os NTC de parede única ou simples (SWNT, do inglês *single-wall carbon nanotubes*), são constituídos por apenas uma camada de carbono, e os nanotubos de paredes múltiplas (MWNT, do inglês *multi-wall carbon nanotubes*), compostos por vários cilindros concêntricos de carbono (AQEL et al.,

2012), em ambos os casos dispostos como folhas de grafeno enroladas, mas não partem delas nas suas sínteses.

De acordo com Lanone et al. (2013), a combinação das propriedades de condutividade térmica, elétrica e resistência mecânica conferem aos NTC propriedades físico-químicas inigualáveis, podendo ser empregados na fabricação de sensores, dispositivos ópticos supercondutores e capacitores eletroquímicos (SAHOO et al., 2010) e, quando conjugados a outros materiais, como polímeros e fibras, servem como elementos de reforço, formando compósitos com excelentes propriedades mecânicas (DAI, 2002).

Figura 7- Estrutura esquemática de nanotubos de parede simples (esquerda) e de paredes múltiplas (direita).



Fonte: ZARBIN (2007).

Em nosso grupo de pesquisa, os NTC têm sido estudados no desenvolvimento de novos materiais funcionais. Em sua dissertação de mestrado, Mojica-Sánchez (2013) sintetizou nanocompósitos luminescentes na forma de filmes autossustentáveis, compostos de matriz polimérica de PVB, nanotubos de carbono de camada múltipla (MWCNT) e de complexo  $\text{Eu}(\text{btf}_a)_3\text{bipy}$ . Vaz (2015), em sua tese de doutorado, utilizou NTC e complexos de lantanídeos para desenvolver dispositivos híbridos nanoestruturados conversores de luz (DNCL), em que o NTC atuava como antenas nanoestruturadas, e em sua tese de doutorado, Mojica-Sánchez (2018) desenvolveu um dispositivo híbrido para monitoramento ambiental usando reconhecimento de molécula-alvo em polímeros molecularmente impressos com marcador fotônico nanoestruturado, contribuindo para o portfólio de patentes de

nanodispositivos do Grupo. Nosso grupo segue o “princípio da precaução”, de forma que só se retira do laboratório os produtos com NTCs imobilizados em compósitos.

Com as diversas possibilidades de melhorias de produtos tecnológicos e inovações com a incorporação de NTCs, estudos envolvendo as diferentes relações entre estes com o ambiente e a biota tem sido realizados e temas como avaliação de risco, toxicidade, remediação e ecotoxicidade estão inseridos nestes estudos (SOM et al., 2010; ZHAO et al., 2012; IHSANULLAH et al., 2016).

A avaliação de risco é uma área de estudo emergente quando se trata de NTC. Embora seja evidente a sua importância na nanotecnologia, existe ainda muitas lacunas sobre os possíveis impactos que estes NM possam acarretar aos seres vivo e ao ambiente (TSUJI et al., 2005).

Scown et al. (2010) apontaram que a toxicidade dos NTC pode ser influenciada por vários fatores, entre estes pela área e química superficial, pelos grupos funcionais, revestimentos, carga e agregação, solubilidade, forma, fotoquímica e método de preparação.

Arias; Yang (2009) em seus estudos sobre a inativação de patógenos bacterianos por NTC em suspensões revelaram que a atividade antimicrobiana dos SWNTs é dependente das soluções tampão e da concentração. Comentaram ainda estes autores que o efeito de carga dos grupos funcionais na superfície dos NTC não é um fator crítico; mas, os MWNTs com grupos superficiais de -OH, -COOH e -NH<sub>2</sub> não mostraram atividade antimicrobiana significativa para todas as células bacterianas testadas em nenhum dos tampões testados em concentrações de até 500-875 µg/mL.

A toxicidade de biomateriais nanoestruturados a base de NTC interferem no funcionamento das células normais, prejudicam os queratinócitos humanos e exibem níveis variáveis de letalidade para as células pulmonares humanas (SHVEDOVA et al., 2003; TEKADE et al., 2014).

Pesquisas em remediação ambiental têm demonstrado que os NTC, são excelentes adsorventes de compostos orgânicos devido a sua elevada capacidade e alta eficiência em sorver contaminantes de ambientes aquíferos, eles também quando cultivados, se mostraram mais eficiente do que grafitados na adsorção do 1,2-diclorobenzeno, da água numa faixa de pH de 3 a 10 (PENG et al., 2003). Em

relação ao efeito do ácido húmico e do surfactante na adsorção de atrazina por NTC, ambos são capazes de dispersar os MWNTs, mas não os SWNTs, em suspensões estáveis nas condições estudadas. Os NTC de superfície modificada tiveram uma capacidade muito reduzida de adsorção de atrazina (SHI et al., 2010).

Estudos têm apontado que a dispersão de NTC em água pode ser modificada por interações com seres vivos. Roberts et al. (2007) analisaram as interações entre *Daphnia magna* e SWNTs revestidos com lisofopidilcolina solúvel em água e descobriram que estes microcrustáceos são capazes de modificar a sua solubilidade, provavelmente através da digestão do revestimento lipídico. Modificação na dispersão de MWNTs foi observada em protozoário unicelular vivo *Stylonychia mytilus*, no qual as células ingeriram os MWNTs e excretaram em forma de grânulos sedimentados de tamanho micrométrico (ZHU et al., 2006).

Efeitos provocados por outros NM de carbono também têm sido investigados em sistemas biológicos. Mesaric et al. (2015) estudando os efeitos causados por *carbono black*, óxido de grafeno e nanotubos de carbono de paredes múltiplas em larvas de *Artemia salina*, perceberam que as altas propriedades de adsorção superficial destes materiais, foram responsáveis pela mortalidade, inibição da natação e respostas bioquímicas nas larvas, sem impactar negativamente o meio marinho. Baun et al. (2008) estudando os fulerenos C<sub>60</sub> demonstraram sua toxicidade aquática e sua capacidade de bioacumular atrazina, metilparatião, pentaclorofenol e fenantreno, contaminantes encontrados na água. Segundo Li et al. (2009), a Cinética de Dispersão do fulereno C<sub>60</sub> no meio aquoso exibe dispersividade, as propriedades físico-químicas e a natureza química, podendo ser significativamente alteradas pela matéria orgânica natural, força iônica, Ca<sup>2+</sup> e luz solar. A hidroxilação superficial deste NM é um dos possíveis mecanismos indicados para estabilização de fulerenos C<sub>60</sub> individuais e de agregados em água (*clusters*); sendo independentemente, do método de preparação da solução coloidal (PRYLUTSKYY et al., 2014).

### **3.2.2 Nanopartículas de Prata (NPs Ag)**

Dentre os NM sintetizados pelo homem e já incorporados em produtos comerciais, as NPs Ag foram utilizadas pioneiramente e aparecem com maior ocorrência até o presente, em particular pelas propriedades bactericidas.

A prata foi utilizada como agente antibacteriano desde a China antiga, havendo também relatos no ocidente desde Hipócrates, médico grego considerado o pai da medicina, que a utilizava finamente dividida, impregnada em bandagens no tratamento de feridas. Foi bastante utilizada na forma coloidal até a produção dos primeiros antibióticos na primeira metade do século XX, e atualmente, com a constatação do surgimento crescente de bactérias que adquiriram resistência devido uso indiscriminado desses antibióticos, a prata vem ressurgindo como agente bactericida e antibacteriano, aliando novas propriedades e maior eficácia na forma de nanopartículas metálicas, muitas vezes incorporadas em novos produtos e processos (BARRERA et al., 2018).

Os elementos metálicos prata (Ag), o ouro (Au), a platina (Pt), o paládio (Pd) e o rutênio (Ru) são os metais mais utilizados na nanotecnologia e na obtenção de nanopartículas (FABREGA et al., 2011). NPs de tamanhos entre um (1) e 100 nanômetros (nm) apresentam propriedades elétricas, ópticas, magnéticas e químicas particulares, diferente da escala macroscópica, possibilitando aplicações nas Áreas das Ciências da Natureza e das Ciências da Saúde (POLTE, 2015).

Além da exploração das propriedades antibacterianas das NP Ag, as propriedades óticas merecem destaque, em particular por apresentam bandas de absorção associadas à ressonância plasmônica de superfície em regiões do espectro do UV-visível que dependem do tamanho dessas NPs (JIM et al., 2003; KELLY et al., 2003), fator importante para a detecção desses potenciais nanocontaminantes de ecossistemas aquáticos, tomados como analitos metálicos modelo no doutorado em tela.

A dependência a cor condutividade elétrica com o tamanho das NPs é devido ao efeito de confinamento quântico sobre os elétrons do metal. A alta relação

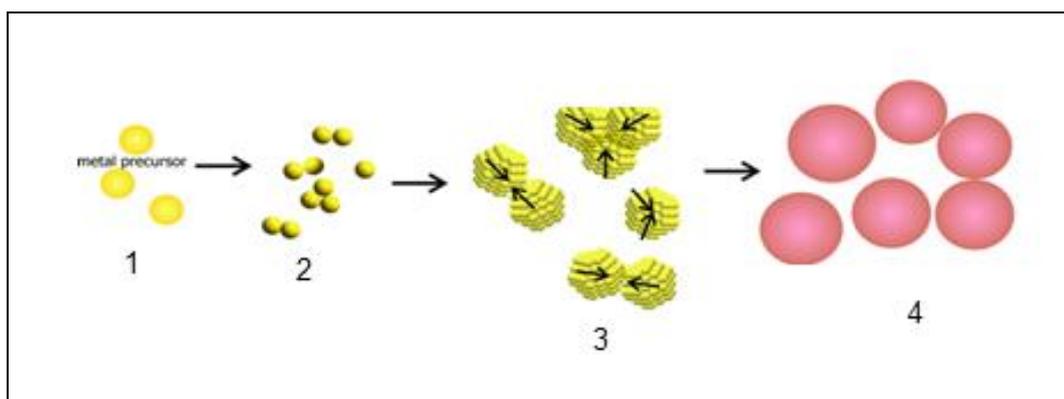
superfície/volume também afeta os campos elétricos locais em torno das nanopartículas, alterando inclusive a sua reatividade (BHANGALE et al., 2019).

As nanopartículas podem ser obtidas por métodos físicos (KUBILIUTE et al., 2013), químicos (PARVEEN et al., 2016) e biológicos (ANKAMWAR et al., 2017), entretanto, apenas a via química está referenciada nesta pesquisa, uma vez que as nanopartículas utilizadas neste estudo foram obtidas por esta rota.

Conforme Westphal et al. (2006) a síntese coloidal é uma das estratégias mais versáteis e econômicas para obtenção de nanopartículas. Segundo Pastoriza-Santos; Liz-Marzán (2008) e Sau; Rogach (2010) há possibilidade de sintetizar de forma controlada partículas com controle de tamanho em diferentes formas, no entanto, o mecanismo que possibilita o crescimento anisotrópico dessas estruturas, ainda não se encontra completamente esclarecido.

De acordo com Zanchet et al. (2000); Mojica-Sánchez (2017), a obtenção de nanopartículas coloidais, que podem ser sintetizadas com tamanho de poucos nanômetros por várias rotas a partir de precursores em soluções, ocorre em meio líquido e processos como nucleação, crescimento e aglomeração podem vir a acontecer (Figura 8).

Figura 8 – Esquema com as etapas de formação das nanopartículas: 1. Precursor metálico; 2. Redução do precursor; 3. Formação dos primeiros *clusters*; 4. Formação de nanopartículas.



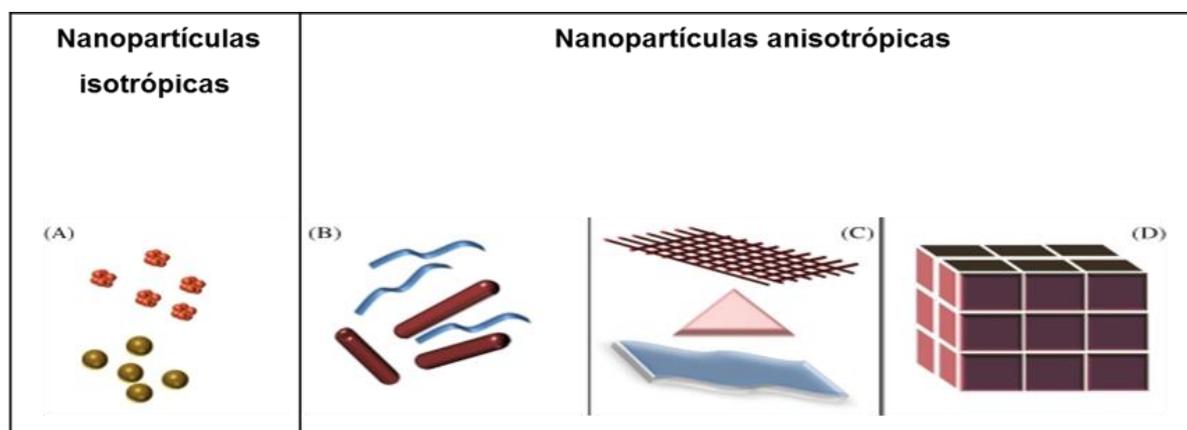
Fonte: modificado de POLTE (2015).

Durante o processo de síntese em meio aquoso, essas estruturas podem formar aglomerados, em virtude de sua instabilidade termodinâmica, e para se obter

dispersões coloidais estáveis, há necessidade de se controlar as interações entre as partículas (SUN, 2002; ZHENG et al., 2003).

Segundo Cushing et al. (2004) etapas como nucleação e crescimento de nanopartículas interferem no seu tamanho e crescimento podendo levar a formação de nanopartículas isotrópicas ou anisotrópicas (Figura 9), nos quais propriedades físicas e químicas são dependentes da sua direção e dimensão (SAJANLAL et al., 2011).

Figura 9- Nanopartículas isotrópicas (esféricas); Nanopartículas anisotrópicas (formas de nanofios, nanoplacas, nanocubos).

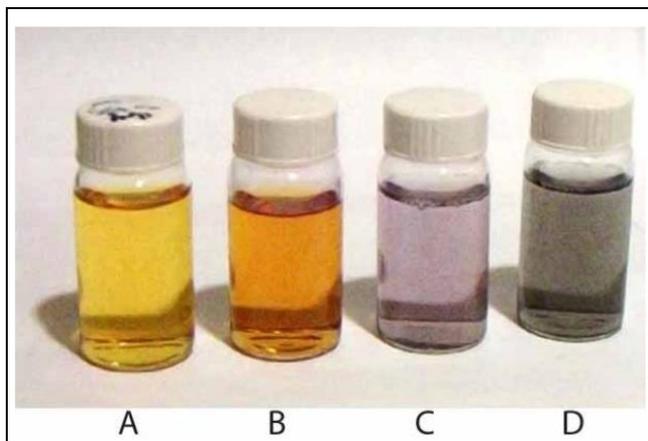


Fonte: modificado de SAJANLAL et al. (2011).

As formas de confinamento dos elétrons resultando na quantização de níveis de energia são parâmetros que podem alterar as propriedades dessas nanoestruturas, e a mudança de cor é um exemplo.

A interação entre as nanopartículas metálicas de prata e a radiação eletromagnética, resulta em banda de ressonância dos plásmons de superfície com absorção na região do visível. As cores observadas, complementares às absorvidas, são diferentes da cor do elemento em escala macroscópica (prata), como mostrado na Figura 10, dependendo do tamanho e forma das nanopartículas (JAIN et al., 2008). Para aglomerados maiores, a cor observada tende à cor do *bulk*, incluindo também efeitos de espalhamento de luz.

Figura 10- Cores da prata coloidal em diferentes estágios de agregação.



Fonte: MULFINGER et al. (2007).

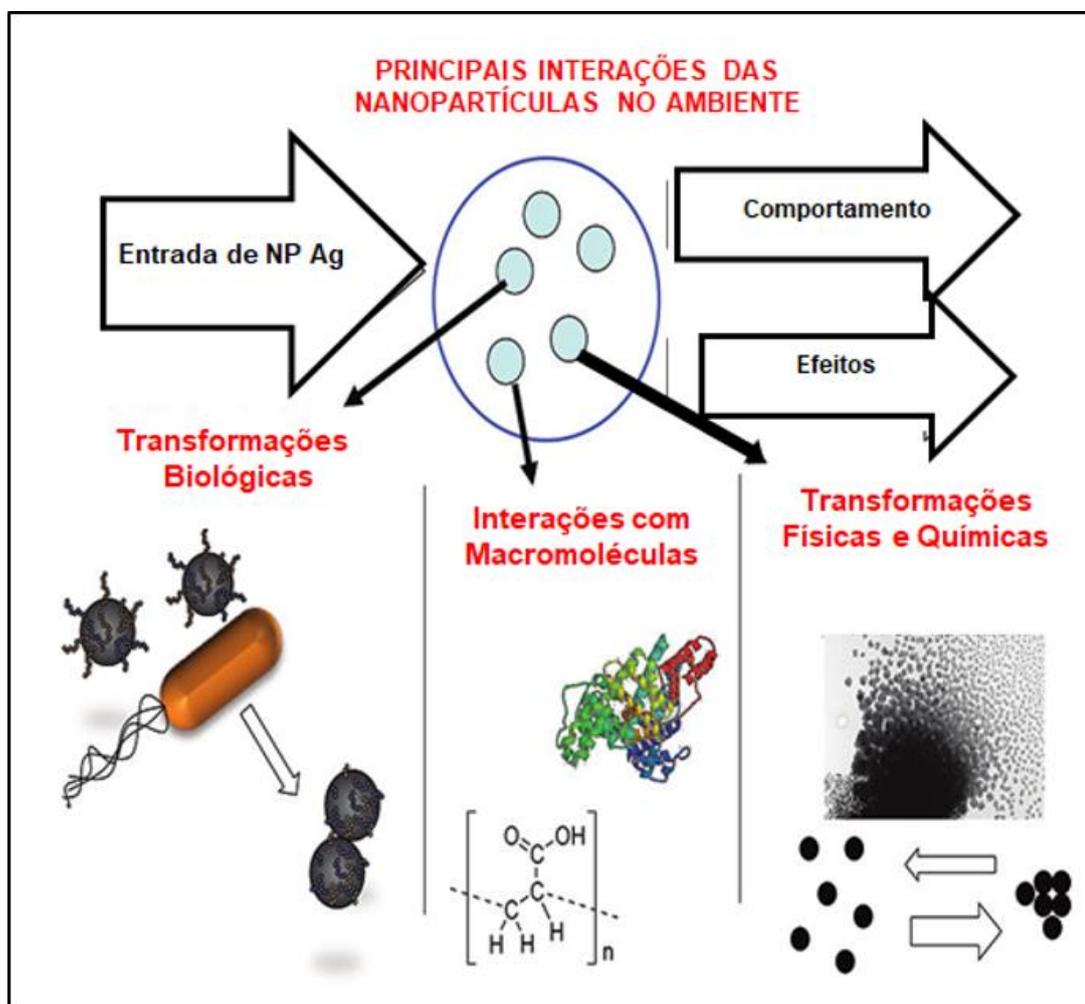
As NPs Ag apresentam uma ampla variedade de aplicações, e o método de preparação, as propriedades físico-químicas, bem como o seu tamanho, forma, dispersividade, pureza e cristalinidade, podem ser identificados nos produtos desenvolvidos nos diversos setores em que são aplicadas, como o alimentício, saúde, cosmeceutica e outros setores da indústria (HENIG, 2007; ZHANG et al., 2016).

O aumento da entrada de NPs Ag manufaturadas nos ambientes aquáticos, o destino desta no ambiente, suas interações com os componentes bióticos e abióticos têm levado a comunidade científica a investigarem se há potenciais riscos de se tornarem biodisponíveis no ambiente (Figura 11) e conseqüentemente, causarem toxicidade e desequilíbrio ambiental (SCOWN et al., 2010; NOGUEIRA et al., 2013).

Neste sentido, uma das possíveis estratégias empregada para avaliar a presença de NPs Ag nos ambientes e o seu efeito tóxico é imputada à capacidade dos organismos aquáticos em bioacumular estes NM (NCR, 2012).

Segundo Salari Joo et al. (2013); Tavana et al. (2014) a competência da biota aquática em bioacumular estes NM manufaturados, está sujeita a fatores como o tamanho das NP Ag, sua forma, espécies, órgãos, condições ambientais, dieta, e duração da exposição e da concentração.

Figura 11 – Desenho esquemático das possíveis interações das nanopartículas de prata no ambiente.



Fonte: LOWRY et al. (2012).

A toxicidade de NPs Ag manufaturadas tem sido investigada a partir da utilização de organismos-teste. Arulvasu et al. (2014) utilizou artêmias com este fim, e a taxa de mortalidade, a porcentagem de eclosão e o efeito genotóxico em náuplios e cistos deste organismo foram avaliados, concluindo-se que concentrações nanomolares de NPs Ag têm efeito tóxico, tanto em náuplios quanto em cistos.

Gambardella et al. (2015) estudaram o efeito das NPs Ag em organismos marinhos de diferentes níveis tróficos a partir da análise de parâmetros previamente estabelecidos para cada organismo. Constataram que as diferentes classes de seres

vivos apresentavam níveis diferentes de sensibilidade às NPs Ag: as medusas foram as espécies mais sensíveis, seguidas por cracas, ouriços do mar, algas verdes, diatomáceas e artêmias. Concluíram que a exposição de NPs Ag pode influenciar diferentes níveis tróficos no Ecossistema Marinho.

A capacidade de transferência de NPs Ag bioacumuladas pela *Artemia salina* para *Danio rerio* (peixe-zebra) a partir de uma rede trófica simulada foi avaliada por Rahmani et al. (2016), e constataram que a artemia captou mais NPs Ag que o peixe-zebra, que o acúmulo de NPs Ag no peixe-zebra foi dependente da dose, com maior acúmulo observado em concentrações mais altas de NPs Ag e concluíram que o fator de transferência trófica de NPs Ag foi  $< 1$  demonstrando que a transferência trófica de NP Ag da artêmia para o peixe-zebra não foi plenamente sucedida.

An et al. (2019) fizeram um estudo comparativo do potencial tóxico das NPs Ag e dos nanofios de prata (NWs Ag) usando a *A. salina* como organismo teste e tendo como base a Norma ISO TS 20787:2017, sendo constatado que a toxicidade de NPs Ag e dos NWs Ag nos náuplios apareceu após 72 h de exposição, se acumularam no intestino dos náuplios. Estes NMs podem induzir a produção de oxigênio reativo (ROS) e alterar a atividade de produção de superóxido dismutase (SOD) e concluíram que eles tiveram efeito tóxico e ainda produzem superóxido dismutase (SOD).

Aplicações de NPs Ag manufaturadas no campo da biomedicina vêm aumentando consideravelmente e se consolidando de forma eficiente. A ação antimicrobiana, antibacteriana, dos compostos de prata, utilizadas a décadas na prevenção de infecções, têm estimulado o desenvolvimento de pesquisas com NP Ag na área médica e farmacêutica com vistas ao melhoramento dessas propriedades na escala nano (BARRERA et al., 2018). Dorjnamjin et al. (2008) desenvolveram uma metodologia para sintetizar NPs Ag usando líquidos iônicos funcionalizados com hidroxila e identificaram sua ampla atividade bactericida e fungicida. Li et al (2005) investigaram o efeito antibacteriano do antibiótico  $\beta$ -lactâmico associado com este material em *Escherichia coli* e comprovaram sua ação antibacteriana sinérgica, sendo mais eficiente em maiores concentrações.

Em trabalhos desenvolvidos no nosso Grupo de pesquisa, Barrera et al. (2018) desenvolveram um recobrimento antibacteriano formado com polímeros e

nanopartículas de prata, produzido por tecnologia de jato de materiais *drop-on-demand* (DoD) e detectaram inibição da ação bacteriana, trazendo processo inovador para produção de recobrimentos antibacterianos. Além disso, foi apontado no mesmo artigo o aumento da produção de flagelina por bactérias expostas por algumas gerações às NP Ag, resultando no aumento da aglomeração das NPs induzida por esta proteína estrutural do flagelo bacteriano, que levaria a uma diminuição da atividade antibacteriana no NM. Antecipando esta possível forma de aumento da resistência bacteriana às NPs, da mesma forma que ocorreu com os antibióticos, foi desenvolvido no Grupo um novo fluido imprimível, à base de extrato de casca de romã, para atuar como inibidor da produção de flagelina pelas bactérias, para garantir a continuidade da ação antibacteriana dos recobrimentos contendo NP Ag, resultando em nova dissertação de mestrado (SOUZA, 2019).

Outro aspecto a ser considerado para aplicação de NPs Ag na área da saúde é o uso da biossíntese, com vistas ao aumento da biocompatibilidade. Vigneshwaran et al. (2007) sintetizaram nanopartículas de prata utilizando o fungo *Aspergillus flavus*, com tamanho médio estimado em  $8,92 \pm 1,61$  nm, estáveis em água por mais de 3 meses, em processo é livre de qualquer solvente ou produtos químicos tóxicos, sendo acessível para produção em larga escala. Em ensaios biológicos com *Andrographis paniculata*, foram identificadas NPs Ag que se mostraram efetivas para aplicações farmacêuticas e biocompatível com meio ambiente (SULOCHANA et al., 2012). A atividade antimicrobiana destes NMs sintetizados a partir do extrato vegetal de *Aloe vera* apresentou ação bactericida 2 a 4 vezes maior do que uma síntese não biológica exposta à mesma cepa bacteriana (LOGARANJAN et al., 2016).

### **3.2.3 Quantum Dots (QDs)**

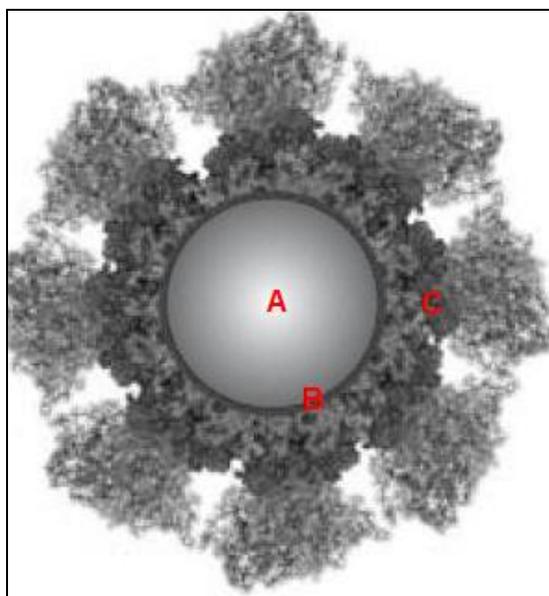
Os *quantum dots* (QDs) são nanocristais semicondutores de dimensões típicas entre 2 e 100 nm (MICHALET et al., 2005; HARDMAN, 2006). Os menores são constituídos de apenas uma centena de átomos. Suas propriedades ópticas únicas são decorrentes do efeito de confinamento quântico, podendo ser usados

como marcadores fluorescentes em sistemas biológicos, pela interação com moléculas, quando funcionalizados (MARSH et al., 2007).

Constituídos estruturalmente de um núcleo cristalino semicondutor e de uma “casca” que protege esse núcleo, os QDs podem apresentar uma bioatividade definida através de funcionalização da casca, conferindo-os funções específicas (Figura 12).

Apontados como nanomateriais de grande interesse tecnológico em virtude de possíveis manipulação de suas propriedades, são utilizados na fabricação de LEDs e processamentos de informações quânticas (WU et al. 2004), células fotovoltaicas (EMIN et al., 2011), transistores (HARTMANN et al., 2017) entre outros; mas, a sua principal aplicação está voltada atualmente para o imageamento biomédico e eletrônico (DABBOUSI et al. 1997; PICCINNO et al., 2012), já havendo marcas comerciais de TVs utilizando esta tecnologia em seus displays, como a linha QLED da Samsung, com tecnologia 8K e 33 milhões e pixels de alta luminosidade e contraste.

Figura 12- *Quantum dots* com as suas estruturas morfológicas:  
A= núcleo; B= casca; C= revestimento bioativo.



Fonte: modificado de HARDMAN (2006).

Nas aplicações relacionadas à saúde humana e monitoramento ambiental, os QDs coloidais são os mais utilizados como marcador fluorescente, destacando-se

como fluoróforos ideais, por apresentarem resistência à luminescência relevante, permitindo a aquisição de imagens bem contrastadas, por longos períodos de tempo (minutos/horas) (MICHALET et al., 2005). Eles vêm sendo utilizados de forma conjugada a uma parte ativa, em procedimentos biotecnológicos como sinalizadores da fluorescência de microtúbulos (AKERMAN et al., 2002) e dispositivos para entrega de fármaco para cada local específico (YU; CHOW 2005). Contudo, o seu descarte no ambiente é motivo de preocupação em virtude do seu potencial perigo à saúde humana e a ambiental, principalmente pela presença de cádmio em muitas das composições.

A toxicidade, a estabilidade e a vida útil dos QDs no ambiente são pouco conhecidas, no entanto, sua introdução nos ecossistemas pode ocorrer por meio de fluxos de resíduos de indústrias que sintetizam e usam, além do descarte incorreto de materiais, em pesquisas e em clínicas. Além disso, os riscos de acidentes resultando em vazamento de matéria prima durante a fabricação e transporte, também são motivos de preocupação (HARDMAN, 2006).

Gagné et al. (2008) avaliaram o potencial tóxico de QDs de telureto de cádmio (CdTe) em mexilhão de água doce *Elliptio complanata* a partir da identificação de mudanças nos parâmetros imunológicos fagocitose, densidade e viabilidade de hemócitos e citotoxicidade para células de mamíferos. A peroxidação lipídica e o dano ao DNA também foram monitorados nas brânquias e nas glândulas digestivas dos mexilhões expostos. A pesquisa revelou que o QDs de telureto de cádmio foi imunotóxico para mexilhões de água doce e que os mesmos ocasionaram estresse oxidativo nas brânquias e danos no DNA em ambos os órgãos.

A distribuição do tamanho de QDs de CdTe em água doce, sua biodisponibilidade e potenciais efeitos tóxicos em *Elliptio complanata*, foram também monitorados e atestaram bioacumulação de cádmio nas brânquias, nos tecidos das glândulas digestivas, gônadas do molusco e nos níveis de metalotioneína (MT) (PEYROT et al., 2009). A exposição de QDs de CdTe levou à indução e inibição significativa de MT na glândula digestiva e brânquias, respectivamente e a diminuição dos seus níveis nas brânquias a partir da exposição deste NM e do sulfato de cádmio (CdSO<sub>4</sub>) pode ter sido resultante do estresse oxidativo em tecidos

branquiais, no qual a MT pode ter sido oxidada pela produção de radicais de oxigênio na superfície dos QDs e também com Cd dissolvido (PEYROT et al., 2009).

Os efeitos de *quantum dots* de carbono ou carbon dots (CQDs) foram investigados entre organismos de diferentes níveis tróficos em ambientes aquáticos. No peixe *Danio rerio*, conhecido como peixe-zebra, paulistinha ou zebrafish e largamente utilizado como modelo experimental, foi observado que ele depurou até 200 mg L<sup>-1</sup> deste material, sem ser afetado toxicamente. Já em *Daphnia magna*, estes NM induziram mortalidade e imobilidade. Na microalga *Scenedesmus obliquus*, houve a inibição da fotossíntese, a absorção nutricional e do seu crescimento, sendo este, o organismo mais sensível quando exposto (YAO et al., 2018).

Por sua vez, Jackson et al. (2012) analisaram a biodisponibilidade, toxicidade e bioacumulação de QDs de seleneto de cádmio/sulfeto de zinco (CdSe/ZnS) funcionalizados com carboxila em *Leptocheirus plumulosus* expostos a concentrações equivalentes de cádmio (Cd) dissolvido, QDs em água, ou QDs em algas. Os QDs com o cádmio dissolvido foram mais acumulados pelo organismo. Os QDs conjugado as algas causaram aumento do número de mortes, enquanto os QDs Cd/Se se localizaram em região específica do microcrustáceo e dispersos em água quando expostos aos QDs conjugados a algas. Isto sugeriu que os íons acumulados atingem os organismos em maiores proporções, possivelmente por favorecerem à transferência pela rede trófica.

Bruneau et al. (2013) avaliaram os efeitos imunológicos e o potencial tóxico dos QDs de sulfureto de cádmio (CdS) e de CdTe nos bivalves *Mytilus edulis* e *E. complanata* e no peixe *Oncorhynchus mykiss*, sendo a toxicidade dependente da concentração, tamanho e dos agregados destes NMs, indicando que estas espécies responderam a exposição das frações diferentemente. Os hemócitos de *M. edulis* foram menos sensíveis a QDs CdS / CdTe do que os macrófagos de *O.* e *E. complanata*.

Tang et al. (2013) compararam os efeitos genotóxicos de nanocristais iônicos do elemento Cd com os QDs de CdTe em hepatócitos de *D. rerio* e verificaram que após 24 h de exposição ocorreu redução do número de hepatócitos viáveis do peixe, acúmulo de Cd, aumento de ROS e ainda descobriram que tanto o CdSO<sub>4</sub> quanto os

---

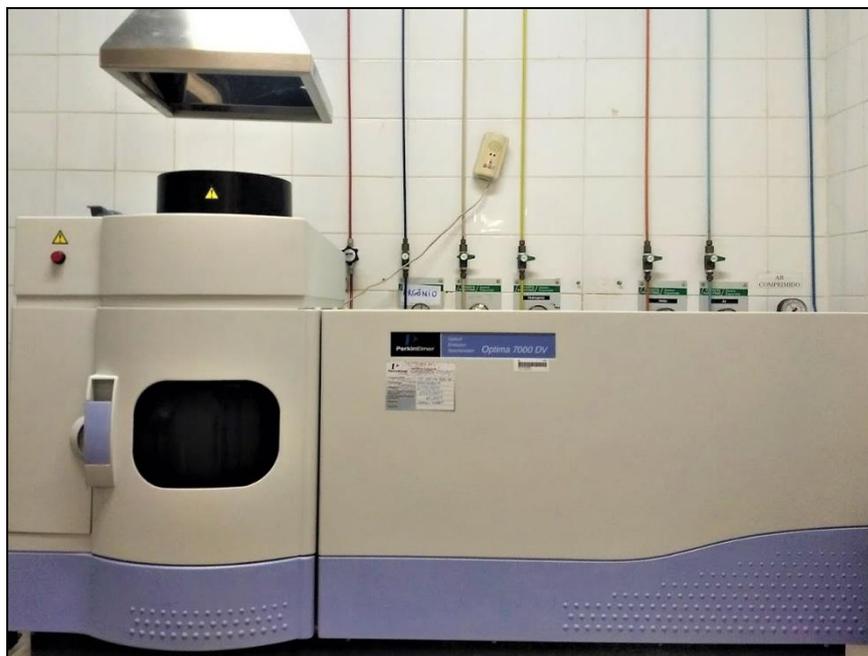
QDs de CdTe induziram a quebra na cadeia de DNA e indicaram que o CdSO<sub>4</sub> foi mais genotóxico do que o CdTe.

### 3.3 ESPECTROMETRIA DE EMISSÃO ÓTICA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP OES)

Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) foi uma das técnicas analíticas utilizadas para as análises das amostras pré-concentradas pelo processo proposto na presente tese, utilizando artêmias como motores filtradores vivos.

As análises para a quantificação do elemento prata foram realizadas em espectrômetro de emissão ótica modelo Optima™ 7000 DV (Dual View), da Perkin Elmer® (Figura 13) da Central Analítica do DQF-UFPE.

Figura 13 – ICP Perkin Elmer® Optima™ 7000 DV (Central Analítica, DQF).



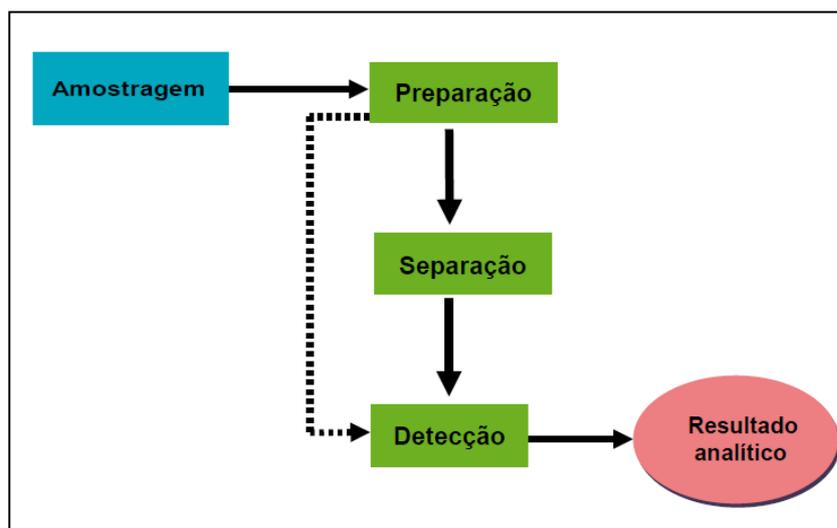
Fonte: CENTRAL ANALÍTICA (DQF-UFPE).

A ICP OES é uma técnica analítica instrumental de elevada sensibilidade, foram selecionados artigos explicitando tanto o seu uso na quantificação de traços

de elementos em amostras, quanto os procedimentos de preparação das amostras a serem analisadas.

Iniciando-se com os cuidados necessários com a preparação das amostras, a Figura 14 apresenta a sequência padrão básica para o processo de análise experimental.

Figura 14 - Esquema padrão de processo de análise instrumental.



Fonte: EURACHEM, modificado por VAZ Jr. (2010).

Hoening (2001) relata a importância dos conhecimentos atuais para se reduzir erros e possíveis efeitos relacionados aos procedimentos de preparação das amostras sobre a qualidade de medição. Por sua vez, Maher et al. (2015) destacaram a importância da integridade das amostras durante a coleta, armazenamento, preparação e análise. Mesko et al. (2016) especificaram problemas encontrados durante a medição de concentrações de halogêneos por ICP OES e ICP MS, em diferentes opções de preparação da amostra, tais como a diluição, a solubilização, a extração e as que envolvem a decomposição da matriz.

A preparação de amostra é uma estratégia necessária para análise em ICP OES e consiste em processos que visem a extração ou separação, digestão, pré-tratamentos, pré-concentração, deixando os analitos mais facilmente detectáveis (VAZ Jr., 2010). Entre estes procedimentos, a digestão de amostra é o mais empregado, podendo ser realizado com ácidos, micro-ondas, fluido supercrítico, bloco digestor,

mufla entre outros (NADKARNI, 1984; ABBRUZZINI et al., 2014; SANTOS et al., 2017).

A digestão de amostras por ácidos, assinalada como a mais usada, foi citada nos trabalhos de Cate et al. (2004) e Sousa et al. (2006). Galazzi et al. (2016) e Sunjog et al. (2016) utilizaram radiação por micro-ondas para a digestão de amostras, enquanto Ramos et al. (2016) e De La Calle et al. (2017) empregaram simultaneamente neste processo, ácidos, peróxidos e/ou micro-ondas.

O uso de mufla e bloco digestor foram utilizados na digestão de amostras em pesquisa desenvolvida por Melo; Silva (2008), além desses métodos, os autores utilizaram os processos de digestão nítrico-perclórica, com água-régia e forno de micro-ondas. Por outro lado, estudos registram a aplicação de pré-tratamento ou pré-digestão de amostra antes da digestão propriamente dita (Abreu-Junior et al., 2012; Arantes de Carvalho et al., 2016).

A aplicação da técnica analítica instrumental ICP OES na determinação de multi-elementos têm sido utilizadas de forma crescente, explorando-se características como análise simultânea, detecção em ampla faixa de concentração, alta precisão, exatidão, sensibilidade e rapidez da medida. A técnica tem sido aplicada em estudos de constituintes inorgânicos presentes em amostras biológicas, ambientais, de alimentos, de bebidas e outras, possibilitado a realização de análises químicas qualitativas e/ou quantitativas nestas áreas ou entre outras, de forma mais criteriosa (NÓBREGA et al., 2006).

Sousa et al. (2006) avaliaram a composição inorgânica de amostras de água de coco, com possível aplicação em procedimentos de controle de qualidade. Macro e micronutrientes em água de coco processada e natural foram monitorados, não sendo identificados alumínio (Al), chumbo (Pb), cádmio (Cd) e selênio (Se) em nenhuma das amostras e os valores médios para a concentração dos analitos foram diferentes, exceto para o do manganês (Mn). A presença de ferro (Fe) e cobre (Cu) nas amostras processadas, evidencia uma possível contaminação. Os íons de cálcio (Ca) e magnésio (Mg) foram classificados como macro constituintes, enquanto os íons de manganês (Mn) e zinco (Zn) foram assinalados como microconstituintes nas amostras de água de coco natural e processadas.

Cate et al. (2014), avaliaram a eficiência do dispositivo analítico baseados em papel micro fluídico ( $\mu$ PADs) para identificar com rapidez os teores de metais de transição nas fumaças de soldagem. Eles analisaram amostras provenientes de três técnicas de soldagem comuns (arco de metal blindado, gás inerte de metal e soldagem de gás inerte de tungstênio) e usaram a técnica do ICP OES para medir as concentrações de ferro (Fe), cobre (Cu), níquel (Ni) e cromo (Cr) estabelecendo comparação com o novo sensor e constataram que ele foi capaz de fornecer resultados no mesmo dia. Outra evidência foi que estes sensores poderiam ser utilizados na área da saúde, em diagnósticos clínicos, por sua viabilidade econômica, em relação aos métodos analíticos.

A técnica ICP OES utilizada na caracterização química de vestimentas litúrgicas antigas (casula) revelou a presença de 10 elementos alumínio (Al), prata (Ag), ouro (Au), cádmio (Cd), cobalto (Co), cromo (Cr), cobre (Cu), níquel (Ni), chumbo (Pb) e zinco (Zn) em seus fios, levando ao reconhecimento de que o artefato registrado no inventário como do século XV, na verdade era de um período posterior. Outro aspecto evidenciado foi que os fios de prata presentes nestas vestimentas se alternam entre o cetim rosado inferior, criando efeitos de claro-escuro e, que um dos fios analisados apesar de ter uma tonalidade prateada, não estava constituído de prata e sim de chumbo, mostrando que este elemento pode dar um efeito metálico as vestimentas (AMORELLO et al., 2016).

Arantes de Carvalho et al. (2016) propuseram um novo método para detecção da concentração de elementos de terra rara cério (Ce), lantânio (La) e neodímio (Nd) em águas subterrâneas, pré-concentrando os analitos em grânulos de alginato de cálcio. Os resultados obtidos atestaram a viabilidade da utilização dos grânulos de alginato de cálcio como substrato para separação rápida e pré-concentração simultânea dos mesmos, aplicando a ICP OES.

Na pesquisa “A importância de avaliar a concentração real de metal em nanopartículas pós-síntese para suas aplicações” realizada por Galazzi et al. (2016), foi constatado, pelo uso de ICP OES, diferenças de concentração de nanopartículas nas seguintes amostras analisadas: solução de NP Ag total, como também em suas frações, denominada NP Ag ressuspensa (NPs Ag-res) e o sobrenadante (Ag-sup). Dentre essas soluções, as de NPs Ag-res foi a única recomendada pelos autores,

para possíveis aplicações, uma vez que os íons de prata livres, estavam presentes em concentrações mais baixas.

Sunjog et al. (2016) determinaram e compararam as concentrações metálicas e metalóides dos sedimentos, da água e dos tecidos do peixe europeu chub provenientes de três corpos d'água da Sérvia, aplicando o ICP OES. Nenhuma correlação entre os elementos em sedimentos, água e tecidos de peixe foi observada, entretanto nas brânquias e no fígado os metais e metalóides se acumularam mais do que músculos e gônadas.

Santos et al. (2017) utilizaram a técnica de ICP OES para avaliar as condições ambientais do manguezal do Rio Passa Vaca, Salvador (BA) em relação ao aporte de concentrações de elementos metálicos no sedimento e identificaram a presença dos metais cromo (Cr), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni), bário (Ba), estrôncio (Sr), vanádio (V) e zinco (Zn), sendo constatado o (Fe) como o elemento de maior concentração em todos os pontos de coleta no ponto (P4) com os elementos Fe, V, Mn e Cr. No ponto (P2) a maior concentração foi do Zn, sugerindo que as baixas concentrações de metais tóxicos, provavelmente se deve à ciclagem destes elementos pelas espécies vegetais de mangue.

Thamilselvi; Radha (2017) investigaram o efeito do sabugo de milho como um novo adsorvente carreador de NPs Ag em tratamento de águas residuais e inativação bacteriana. A análise, do sabugo de milho modificado com NPs Ag, pela técnica ICP OES forneceu o registro quantitativo de NPs Ag adsorvidas ao sabugo de milho e por outras técnicas demonstraram a capacidade em remover poluentes e coliformes fecais, bem como sua excelente ação bactericida sobre *E. coli*. Além disso, perceberam que sua eficiência de adsorção como novo adsorvente foi significativa até 3 ciclos, sendo este sistema um adsorvente promissor e de baixo custo para tratamento de águas residuais.

Anekthirakun; Imyim (2018) avaliaram a eficiência da sílica aminopropílica (SiAP) como um sorvente sólido efetivo na extração e separação de íons Ag (I) e de NPs Ag em solução aquosa de produtos domésticos e mediu sua concentração com ICP OES. Verificaram que a sílica aminopropílica (SiAP) foi eficiente na extração dos íons Ag (I) e das NPs Ag, pois ela pode separar íons Ag (I) e NPs Ag pela

extração e dessorção sequencial de espécies de prata. Constataram que a tioureia foi mais eficiente na dessorção de íons Ag (I) do que a combinação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-tioureia na dessorção de NPs Ag. Concluíram que o método proposto aplicado para separar espécies de prata em produtos domésticos foi bem sucedido, simples, confiável, econômico e fácil de usar.

Barker et al. (2018) avaliaram os efeitos da exposição a curto e longo prazos de NM Ag e íons de prata em biofilmes de *Nitrosomonas europaea* e células planctônicas e usaram a técnica analítica ICP OES para quantificar a Ag nos biofilmes. O estudo revelou que os biofilmes foram mais resistentes à inibição de Ag<sup>+</sup> e de NPs Ag do que as células planctônicas e que em *N. europaea* expostos a baixas concentrações de NPs Ag por 48 h houve mais acúmulo de Ag que nas altas concentrações de NPs Ag por 3 h. O aumento da resistência foi atribuído a aumento da massa celular e taxas de crescimento mais lentas. Foi constatado que a Ag<sup>+</sup> inibe enzimas em baixas concentrações e mata células em altas concentrações e que ensaios de toxicidade de curto prazo subestimam a toxicidade de NPs Ag em biofilmes.

### 3.4 DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS DO MICROCRUSTÁCEO ARTÊMIA

Nesta parte do documento são exibidos a classificação taxonômica e aspectos relacionados à morfologia, biologia, ciclo vital e reprodutivo, além da distribuição geográfica desses animais a serem utilizados como parte ativa dos dispositivos pré-concentradores propostos nesta tese.

### **3.4.1 Classificação Taxonômica**

De acordo com os trabalhos de Martin; Davis (2001) e Asem et al. (2010), a Espécie *Artemia franciscana* Kellogg, utilizada como microcrustáceo filtrador nesta tese, possui a seguinte classificação taxonômica:

Filo Artropoda Siebold e Stannius, 1848

Subfilo Crustacea Pennant, 1777

Classe Branchiopoda Latreille, 1806

Subclasse Sarsostraca Tasch, 1969

Ordem Anostraca Sars, 1867

Subordem Artemiina Weekers et al., 2002

Família Artemiidae Grochowski, 1896

Gênero *Artemia* Leach, 1819

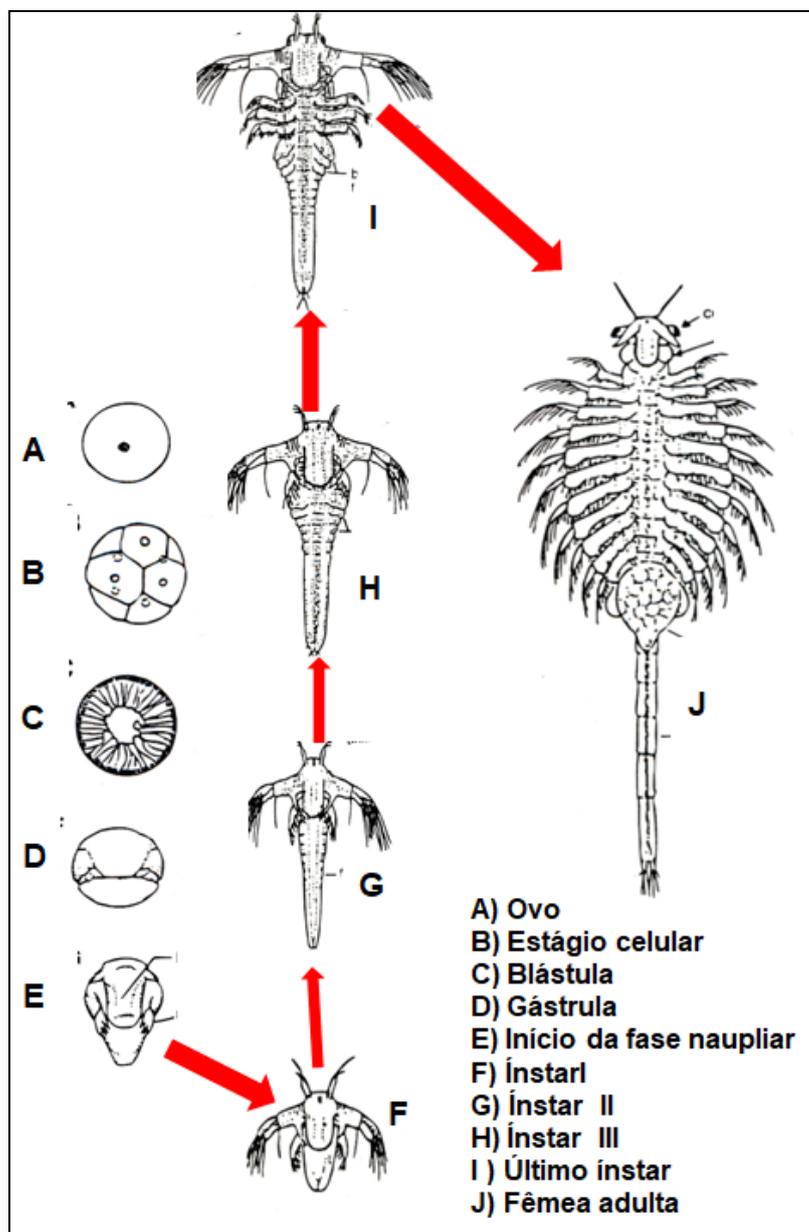
Espécie *Artemia franciscana* Kellogg, 1906

### **3.4.2 Aspectos Morfológicos**

As artêmias são animais de pequeno porte pertencentes ao Filo Arthropoda e Subfilo Crustacea cujo corpo inteiro encontra-se recoberto por exoesqueleto fino e flexível constituído de quitina, onde os músculos são unidos internamente (CRIEL; MACRAE, 2002).

Apesar de serem consideradas uma linhagem antiga de crustáceos primitivos as artêmias, apresentam um desenvolvimento semelhante à de outros crustáceos (Figura 15). Embora existam divergências quanto ao número de estágios e metamorfoses que se sucedem, sabe-se que o microcrustáceo artêmia requer cerca de 14 muda para atingir a forma adulta (FOX, 2001). Além disso, o número de mudas varia segundo as condições de criação (Weisz, 1947).

Figura 15 - Etapas do desenvolvimento do microcrustáceo Artêmia.



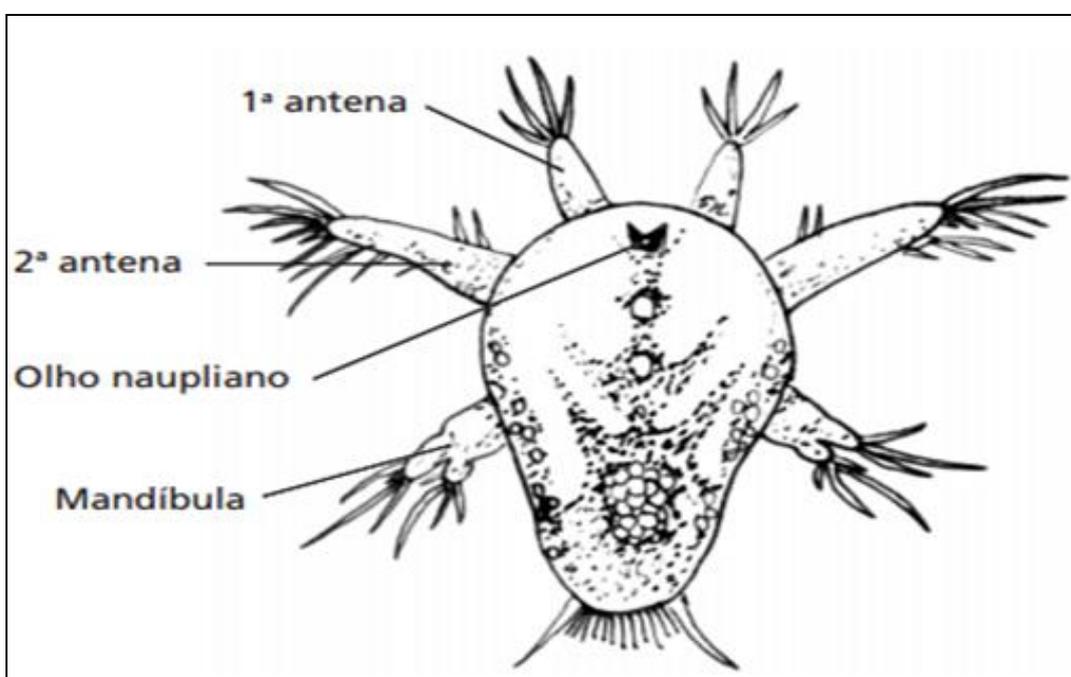
Fonte: modificado de DREWES (2006).

Após eclosão dos cistos, as artêmias na fase larval possuem poucos segmentos formados, conforme observado na figura 16, em que podem ser identificados o olho naupliar, um par de antênulas, um par de antenas e um par de mandíbulas. Além dessas estruturas, na figura 17 pode ser também observado o sistema digestório. Lavens; Sorgeloos (1996) em suas pesquisas registraram que as larvas naupliares recém-eclodidas, ínstares I, apresentam tamanhos entre 400 e

500  $\mu\text{m}$ , além disso, verificaram que nessa fase naupliar o sistema digestório não está ainda funcional, ou seja, encontra-se fechado, permitindo que as mesmas sejam nutridas exclusivamente de suas reservas vitelínicas.

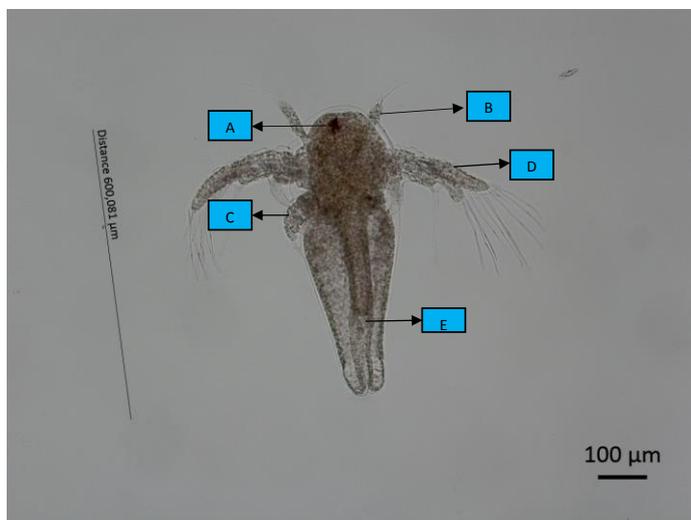
No presente projeto, as artêmias foram utilizadas no estágio naupliar após a abertura do sistema digestório, onde o filtrado contendo os nanocontaminantes são armazenados.

Figura 16 - Larva naupliar Ínstar I de artêmia.



Fonte: VENTURA et al. (2008).

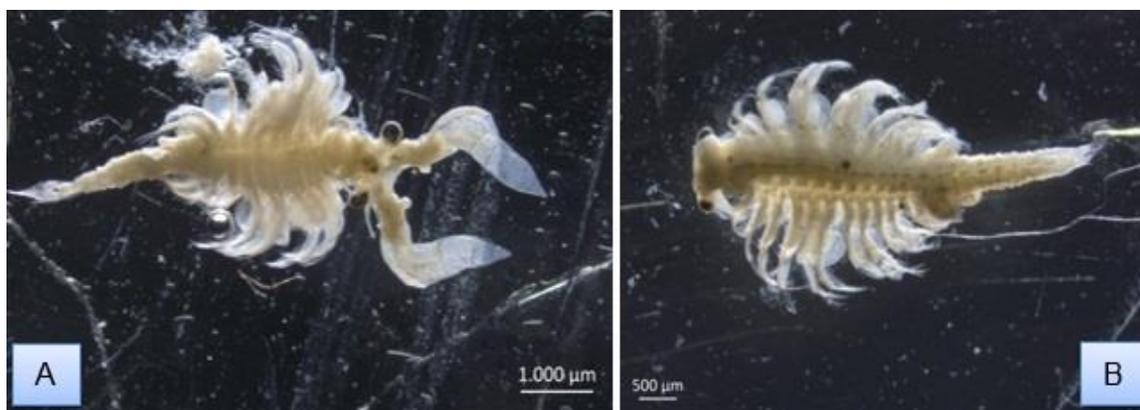
Figura 17 – Microscopia ótica da Larva naupliar Ínstar II de artêmia com destaque das seguintes estruturas:  
A - Olho naupliar; B – Antênula; C – Mandíbula; D - Antena; E - Sistema Digestório.



Fonte: AUTORA (2020).

A Figura 18 apresenta imagens de microscopia ótica de indivíduos adultos. Nessa fase, o comprimento do corpo aumenta em decorrência de sucessivas mudas e do aumento gradual do número de segmentos. Nos machos (Fig. 18-A) o corpo longo e segmentado apresenta um comprimento que varia de 8 a 10 mm, já nas fêmeas (Fig. 18-B), o comprimento varia de e 10 a 12 mm (DHONT et al., 2013). Segundo Corrêa; Penafort (2011) os indivíduos adultos podem apresentar comprimento de aproximadamente 1 cm. Por outro lado, o tamanho dos indivíduos de *A. parthenogenetica*, pode ultrapassar os 18 mm (AMAT, 1985).

Figura 18 - Espécimes de indivíduos adultos de *Artemia franciscana* (A = indivíduo macho e B = indivíduo fêmea).



Fonte: AUTORA (2020).

Na cabeça dos animais adultos pode-se observar várias estruturas, dentre as quais um par de antenas, que perdem a função locomotora quando os indivíduos nesta fase assumem funções diferenciadas entre indivíduos machos e fêmeas. Nos machos, as antenas se diferenciam em cláspers, órgãos em forma de pinças utilizadas para prender a fêmea durante a cópula, nas fêmeas, as antenas assumem a função sensorial (Figuras 19 e 20) (LAVENS; SORGELOOS, 1996).

A região torácica das artêmias adultas é formada por 11 pares de apêndices de formato foliáceo denominados de toracópodes, responsáveis pela natação, respiração e alimentação (LAVENS; SORGELOOS, 1996). Já o abdômen é constituído por oito segmentos abdominais, entre os quais os dois mais próximos da região torácica, correspondem aos segmentos genitais cuja função nas fêmeas é a de alojar o saco ovífero e nos machos, o pênis (Figura 21: A e B). Todos os segmentos abdominais são desprovidos de apêndices. O último segmento é formado pela furca caudal, também chamada de telson (DHONT et al., 2013).

Figura 19 - Detalhe da cabeça do macho exibindo o Cláspers, estruturas em forma de pinça – Microscopia ótica, 40 x.



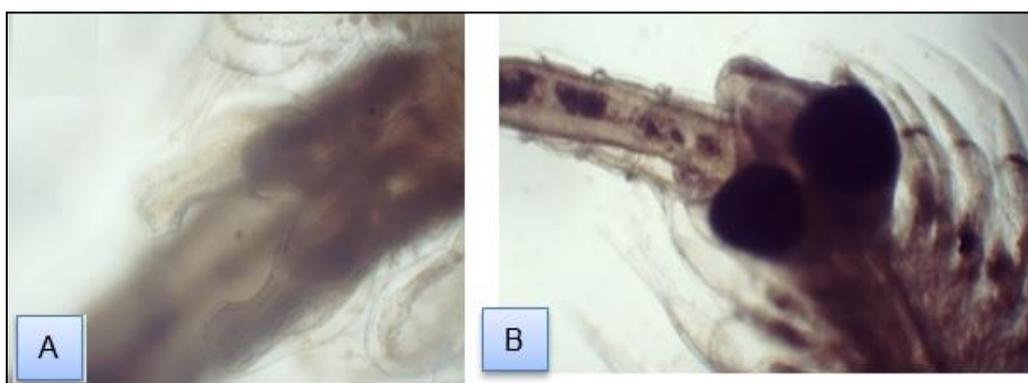
Fonte: AUTORA (2020).

Figura 20 - Detalhe da cabeça da fêmea mostrando atrofiamento do 2º par de antenas – Microscopia ótica, 40 x.



Fonte: AUTORA (2020).

Figura 21 - A: Espécime masculino exibindo detalhe do órgão copulador; B: Espécimen feminino exibindo detalhe de saco ovífero – Microscopia ótica, 40 x.



Fonte: AUTORA (2020).

### **3.4.3 Aspectos Biológicos**

As artêmias são microcrustáceos classificados quanto ao hábito alimentar como animais filtradores não seletivos, que podem ingerir alimentos com dimensões de até 50  $\mu\text{m}$ , tais como detritos orgânicos, algas microscópicas e bactérias (LAVENS; SORGELOOS, 1996). No estágio ínstar I a alimentação é realizada apenas de reservas vitelinas, a partir do estado II, a nutrição passa a ser realizada por filtração da água com ajuda das antenas, já podendo ser utilizadas neste projeto; na fase adulta, o alimento é capturado ficando aderido nas cerdas a partir dos

batimentos das extremidades onde o indivíduo gera uma corrente de água (AMAT, 1985; COSTA,1983).

Apontadas como animais osmorreguladores, são capazes de regular a pressão osmótica por intermédio de diferentes estruturas conforme estágio de desenvolvimento. No estágio larval (ínstar), a glândula de sal é que realiza a excreção dos sais; na fase adulta, são os toracópodes, as glândulas maxilares e o intestino que eliminam os sais (AMAT, 1985; LÓPEZ, 2012).

Modelo de animal extremófilo e osmotolerantes, as artêmias podem habitar lugares onde as condições ambientais são desfavoráveis à sobrevivência da maioria dos seres vivos e favoráveis a sua sobrevivência. Capazes de desenvolverem estratégias adaptativas fisiológicas bastante eficientes, podem sobreviver a variações de salinidade entre 10 e 340 g L<sup>-1</sup> na presença de diversos compostos iônicos e a diferentes regimes de temperatura, podendo suportar variações entre 5 e 35 °C. (PERSOONE; SORGELOOS, 1980; AMAT, 1995; GAJARDO; BEARDMORE, 2012; DHONT et al.,2013).

Estimados segundo Browne; Wasigasekera (2000) e Soundarapandian; Saravanakumar (2009) como os parâmetros ambientais que mais influenciam as populações de artêmias, a temperatura e a produção de alimentos podem levar à ausência temporária da espécie DHONT et al. (2013), como também, ambientes com diferentes temperaturas e salinidades podem interferir no fenótipo de uma população, levando-a, a apresentar uma variabilidade fenotípica. (LAVENS; SORGELOOS, 1996).

De acordo com West-Eberhard (1989) plasticidade fenotípica é a habilidade de um único genótipo expressar formas alternativas de morfologia, estado fisiológico e/ou comportamento em resposta às condições ambientais; ou segundo Scheiner (1993) é a habilidade que tem um organismo em alterar sua fisiologia e/ou morfologia em decorrência de sua interação com o ambiente; ou pode ser definida ainda como a capacidade que um genótipo tem em produzir fenótipos distintos, quando expostos a diferentes ambientes em toda a sua Ontogenia (PIGLIUCCI, 2005).

Neste sentido, Browne; Wasigasekera (2000) concluíram que *Artemia franciscana* foi à espécie que demonstrou tolerância a maiores intervalos de

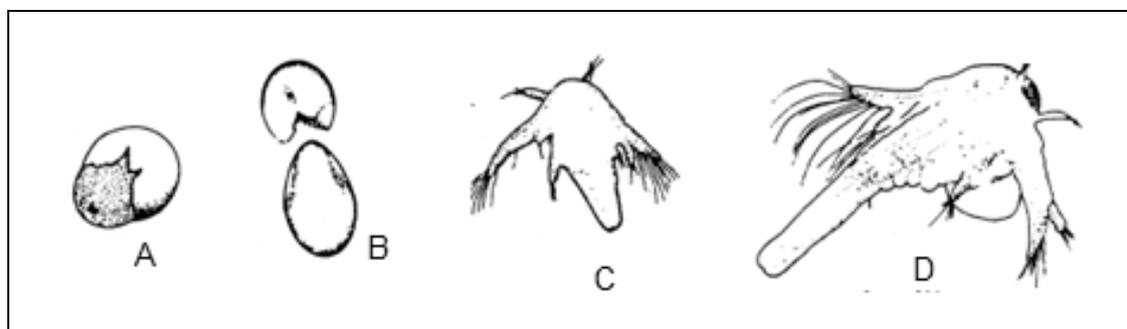
temperatura e um alto grau de Plasticidade Fenotípica, sendo esta a espécie utilizada neste projeto.

#### 3.4.4 Ciclo Vital e Ciclo Reprodutivo

As artêmias são animais cujo ciclo de vida e o reprodutivo pode variar em função das condições ambientais em que elas se encontram. De acordo com Gomes (2012) o ciclo de vida prolonga-se por 21 dias, já Vinatea (1994) afirma que o tempo de vida dura em torno de 14 dias; por sua vez, Lavens; Sorgeloos (1996) destacam que em condições ambientais ótimas, elas podem sobreviver durante vários meses e passar da fase naupliar para adulta em apenas oito dias, ou segundo Santos (2008) elas podem viver mais de seis meses.

Por outro lado, Igarashi (2008) estudando o desenvolvimento das artêmias constatou que no seu ciclo vital havia quatro fases morfológicas distintas, os quais ele nomeou de: náuplio, metanáuplio, pré-adulto e adulto. Treece (2000), no entanto, ilustrou os estágios iniciais do desenvolvimento desse animal através de desenhos esquemáticos, a partir de pesquisa sobre a produção de artêmias para o cultivo de larvas de peixes marinhos (Figura 22). Segundo o mesmo autor, cistos e ovos encapsulados, possuem morfologia bicôncava com diâmetro que varia de 200  $\mu\text{m}$  a 300  $\mu\text{m}$ , dependendo da cepa.

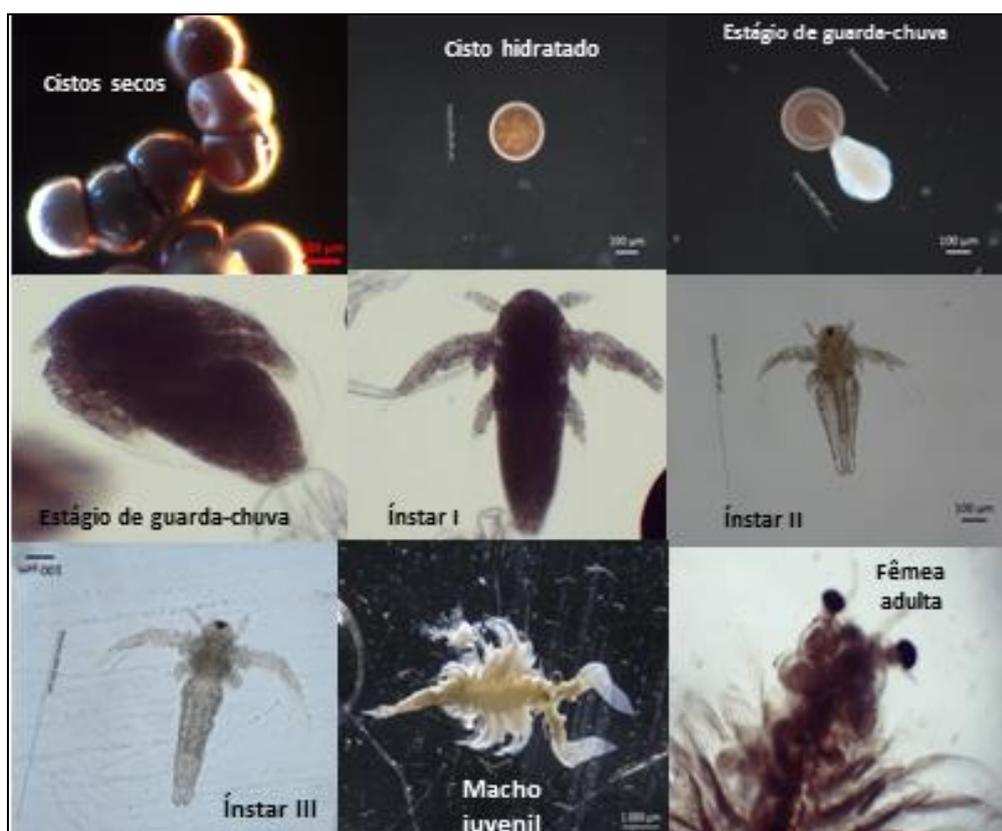
Figura 22- Representação esquemática dos estágios de desenvolvimento. A) Pré-náuplio – estágio I; B) Pré-náuplio – estágio II; C) Larva naupliar I ou Ínstar I; D) Larva naupliar V ou Ínstar V.



Fonte: TREECE (2000).

Consideradas organismos holometábolos porque realizam metamorfose completa (Figura 23), as artêmias apresentam dimorfismo sexual, podendo atingir a maturidade sexual em duas semanas, quando a temperatura for superior a 25 °C e em um ou dois meses, quando as temperaturas forem inferiores (ARANA, 1999; SANTOS, 2008).

Figura 23 - Estágios morfológicos de desenvolvimento da *Artemia franciscana*.

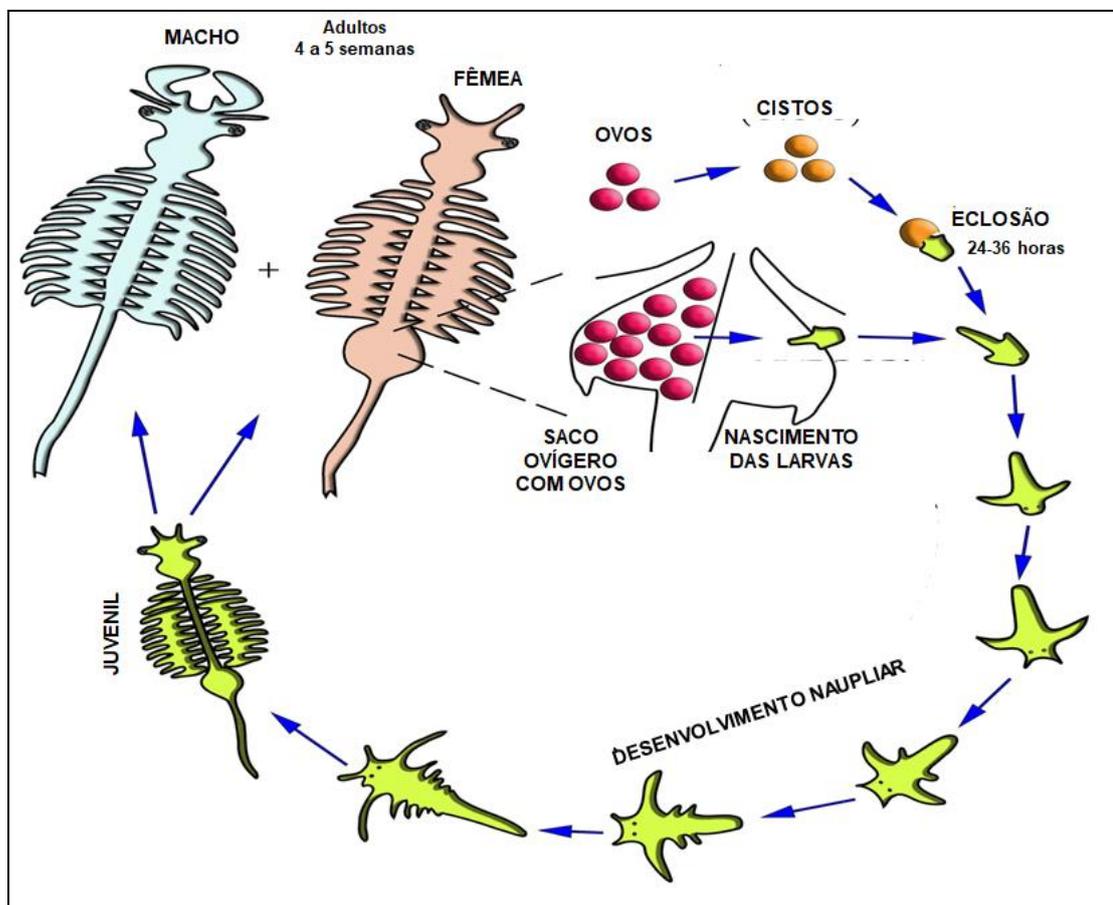


Fonte: AUTORA (2020).

Segundo Narciso (2000) as artêmias podem reproduzir-se sexuadamente, por ovoviparidade, liberando náuplios para o ambiente, quando as condições do meio são favoráveis, como assexuadamente, por partenogênese através da oviparidade, quando as condições do ambiente são desfavoráveis e acontece a liberação de cistos, que nada mais são do que ovos em estado de diapausa, de dormência (Figura 24). Nestas condições o ovo diminui seu metabolismo e permanece neste estado até que as condições ambientais se tornem propícias para eclodirem. O cisto é o ovo que foi interrompido na fase de Gástrula. Em ambos os tipos de reprodução o desenvolvimento embrionário acontece dentro do útero. Este estágio de dormência

é bastante favorável para a estocagem dos cistos a serem utilizados na aplicação aqui proposta, pois podem ser levados à eclosão apenas quando da necessidade do uso como parte ativa dos concentradores vivos.

Figura 24 - Ciclo de vida da *Artemia franciscana*.



Fonte: modificado de HOLLERGSCHWANDTNE et al. (2017).

### 3.4.5 Distribuição Geográfica

De acordo com Câmara (1996) as artêmias são crustáceos cosmopolitas com ampla distribuição geográfica sendo encontradas em todos os continentes, com exceção da Antártica. Habitantes de Ecossistemas hipersalinos (salinas litorâneas ou interiores, lagos salgados e águas haloalinas), no qual a distribuição geográfica não é contínua, as populações de artêmias encontram-se isoladas em biótopos,

localizados em regiões de climas tropicais, subtropicais e de zonas temperadas (PERSOONE; SORGELOOS, 1980) e (GAJARDO; BEARDMORE, 2012).

Segundo Van Stappen (2002) há registros da presença desses animais em altitudes muito elevadas, como no planalto tibetano, no Tibet, a 4.500 m acima do nível do mar; como também no deserto de Atacama, no Chile a 2.500 m conforme informações contidas nos estudos de Gajardo; Beardone (1993) e de Demergasso et al. (2004), bem como há registros da presença de artêmias em altitudes mais baixas, como por exemplo, no Continente Americano.

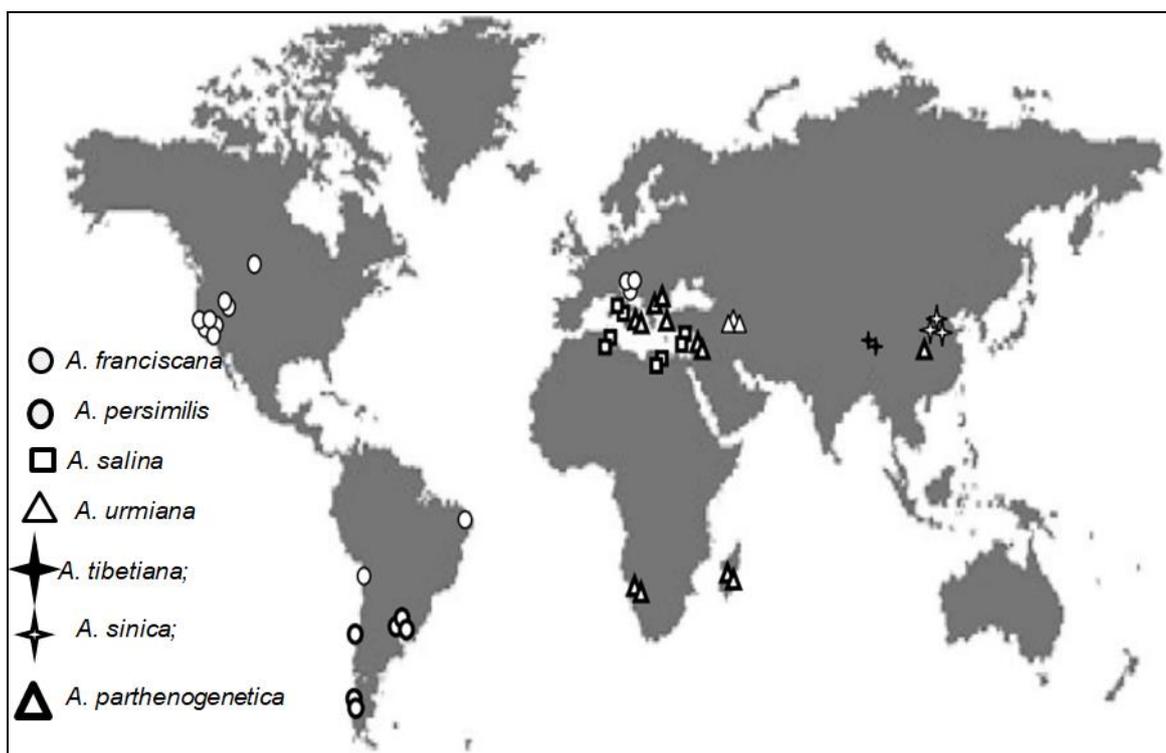
Dhont et al. (2013) mencionam que o gênero *Artemia* (Leach,1819) está constituído de espécies bissexuais, encontradas no velho e novo mundo e por populações partenogênicas com diferentes níveis de ploidias, endêmicas da Europa, África, Ásia e também registradas na Austrália, todas reconhecidas por *A. parthenogenetica* (Muñoz et al.2010).

Conforme Gajardo; Beardmore (2012) há seis espécies bissexuais de artêmias em todo o mundo. A seguir são apresentadas as espécies de artêmias e suas respectivas distribuições geográficas:

1. *A. salina* (Leach,1890): área do Mediterrâneo;
2. *A. urmiana* (Günther, 1890): Lago Urmia - Iran e uma localidade da Criméia- Ucrânia;
3. *A. sinica* (Cai, 1989): interior da China e da Mongólia;
4. *A. tibetiana* (Abatzopoulos et al, 1998): Tibet;
5. *A. persimilis* (Piccinelli e Prosdocini, 1968): Sul da América do Sul;
6. *A. franciscana* (Kellogg, 1906): América do Norte, Central e do Sul.

Embora as duas últimas espécies bissexuais relacionadas acima sejam endêmicas das Américas, pode-se observar na Figura 25, que a *A. franciscana* se apresenta assinalada em diversas regiões do planeta. Amat et al. (2007) e Varó et al. (2015) relataram que este acontecimento se deve à disponibilidade de comercialização dos cistos desta espécie, para aquicultura e a sua introdução em salinas.

Figura 25 - Distribuição geográfica mundial das diferentes espécies de artêmias.



Fonte: modificado de BAXEVANIS, et al. (2006).

De acordo com Vanhaecke et al (1984) e Câmara (2001) as cepas de artêmias oriundas da Baía de São Francisco, Estados Unidos da América, foram introduzidas no Brasil, no Rio Grande do Norte, particularmente nas salinas de Macau, na década de 1970. Assim, a espécie que ocorre no Brasil é a *A. franciscana*, cuja distribuição geográfica abrange as salinas de Macau (Rio Grande do Norte, Brasil) e Cabo Frio (Rio de Janeiro, Brasil) (CÂMARA, 2001). Mota Klein (1996) ressalta que populações de artêmias são também encontradas no estado do Ceará. Neste projeto, a espécie utilizada foi a *Artemia franciscana*.

## 4 METODOLOGIA

A presente pesquisa foi desenvolvida utilizando a infraestrutura laboratorial do Grupo de Arquitetura de Nanodispositivos Fotônicos e Bioinspirados: o Biotério de Espécies Nanoestruturadas (BEN-DQF/UFPE), unidade integrante do Laboratório de Arquitetura de Nanodispositivos Fotônicos e Bioinspirados (LandFoton- DQF/UFPE) e na empresa Ponto Quântico Nanotecnologia, hub de inovação do LandFoton, instalada na Positiva, Núcleo de Inovação Tecnológica (NIT) da Universidade Federal de Pernambuco.

A pesquisa constou de duas etapas, com as respectivas atividades experimentais associadas.

Na primeira etapa, foram realizadas as seguintes atividades experimentais:

- Taxonomia morfológica e taxonomia molecular do microcrustáceo;
- Testes de sobrevivência com larvas naupliares da *Artemia franciscana* (Etapa de eclosão e Experimento de sobrevivência);
- Início de Bioensaios com as larvas naupliares da *Artemia franciscana* para incorporação de NPs Ag, micropoluentes modelo.

Destaca-se que as metodologias taxônomica morfológica e molecular encontram-se descritas nesse documento, enquanto a metodologia referente aos testes de sobrevivência seguiu a metodologia proposta por Browne; Wanigasekera (2000), com adaptações, para constatar as condições ideais de sobrevivência das artêmias. A etapa de eclosão e resumo dos experimentos de sobrevivência encontram-se no anexo A.

Na segunda etapa, foram realizadas as seguintes atividades experimentais:

- Pré-tratamentos de amostras;
- Bioensaios com as larvas naupliares da *Artemia franciscana* para incorporação dos seguintes nanomateriais:
  - nanopartículas de prata (NPs Ag);
  - nanotubos de carbono (NTC);
  - *quantum dots* (QDs).

- Bioensaios com as larvas naupliares da *Artemia franciscana* para incorporação da Olanzapina como fármaco neuroléptico, inibidor de funções psicomotoras.

#### 4.1 ANÁLISE TAXONÔMICA MORFOLÓGICA E MOLECULAR

A identificação taxonômica morfológica do microcrustáceo foi realizada com o auxílio de imagens obtidas em Microscópio (Discovery V.8, ZEISS) com câmera acoplada (ZEISS- AXIOCAM MRC) e programa de captura e edição de imagem (ZEN V.2), estereomicroscópio e microscópio (Lumen) com câmera de *Neubauer* acoplada, com resultados avaliados com base na bibliografia especializada. Do ponto de vista da toxonomia morfológica, os espécimes analisados não foram determinados até o nível de espécie, uma vez que apresentam diferenças morfométricas ocasionadas pela exposição a condições ambientais diferentes, necessitando, neste caso, fazer análise molecular, para uma identificação final segura.

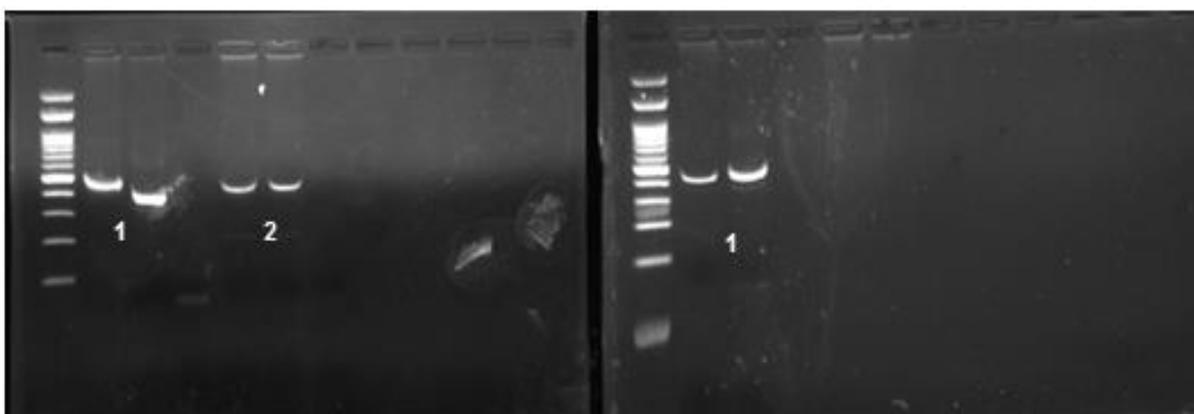
Para a realização da taxonomia molecular da espécie escolhida, foi extraído o DNA de exemplares de indivíduos adultos, seguindo o protocolo de Fenol/Clorofórmio/Álcool Isoamílico (FCI) modificado (Sambrook et al. 1989) (anexo B). Após a extração, o DNA foi quantificado no espectrofotômetro UV-Vis (NanoVue Plus™) e armazenado a uma temperatura de – 20 °C, para posterior análise.

A amplificação do Primer Universal e do gene citocromo C oxidase I (COI) da espécie, foi realizada por reação em cadeia da polimerase (PCR), para os primers L2510 F (5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3') e H3080 R (5'-CCGGTCTGAACTCAGATCCACGT-3'); ANO-LCO F (5'-TRTAYTTTATTTTTGGNGC-3') e PAR-HCO R (5'-GACGTRTTNARGTTTCGGTCNGT-3'), descritos por Palumbi (1996). Para a amplificação por PCR, utilizou-se um volume final de 10 µL, contendo, 93 ng de DNA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,4, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, para o conjunto de primer (L2510 e H3080) e 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, para o conjunto de primer (ANO-LCO e PAR - HCO), 200 µM de cada dNTP, 10 pmoles de cada primer e 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen do Brasil) e água ultrapura para completar o volume da

reação. As reações de amplificação foram efetuadas em termociclador Modelo Veriti 96 - Well Thermal Cycler, sob as seguintes condições térmicas: uma desnaturação inicial a 95 °C por 4 min, seguida de 32 ciclos a 94 °C por 50 s, 55 °C por 50 s e 72 °C por 1 min, seguido por uma extensão final a 72 °C por 5 min.

O produto da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1% e os tamanhos dos fragmentos gerados foram estimados com base em um marcador de peso molecular Ladder de 100 pares de bases (pb) (Figura 26).

Figura 26 – Padrão eletroforético em gel de agarose dos produtos amplificados do DNA das amostras de artêmias adultas, por PCR (1 primer: L2510F, H3080 R; 2: ANO-LCOF, PAR-HCO R).



Fonte: AUTORA (2020).

Os fragmentos obtidos de tamanho aproximado de 550 pb foram purificados com as enzimas Exol/SAP de acordo com o protocolo seguido (Anexo C), para remoção dos primers e nucleotídeos não incorporados, e sequenciados em um sequenciador 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, CA, USA).

Todo o procedimento experimental que culminou com a identificação molecular da espécie utilizada neste trabalho foi processado no Laboratório de Genética Aplicada-LAGA, pertencente ao Departamento de Pesca, da Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFRPE.

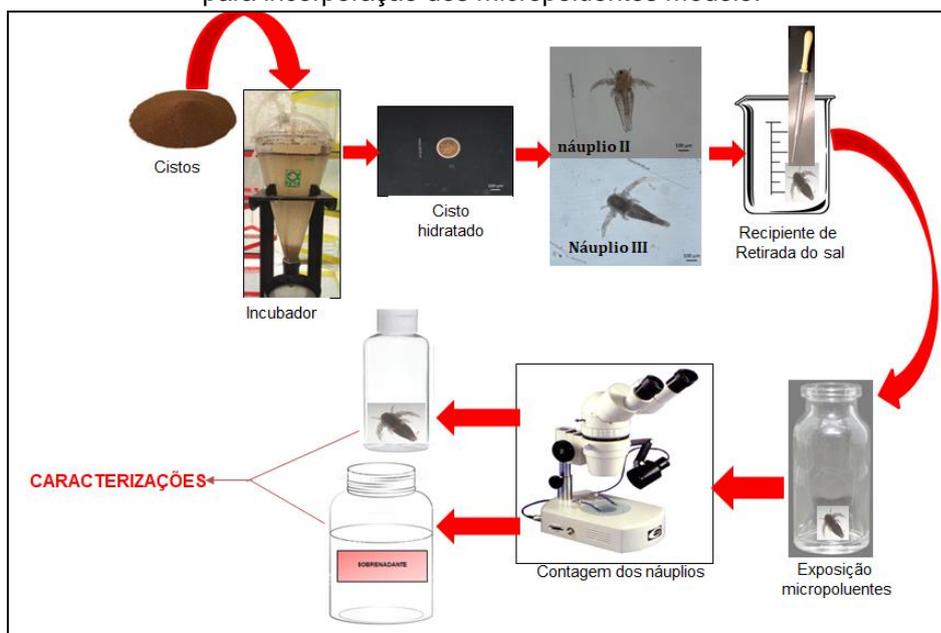
Nesse segmento, também são apresentadas informações a respeito dos aspectos sistemáticos, biológicos, ecológicos, morfológicos e do ciclo de vida do organismo estudado, que serão referenciados nos resultados e discussões.

#### 4.2 BIOENSAIOS COM ARTÊMIAS COMO CONCENTRADORES VIVOS PARA INCORPORAÇÃO DE MICROPOLUENTES MODELO

Neste estudo foram efetuados quatro tipos de bioensaios com base no tipo de micropolvente exposto às artêmias para atuarem como concentradores vivos. As caracterizações das amostras foram realizadas com base na incorporação desses micropoluentes pelos ínstares II e III, já que nestas fases, já houve abertura do sistema digestório dos animais. Para a análise de amostras com NPs Ag, utilizou-se a Espectrometria de Absorção na Região do Ultravioleta-Visível (UV-Vis), Espectrometria de Emissão Ótica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES) e Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS); para NTC utilizou-se Espectroscopia Raman e para os QDs a Microscopia de Fluorescência, e para as amostras em que os náuplios foram expostos à Olanzapina (OLZ), também utilizou-se o UV-Vis. Imagens de Microscopia Ótica, também foram realizadas para exibir aglomerados de NTC ou de NPs Ag no interior das larvas naupliares.

A Figura 27 mostra a sequência inicialmente utilizada para o uso das artêmias como pré-concentradores vivo de micropoluentes modelo.

Figura 27- Representação gráfica dos Bioensaios como concentrador vivo para incorporação dos micropoluentes modelo.



Fonte: AUTORA (2020).

Para realização dos Bioensaios, ínstares naupliares II e III obtidos na etapa de eclosão, foram coletados com auxílio de estereomicroscópio binocular e pipetas de Pasteur e em seguida transferidos para um recipiente contendo água destilada e deixados neste meio, por 30 minutos, com a finalidade de retirar o sal presente, para posteriormente serem expostos aos micropoluentes nos experimentos de exposição (Figura 27).

Todos os procedimentos foram feitos com água destilada, já que constatou-se que na presença de água salina o micropoluente modelo NP Ag interagiu com o cloreto de sódio (NaCl), conforme observado nos espectros de absorção comparados nos dois meios, mostrados no ANEXO D. Considerando as características das artêmias como animais extremófilos, observa-se que as mesmas conseguem sobreviver em situações adversas, e mantiveram-se vivas durante e depois dos ensaios na ausência de sal, em água destilada.

#### 4.2.1 Protocolo de exposição de larvas naupliares da *Artemia franciscana* a Nanopartículas de prata

O protocolo constou da exposição de larvas naupliares a cinco sistemas constituídos por soluções teste de NPs Ag com cinco diferentes diluições em água destilada, partindo de uma solução estoque inicial de 12,9 mg/L, conforme proporções especificadas na tabela 4.

Tabela 4- Sistemas formados por soluções teste.

SISTEMAS (soluções teste de 5 mL)	Volume (mL) da solução estoque de NP Ag de 12,9 mg/L	Volume de H <sub>2</sub> O destilada (mL)	Concentração final de prata (µg/L)
1	0,5	4,5	1290
2	0,6	4,4	1550
3	0,7	4,3	1800
4	0,8	4,2	2060
5	0,9	4,1	2320

Fonte: AUTORA (2020).

Para a determinação do início do tempo de filtração e o tempo de exposição dos microcrustáceos para o desenvolvimento de bioensaios com NPs Ag, foi utilizado o sistema mais concentrado (SISTEMA 5).

#### 4.2.1.1 Análises por Espectrometria de Absorção na Região do Ultravioleta Visível (UV-Vis)

Os ínstares II e III foram expostos às soluções teste de NPs Ag conforme descritas nos sistemas da Tabela 4, durante o período de uma hora, conforme adaptação da metodologia, descrita por Meyer et al. (1982).

As NPs Ag utilizadas nessa pesquisa foram sintetizadas por via química, no qual foi utilizada a solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ )  $1 \text{ mmol L}^{-1}$  como precursor metálico e a solução de borohidreto de sódio ( $\text{NaBH}_4$ )  $2 \text{ mmol L}^{-1}$ , como agente redutor e estabilizante, conforme protocolo (Anexo E) desenvolvido por Mojica-Sánchez (2017).

Inicialmente as soluções teste foram depositadas em recipientes de vidro e em seguida, larvas naupliares foram coletadas e expostas a essas. O conjunto formado por um volume de 5 mL de solução teste e 50 náuplios representou amostras individuais.

A Tabela 5 contém o resumo das condições do bioensaio em que as larvas foram expostas a diferentes volumes de solução de NP Ag. Cada sistema constou da produção de 30 amostras, provenientes de seis réplicas e do uso de 300 larvas naupliares e de 30 mL de solução teste, perfazendo um total de 1500 náuplios e de um volume de 150 mL de solução teste.

Tabela 5 - Resumo das condições do Bioensaio com larvas naupliares de *Artemia franciscana* expostas a NPs Ag.

PARÂMETROS	CONDIÇÃO
Tipo de teste	Estático sem renovação de água
Número de sistemas	05
Número de soluções teste	05
Componentes das soluções teste	NP Ag e H <sub>2</sub> O destilada
Volume total de cada solução teste	5 mL
Volume de solução de NP Ag nas soluções teste	0,5 mL; 0,6 mL; 0,7 mL; 0,8 mL e 0,9 mL
Água de diluição	Água destilada
Volume de H <sub>2</sub> O destilada nas soluções teste	4,5 mL; 4,4 mL; 4,3 mL; 4,2 mL e 4,1 mL
Número de amostra/sistema	06
Número total de amostras e recipientes de vidro	30
Estágios naupliares utilizados	II e III
Número de náuplios/sistema	50
Total de náuplios utilizados no experimento	1500
Volume total de solução teste	150 mL
Alimentação durante o ensaio	Não
Resposta	Diminuição da banda de ressonância plasmônica da prata no espectro de absorção UV-Vis

Fonte: AUTORA (2020).

Após o tempo total de exposição, as larvas naupliares foram retiradas e acondicionadas em outros recipientes, para serem posteriormente submetidas ao processo de digestão de amostras, para análise por Espectrometria de Emissão Ótica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES).

As soluções teste e os seus respectivos filtrados de cada amostra, após exposição e recolhimento dos microcrustáceos filtradores, foram submetidos à análise no UV-Vis usando espectrofotômetro (Perkin Elmer, modelo Lambda 650). Para isso, uma alíquota de 2 mL de cada amostra foi transferida para uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico e os espectros foram registrados entre 200 e 700 nm. Os filtrados das amostras, após terem sido caracterizados pela espectrometria molecular UV-Vis, foram devidamente etiquetados e guardados para a posteriori serem submetidos à análise pela técnica de ICP OES.

#### 4.2.1.2 Análises por Espectrometria de Emissão Ótica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES)

O protocolo proposto neste item visa à determinação do elemento prata nas amostras e seus respectivos filtrados resultantes da exposição às larvas naupliares dos microcrustáceos filtradores.

Para isso, os recipientes utilizados foram lavados com água e sabão neutro e colocados em banho de HNO<sub>3</sub> 10 % (v/v) por no mínimo 24 h e posteriormente, lavados com água ultrapura do tipo I de equipamento Milli-Q<sup>®</sup> e secados em estufa a 60 °C. Os reagentes utilizados no desenvolvimento deste protocolo foram de grau analítico, HNO<sub>3</sub> da marca Sigma-Aldrich e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> da marca J.T. Baker.

As amostras constituídas de larvas naupliares foram submetidas a um pré-tratamento, já as representadas pelos filtrados, foram apenas diluídas.

O tratamento das amostras com larvas foi realizado por digestão úmida, assistida por radiação em forno de micro-ondas de uso doméstico (2450 MHz). Este procedimento consistiu na exposição de larvas naupliares à solução constituída de 2 mL de ácido nítrico (HNO<sub>3</sub>) 65%, peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 % e da adição ou não de água Milli-Q<sup>®</sup>, de forma a totalizar um volume de 5 mL (Tabela 6). No forno de micro-ondas, as amostras foram expostas em recipientes abertos e submetidas seis vezes a uma potência de 10 W por 5 segundos.

Tabela 6 – Condições de digestão das amostras.

SOLUÇÕES TESTE	REAGENTES DA DIGESTÃO	
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	Água Milli-Q <sup>®</sup> (mL)
0,9 mL NP Ag + 4,1 mL H <sub>2</sub> O destilada	3	-
0,8 mL NP Ag + 4,2 mL H <sub>2</sub> O destilada	1	2
0,7 mL NP Ag + 4,3 mL H <sub>2</sub> O destilada	3	-
0,6 mL NP Ag + 4,4 mL H <sub>2</sub> O destilada	1	2
0,5 mL NP Ag + 4,5 mL H <sub>2</sub> O destilada	2	1
0,5 mL NP Ag + 4,5 mL H <sub>2</sub> O destilada	2	1

Fonte: AUTORA (2020).

Foi elaborado um planejamento fatorial composto de duas variáveis estudadas em dois níveis, com duas repetições no ponto central, sendo realizado um planejamento 2<sup>2</sup>. Na tabela 7 são mostradas as variáveis com seus níveis (-1) e (+1) que podem influenciar no processo de digestão das larvas naupliares. Na tabela

8 é apresentada a matriz de experimentos na qual foi utilizada a correlação entre as variáveis e seus níveis, repetindo-se os ensaios duas vezes para os pontos centrais (0).

Tabela 7- Variáveis e níveis empregados no planejamento fatorial 2<sup>2</sup>.

VARIÁVEIS		NÍVEIS		
		(-1)	(0)	(+1)
A	[HNO <sub>3</sub> ] (M)	2	5	8
B	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mL)	1	2	3

Fonte: AUTORA (2020).

Tabela 8 - Matriz do planejamento experimental utilizando o planejamento fatorial 2<sup>2</sup> com repetição de dois pontos centrais.

SOLUÇÕES TESTE	CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS											
	1		2		3		4		5		6	
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
0,9 mL NP Ag + 4,1 mL H <sub>2</sub> O destilada	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(0)	(0)	(0)	(0)
0,8 mL NP Ag + 4,2 mL H <sub>2</sub> O destilada	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(0)	(0)	(0)	(0)
0,7 mL NP Ag + 4,3 mL H <sub>2</sub> O destilada	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(0)	(0)	(0)	(0)
0,6 mL NP Ag + 4,4 mL H <sub>2</sub> O destilada	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(0)	(0)	(0)	(0)
0,5 mL NP Ag + 4,5 mL H <sub>2</sub> O destilada	(+)	(+)	(+)	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)	(0)	(0)	(0)	(0)

Fonte: AUTORA (2020).

Antes de serem analisadas pela técnica de ICP OES, as amostras tiveram que ser diluídas. Utilizou-se no processo de diluição 0,50 mL de amostra com 0,15 mL de HNO<sub>3</sub> (65%) e 1,35 mL de água Milli-Q<sup>®</sup>, totalizando um volume de 2 mL. A determinação de Ag foi realizada no ICP OES modelo Optima<sup>TM</sup> 7000 DV (Perkin Elmer<sup>®</sup>), mediante as condições operacionais descritas na tabela 9.

Tabela 9- Condições de Operação no equipamento de ICP OES.

PARÂMETROS	CONDIÇÕES
Potência de RF (kW)	1,3
Vazão de nebulização (L min <sup>-1</sup> )	0,8
Vazão do argônio auxiliar (L min <sup>-1</sup> )	0,2
Vazão do argônio principal (L min <sup>-1</sup> )	15
Taxa de aspiração da amostra (MI min <sup>-1</sup> )	1,0
Número de replicatas	3
Número de brancos	5
Padrão interno 1mg L <sup>-1</sup>	Ag
Configuração da tocha	Axial
Nebulizador	Concêntrico
Câmara de nebulização	Scott
Elemento	Ag
Comprimento de onda de detecção (nm)	328,068

Fonte: AUTORA (2020).

A eficiência da metodologia experimental foi avaliada a partir do registro de traços do micropolvente prata presentes nas amostras constituídas por náuplios expostos aos diferentes volumes de NP Ag. A técnica ICP OES, também permitiu analisar o efeito do procedimento de digestão de amostras.

A análise estatística dos dados do planejamento fatorial  $2^2$ , com duas repetições no ponto central, foi realizada com o auxílio do *Software Statgraphics XV* (Centurion), no qual foram investigados os efeitos das variáveis e das interações entre elas, a partir da Análise de Variância (ANOVA),  $\alpha = 0,05$ , Desvio Padrão e Diagrama de Pareto. Também foi efetivada uma análise multinível / multifator onde foram avaliados em conjunto o  $\text{HNO}_3$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a quantidade de NP de Ag.

O teste de Durbin-Watson foi utilizado na detecção da autocorrelação residual nos erros do modelo de Regressão. A análise de Regressão e Correlação foi empregada para reconhecer as relações estabelecidas entre as variáveis independentes molaridade do  $\text{HNO}_3$ , o volume de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e concentração de nanopartículas de prata (NPs Ag), sendo a variável dependente, a maior concentração do elemento prata nas amostras.

Abaixo é apresentada a Figura 28 que contém o resumo das etapas realizadas para a determinação do elemento prata nas amostras, a partir da técnica de ICP OES.

Figura 28 - Fluxograma das etapas desenvolvidas para determinação do elemento prata (Ag) nas amostras pela ICP OES.



Fonte: AUTORA (2020).

#### 4.2.1.3 Análises por Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS)

As larvas naupliares expostas ao Sistema 5 (Tabela 4) foram coletadas do filtrado e fixadas em solução de Karnovsky à temperatura ambiente enquanto os filtrados foram acondicionados em recipientes individuais e levados para serem

caracterizado por Espectroscopia UV-Vis. As larvas foram, em seguida, submetidas ao tratamento de amostras descrito no anexo F, para posteriormente serem caracterizadas pela técnica de EDS.

As análises químicas realizadas por EDS para a determinação do elemento prata nos náuplios foram realizadas no Departamento de Física (DF) - UFPE em microscópio eletrônico de varredura (MEV), modelo MIRA 3 LMH Schottky FE-SEM (Tescan). Imagens de ínstares naupliares foram obtidas a partir deste microscópio e do microscópio eletrônico de varredura (MEV), modelo EVO LS15 do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) – UFPE.

#### 4.2.2 Protocolo de Exposição das larvas naupliares da *Artemia franciscana* Kellog, 1906 a nanotubos de carbono (NTC)

Neste bioensaio as larvas naupliares foram expostas a quatro tipos de sistemas (dois controles e dois experimentais), durante o período de 1 hora. Um dos sistemas controle apresentava solução teste constituída apenas por água destilada, e outro, composto de água destilada e microalga *Nannochloropsis oculata*. Nos sistemas experimentais, a solução teste, era composta de água destilada e NTC em um deles, enquanto no outro era constituída de água destilada, microalga *Nannochloropsis oculata* e NTC (Tabela 10).

Tabela 10- Sistemas de exposição com os componentes das soluções teste.

SISTEMAS	COMPONPONTES DAS SOLUÇÕES TESTE		
	H <sub>2</sub> O Destilada (mL)	Microalgas (mL)	NTC (mg L <sup>-1</sup> )
<b>CONTROLE 1</b>	20	-	-
<b>CONTROLE 2</b>	17,5	2,5	-
<b>EXPERIMENTAL 1</b>	20	-	0,3 ou 0,5
<b>EXPERIMENTAL 2</b>	17,5	2,5	0,3 ou 0,5

Fonte: AUTORA (2020).

Nas amostras dos sistemas experimentais, antes da exposição das larvas naupliares aos NTC, nas soluções teste foi adicionado surfactante Triton X-100, para dispersar os NTC. Em seguida, as soluções teste foram sonicadas durante um

período de 1h 30 min, em equipamento de ultrassom da marca UNIQUE, para otimizar a dispersão dos NTC. A Tabela 11 apresenta resumo das condições experimentais de exposição.

Tabela 11- Resumo das condições experimentais do Bioensaio de exposição de náuplios a NTC.

PARÂMETROS	CONDIÇÃO
Tipo de teste	Estático sem renovação de água
Recipiente de exposição	Béquer de 50 mL
Água utilizada no experimento	Destilada
Concentração de NTC utilizados	0,3 mg L <sup>-1</sup> ou 0,5 mg L <sup>-1</sup>
Volume de água destilada	20 mL ou 17, 5 mL
Volume de microalgas	2,5 mL
Volume total da solução dispersante por sistema	20 mL
Volume de Triton X-100	0,6 mL
Total de sistemas utilizados	4
Total de náuplios por sistema ou amostra	50
Total de náuplios usados no Bioensaio	200
Fases naupliares	Ínstares II e III

Fonte: AUTORA (2020).

Após o período de exposição, as larvas naupliares foram coletadas com auxílio de estereomicroscópio e pipetas de *Pasteur* e acondicionadas em *Eppendorf* de 1,5 mL, onde foram fixadas em solução de formaldeído a 10 %, à temperatura ambiente. Posteriormente, foram submetidas a um processamento de tratamento de amostra biológica (anexo G), para serem analisadas pela Espectroscopia Raman (ER).

#### 4.2.2.1 Análises por Espectroscopia Raman (ER)

As análises das amostras por ER foram realizadas em Espectrômetro Raman SENTERRA-BRUKER com microscópio Olympus acoplado, operando com linha de excitação em 532 nm e grade de difração de 1200 linhas/mm. Nas amostras provenientes dos sistemas Controle 1 e 2 e do Experimental 3 e 4, a potência do laser e o tempo de integração utilizados para análise das amostras foram de 20 mW / 20 s, e de 10 mW / 20 s, no sistema Experimental 3, uma vez que o poder de penetração do laser estava danificando a amostra. A objetiva usada na análise foi a de 50x e Imagens das amostras depositas nas lâminas foram também obtidas.

O processamento das amostras biológicas foi realizado no LIKA – UFPE e as análises de Espectroscopia Raman, no Instituto de Criminalística Professor Armando Samico (ICPAS/PE).

#### 4.2.2.2 Análises por Microscopia Ótica

Foram realizadas fotografias de alguns espécimes expostos a NTC no laboratório de Toxicidade e Comunicação Celular (LTCC), do Departamento de Histologia e Embriologia (DHE) – UFPE, em microscópio binocular ótico da Lumen, com câmara de *Neubauer* acoplada.

#### 4.2.3 Protocolo de Exposição das larvas naupliares da *Artemia franciscana* Kellog, 1906 a *Quantum dots* (QDs)

Neste bioensaio, as larvas naupliares foram expostas durante o período de uma hora a dois tipos de sistemas: um controle, constituído apenas de água destilada e dois experimentais; o sistema experimental formado por solução teste constituído de água destilada e QDs de ZnCdTe-TGA (telureto de cádmio e zinco estabilizado pelo ácido tioglicólico), conforme observado na tabela 12.

Tabela 12- Resumo das condições experimentais do Bioensaio de exposição de náuplios a QDs.

SISTEMAS	COMPONENTES DAS SOLUÇÕES TESTE	
	H <sub>2</sub> O D (mL)	ZnCdTe (mL)
<b>CONTROLE</b>	5,0	-
<b>EXPERIMENTAL</b>	4,5	0,5

Fonte: AUTORA (2020).

Decorrido o tempo de exposição dos náuplios às soluções teste, os ínstares naupliares foram coletados e fixados em solução de Karnovsky à temperatura ambiente, para posteriormente serem caracterizados pela Microscopia de Fluorescência (MFL).

#### 4.2.3.1 Análises por Microscopia de Fluorescência

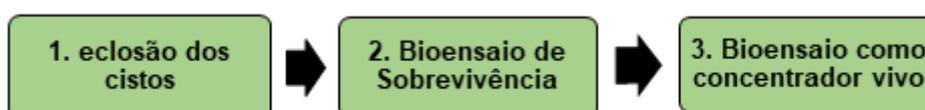
As análises foram realizadas no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), no setor de Microscopia eletrônica e no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE).

Para a realização dessa análise, ínstares naupliares tiveram que ser depositados em lâminas de vidro e em seguida levados ao microscópio para serem submetidos a filtros DAPI (365 nm); Alexa (488 nm) e Alexa (546 nm). As amostras caracterizadas no CETENE tiveram que ser cobertas por lamínula, para análise em microscópio é invertido.

#### 4.2.4 Protocolo de Exposição das larvas naupliares da *Artemia franciscana* Kellog, 1906 ao fármaco Olanzapina

Os experimentos com exposição das artêmias ao fármaco psicotrópico Olanzapina (OLZ) foram feitos em paralelo aos trabalhos com os nanocontaminantes e são apresentados no Anexo I. A metodologia empregada neste protocolo foi desenvolvida em 3 etapas (Figura 29), sendo a primeira, relacionada com eclosão dos cistos. Nesta fase, foram utilizados em cada eclosão, aproximadamente, 0,35 g de cistos procedentes das lagoas de Macau- RN/BR. Na segunda fase, os náuplios da fase II e III foram expostos à OLZ, seguindo a metodologia proposta por Browne, Wanigasekera (2000) com adaptações, e a terceira fase refere-se à análise do filtrado dos náuplios, através de medida indireta da concentração do fármaco por Espectrometria de Absorção na região UV-Vis.

Figura 29 - Fluxograma com as três etapas experimentais da exposição das larvas naupliares ao fármaco Olanzapina.



Fonte: AUTORA (2020).

Para a realização deste bioensaio, preparou-se uma solução estoque de 35 mg L<sup>-1</sup> de OLZ, com água mineral de pH de 6,0 (marca Diamante). A solução estoque foi submetida a um equipamento de ultrassom da marca UNIQUE, durante aproximadamente 20 minutos. Em seguida, soluções teste de 50 mL de 1, 25 mgL<sup>-1</sup>; 2,5 mgL<sup>-1</sup>; 5 mgL<sup>-1</sup>; 10 mgL<sup>-1</sup>; 15 mgL<sup>-1</sup>; 20 mgL<sup>-1</sup>; 25 mgL<sup>-1</sup> e 30 mgL<sup>-1</sup> foram preparadas a partir da diluição da solução estoque. Após a preparação das soluções teste, foi traçada uma curva de calibração na faixa de concentração em que há linearidade da lei de Beer-Lambert. Neste bioensaio, as larvas foram expostas apenas às soluções teste de 5 mgL<sup>-1</sup> e 10 mgL<sup>-1</sup> de OLZ, uma vez que apresentaram maior taxa de sobrevivência durante o período de 24 horas. Alíquotas de 4 mL das soluções teste de 5 mgL<sup>-1</sup> e 10 mgL<sup>-1</sup> de OLZ foram coletados e depositados em recipientes de vidro específicos. Dois grupos de 10 larvas naupliares, totalizando 20 náuplios, foram coletados e em seguida, cada grupo foi exposto a uma solução teste durante um período total de 140 minutos.

#### 4.2.4.1 Análises por Espectrometria de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta Visível (UV-Vis)

Ainda em referência aos experimentos com exposição das artêmias à OLZ, apresentados no Anexo I, foram realizadas análises das soluções teste de 5 mgL<sup>-1</sup> e 10 mgL<sup>-1</sup> do fármaco por espectrometria UV-Vis antes e após a exposição aos náuplios, a cada 20 minutos, de forma a se conhecer o comportamento de filtragem das larvas naupliares quando expostas ao fármaco modelo.

Análises cinéticas das duas soluções teste do fármaco foram realizadas para se verificar a possibilidade de decomposição ao longo do tempo. Para isso as soluções teste foram analisadas por UV-Vis nos intervalos de 0 min, 120 min e 360 minutos após as preparações.

As análises UV-Vis das soluções teste e dos filtrados foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis (Varian Cary 50) com lâmpada de xenônio, do Laboratório de Eletrossíntese – LES no DQF/UFPE. Para isso, uma alíquota de 2 mL de cada sistema foi colhida e transferida para uma cubeta de quartzo de 1 cm de caminho ótico, e os espectros registrados entre 200 e 700 nm.

A tabela 13 apresenta as condições experimentais do protocolo de exposição do fármaco OLZ aos náuplios.

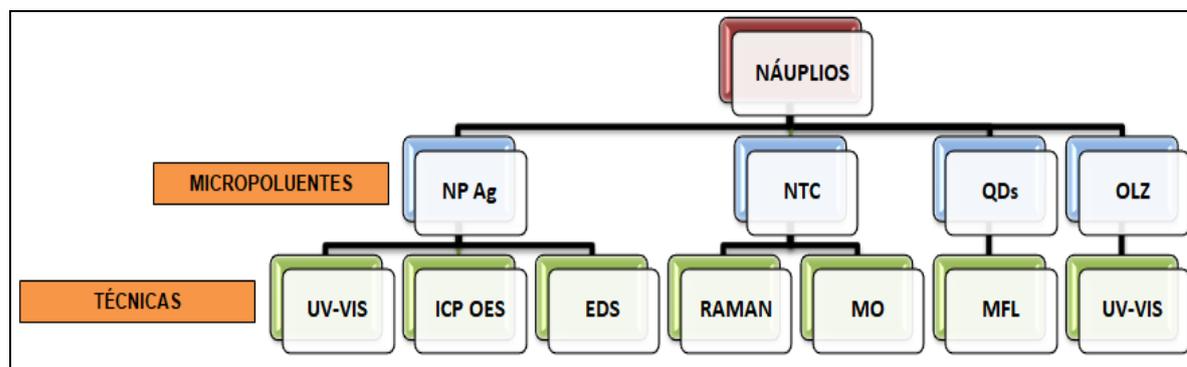
Tabela 13 – Resumo das condições experimentais do protocolo de exposição do fármaco OLZ aos náuplios.

PARÂMETROS	CONDIÇÃO
Tipo de teste	Estático sem renovação de água
Recipientes de exposição	Vasos de vidros
Água utilizada na diluição	Mineral da marca Diamante
pH da água utilizada	6,0
Concentração de OLZ utilizadas	5 mg L <sup>-1</sup> ; 10 mg L <sup>-1</sup>
Número total de soluções testes	2
Volume de solução teste / amostra	4 mL
Total de amostras/ soluções teste	2
Total de amostras	4
Total de náuplios / amostra	10
Total de náuplios usados no Bioensaio	40
Tempos avaliados	140 min; 360 min
Fases naupliares	Ínstares II e III
Resposta esperada	Diminuição da banda de absorção da OLZ

Fonte: AUTORA (2020).

A Figura 30 representa um diagrama com o resumo de todas as metodologias aplicadas neste estudo, destacando as técnicas analíticas utilizadas para cada micropoluentes modelo.

Figura 30 - Diagrama contendo os micropoluentes e as técnicas utilizadas nos bioensaios com as larvas naupliares.



Fonte: AUTORA (2020).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Nesta seção serão apresentados os resultados dos experimentos realizados e discussões com vistas à aplicação das artêmias em sua fase larval como pré-concentradores vivos de traços de nanomateriais e contaminantes moleculares (micropoluentes) de ecossistemas aquáticos. Será avaliada a possibilidade de determinação de uma curva analítica e sua equação, em função do tempo de filtração não seletiva desses animais utilizados como motores filtradores, para pelo menos uma técnica analítica e um nanocontaminante modelo, como prova de conceito para elaboração de um dispositivo patenteável.

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA MORFOLÓGICA

A classificação do animal estudado sob a ótica da análise taxonômica morfológica foi possível até a categoria taxonômica gênero. Neste estudo, a análise dos espécimes permitiu elaborar uma diagnose do gênero *Artemia* com base nas semelhanças morfológicas e funcionais. Por outro lado, a classificação taxonômica morfológica a nível de espécie, não foi concluída porque alguns exemplares analisados apresentaram certos níveis de diferenças em estruturas morfológicas, geralmente usadas para classificar os organismos nesta categoria.

Embora a taxonomia morfológica seja relevante na identificação de espécies, em alguns casos, ela pode apresentar limitações, sendo necessária a realização da taxonomia molecular para elucidar a espécie, concluindo o estudo de análise taxonômica.

#### 5.1.1 Diagnose do Gênero

*Artemia* Leach, 1819

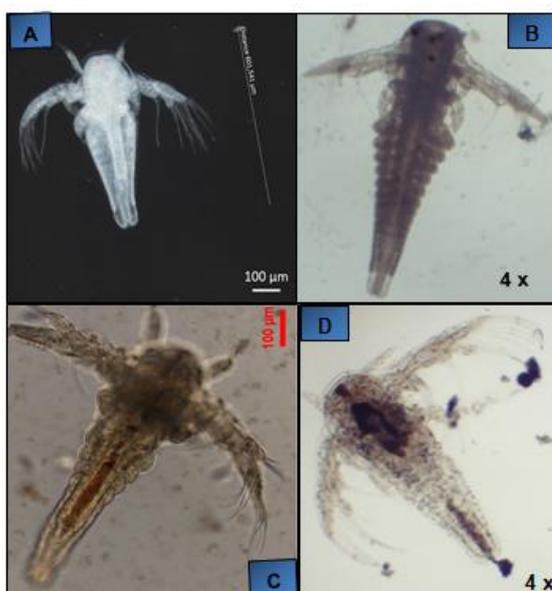
Animal com corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen. Corpo delgado e achatado dorso-ventralmente. Cabeça desprovida de carapaça, com par de olhos compostos e pedunculados, situados lateralmente. Machos menores que as fêmeas. Segundo par de antenas evidencia dimorfismo sexual. Nos machos o segundo par de antenas se diferencia em claspers, cuja função é prender a fêmea durante o

acasalamento. Pênis de forma bifurcada situado na região posterior, após o 11º par de taracópodes. Nas fêmeas o segundo par de antenas, sofre um atrofiamento, ficando menor do que o primeiro par de antenas. Tórax com 11 pares de toracópodes em forma de folhas. Abdome situado após a região genital; desprovido de apêndices, de formato quase cilíndrico e constituído por seis segmentos abdominais. Telson com furca caudal bifurcada com ramos curtos e repletos de cerdas longas e finas. Nas fêmeas, a parte distal é ligeiramente afilada, nos machos a parte distal apresenta borda arredondada.

Neste estudo, além da descrição do gênero *Artemia* é apresentado também informações relacionadas à biologia (tamanho das larvas e dos adultos, aspectos morfológicos dos indivíduos adultos, ciclo de vida e tempo de maturação sexual) a partir do desenvolvimento em condições laboratoriais. As imagens dos indivíduos naupliares e adultos presentes neste tópico foram obtidas por microscopia ótica.

Foi observado que os ínstares naupliares II e III resultantes da eclosão em água salina constituída apenas de NaCl (cloreto de sódio não iodado) apresentaram tamanhos médio de 500 µm, em contrapartida, os náuplios obtidos a partir de água do mar descontaminada (Apêndice A) assinalaram tamanho médio de 950 µm). Por outro lado, náuplios expostos aos micropoluentes NPs Ag e NTC, registraram tamanho médio respectivamente, 760 µm e 574 µm (Figura 31).

Figura 31- Ínstares naupliares II e III expostos a: (A) Água salina apenas com NaCl; (B) Água do mar descontaminada; (C) NPs Ag e (D) NTC.



Fonte: AUTORA (2020).

Ainda referente aos ínstares II e III, foi verificado que indivíduos naupliares nestas fases conseguiram se manter vivos sem fornecimento de alimento durante 13 dias (Figura 32). As imagens dos indivíduos naupliares evidenciam alterações em sua anatomia e morfologia. A região do trato digestivo se encontra com deformações, no qual pode ser observado alargamento desprovido de segmentação ou certo estreitamento, neste caso, sugerindo que eles entraram em condição de inanição. A imagem também revela que nestes espécimes, os taracópodes parecem atrofiados ou praticamente inexistentes, sugerindo que os náuplios quando submetidos a uma situação de estresse alimentar (carência de alimento) podem desenvolver um processo semelhante à seca fisiológica das plantas. De acordo com Fageria (1989) a seca fisiológica ocorre em condições de deficiência hídrica induzida pelo efeito osmótico. Em tal processo é comum ocorrer alterações morfológicas e anatômicas nas plantas como medida para manter a absorção de água e reduzir a taxa de transpiração. Nos indivíduos naupliares, a condição foi relacionada à falta de alimentação, o que possivelmente ocasionou fraqueza extrema, podendo levá-los à degeneração da gordura corporal, músculos entre outras partes do corpo e a consumirem os seus próprios tecidos com a finalidade de obter as calorias necessárias para sobreviverem.

Figura 32- Indivíduos naupliares sem fornecimento de alimentação por 13 dias.

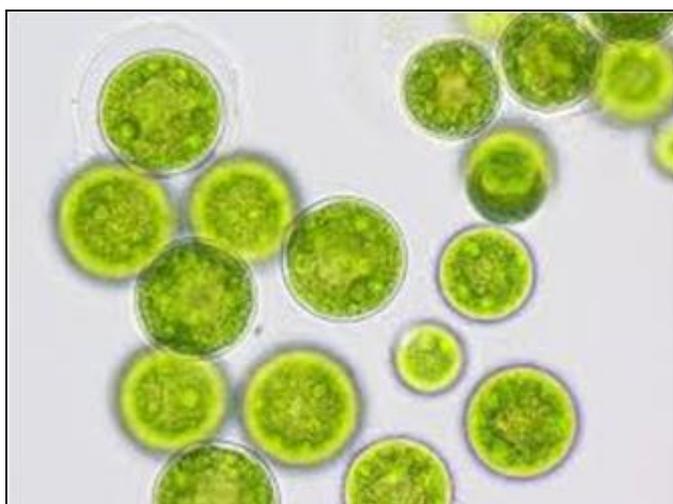


Fonte: AUTORA (2020).

Nos indivíduos adultos, o tamanho médio registrado foi de 6 mm para os machos e 5 mm para as fêmeas, ambos mantidos em água salina com apenas NaCl; já para os indivíduos desenvolvidos em água do mar descontaminada, o tamanho médio registrado foi de 8 mm para os machos e de 6 mm para as fêmeas. Os resultados também apontaram uma moderada oscilação no tamanho dos indivíduos machos e fêmeas cultivados em ambos os meios, mas com a redução dos tamanhos médios em água salina com apenas NaCl.

Em condições laboratoriais favoráveis, onde o pH (8,5), a temperatura (28 °C) e a salinidade (35 g L<sup>-1</sup>) foram controlados e os animais alimentados com microalga *Nannochloropsis oculata* (Figura 33), foi verificado que o tempo de sobrevivência variou entre 27 e 56 dias e que a maturidade sexual dos indivíduos foi registrada entre 14 e 17 dias, bem semelhante ao constatado por Gilchrist (1959). Nestas mesmas condições foi observado que os indivíduos adultos, originados de cistos adquiridos em loja de aquaristas, conseguiram reproduzir sexualmente em cativeiro, e por ovoviparidade (processo de desenvolvimento do animal dentro de um ovo alojado no interior do corpo da fêmea) liberaram larvas naupliares diretamente no ambiente artificial.

Figura 33- Microalga da espécie *Nannochloropsis oculata*.

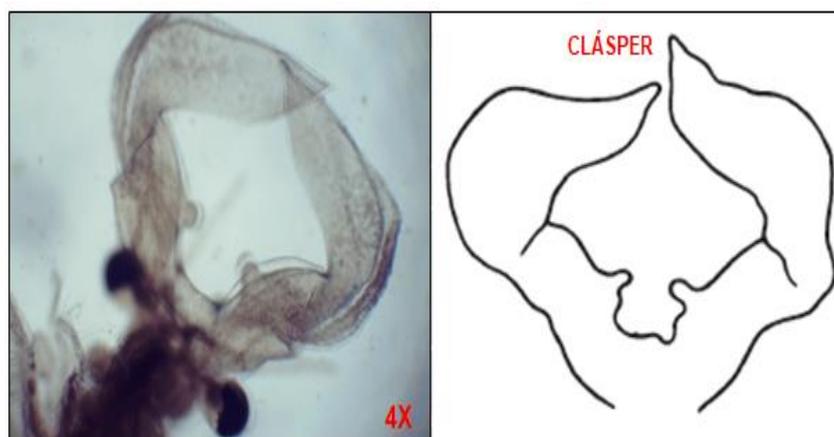


Fonte: DANIELLS (2015).

Nesta pesquisa foram também visualizadas o cláspes nos machos, a furca e o saco ovífero, estruturas importantes do ponto de vista taxonômico. O cláspes

(Figura 34), órgão surgido a partir da antena modificada nos indivíduos masculinos, apresenta tamanho médio de 5,89 mm, e na parte interior desta estrutura encontra-se um par de botões de forma arredondada, com tamanho médio de 1,28 mm.

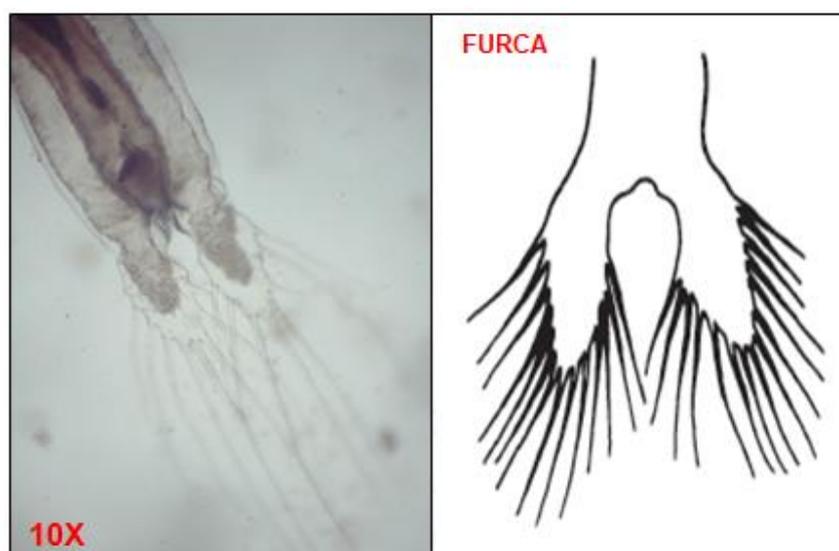
Figura 34 - Cláster da *Artemia franciscana*.



Fonte: AUTORA (2020); desenho de BARIGOZZI, (1974).

A furca, também conhecida como telson, é bifurcada e apresenta várias cerdas longas situadas na parte externa e interna da região bifurcada (Figura 35).

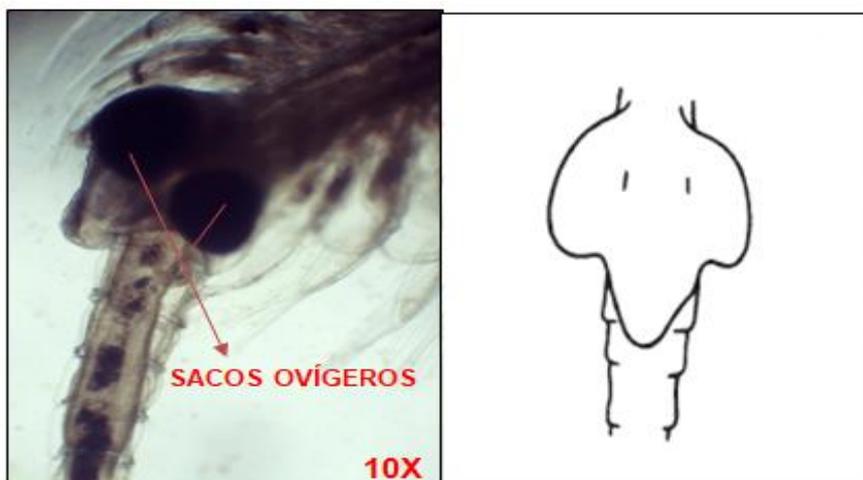
Figura 35 - Morfologia da furca da *Artemia franciscana*.



Fonte: AUTORA (2020); desenho de BARIGOZZI, (1974).

Os sacos ovíferos, estruturas de formato ligeiramente arredondados, situados atrás do último par de taracópodos (11<sup>o</sup>), um em cada lado (Figura 36).

Figura 36 - Morfologia dos sacos ovíferos da *Artemia franciscana*.

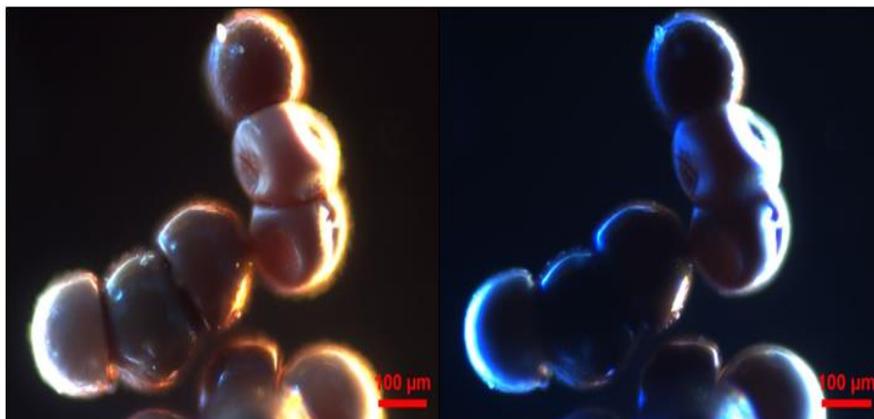


Fonte: AUTORA (2020); desenho de BARIGOZZI, (1974).

Quando a água do ambiente artificial apresentou pH= 6,0 e a temperatura e salinidade se mantiveram constantes, houve uma diminuição da copulação entre os indivíduos adultos, ausência de larvas naupliares no ambiente e muitos cistos fixados nas paredes do sistema. Além disso, os indivíduos adultos encontrados nesta condição apresentaram comprimentos em torno de 3 a 4 mm, diferentes dos indivíduos originados de condições favoráveis, no qual foram registrados tamanhos entre 5 mm e 10,6 mm.

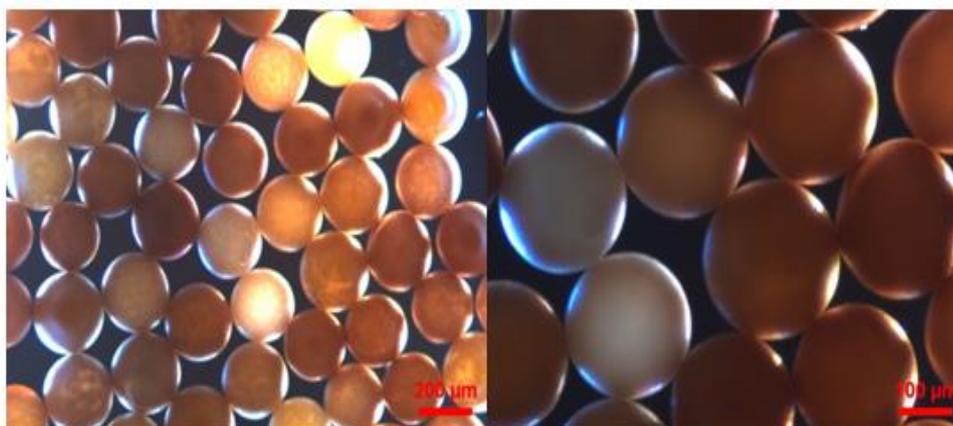
Os cistos utilizados nesta pesquisa apresentaram diâmetro em torno de 249  $\mu\text{m}$ . Sua morfologia varia de bicôncava quando em estado desidratado (Figura 37) a esférica quando, hidratados (Figura 38).

Figura 37 - Cistos de artêmias desidratados.



Fonte: AUTORA (2020).

Figura 38 - Cistos de artêmias hidratados.



Fonte: AUTORA (2020).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO TAXONÔMICA MOLECULAR

As sequências obtidas foram editadas no *software BioEdit* e comparadas com o banco de dados GenBank, resultando na identificação positiva para a espécie *Artemia franciscana* (X69067.1), com score de 100%.

## 5.3 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS COM CONCENTRADOR VIVO

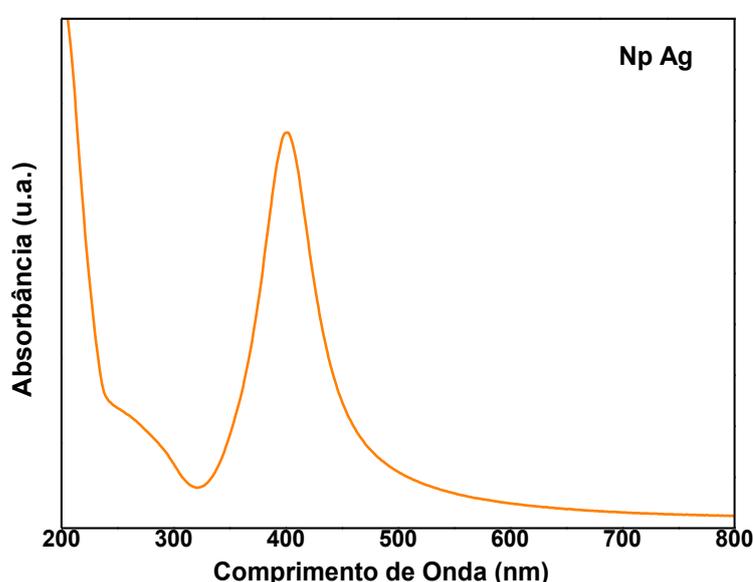
### 5.3.1 Bioensaios empregando NP Ag

*Artemia franciscana* (Kellogg, 1906)

### 5.3.1.1 Espectrometria de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta Visível (UV-Vis)

A Figura 39 corresponde ao espectro de absorção UV-Vis da solução de prata coloidal obtida por via química. Foi observado que o comprimento de onda máximo de absorção associado à banda de ressonância plasmônica da prata (SPR) foi de 400 nm, que originou uma única banda de absorção correspondente às NPs Ag esféricas e de diâmetro médio de 20-35 nm.

Figura 39 - Espectro de absorção UV-Vis das NPs Ag.



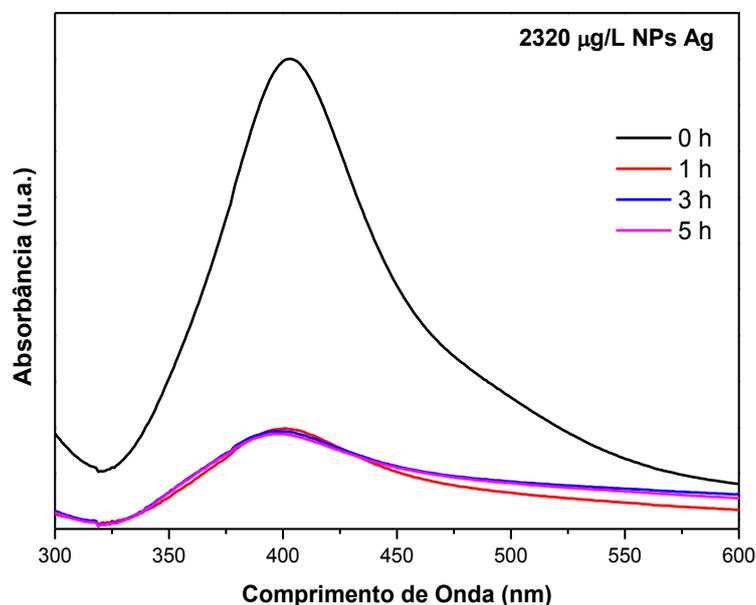
Fonte: MOJICA-SÁNCHEZ (2017).

A Figura 40 apresenta os espectros de absorção UV-Vis do Sistema 5 (Tabela 4), cuja concentração de NPs Ag corresponde a 420 µg/L, antes (0h) e após a exposição às artêmias por períodos de 1 h; 3 h e 5 h. Foi observada uma forte diminuição da intensidade de absorção da banda de ressonância plasmônica das NPs Ag no sobrenadante após 1h de filtração da amostra pelo microcrustáceo, entretanto, não se detectou alteração relevante no espectro de absorção UV-Vis nos períodos seguintes analisados, indicando uma saturação dos filtros vivos após a primeira hora.

Diante desse resultado, optou-se por expor as larvas naupliares as NPs Ag por períodos de até 60 minutos, melhorando o tempo gasto na realização das

atividades experimentais a partir da análise do espectro de absorção UV-Vis obtido em função do tempo de filtração.

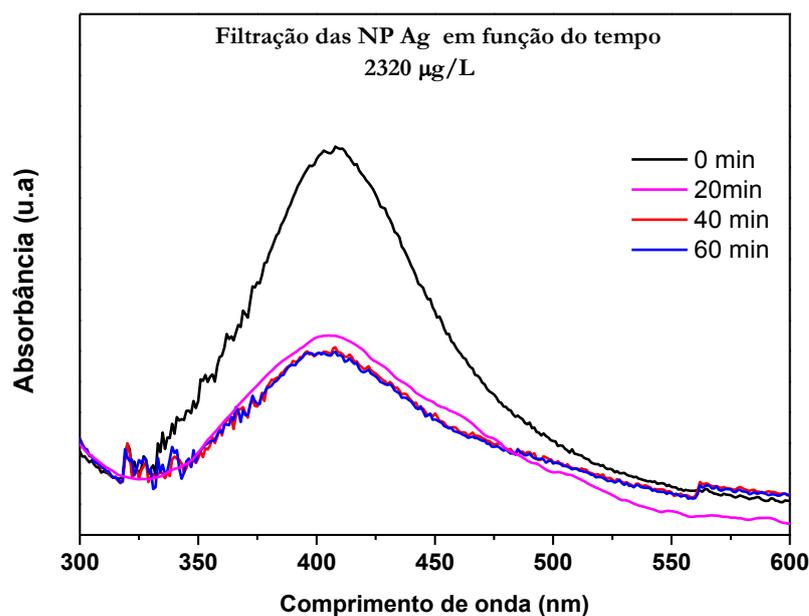
Figura 40 - Espectros de absorção UV-Vis para as NP Ag do Sistema 5.



Fonte: AUTORA (2020).

Diante da saturação do sistema vivo de filtragem constatada nos espectros da Figura 40 para o Sistema 5 (o mais concentrado), foram realizados ensaios com tempos mais curtos de exposição das artêmias no mesmo Sistema (Figura 41).

Figura 41 - Espectros de absorção UV-Vis da filtração das NPs Ag (900 µL) em função do tempo.



Fonte: AUTORA (2020).

A figura 41 apresenta os espectros de absorção do sobrenadante da filtração registrados para tempos de exposição às larvas naupliares de 20 min, 40 min e 60 min, comparados ao espectro do Sistema 5 antes da exposição. Observa-se o maior volume de filtração nos 20 minutos iniciais de exposição dos náuplios às NPs Ag através da forte redução da banda de ressonância plasmônica das NPs Ag.

A figura também revela que entre 20 e 40 min a redução da intensidade da banda de absorção é muito discreta, e entre 40 e 60 minutos não houve mais absorção de NP Ag pelo grupo constituído de 50 náuplios, de dois dias, em 5 mL de solução para a concentração máxima utilizada, 420 µg/L, equivalente a 2,10 µg de Ag nos 5 mL de água (Sistema 5, conforme tabela 14).

Tabela 14- Sistemas de NP Ag em água preparados com 5 mL.

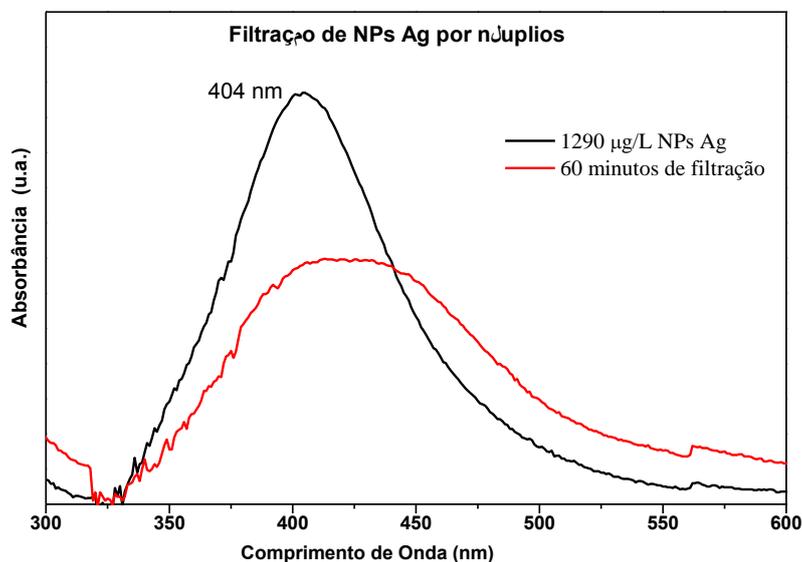
<b>Sistemas</b>	<b>Concentração de Ag (µg/L)</b>
1	1290
2	1550
3	1800
4	2060
5	2320

Fonte: AUTORA (2020).

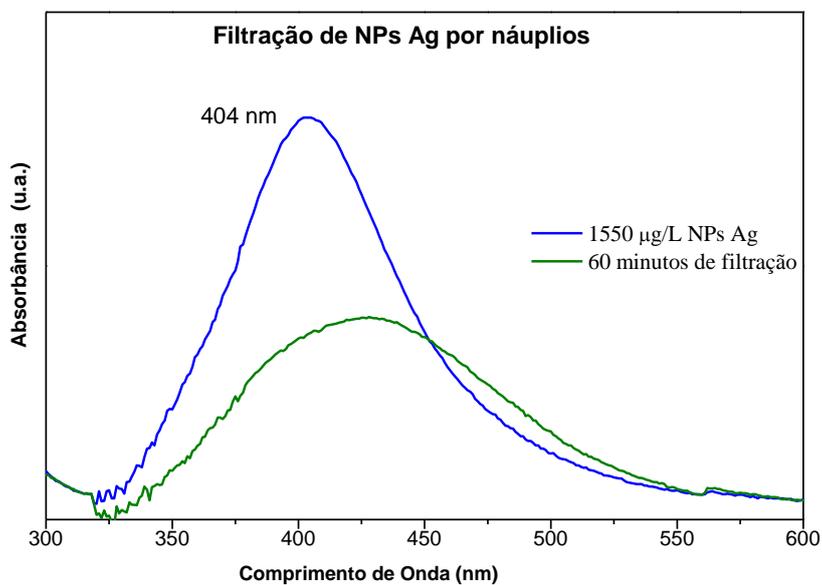
A Figura 42 (A); (B); (C); (D); (E) apresenta os espectros de absorção UV-Vis para as concentrações de NP Ag em água dos Sistemas 1 a 5 estudados (tabela 14), antes e após a exposição às larvas naupliares.

Figura 42- Espectros de Absorção UV-Vis antes e após 60 minutos de filtração por 50 náuplios no: (A) Sistema 1; (B) Sistema 2; (C) Sistema 3; (D) Sistema 4; (E) Sistema 5.

(A) SISTEMA 1

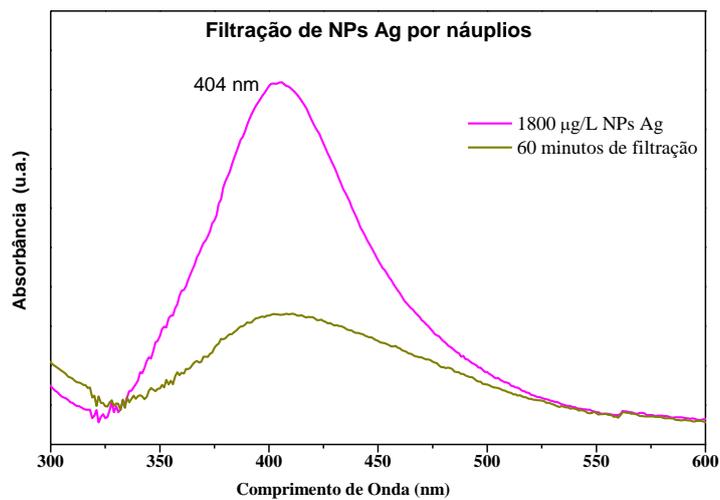


(B) SISTEMA 2

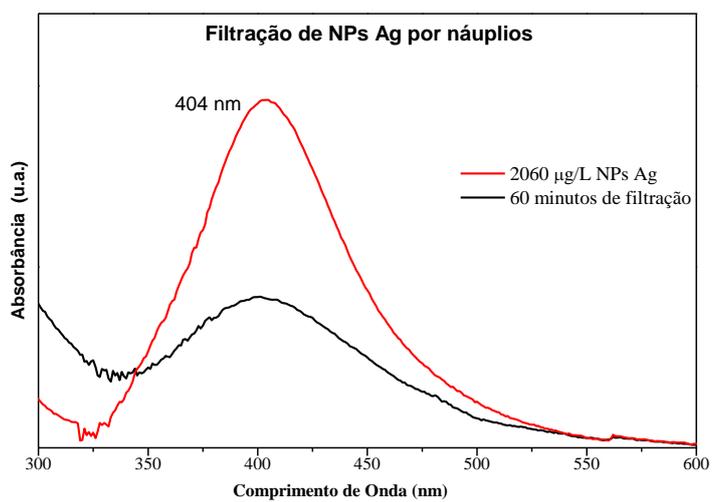


Fonte: AUTORA (2020).

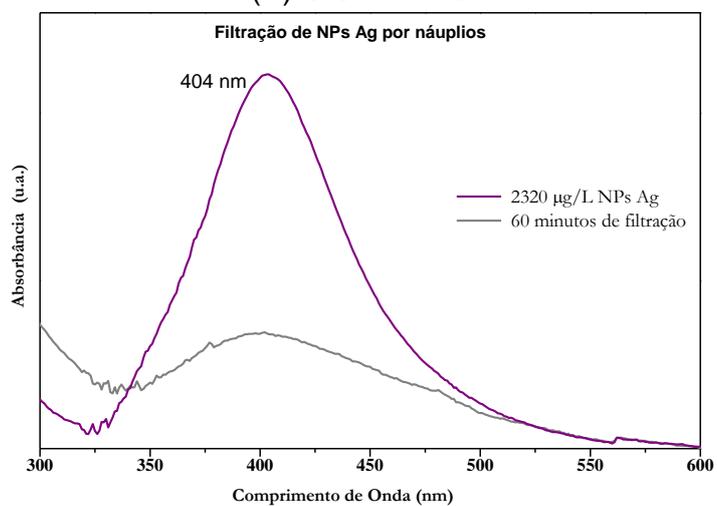
## (C) SISTEMA 3



## (D) SISTEMA 4



## (E) SISTEMA 5



Fonte: AUTORA (2020).

Ao se observar os espectros de absorção UV-Vis da Figura 42, percebe-se a ação dos microcrustáceos filtradores desempenhando o papel de filtros vivos de forma efetiva, como proposto, para as concentrações de NPs Ag nas soluções testes de todos os Sistemas. Este comportamento é um indicativo de que as larvas naupliares, por serem organismos filtradores não seletivos, devem filtrar e incorporar as NPs Ag, promovendo a diminuição de intensidade de absorção associada à banda de ressonância plasmônica das NPs Ag que restam na solução do filtrado.

Com base nesses resultados obtidos e com vistas a aplicações das artêmias como motores vivos em dispositivos pré-concentradores, como prova de conceito escolheu-se utilizar a técnica de Espectrometria de Absorção UV-Vis e NP Ag como nanocontaminante modelo. Foi traçada uma curva analítica como curva de correlação para determinação da concentração deste nanocontaminante em amostras desconhecidas. Essas amostras foram pré-concentradas através de processo de redispersão em volume menor de água do nanocontaminante filtrado pelas artêmias.

Outras curvas de calibração também podem ser traçadas usando outras técnicas analíticas e outros contaminantes, conforme esquema da Figura 30. Para tal é necessário ajustar a melhor curva para medidas com as mesmas quantidades de artêmias expostas por um mesmo tempo, em soluções de concentrações conhecidas, em volumes pré-determinados.

A Espectrometria de Absorção UV-Vis foi a técnica analítica utilizada na Prova de Conceito (PoC) para demonstrar que as larvas naupliares de artêmias podem ser usadas como pré-tratamento em análise de traços de micropoluentes a partir da capacidade filtradora não seletiva e contínua desses microcrustáceos. Uma vez que esses animais puderam filtrar NPs Ag e concentrar em seu interior, este nanocontaminante modelo foi utilizado para a determinação de uma função de correlação, definida a partir de uma curva analítica traçada com as amostras padrão dos Sistemas da Tabela 13.

A Curva analítica foi elaborada por medida indireta da quantidade de prata incorporada nesses animais através da absorção do que resta no filtrado após a exposição da amostra aos náuplios.

#### 5.1.1.1.1 *Determinação de curva analítica e função de correlação*

A pré-concentração de uma amostra desconhecida deve ser feita pela digestão de um número determinado de náuplios expostos e coletados após tempo preestabelecido de filtração, e redispersão em volume menor do que da amostra original, definindo-se assim um fator de concentração. Para a determinação da concentração real do analito na amostra em função da concentração nominal medida por absorção UV-Vis de uma amostra pré-concentrada, uma função de correlação deve ser estabelecida a partir de uma curva analítica elaborada com as amostras de concentrações conhecidas.

Os cinco (5) Sistemas da tabela 13, de concentrações conhecidas (C) de NPs Ag em água foram utilizadas:  $C_1=1290 \mu\text{g/L}$ ,  $C_2=1550 \mu\text{g/L}$ ,  $C_3=1800 \mu\text{g/L}$ ,  $C_4=2060 \mu\text{g/L}$ ,  $C_5=2320 \mu\text{g/L}$ .

Para se traçar a curva analítica de correlação, realizou-se as etapas a seguir:

- 1) As linhas de base dos espectros de absorção foram corrigidas, e a absorbância " $A_n$ " foi medida ( $A_1$ ,  $A_2$ ,  $A_3$ ,  $A_4$  e  $A_5$ ) no comprimento máximo da banda de absorção da (Ag) para cada amostra de concentração  $C_n$ .
- 2) Em seguida, um número/massa de náuplios vivos nas fases II ou III foram expostos em cada uma das amostras de concentrações conhecidas  $C_n$ , retirando-os após o tempo  $t$  de filtração. Utilizou-se aqui 50 espécimes e  $t= 60$  minutos.
- 3) Logo após a retirada dos náuplios, a absorbância do sobrenadante (filtrado) ( $A_{sn}$ ) foi medida no mesmo comprimento de onda de 1) para cada amostra.
- 4) Uma tabela foi obtida com valores de " $A_n$ " e " $A_{sn}$ " para cada concentração " $C_n$ " do analito (tabela válida para medidas com o mesmo número de artêmias e mesmo tempo de filtração).
- 5) Para se determinar uma concentração de analito desconhecida " $C$ ", foram considerados os pontos a seguir.
  - a. Os espectros de absorção medidos em cubeta de caminho ótico " $L$ " em um volume " $V$ ", numa solução de concentração molar de analito " $C$ " com coeficiente de absorção " $a$ ", pela lei de Beer–Lambert correspondem a:

$$A_n = a.L. C_n$$

b. A massa “m” do analito de massa atômica “M”:  $A_n = aLm_n/(MV)$

c. Para o mesmo analito, caminho ótico e volume de solução:  $aL/(MV)$  é constante, então:

$$A_n = m_n K.$$

d. A massa de analito que as artêmias filtram “ $m_f$ ” em um tempo “t” é a massa do analito na solução inicial “m” menos a massa que ficou no filtrado (sobrenadante) “ $m_s$ ”, temos:  $m_{fn} = m_n - m_{sn}$ , e assim:

$$m_{fn} = (A_n - A_{sn}) / K.$$

e. A concentração de valor máximo utilizada é tomada como a concentração de referência ( $C_R$ ), uma vez que os erros para as medidas nesse ponto são menores. Nesse estudo com cinco Sistemas,  $C_R = C_5$ ,  $A_R = A_5$  e  $A_{sR} = A_{s5}$ , e, portanto:

$$m_R = (A_R - A_{sR}) / K$$

em que  $m_R$  é definido como a massa de referência.

f. Define-se uma massa efetiva  $m_E = m/m_R$ ,

logo, a massa de analito filtrada efetiva

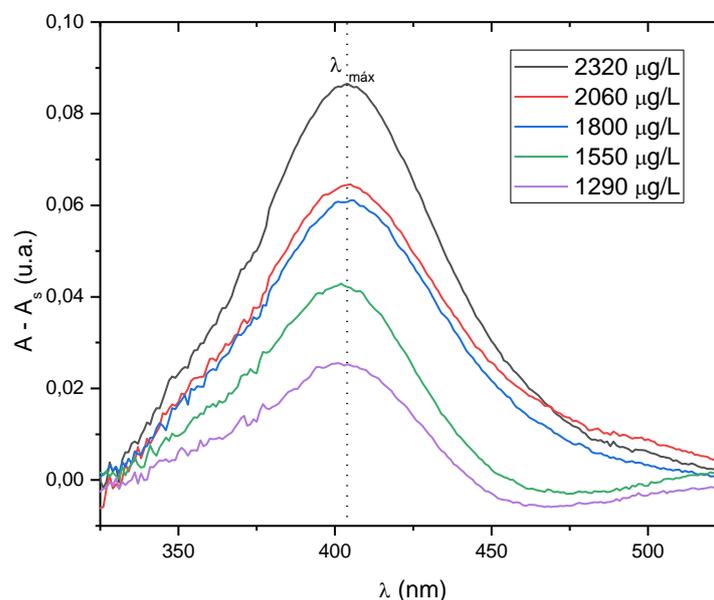
$$m_{fEn} = (A_n - A_{sn}) / (A_R - A_{sR}).$$

Traça-se então a curva de correlação  $C = f(m_{fEn})$ .

Nesta pesquisa, utilizando-se os cinco Sistemas da Tabela 14 e os respectivos espectros de absorção, obteve-se o gráfico da figura 43, com a diferença entre os espectros de absorção ( $A - A_s$ ), antes e depois da filtragem por um grupo de 50 larvas naupliares durante um período de 60 minutos para cada amostra de concentração  $C_n$ .

A Tabela 15 apresenta os valores das massas efetivas filtradas por 50 náuplios para cada concentração  $C_n$  dos Sistema da Tabela 14, calculadas a partir dos valores de ( $A - A_s$ ) obtidos no gráfico da Figura 43.

Figura 43- Diferenças dos espectros de absorção UV-Vis ( $A - A_s$ ) antes e depois da filtração por 50 náuplios por 60 minutos para cada amostra de concentração  $C_n$ .



Fonte: AUTORA (2020).

Tabela 15 – Valores das massas efetivas filtradas por 50 náuplios para cada concentração de NP Ag na amostra.

Amostras	$C_n$ ( $\mu\text{g/L}$ )	$(A_n - A_{Sn})$ Em 404 nm	$m_{fE}$ $\mu\text{g}$
1	1290	0,02532	0,29254
2	1550	0,04217	0,48712
3	1800	0,06073	0,70156
4	2060	0,06446	0,74467
5=R	2320	0,08657	1,00000

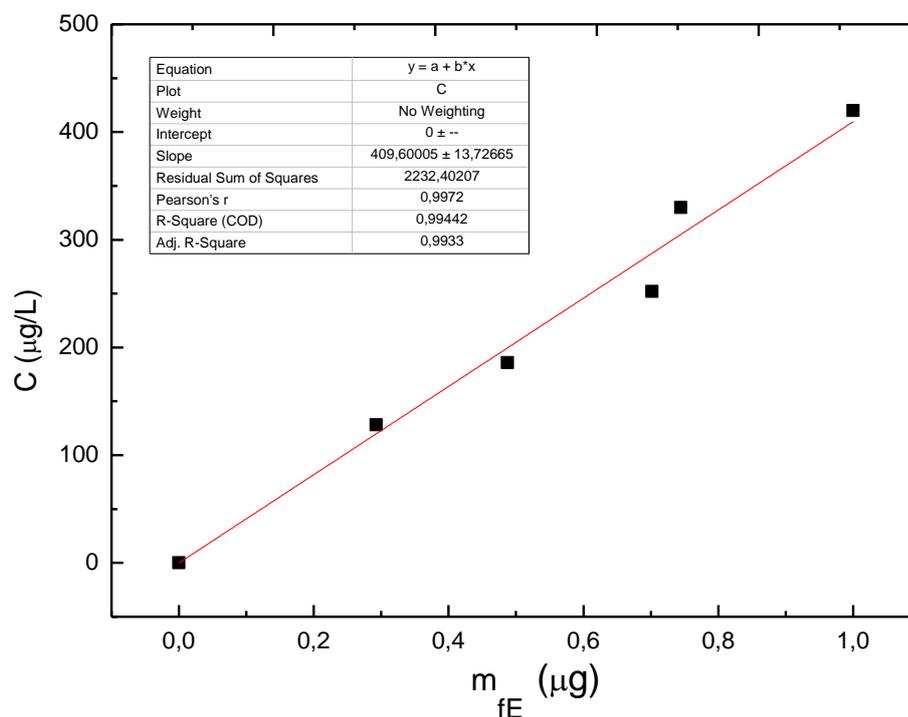
Fonte: AUTORA (2020).

A Figura 44 mostra a curva analítica de correlação entre a massa efetiva de NP Ag filtrada pelas artêmias ( $m_{fE}$ ) medida pela diferença dos espectros de absorção antes e depois da filtração, e a concentração real da amostra contendo nanopartículas de prata em água.

A melhor curva ajustada, com coeficiente de correlação  $R^2=0,99442$  para o presente experimento foi:

$$C(\mu\text{g/L}) = 409,6m_E$$

Figura 44 – Curva da concentração de NP Ag em água (C) em função da massa efetiva filtrada pelas artêmias ( $m_{fE}$ ).



Fonte: AUTORA (2020).

#### 5.1.1.1.2 Medida da concentração em amostra pré-concentrada

Para a determinação da concentração desconhecida “ $C_D$ ” de traços do nanocontaminante em uma amostra qualquer através de pré-concentração obtida pelo processo estabelecido neste trabalho, deve-se digerir/macerar os náuplios recolhidos após o processo de filtragem (em mesmo número e tempo de filtragem utilizados para elaboração da curva de calibração), redispersar em volume de água menor, definindo um fator de concentração, e medir o valor da absorbância desconhecida “ $A_D$ ” no espectro de absorção UV-Vis no mesmo comprimento de onda de absorção usado na curva de calibração.

O volume utilizado para produzir o concentrado “ $V_c$ ” deve ser o mínimo possível, para uma melhor sensibilidade, mantendo-se o caminho ótico “ $L$ ” para a medida de absorbância  $A_D$ . Define-se um fator de concentração  $f_c = V_c/V$ , no qual “ $V$ ” é o volume utilizado na curva de calibração.

O cálculo da massa efetiva filtrada pelas artêmias na amostra desconhecida ( $m_{fED}$ ) para o cálculo da concentração  $C_D$  a partir da curva analítica de correlação, considerando a pré-concentração da amostra, pode ser feito da seguinte forma:

como  $m_{fED} = m_{fD}/m_R$  e como  $A = m \cdot K$ ,  $m_{fD} = A_D/K$

mas com a amostra pré-concentrada em um volume  $V_c$ ,  $m_{fD} = A_D V_c / K'$  e lembrando que  $m_R = (A_R - A_{sR})/K$ , então  $m_R = (A_R - A_{sR})V/K'$ , logo:

$$m_{fED} = (A_D V_c / K') / [(A_R - A_{sR})V / K']$$

e considerando o fator de concentração  $f_c = V_c/V$ :

$$m_{fED} = f_c \cdot A_D / (A_R - A_{sR})$$

onde  $A_D$  é absorvância no mesmo comprimento de onda usado na curva de calibração (máximo da banda de absorção da Ag) no espectro de absorção da solução pré-concentrada pelas artêmias (em mesmo número utilizado na curva de calibração) dispersas em um volume concentrado  $V_c = V \cdot f_c$ .

E o valor da concentração da amostra desconhecida  $C_D$  é calculado a partir da equação ajustada da curva analítica de correlação  $C_D = b \cdot m_{fED}$ , em que  $b$  é o coeficiente angular da curva ajustada. Dessa maneira:

$$C = b \cdot f_c \cdot A_D / (A_R - A_{sR})$$

E considerando que nesse estudo,  $b = 409,6$ ,  $(A_R - A_{sR}) = 0,08657$  e  $V = 5$  mL, o cálculo da concentração de NPs Ag em uma amostra de água desconhecida em que foi medida a absorvância  $A_D$  da solução de artêmias maceradas após 60 minutos de imersão no volume de 5 mL da amostra desconhecida é definida para um volume concentrado  $V_c$  como:

$$C(\mu\text{g/L}) = 946 \cdot V_c \cdot A_D$$

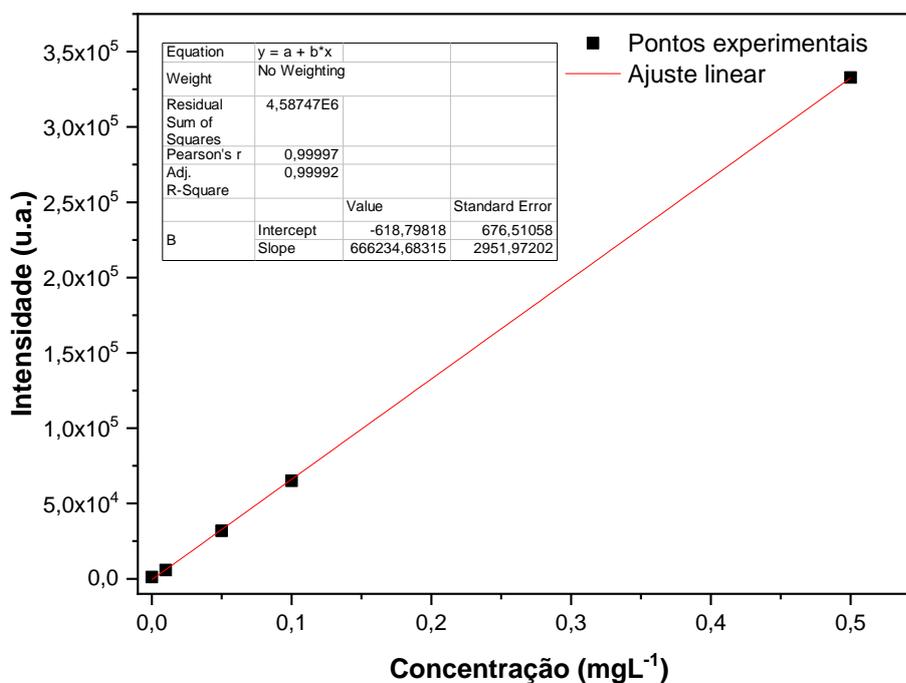
### 5.3.1.2 Espectrometria de Emissão Ótica em Plasma Indutivamente Acoplado (ICP OES)

A técnica de ICP OES é amplamente utilizada para análises ambientais, por permitir a detecção de metais-traço de mais de um elemento simultaneamente (multielementar), com baixa vulnerabilidade para interferentes, seletividade, linearidade, sensibilidade e repetitividade. Com isso, tem-se uma técnica interessante para a detecção de nanocontaminantes metálicos em Ecossistemas aquáticos, como as NP Ag utilizadas neste trabalho.

A técnica utiliza uma fonte de plasma para excitar os átomos da amostra, e o espectro de emissão é característico de cada elemento, com intensidade diretamente relacionada à concentração do elemento correspondente, permitindo medidas absolutas a partir do uso de padrões de referência de cada elemento.

A curva analítica construída utilizando-se soluções na faixa de 0,01 a 0,5 mg L<sup>-1</sup> de Ag é mostrada na figura 45. A equação da reta,  $A = -618,8 + 666234 C$  (onde A é absorbância e C é a concentração) apresentou  $R^2 = 0,99992$ .

Figura 45 – Curva analítica obtida por ICP- OES para prata.



Fonte: AUTORA (2020).

As larvas naupliares com os analitos filtrados foram submetidas ao protocolo de digestão nas condições descritas na Tabela 6. O protocolo de digestão de amostras aplicado mostrou-se eficiente, resultando em melhor detecção da prata.

Os cinco Sistemas de 5 mL de água da Tabela 4, constituídos de náuplios e volumes de 500 a 900  $\mu\text{L}$  de solução estoque de NPs Ag, foram submetidos a ácido nítrico ( $\text{HNO}_3$ ) nas concentrações de 5 e 8  $\text{mol L}^{-1}$  e peróxido de hidrogênio  $\text{H}_2\text{O}_2$ , com volumes de 2 e 3 mL. Foi constatado que a melhor condição de digestão foi aquela em que os náuplios foram expostos ao volume de 900  $\mu\text{L}$  de solução estoque de NPs Ag e submetidos ao processo de digestão com 8  $\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$  e volume de 3 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , sendo registrado 6,05  $\mu\text{g}$  de Ag nos náuplios. Para a mesma condição de digestão, também se obteve melhor detecção de Ag nos volumes de 800 e 500  $\mu\text{L}$  de solução estoque de NPs Ag, no qual foram assinalados respectivamente, os valores de 1,11 e 2,71  $\mu\text{g}$  de Ag. Já para os volumes de 600 e 700  $\mu\text{L}$  de solução estoque de NPs Ag, o máximo de detecção sinalizado na condição digestão com 5  $\text{mol L}^{-1}$  de  $\text{HNO}_3$  e o volume de 2 mL de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , foi respectivamente, de 5,11 e 1,54  $\mu\text{g}$  de Ag.

Embora os resultados demonstrem que os ínstares naupliares II e III concentraram o micropolvente prata, pela análise no ICP OES, os valores de massas de prata obtidos nos náuplios, submetidos a diferentes condições de digestão, demonstraram que esses organismos apresentam respostas de filtração distintas nesses dois estágios de desenvolvimento, pois eles filtraram e concentram as NPs Ag de maneira diferente. Provavelmente a oscilação no comportamento da filtração e concentração deve-se à interação de cada indivíduo com o meio onde se encontrava, mediante o seu metabolismo, dificultando a elaboração imediata de uma tabela correlacional para esta técnica com os valores medidos de Ag nas cinco concentrações, obtidos após digestão dos náuplios, indicando que devem ser utilizados náuplios em mesmo estágio de desenvolvimento, como foi feito nos ensaios por absorção UV-Vis.

Por outro lado, com base apenas no valor máximo de massa de Ag obtida a partir do processo de digestão dos náuplios, foi elaborada uma tabela com os valores esperados para a massa de Ag nos náuplios digeridos para cada massa inicial de prata na amostra. Os valores esperados foram calculados na mesma

proporção medida na amostra mais concentrada, que forneceu o valor máximo de Ag de 6,05 µg, resultante do processo de digestão de uma população de 50 náuplios exposta ao volume de 900 µL de solução estoque de NPs Ag durante o período de uma hora (1 h) parâmetros considerados ideais para o processo.

Para os demais volumes de 800, 700, 600 e 500 µL de solução estoque de NPs Ag, foi calculada a massa prevista de Ag nos náuplios nas mesmas proporções medidas por ICP OES para a amostra com 900 µL de solução estoque, considerando um comportamento linear. A Tabela 16 pode ser inicialmente empregada na detecção da presença de traços de Ag nos ambientes aquáticos a partir das amostras pré-concentradas pelos concentradores vivos propostos. Para isso, uma população de 50 indivíduos naupliares na fase II e III poderá ser exposta, durante o período de 1 h, a uma alíquota de água proveniente de Ecossistemas Aquáticos, suspeitos da presença de NPs Ag como nanocontaminante.

Tabela 16 – Massa total de prata, obtida nos náuplios digeridos estimada para cada concentração de prata na amostra, calculada a partir da medida de ICP OES com a solução mais concentrada (900 µL de solução estoque de NP Ag).

Volume de solução estoque de NPs Ag (µL)	Massa Inicial de Ag na amostra (µg) / 5 mL H <sub>2</sub> O	Massa total de Ag (µg) nos náuplios em volume de 5 mL
900	11,69	6,05*
800	10,32	5,34*
700	9,03	4,67*
600	7,74	4,00*
500	6,45	3,33*

\*Massa de prata medida; \*Massa de prata prevista a partir da massa medida.

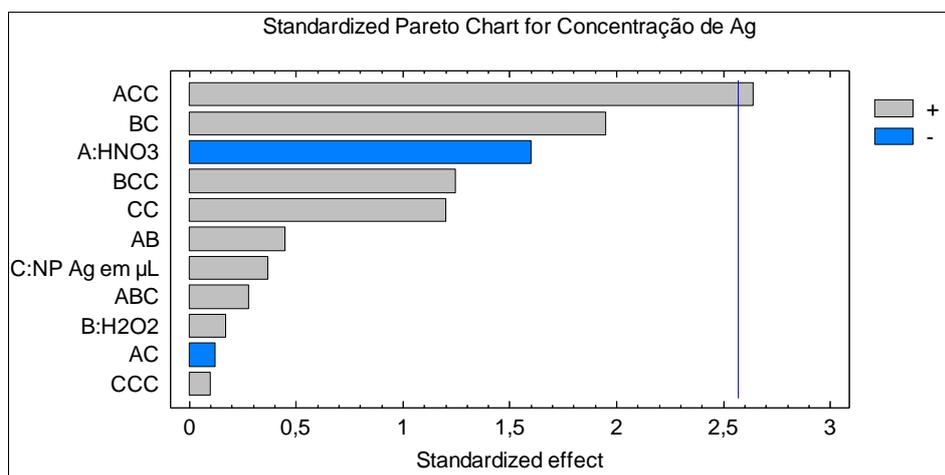
Fonte: AUTORA (2020).

Para a otimização do processo de digestão das amostras contendo os náuplios e as NP Ag filtradas por eles, as relações entre as variáveis independentes: (1) molaridade do HNO<sub>3</sub>, (2) volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e (3) volume de nanopartículas de

prata (NPs Ag) e a resposta: concentração de Ag, foi investigada por análise estatística.

Os efeitos de cada uma das três variáveis analisadas e suas interações foram analisados para maximização da detecção de massa de Ag. A significância dessas variáveis pode ser observada na figura 46, que representa o Diagrama de Pareto. A partir da imagem, foi visualizado que as variáveis molaridade de  $\text{HNO}_3$ , volume de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e volume de nanopartículas de prata (NPs Ag), agindo isoladamente não apresentaram significância estatística, uma vez que o valor de “T” calculado para essas variáveis não conseguiu ultrapassar o crítico com 95 % de confiança. Isso sugere que a ação delas isoladamente, não permitiu a extração de um maior percentual de prata dos náuplios. Em contrapartida, na análise multinível / multifator no qual foram avaliados em conjunto o  $\text{HNO}_3$ , o  $\text{H}_2\text{O}_2$  e a quantidade de NP de Ag, foi observado que a interação entre os fatores com dois níveis (A):  $\text{HNO}_3$  e cinco níveis (C): NP Ag, possibilitou uma maior resposta, superior ao valor de “T” crítico. Isto demonstra que a interação entre esses fatores apresenta significância estatística.

Figura 46 – Diagrama de pareto indicando os efeitos padronizados para concentração de prata.

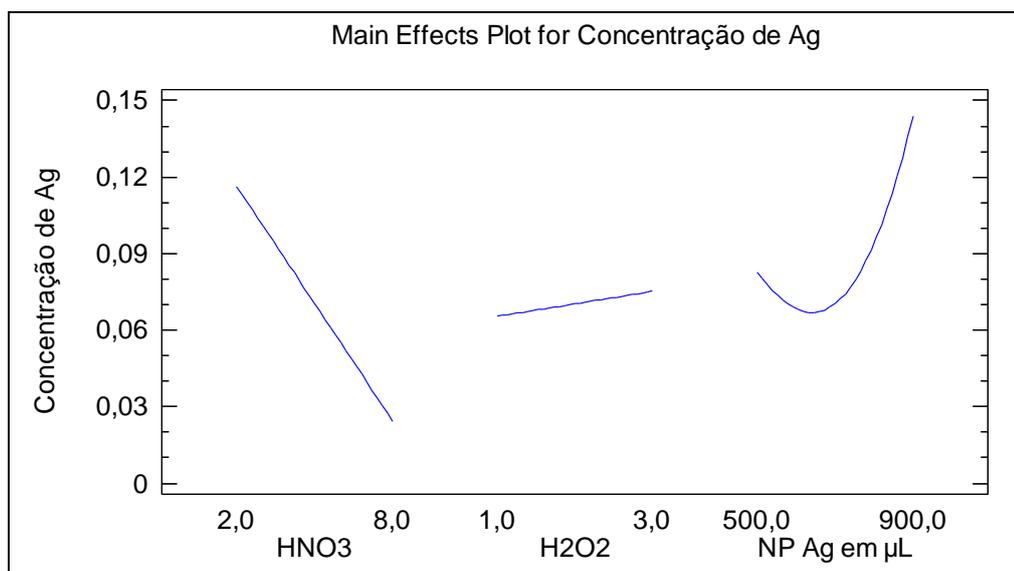


\*A fonte de todas as figuras a partir desta seção são da autora.

A Figura 47 expressa o efeito médio de cada variável sobre a concentração de Ag disponibilizada pelo processo de digestão. Com relação à variável  $\text{HNO}_3$ , foi observado que se aumentar a molaridade, a concentração de Ag disponibilizada

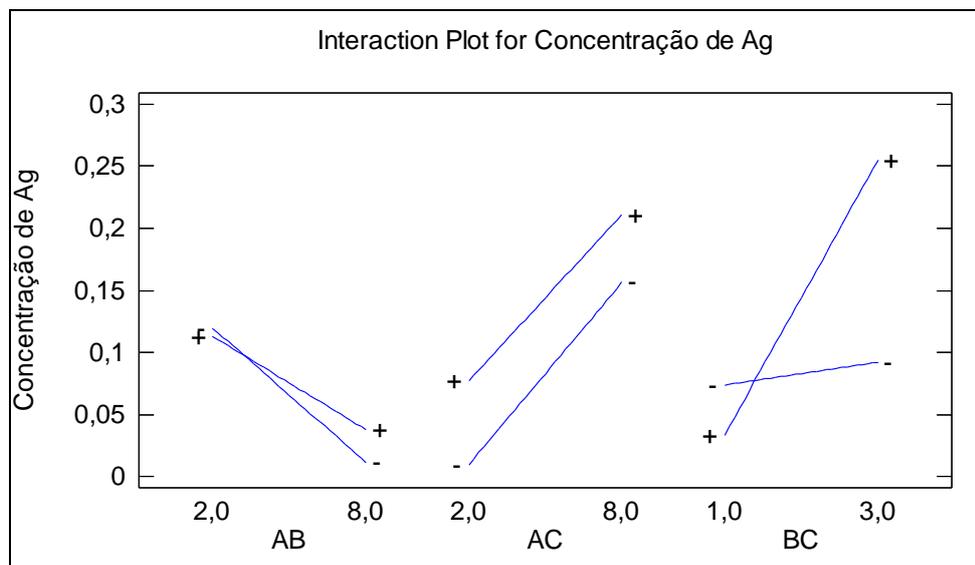
diminui. Já em relação à variável  $H_2O_2$ , foi evidenciado que houve um leve aumento da concentração de Ag medida, mediante o aumento do volume e quanto à variável volume de NPs Ag, verificou-se que houve uma diminuição entre os volumes de 500 e 600  $\mu L$  e acima de 600  $\mu L$  aproximadamente, houve um aumento na concentração de Ag nas amostras.

Figura 47- Efeitos individuais médios das variáveis independentes sobre a concentração de prata disponível após digestão dos náuplios.



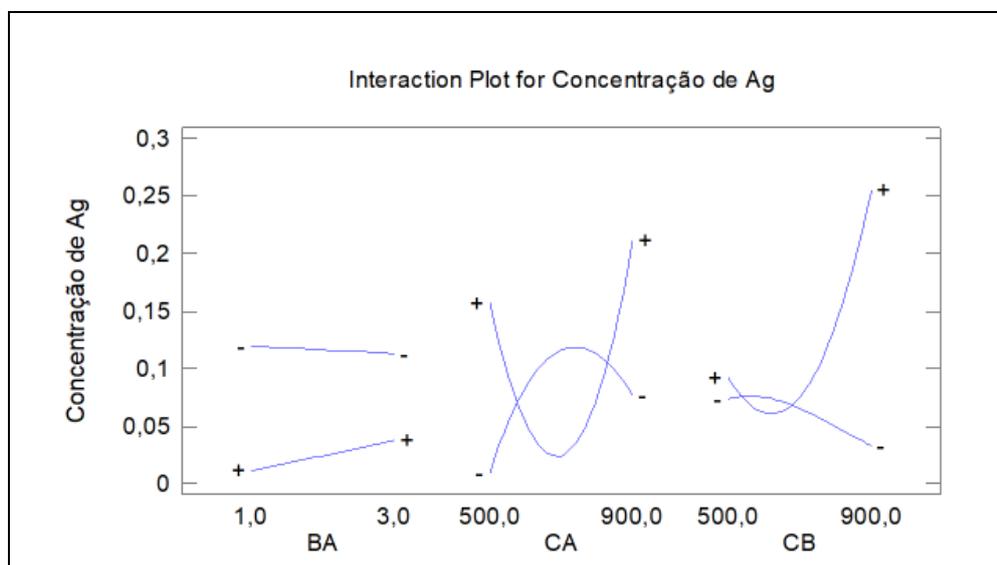
A Figura 48 exibe o efeito médio das interações entre as variáveis molaridade de  $HNO_3$ , volume de  $H_2O_2$  e volume de NPs Ag combinados 2 a 2. Nota-se que quanto menor for a molaridade de  $HNO_3$  e maior o volume de  $H_2O_2$  há obtenção de maior concentração de Ag disponibilizada por digestão. Por outro lado, quanto maior a molaridade do ácido  $HNO_3$  e quanto maior o volume da solução de NPs Ag, maior foi a concentração de Ag obtida, havendo entre estas variáveis um comportamento de interação. Comparando-se o efeito de interação das variáveis  $H_2O_2$  e NPs Ag, verificou-se que quanto maior foi o volume de peróxido e de NPs Ag empregados, maior foi a concentração de Ag disponibilizada após digestão. Contudo, foi observado que o volume das soluções de NPs Ag, contribui para o aumento da concentração de Ag disponibilizada por digestão de forma mais expressiva quando o volume de peróxido for maior.

Figura 48- Efeito da média das interações entre as variáveis e a concentração de prata.



Por fim, a Figura 49 revela o resultado do comportamento da interação entre as variáveis para alcançar a maior concentração de Ag disponibilizada por digestão dos náuplios. No primeiro gráfico foi demonstrado que o aumento do volume de  $H_2O_2$  promoveu um leve aumento da concentração de Ag disponibilizada, enquanto que os diferentes valores de molaridade do ácido interferiram proporcionado o aumento da concentração de Ag disponibilizada de forma sutil. A imagem do segundo gráfico mostra que no volume de 500  $\mu L$  de solução de NPs Ag e na menor molaridade do  $HNO_3$ , há um aumento da concentração de Ag disponibilizada; já o aumento da molaridade do ácido nítrico entre o volume superior a 500 e o volume de 700  $\mu L$  de NPs Ag, proporcionou a diminuição da concentração de Ag disponibilizada, por conseguinte, a diminuição da molaridade do ácido nítrico observada entre o volume superior a 700 até o volume de 900  $\mu L$  de NPs Ag promoveu um aumento da concentração de prata disponibilizada por digestão dos náuplios. Na imagem do terceiro gráfico, observa-se o comportamento do  $H_2O_2$  e do volume de solução de NPs Ag. No volume de 500  $\mu L$  de solução de NPs Ag e no maior volume de peróxido, observa-se um ligeiro aumento da concentração de prata. Entre o volume 600 e 900  $\mu L$  de NPs Ag nota-se um acentuado aumento da concentração de prata disponibilizada por digestão da amostra, mediante aumento do volume de peróxido.

Figura 49 - Efeito da média das interações entre as variáveis e a concentração de prata dos efeitos de interação inversa ao da Figura 48.



As Figuras 50 e 51 representam gráficos de superfície. A partir da análise deles é possível verificar qual a condição mais eficiente e a menos eficiente para obtenção de prata disponibilizada por digestão dos náuplios. A melhor condição de digestão foi aquela em que a amostra foi submetida à maior molaridade de  $\text{HNO}_3$  e ao volume máximo de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , no qual foi registrado um valor máximo de 0,302609 (Figura 50), enquanto, a condição menos eficiente (Figura 51), assinalou um valor de -0,059805.

Figura 50- Condição de digestão mais eficiente para detecção de prata.

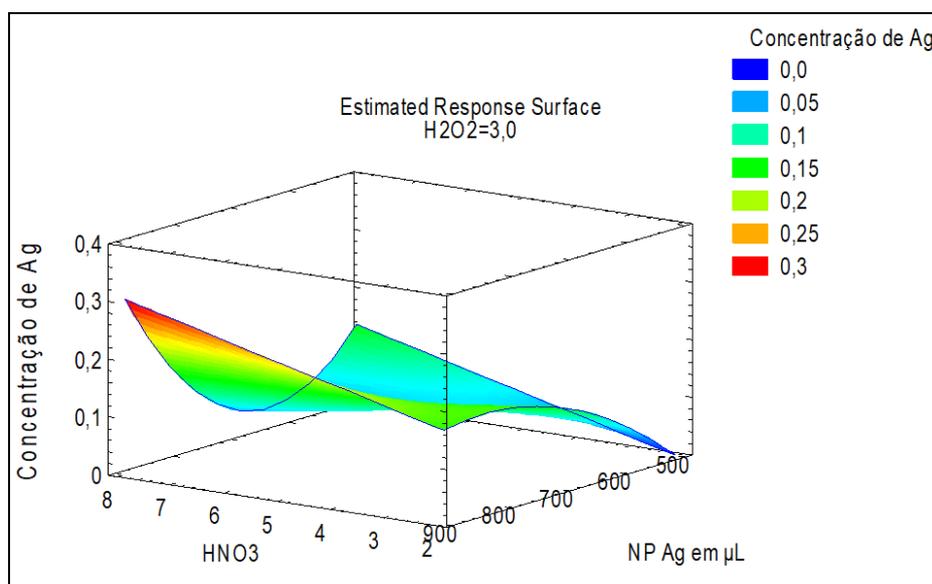
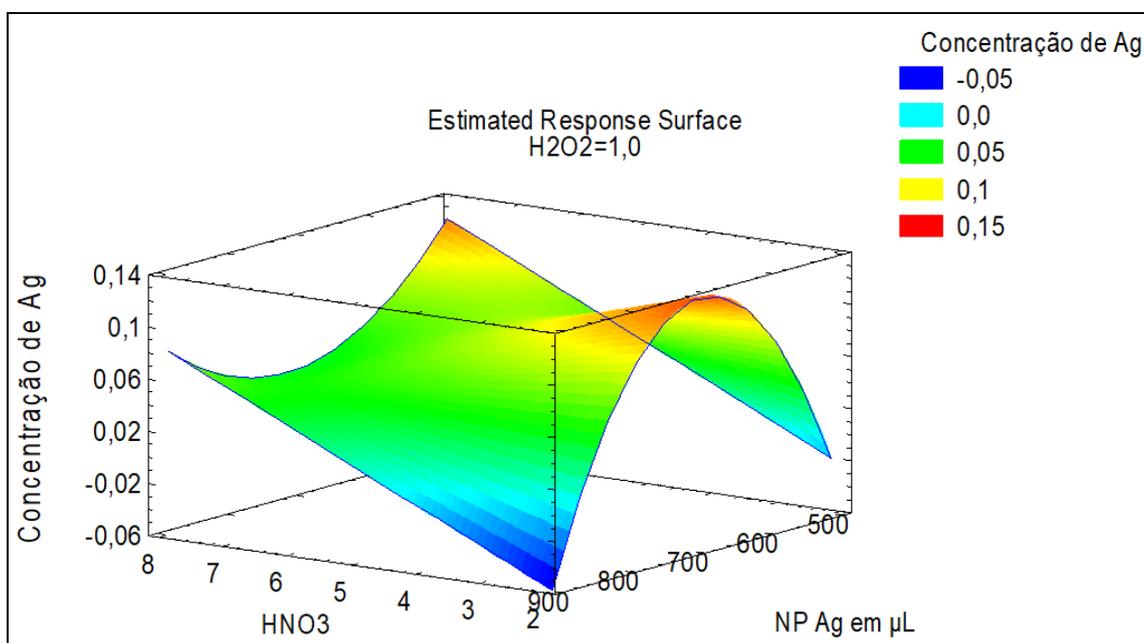


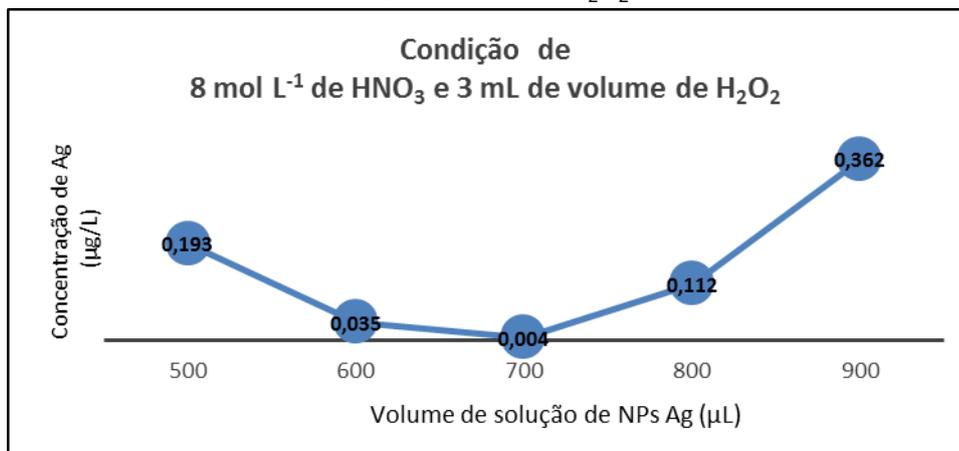
Figura 51- Condição de digestão menos eficiente para detecção de prata.



A predição de valores negativos nesse caso é resultante de um maior erro associado às análises. Apesar da variância explicada pelo modelo de regressão ser baixa, o que inviabiliza a interpretação direta da superfície de resposta, ainda é possível analisar os efeitos individuais e de interação como foram anteriormente apresentados. As interpretações desses gráficos de interação média entre os fatores nos levam à conclusão de que a concentração de Ag disponibilizada na amostra é maior quando temos uma maior quantidade de ácido nítrico e peróxido, que leva à melhor eficiência de digestão e à maior disponibilidade do metal na amostra digerida. O aumento da concentração de Ag disponibilizada após digestão com em função do aumento do volume de solução de NPs Ag é mostrado na figura 52, construída para 8 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> e 3 mL de volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Como pode ser evidenciado na figura 52 houve um aumento da quantidade de Ag disponibilizado após digestão da amostra quando o volume de NPs Ag foi maior, porém esse comportamento não foi linear.

Figura 52- Aumento da quantidade de prata disponibilizada após digestão com 8 mol L<sup>-1</sup> de HNO<sub>3</sub> e 3 mL de volume de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



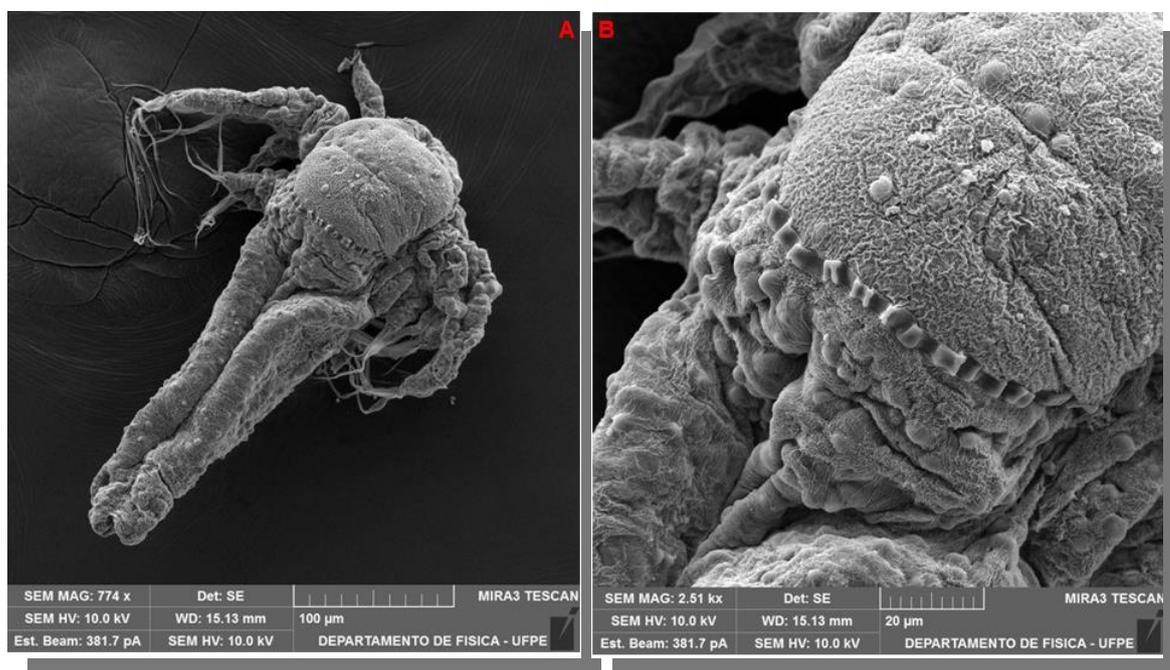
As análises apresentadas permitiram uma melhor compreensão do processo de digestão das artêmias após filtragem, concluindo-se ser indispensável se seguir o mesmo protocolo para digestão dos concentradores vivos na determinação das curvas de calibração e nas medidas das amostras, para que haja confiabilidade nas medidas.

### 5.3.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Espectroscopia de Raios X por Dispersão de Energia (EDS)

A Figura 53 (A e B) apresenta a micrografia de um náuplio de artêmia registrada por microscopia eletrônica de varredura, enquanto a Figuras 54 mostra o ponto em que foi registrado o espectro EDS da Figura 55, referente à amostra em que os náuplios foram expostos a NPs Ag.

Como o EDX no MEV é uma técnica de análise de superfície, e as NP Ag filtradas são armazenadas no interior do trato digestório do náuplio, não é possível se fazer uma análise da quantidade de prata filtrada. Observa-se, no entanto, uma mínima quantidade de prata nas cerdas do espécimen analisado, identificado pela linha L do elemento, com fluorescência em torno de 3 keV, apontado em vermelho na Figura 55 e na Tabela 17. A linha K<sub>α</sub> da prata não aparece no espectro, pois situa-se em torno de 22 keV, fora do intervalo de energia registrado.

Figura 53- A: Micrografia de espécimen naupliar, com aumento de 774 x; B: Detalhe do espécimen naupliar, com aumento de 2510 X.



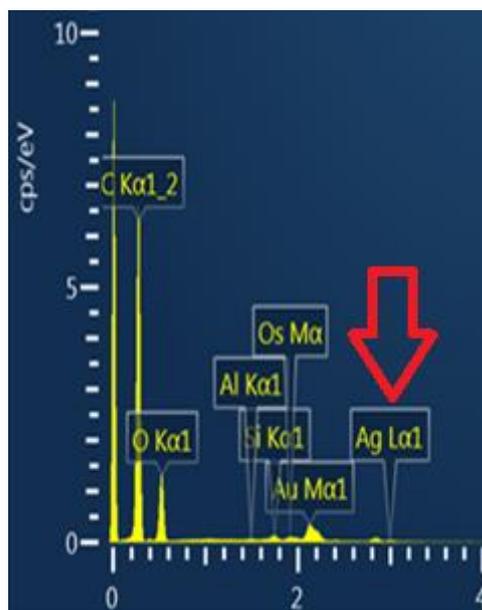
Fonte: AUTORA (2020).

Figura 54- Ponto das cerdas do espécimen naupliar onde foi realizada a medida de EDS.



Fonte: AUTORA (2020).

Figura 55- Espectro EDS da área apontada na figura 54, com identificação de traços de Ag.



Fonte: AUTORA (2020).

Tabela 17- Elementos químicos identificados por EDS, com destaque para a Prata.

Visualização dos Resultados da Quantificação

Dados Visualizados: Espectro 5

Opção de... Todos os Elementos Processados (Normalizado)

Elemento	Tipo de Linha	Quant	Área	Sigma	Ajustar Índice
O	Série K	Sim	36046.1	332.6	99.2
C	Série K	Sim	150256.9	683.1	567.2
Si	Série K	Sim	3729.5	184.1	1.3
Si	Série L	Não	150.0	134.3	179.0
Ag	Série L	Sim	530.2	195.9	26.7
Ag	Série M	Não	9973.6	547.0	254.2
Al	Série K	Sim	590.1	142.6	0.2
Al	Série L	Não	-152.1	201.4	3.6
Os	Série M	Sim	4421.5	366.5	1.4
Au	Série M	Não	21541.4	537.9	28.7
	Ruído 1	Não	71469.6	2806.4	0.5
	Ruído 2	Não	-5278.3	5448.5	0.3
	Ruído 3	Não	84784.9	3293.7	0.3

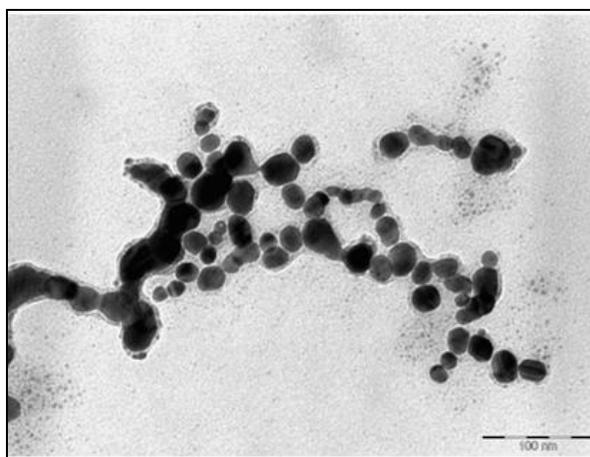
Fonte: AUTORA (2020).

Pela análise de EDS, conclui-se que a quantidade de prata que fica acumulada fora do trato digestório do animal é muito reduzida, não sendo possível a identificação no interior do animal pela não penetração do feixe de elétrons, sendo EDS uma técnica de análise de superfície.

#### 5.3.1.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)

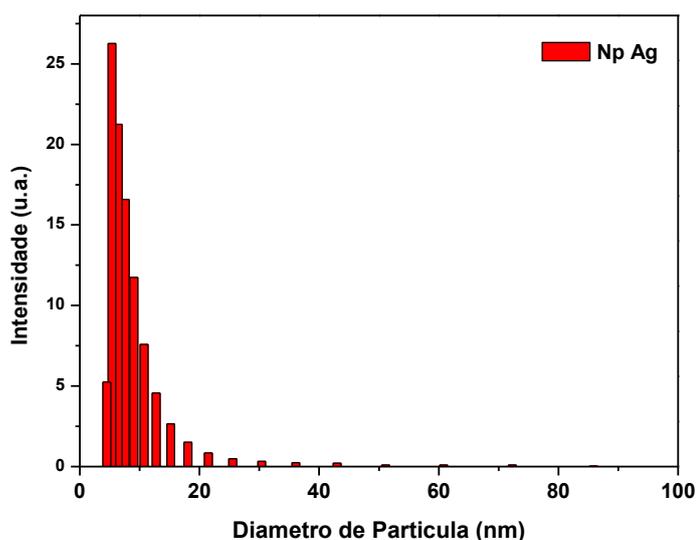
As informações referentes à morfologia e distribuição de tamanhos das NPs Ag utilizadas neste trabalho estão dispostas na tese de Mojica- Sánchez (2018), desenvolvida no mesmo Grupo. A imagem de microscopia eletrônica de transmissão (TEM) deste nanomaterial foi obtida utilizando-se um microscópio Morgagni (100 kV) e exibem NPs Ag com morfologias esféricas e tamanhos menores que 20 nm, reiterando o resultado da análise do espalhamento dinâmico de luz (DLS) para este nanomaterial (Figuras 56 e 57).

Figura 56- Imagem de Microscopia eletrônica de transmissão das NPs Ag.



Fonte: MOJICA- SÁNCHEZ (2018).

Figura 57- Distribuição de tamanhos das NPs Ag obtido por DLS.



Fonte: MOJICA- SÁNCHEZ (2018).

### 5.3.2 Bioensaios empregando NTC

No presente trabalho foram utilizados nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) com 90% de pureza, cedidos pela indústria coreana CNT Co. Ltd. Apresentam diâmetros entre 10-70 nm e comprimentos de 8-20  $\mu\text{m}$ .

#### 5.3.2.1 Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman é uma ferramenta muito utilizada na caracterização de nanotubos de carbono, pois é sensível a mudanças de parâmetros estruturais como diâmetro, defeitos e quiralidade, em particular no caos dos nanotubos de parede simples (SWCNT).

Mesmo utilizando-se MWCNT neste trabalho, é uma técnica que pode trazer informações sensíveis às mudanças do material interagindo com outras espécies, conforme descrito na tese de Elaine Vaz, desenvolvida no Grupo (VAZ, 2015), a partir da análise das três principais bandas de espalhamento: a banda G, decorrente das vibrações do estiramento simétrico C-C no plano, a banda D, característica da quebra de simetria da rede hexagonal por qualquer defeito (como hibridização  $\text{sp}^3$ , heteroátomo) e a banda G', característica de materiais gráfiticos, relacionada à organização estrutural do plano bidimensional (grafeno).

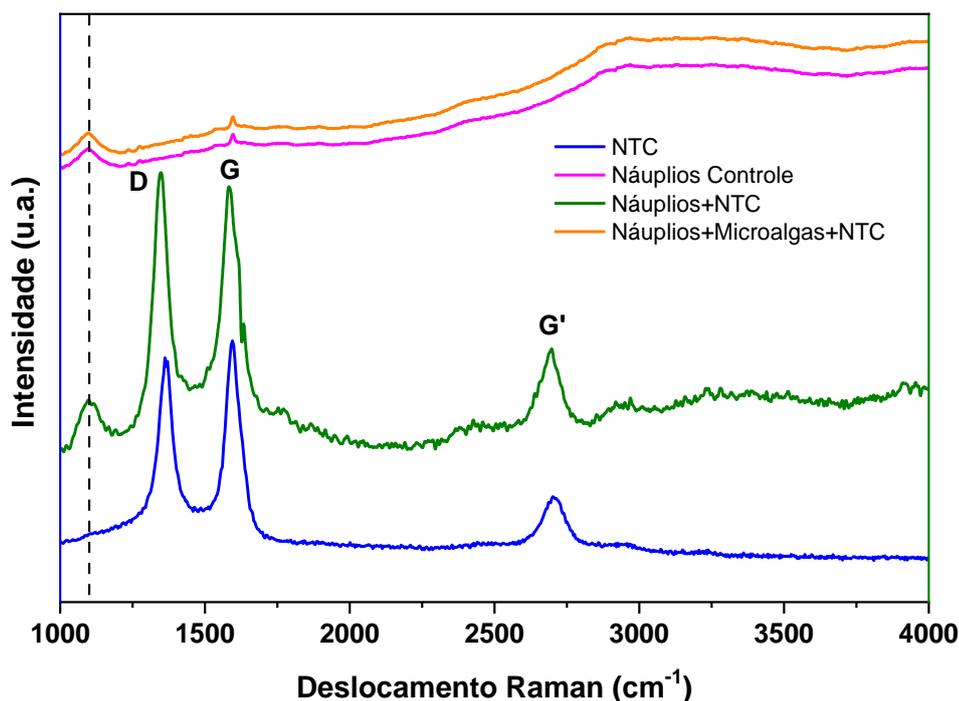
Uma análise comparada dos espectros Raman pode ser feita na figura 58, em que o espectro do NTC puro (em azul) pode ser confrontado com o de três tipos de amostras em que o concentrador vivo foi (náuplios) exposto: apenas à água destilada (náuplios controle), apenas aos NTC (em verde) e simultaneamente a microalgas e NTC.

Não se conseguiu observar as bandas características dos NTC na amostra do concentrador vivo contendo as microalgas (*Nannochloropsis oculata*) utilizadas na alimentação dos náuplios, mas com as amostra de náuplios+NTC, foi possível observar de forma evidente as três bandas características do NTC: a banda D, sensível à desordem, em  $1361\text{ cm}^{-1}$ , a banda G, associada ao carbono gráfitico, em  $1594\text{ cm}^{-1}$  e a banda G', localizada próximo a  $2700\text{ cm}^{-1}$ .

A mudança na relação de intensidades observada entre as bandas D e G do NTC indica uma mudança do grau de desordem do material na presença dos náuplios concentradores, sendo um indicativo de que os NTC foram incorporados pelos náuplios.

Segundo Biris et al (2009), em ambientes biológicos *in vivo* a simples presença da banda G pode ser usada para avaliar a presença de NTC, mas na Figura 58, é possível que a alta fluorescência das microalgas possa estar mascarando o sinal do espalhamento Raman dos NTC na amostra em que os náuplios foram expostos simultaneamente às microalgas e aos nanotubos (curva em laranja). Observa-se também uma banda de espalhamento associada apenas à presença dos náuplios (tracejada na figura 58), pois está presente no espectro dos náuplios controle.

Figura 58- Espectros Raman de amostras com náuplios expostos a microalgas e/ou NTC.



Fonte: AUTORA (2020).

A relação das intensidades  $I_D/I_G$  mudou na presença dos náuplios, um indício de que os nanotubos foram incorporados pelos náuplios, e apesar da mudança ser discreta, foi suficiente para a relação passar a ser maior que 1 na amostra com os náuplios.

Conclui-se, a partir da espectroscopia Raman, que os náuplios também podem ser utilizados como concentradores vivos de NTC como nanocontaminante em água.

### 5.3.2.2 Microscopia Ótica (MO)

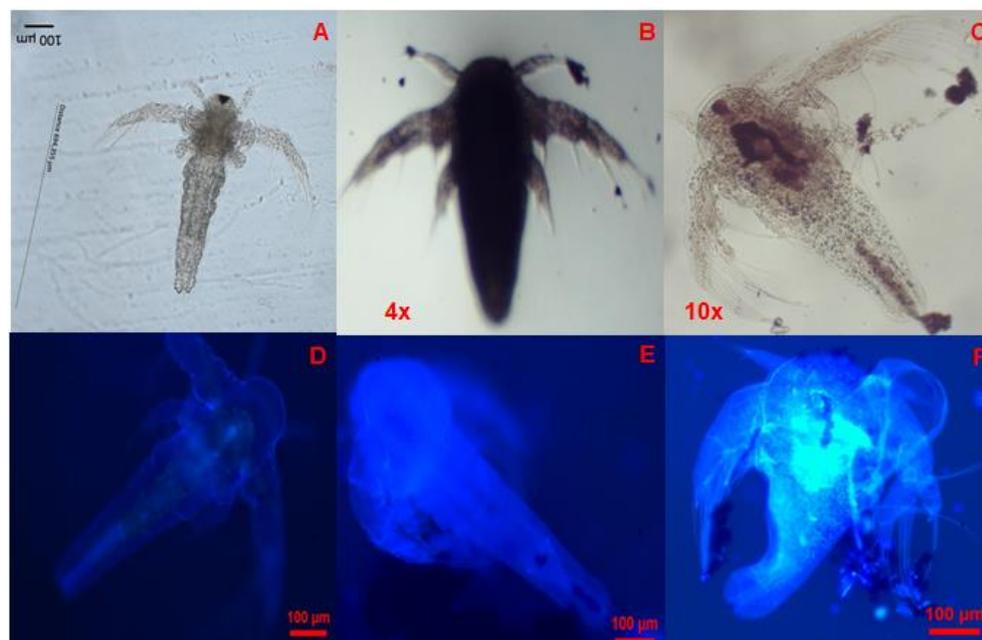
Imagens de náuplios expostos a nanopartículas de prata (NPs Ag) e a nanotubos de carbono (NTC) e seus respectivos controles são mostradas nas Figuras 59 e 60 respectivamente, obtidas em microscópio óptico com câmera acoplada e em microscópio Axion Vision ótico de fluorescência.

Figura 59 – Náuplios (A e D: grupo controle; B, C, E, F: expostos a NPs Ag).



Fonte: AUTORA (2020).

Figura 60 – Náuplios (A e D: grupo controle; B, C, E, F: grupo exposto a NTC).



Fonte: AUTORA (2020).

Pode-se observar pequenos aglomerados de partículas em partes do trato digestivo tanto nos animais dos grupos B, C, E e F da figuras 59, expostos a NP Ag, quanto nos animais expostos a NTC, dos grupos B, C, E e F (Figura 60), estruturas essas, não observadas nos grupos controle (A e D) em ambos os casos. Os aglomerados de cor amarelada são típicos de NPs Ag, enquanto os NTC aparecem na cor preta característica. A Figura 60 (B) corresponde a um exemplar naupliar na fase ínstar II exposto a NTC. É possível visualizar que o referido espécime apresenta em todo o corpo uma coloração preta, sugerindo que nesta fase, as células iniciais dos tecidos que se encontram em diferenciação tenham uma maior facilidade de incorporar o nanomaterial modelo.

### 5.3.3 Bioensaios empregando QDs

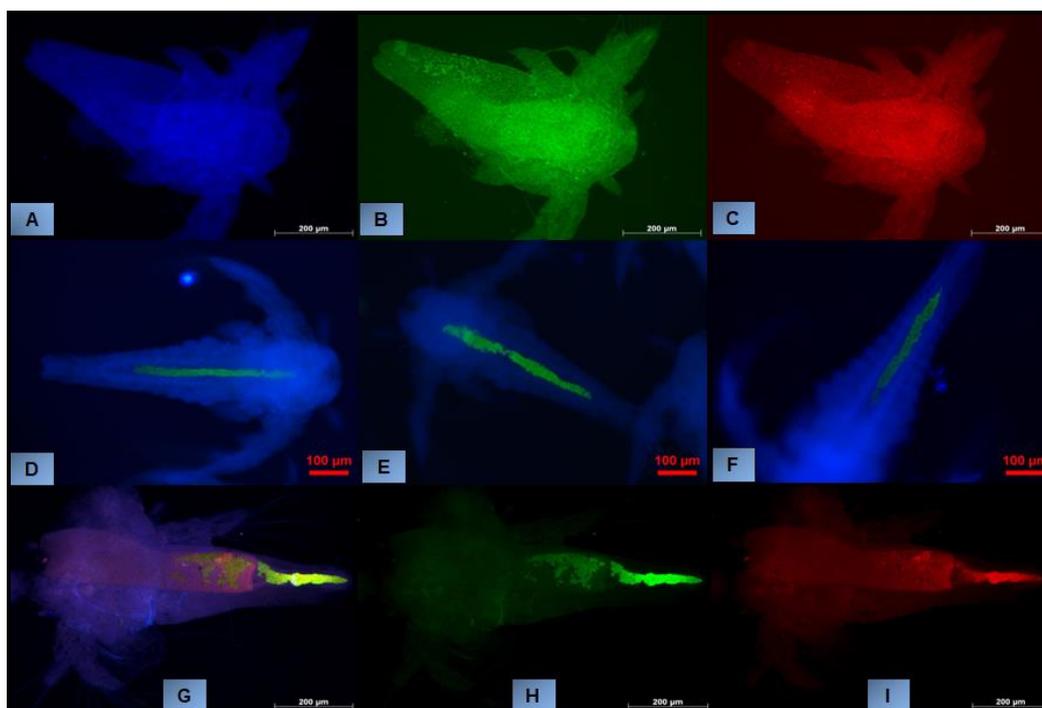
Representando os *quantum dots* (QDs) ou pontos quânticos, como potenciais nanocontaminantes que já integram vários produtos comerciais, foram utilizados QDs de telureto de cádmio e zinco (ZnCdTe).

### 5.3.3.1 Microscopia de Fluorescência (MF)

A microscopia de fluorescência foi a técnica empregada para monitorar esses QDs de semicondutores no interior das larvas naupliares de artêmias. A figura 61 exibe imagens registradas por microscopia ótica de fluorescência dos náuplios expostos aos QDs de ZnCdTe e os respectivos controles não expostos.

As imagens de A a C representam náuplios controle, que foram submetidos aos filtros de lasers Dapi (365 nm), Alexa Flúor (488 nm) e Alexa (546 nm), respectivamente. Nessas imagens, os náuplios não apresentaram nenhum tipo de marcação fluorescente, enquanto que nas imagens de D a I, dos ínstares naupliares expostos aos QDs, visualiza-se a presença de fluorescência na cor verde alusiva ao aglomerado de quantum dots localizados ao longo do intestino do animal. A maior evidência da fluorescência é observada nas imagens em que há um contraste entre a autofluorescência do animal na coloração azul com a cor verde emitida pelos aglomerados de QDs de ZnCdTe, quando excitados com o filtro de laser Dapi (365 nm).

Figura 61 – Micrografias de fluorescência de larvas controle: com o filtro Dp (365 nm) (A); com o filtro AF (488 nm) (B); com filtro A (546 nm) (C) e de larvas expostas aos QDs com filtro Dp (D, E, F); com os três filtros juntos: Dp, AF e A (G), com o filtro AF (H) e com o filtro A (I).



Fonte: AUTORA (2020).

A visualização da fluorescência emitida pelo aglomerado de QDs de ZnCdTe ao longo do intestino das larvas naupliares é um indicativo de que está ocorrendo a filtração e acúmulo desse material pelo animal.

É possível que o estabilizante utilizado para passivar os QDs, o ácido tioglicólico (TGA), (JHONSI; RENGANATHAN, 2010; PODERYS et al., 2010) esteja se ligando com os grupos tióis dos aminoácidos cisteínas de proteínas da membrana das células do intestino do animal (enterócitos), através de interações estabelecidas entre os seus grupos carboxílicos (MUNOZ et al., 1999; YEPIZ-PLASCENCIA; GARCÍA-TRIANA, 2012; CUNHA et al., 2017; LIMA et al., 2018).

Como os QDs se concentraram no tubo intestinal dos náuplios na forma de aglomerados e foram observados pela fluorescência (~ 550 nm), eles também podem ser empregados como marcadores desta região do animal, assim, a visualização da fluorescência por toda extensão do tubo intestinal das dos náuplios revela que essas larvas podem concentrar QDs pela capacidade filtradora não seletiva e serem empregadas como concentradores vivos para pré-concentrar traços de nanocontaminantes desta natureza em ecossistemas aquáticos.

## 6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos a partir desta pesquisa, conclui-se que as larvas naupliares do microcrustáceo *Artemia franciscana* podem funcionar como micromotores vivos, parte ativa de pré-concentradores de nanocontaminantes de ecossistemas aquáticos, pelos motivos a seguir, que resumem a nova estratégia analítica:

- Os experimentos executados neste estudo demonstraram que as larvas naupliares podem filtrar e concentrar potenciais nanocontaminantes em seu interior. Três classes de nanopoluentes modelo foram testadas, NP Ag, representando a classe de nanopartículas metálicas como potenciais nanocontaminantes de dimensão zero, nanotubos de carbono, representando a classe de nanoestruturas do carbono, representando em particular potenciais nanocontaminantes de dimensão 1 e quantum dots, representando nanoestruturas semicondutoras, materiais já amplamente utilizados na indústria que representam risco tanto pela natureza composicional quanto riscos relacionados às propriedades associadas à dimensão.
- A prova de conceito da capacidade filtradora nas três classes de nanocontaminantes foi estabelecida, e o processamento histológico mostrou-se viável para preparação das amostras, usando análise multivariada no procedimento de digestão dos concentradores vivos para posterior análise, com disponibilização dos analitos modelo para posterior análise. Tais resultados, corroboram com a prova de conceito de que estes organismos podem funcionar como concentradores vivos de xenobióticos, facilitando a detecção *ex situ* de traços desses poluentes, em função do tempo de filtração não seletiva desses animais, utilizados como sondas vivas, quando as concentrações nominais não permitirem análises precisas aumentando com isto, a sensibilidade de detecção de traços desses nanocontaminantes.
- Para análise das amostras pré-concentradas, as técnicas analíticas de ICP OES e espectroscopia de absorção UV-Vis foram testadas para estabelecimento de curvas analíticas para correlação entre as concentrações nominais medidas nos concentrados e as concentrações reais nas amostras

analisadas, e escolheu-se a técnica de absorção UV-Vis para o desenvolvimento de um produto tecnológico, com curva e respectiva equação analítica estabelecida para nanopartículas de prata em meio aquoso. Fruto deste trabalho de tese, um protótipo de concentrador vivo de nanocontaminantes foi desenvolvido e uma patente do produto e respectivo processo foi depositada no INPI sob o número BR102020003546-0 (SOUZA SILVA; SANTA-CRUZ, 2020) com vistas a procedimento de pedido de exame prioritário no âmbito do Programa Patentes Verdes do INPI (Resolução no 175/2016).

- As informações a respeito do processo de biofiltração não seletiva contidas neste novo instrumento analítico são inéditas e podem levar a novos produtos e processos caracterizados pela inovação tecnológica associada a produtos bioinspirados.

## **7 PERSPECTIVAS**

Com base nos resultados alcançados, o presente estudo contribuiu com a validação de provas de conceito que apontaram a viabilidade do uso de microcrustáceos filtradores como motores concentradores em aplicações tecnológicas inovadoras, chegando-se a um nível de maturidade tecnológica avançado para o ambiente acadêmico, com a elaboração de protótipo e equação analítica para um binômio específico de um analito modelo (NP Ag) e uma técnica analítica simples (Absorção UV-Vis) em condições bem definidas, havendo, no entanto, necessidade de validação de faixas de linearidade em função de diversos parâmetros, como limites mínimos de detecção associados a fatores de pré-concentração, número de indivíduos e saturação da capacidade filtradora em função do volume da alíquota de amostra em relação ao número e indivíduos.

Pretende-se, ainda, como atividades futuras, a validação em ambiente relevante avaliando possibilidade de uso em campo, e novas investigações sobre os eventos fisiológicos de filtração usados pelas artêmias, suas formas de interação com outros nanocontaminantes e micropoluentes, como no monitoramento de microplásticos em oceanos, já em vistas de execução.

A avaliação de diferentes comportamentos de filtragem individuais e coletivos também deve ser estudada, bem como a avaliação do uso de populações naupliares com um número crescente de indivíduos. Estas indagações poderão contribuir para novas aplicações da *Artemia franciscana* (Kellog, 1906) e outros microcrustáceos filtradores não seletivos, como uma nova metodologia analítica, eficiente, rápida e econômica, em grande escala em monitoramentos ambientais de traços de poluentes em Ecossistemas Aquáticos.

**REFERÊNCIAS**

Abatzopoulos, T.J; Beardmore, J. A; Clegg, J.S.; Sorgeloos, P. (2002). *Artemia: Basic and Applied Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.

Abbruzzini, T. F.; Silva, C. A.; Andrade, D. A. de; Carneiro, W. J. de O. (2014). Influence of digestion methods on the recovery of Iron, Zinc, Nickel, Chromium, Cadmium and Lead contents in 11 organic residues. *Revista Brasileira de Ciência Do Solo*, 38(1), 166–176. doi:10.1590/s0100-06832014000100016.

Abreu-Junior, H.C.; Basso, C.A.; Chitolina, C.J.; Silva, C.F.; Boralli, K.; Wendel, F.C. (2012). Caracterização de compostos de resíduos sólidos urbanos orgânicos de unidades de reciclagem e compostagem dos municípios de São Paulo e de São José dos Campos. *HOLOS Environment*, 225-240. doi: <http://dx.doi.org/10.14295/holos.v12i2.4642>. Acessado em: 23/07/2019.

Acey, R. A., Bailey, S., Healy, P., Jo, C., Unger, T. F., & Hudson, R. A. (2002). A butyrylcholinesterase in the early development of the brine shrimp (*Artemia salina*) larvae: a target for phthalate ester embryotoxicity? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 299(4), 659–662. doi: 10.1016/s0006-291x(02)02716-x.

Ait-aissa, S., Pandard, P., Magaud, H., Arrigo, A. P., Thybaud, E.; Porcher, J. M. (2003). Evaluation of an in vitro hsp70 induction test for toxicity assessment of complex mixtures: comparison with chemical analyses and ecotoxicity tests. *Ecotox Environ. Safe*, 92-104.

Akerman, M. E.; Chan, W. C. W.; Laakkonen, P.; Bhatia, S. N.; Ruoslahti, E. (2002). Nanocrystal targeting in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(20), 12617–12621. doi:10.1073/pnas.152463399.

Al-Maadheed, S., Goktepe, I., Latiff, A. B. A., & Shomar, B. (2019). Antibiotics in hospital effluent and domestic wastewater treatment plants in Doha, Qatar. *Journal of Water Process Engineering*, 28, 60–68. doi: 10.1016/j.jwpe.2019.01.005.

Amat, F., 1985. Biología de Artemia. Informes Tecnicos del Instituto Investigaciones Pesqueras 126-127: 3-60.

Amat, F.; Hontoria, F.; Navarro, J.C.; Vieira, N.; Mura, G. (2007). Biodiversity loss in the genus *Artemia* in the Western Mediterranean Region. *Limnetica*, 387-404.

Amorello, D.; Barreca, S.; Bruno, M.; Milia, A.; Orecchio, S.; Pettignano, A. (2016). Chemical characterization of ancient liturgical vestment (chasuble) by Inductively Coupled Plasma–Optical Emission Spectrometry (ICP–OES). *Microchemical Journal*, 129, 305–309. doi:10.1016/j.microc.2016.07.011.

An, H. J.; Sarkheil, M.; Park, H. S.; Yu, I. J.; Johari, S. A. (2019). Comparative toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nanowires (AgNWs) on saltwater microcrustacean, *Artemia salina*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 218, 62-69. doi: 10.1016/j.cbpc.2019.01.002.

Anekthirakun, P.; Imyim, A. (2019). Separation of silver ions and silver nanoparticles by silica based-solid phase extraction prior to ICP-OES determination. *Microchemical Journal*. doi: 10.1016/j.microc.2018.11.008.

Ankamwar, B.; Salgaonkar, M.; Sur, K.U. (2017). Room Temperature Green Synthesis of Anisotropic Gold Nanoparticles Using Novel Biological Fruit Extract. *Journal, Inorganic and Nano-Metal Chemistry*, 1359-1363.

Aqel, A.; El-Nour, K. M. M. A.; Ammar, R. A. A.; Al-Warthan, A. (2012). Carbon nanotubes, science and technology part (I) structure, synthesis and characterisation. *Arabian Journal of Chemistry*, 5(1), 1–23. doi: 10.1016/j.arabjc.2010.08.022.

Arana, L. V. *Manual de producción de Artemia (Quistes y Biomassa) en Módulos de Cultivo*. Universidad Autónoma Metropolitana, México, 1999. 47 p.

Arantes de Carvalho, G. G.; Kondaveeti, S.; Petri, D. F. S.; Fioroto, A. M.; Albuquerque, L. G. R.; Oliveira, P. V. (2016). Evaluation of calcium alginate beads for Ce, La and Nd preconcentration from groundwater prior to ICP OES analysis. *Talanta*, 161, 707–712. doi:10.1016/j.talanta.2016.09.027.

Arias, A. R. L.; Buss, D. F.; Albuquerque, C.; Inácio, A. F.; Freire, M. M.; Egler, M.; Mugnai, R.; Baptista, D. F. (2007). Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 12, n. 1, p. 61-72.

Arias, L. R.; Yang, L. (2009). Inactivation of Bacterial Pathogens by Carbon Nanotubes in Suspensions. *Langmuir*, 25(5), 3003–3012. doi:10.1021/la802769m.

Arulvasu, C.; Jennifer, S. M.; Prabhu, D.; Chandhirasekar, D. (2014). Toxicity Effect of Silver Nanoparticles in Brine Shrimp *Artemia*. *The Scientific World Journal*, 2014, 1–10. doi:10.1155/2014/256919.

Asem, A. (2008) Historical record on brine shrimp *Artemia* more than one thousand years ago from Urmia Lake, Iran. *Journal of Biological Research*, 9, 113–114.

Asem, A. Rastegar-Pouyani, N.; Ríos-Escalante, D. R. (2010). The genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Branchiopoda). I. True and false taxonomical descriptions. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 501-506. doi: 10.3856/vol38-issue3-fulltext-14.

Asem, A.; Rastegar-Pouyani, N.; Ríos-Escalante, D. R. (2010). The genus *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Branchiopoda). I. True and false taxonomical descriptions. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 38(3): 501-506. doi: 10.3856/vol38-issue3-fulltext-14.

Avant, B., Bouchard, D., Chang, X., Hsieh, H.-S., Acrey, B., Han, Y.; Spear, J.; Zepp, R.; Knightes, C. D. (2019). Environmental fate of multiwalled carbon nanotubes and graphene oxide across different aquatic ecosystems. *NanoImpact*, 13, 1–12. doi:10.1016/j.impact.2018.11.001.

Barker, L. K.; Giska, J. R.; Radniecki, T. S.; & Semprini, L. (2018). Effects of short- and long-term exposure of silver nanoparticles and silver ions to *Nitrosomonas europaea* biofilms and planktonic cells. *Chemosphere*, 206, 606–614. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.05.017.

Barrera, N.; Guerrero, L.; Debut, A.; Santa-Cruz, P. (2018). Printable nanocomposites of polymers and silver nanoparticles for antibacterial devices produced by DoD technology. *PLOS ONE*, 13(7), e0200918. doi:10.1371/journal.pone.0200918.

Baun, A.; Sørensen, S. N.; Rasmussen, R. F.; Hartmann, N. B.; Koch, C. B. (2008). Toxicity and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous suspensions of aggregates of nano-C60. *Aquatic Toxicology*, 86(3), 379–387. doi: 10.1016/j.aquatox.2007.11.019.

Baxevanis, A. D.; Kappas, I.; Abatzopoulos, T. J. (2006). Molecular phylogenetics and asexuality in the brine shrimp *Artemia*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40(3), 724–738. doi:10.1016/j.ympev.2006.04.010.

Bean, T. G.; Rattner, B. A. (2018). Environmental Contaminants of Health-Care Origin: Exposure and Potential Effects in Wildlife. *Health Care and Environmental Contamination*, 87–122. doi: 10.1016/b978-0-444-63857-1.00006-1.

Bengtson, D.; Léger, P.; Sorgeloos, P. (1991). Use of *Artemia* as food source. In R. Brownw, P. Sorgeloos & C.N.A. Trotman (eds), *Artemia Biology*. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA: 255-285.

Bergami, E.; Bocci, E.; Vannuccini, M. L.; Monopoli, M.; Salvati, A.; Dawson, K. A.; Corsi, I. (2016). Nano-sized polystyrene affects feeding, behavior and physiology of brine shrimp *Artemia franciscana* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 123, 18–25. doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.09.021.

Bhangale, G.H.; Bachhav, G.S.; Nerkar, M.D.; Sarode, M.K.; D.R. Patil, R.D. (2019). Study on Optical Properties of Green Synthesized Silver Nanoparticles for Surface Plasmon Resonance. *Journal of Nanoscience and Technology*, 5 (2) 658–661. <https://doi.org/10.30799/jnst.230.19050203>.

Biris, A. S., Galanzha, E. I., Li, Z., Mahmood, M., Xu, Y., & Zharov, V. P. (2009). In vivo Raman flow cytometry for real-time detection of carbon nanotube kinetics in

lymph, blood, and tissues. *Journal of Biomedical Optics*, 14(2), 021006. doi:10.1117/1.3119145.

Browne, A. R.; Wanigasekera, G. (2000). Combined effects of salinity and temperature on survival and reproduction of five species of *Artemia*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 29–44.

Bruneau, A.; Fortier, M.; Gagne, F.; Gagnon, C.; Turcotte, P.; Tayabali, A.,... Fournier, M. (2013). Size distribution effects of cadmium tellurium quantum dots (CdS/CdTe) immunotoxicity on aquatic organisms. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 15(3), 596. doi:10.1039/c2em30896g.

Brushan, B. (2004). Springer Handbook of Nanotechnology, 1 ed. Ohio, EUA, Springer.

Buikema, A. L.; Voshell, J. R. Toxicity studies using freshwater benthic macroinvertebrates. In: ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. (Eds.). Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. New York: Chapman and Hall, 1993. p. 344-398.

Câmara, M. R. (1996). *Artemia no Brasil: em busca de um modelo autossustentável de produção*. *Panorama de Aquicultura*, 16-19.

Câmara, M. R. (2001). Dispersal of *Artemia franciscana* Kellogg (Crustacea; Anostraca) populations in the coastal saltworks of Rio Grande do Norte, northeastern Brazil. *Saline Lakes*, 145–148. doi:10.1007/978-94-017-2934-5\_13.

Campos, C. E. Estudo de propriedades físicas de nanomateriais produzidos por síntese mecânica: Nanomateriais, síntese mecânica e caracterização de propriedades físicas. Carlos Eduardo Maduro de Campos - Florianópolis, 2005. 110f.

Cantarella, M.; Carroccio, C.S.; Dattilo, S.; Avolio, R.; Castaldo, R.; Puglisi, C.; Privitera, V. (2019). Molecularly imprinted polymer for selective adsorption of diclofenac from contaminated water. *Chemical Engineering Journal*. doi: <https://doi.org/10.1016/j.cej.2019.02.146>.

Cate, M. D.; Nanthasurasak, P.; Riwkulkajorn, P.; L'Orange, C.; Henry, S. C.; Volckens, J. (2014). Rapid Detection of Transition Metals in Welding Fumes Using Paper-Based Analytical Devices. *The Annals of Occupational Hygiene*, vol. 58, No. 4, 413 - 423. doi: 10.1093/annhyg/met078.

Cavalcante, M. F.; Oliveira, M. C. C.; Velandia, J. R.; Echevarria, A. (2000). Síntese de 1, 3, 5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, 20-22.

Chan, W. C. (1998). Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection. *Science*, 281(5385), 2016–2018. doi:10.1126/science.281.5385.2016.

Collins, P. C.; Brice, D. A.; Samimi, P.; Ghamarian, I.; Fraser, H. L. (2016). Microstructural Control of Additively Manufactured Metallic Materials. *Annual Review of Materials Research*, 46(1), 63–91. doi: 10.1146/annurev-matsci-070115-031816.

Comeche, A.; Martín-Villamil, M.; Picó, Y.; Varó, I. (2017). Effect of methylparaben in *Artemia franciscana*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 199, 98–105. doi:10.1016/j.cbpc.2017.04.004.

Comissão Europeia - Comunicado de Imprensa. (2011). O que são nanomateriais? Comissão Europeia abre novos caminhos com uma definição comum. [http://europa.eu/rapid/press-release\\_IP-11-1202\\_pt.htm](http://europa.eu/rapid/press-release_IP-11-1202_pt.htm).

Corrêa; J. M.; Penafort, J. M. (2011) Considerações sobre biologia e utilização de *Artemia* sp. (CRUSTACEA: BRANCHIOPODA: ANOSTRACA) – considerations about biology and use 74 of *Artemia* sp. (CRUSTACEA: BRANCHIOPODA: ANOSTRACA). *Revista Electrónica de Veterinaria*, 1-11.

Corrêa; J. M.; Penafort, J. M. (2011). Considerações sobre biologia e utilização de *Artemia* sp. (CRUSTACEA: BRANCHIOPODA: ANOSTRACA) – considerations about biology and use 74 of *Artemia* sp. (CRUSTACEA: BRANCHIOPODA: ANOSTRACA). *Revista Electrónica de Veterinaria*, 1-11.

Costa, C. I. (2004). Desenvolvimento de Dispositivo Fotônico para monitoramento de metais poluentes em recursos hídricos. Tese de Doutorado.73p.

Costa, P.F. (1983). Biologia e cultura de *Artemia salina*. In Manual de Maricultura. Brasília: Ministério da Marinha, Instituto Nacional de Estudos do Mar. Projeto Cabo Frio, RJ.,1v.

Criel, G.R.J.; MacRae, T.H. (2002). *Artemia* morphology and structure. In: Abatzopoulos T.J.; Beardmore, J.A.; Clegg, J.S.; Sorgeloos, P. editors. *Artemia*, basic and applied biology. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1–37.

Croghan, C. P. (1958). The mechanism of osmotic regulation in *artemia salina* (L.): the physiology of the gut. 243-249. *Journal of Experimental Biology*, 35: 243-249.

Cushing, B. L.; Kolesnichenko, V. L.; O'Connor, C. J. (2004). Recent Advances in the Liquid-Phase Syntheses of Inorganic Nanoparticles. *Chemical Reviews*, 104(9), 3893–3946. doi: 10.1021/cr030027b.

Da Silva, S. M. B. C.; Rocha, J. L., Martins, P. C. C., Gálvez, A. O., dos Santos, F. L., Andrade, H. A., & Coimbra, M. R. M. (2014). Experimental infection of infectious myonecrosis virus (IMNV) in the Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Boone, 1931). *Aquaculture International*, 23(2), 563–576. doi:10.1007/s10499-014-9836-9.

Dabbousi, B. O.; Rodriguez-Viejo, J.; Mikulec, F. V.; Heine, J. R.; Mattoussi, H.; Ober, R.; Jensen, F. K.; Bawendi, M. G. (1997). (CdSe)ZnS Core–Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites. *The Journal of Physical Chemistry B*, 101(46), 9463–9475. doi:10.1021/jp971091y.

Dai, H. (2002). Carbon nanotubes: opportunities and challenges. *Surface Science*, 500(1-3), 218–24. doi:10.1016/s0039-6028(01)01558-8.

De la Calle, I.; Menta, M.; Klein, M.; Séby, F. (2017). Screening of TiO<sub>2</sub> and Au nanoparticles in cosmetics and determination of elemental impurities by multiple

techniques (DLS, SP-ICP-MS, ICP-MS and ICP-OES). *Talanta*, 171, 291–306. doi:10.1016/j.talanta.2017.05.002.

Demergasso, C.; Casamayor, E. O.; Chong, G.; Galleguillos, P.; Escudero, L.; Pedrós-Alió, C. (2004). Distribution of prokaryotic genetic diversity in athalassohaline lakes of the Atacama Desert, northern Chile. *FEMS Microbiology Ecology*, 48(1), 57–69. doi:10.1016/j.femsec.2003.12.013.

Dhont, J.; Dierckens, K.; Støttrup, J.; Van Stappen, G.; Wille, M.; Sorgeloos, P. (2013). Rotifers, Artemia and copepods as live feeds for fish larvae in aquaculture. In book: *Advances in Aquaculture Hatchery Technology*, 157–202 (Chapter 5). doi:10.1533/9780857097460.1.157.

Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G., & Alexander, A. (2006). Carbon Nanotubes: A Review of Their Properties in Relation to Pulmonary Toxicology and Workplace Safety. *Toxicological Sciences*, 92(1), 5–22. doi:10.1093/toxsci/kfj130.

Drewes, C (2006). Quantitative investigations of hatching in brine shrimp cysts. Pages 299- 312, in *Tested Studies for Laboratory Teaching, Volume 27* (M.A. O'Donnell, Editor). Proceedings of the 27th Workshop/Conference of the Association for Biology Laboratory Education (ABLE), 383 pages. [http://www.ableweb.org/biologylabs/wpcontent/uploads/volumes/vol27/17\\_Drewes.pdf](http://www.ableweb.org/biologylabs/wpcontent/uploads/volumes/vol27/17_Drewes.pdf).

Duxson, P.; Provis, J. L.; Lukey, G. C.; van Deventer, J. S. J. (2007). The role of inorganic polymer technology in the development of “green concrete.” *Cement and Concrete Research*, 37(12), 1590–1597. doi: 10.1016/j.cemconres.2007.08.018.

Emin, S.; Singh, S. P.; Han, L.; Satoh, N.; Islam, A. (2011). Colloidal quantum dot solar cells. *Solar Energy*, 85(6), 1264–1282. doi: 10.1016/j.solener.2011.02.005.

Engel, D. W.; Angelovic, J. W. (1968). The influence of salinity and temperature upon the respiration of brine shrimp nauplii. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 26(2), 749–752. doi:10.1016/0010-406x(68)90669-5.

Engelmann, M.; sliggers, B. (2015). Johannes Albertus Schlosser, the first author describing *Artemia salina* (L.) (Branchiopoda: Anostraca): a biographical sketch. *Journal of Crustacean Biology*, 571-575.

Fabrega, J.; Luoma, S. N.; Tyler, C. R.; Galloway, T. S.; Lead, J. R. (2011). Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. *Environment International*, 37(2), 517–531. doi:10.1016/j.envint.2010.10.012.

Faria-Tischer, S. C. P.; Tischer, A. C. (2012). Nanobiotechnology: platform technology for biomaterials and biological applications the nanostructures Nanobiotechnologia: plataforma tecnológica para biomateriais e aplicação biológica de nanoestruturas. *Biochemistry and Biotechnology Reports*, 32-53.

Ferreira, S.H; Rangel, C.M. (2009). Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. *Química Nova*, 1860-1870.

Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 294-299.

Fortner, J. D.; Lyon, D. Y.; Sayes, C. M.; Boyd, A. M.; Falkner, J. C.; Hotze, E. M.; Alemany, L. B.; Tao, Y. J.; Guo, W.; Ausman, K. D.; Colvin, V. L.; Hughes, J. B. (2005) C<sub>60</sub> in Water: Nanocrystal Formation and Microbial Response; *Environmental Science & Technology*, 4307.

Fox, R. (2001). *Artemia* sp., Invertebrate Zoology, Laboratory Exercises, Lander University.

Gagné, F.; Auclair, J.; Turcotte, P.; Fournier, M.; Gagnon, C.; Sauvé, S.; Blaise, C. (2008). Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquatic Toxicology*, 86(3), 333–340. doi:10.1016/j.aquatox.2007.11.013.

Gajardo, G. M.; Beardmore, J. A. (1993). Electrophoretic evidence suggests that the *Artemia* found in the Salar de Atacama, Chile, is *A. franciscana Kellogg*. *Hydrobiologia*, 257(2), 65–71. doi: 10.1007/bf00005947.

Gajardo, G. M.; Beardmore, J. A. (2012). The brine shrimp *Artemia*: adapted to critical Life conditions. *Frontiers in Physiology*, 3. doi:10.3389/fphys.2012.00185.

Galazzi, R. M.; Santos, E. de B.; Caurin, T.; Pessôa, G. de S.; Mazali, I. O.; Arruda, M. A. Z. (2016). The importance of evaluating the real metal concentration in nanoparticles post-synthesis for their applications: A case-study using silver nanoparticles. *Talanta*, 146, 795–800. doi:10.1016/j.talanta.2015.06.016.

Gambardella, C.; Costa, E.; Piazza, V.; Fabbrocini, A.; Magi, E.; Faimali, M.; Garaventa, F. (2015). Effect of silver nanoparticles on marine organisms belonging to different trophic levels. *Marine Environmental Research*, 111, 41–49. doi: 10.1016/j.marenvres.2015.06.001.

Gomes, L. E. (2012). A utilização de artêmias como indicador natural de poluição no ambiente aquático. <http://biologiaacontecendo.blogspot.com.br/2012/04/artemia-salina.html> Acessado em 10/09/2017.

Gómez López, A. (2017). Nanomedicina y su impacto en la práctica médica. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, 26(3), 129–130. doi: 10.1016/j.reper.2017.06.003.

Gonçalves, S.E.; Silva, B. M. J.; Pavesi, T.; Moreira, C. J. (2014). A importância da determinação analítica de intermediários reativos e de seus produtos de reações com biomacromoléculas: uma mini revisão. *Química Nova*, Vol. 37, No. 2, 317-322.

Gottardo, S. et al. (2017). NANoREG framework for the safety assessment of nanomaterials, EUR 28550 EN, doi: 10.2760/245972.

Green, A. J.; Jenkins, K. M.; Bell, D.; Morris, P. J.; KINGSFORD, R. T. (2008). The potential role of waterbirds in dispersing invertebrates and plants in arid Australia. *Freshwater Biology*, 53, 380-392. doi:10.1111/j.1365-2427.2007.01901.x

Haché, R.; Plante, S. (2011). The relation ship between enrichment, fatty acid profiles and bacterial load in cultured rotifers (*Brachionus plicatilis L-strain*) and Artemia (*Artemia salina strain Franciscana*). *Aquaculture*, 311(1-4), 201–208. doi: 10.1016/j.aquaculture.2010.11.034.

Hardman, R. (2006). A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors. *Environmental Health Perspectives*, 114(2), 165–172. doi: 10.1289/ehp.8284.

Hartmann, F.; Maier, P.; Rebello Sousa Dias, M.; Göpfert, S.; Castelano, L. K.; Emmerling, M.; Schneider, C.; Höfling, S.; Kamp, M.; Pershin, Y.; Marques, E. G.; Lopez-Richard, V.; Worschech, L. (2017). Nanoscale Tipping Bucket Effect in a Quantum Dot Transistor-Based Counter. *Nano Letters*, 17(4), 2273–2279. doi:10.1021/acs.nanolett.6b04911.

Henig, R.M. Our Silver-Coated Future. (2007). p. 22–29. OnEarth. Acessado em 20/07/2019: <http://archive.oneyearth.org/article/our-silver-coated-future>.

Hiriyanna, S. H.; Basavaiah, K.; Goud, P.; Dhayanithi, V.; Raju, K.; Pati, H. P. (2008). Identification and characterization of olanzapine degradation products under oxidative stress conditions. *Acta Chromatographica*, 20(1), 81–93. doi:10.1556/achrom.20.2008.1.7.

Hoening, M. (2001). Preparation steps in environmental trace element analysis — facts and traps. *Talanta*, 54(6), 1021–1038. doi:10.1016/s0039-9140(01)00329-0.

Hollergschwandtner, E.; Schwaha, T.; Neumüller, J.; Kaindl, U.; Gruber, D.; Eckhard, M.; Stöger-Pöllach, M.; Reipert, S. (2017). Novel mesostructured inclusions in the epidermal lining of *Artemia franciscana* ovisacs show optical activity. *PeerJ*, 5: e3923. doi: 10.7717/peerj.3923.

Hu, Y.; Chen, X.; Yang, K.; Lin, D. (2018). Distinct toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna* in M4 medium and surface water. *Science of The Total Environment*, 618, 838–846. doi: 10.1016/j.scitotenv.2017.08.222.

Igarashi, A.M. (2008). Potencial econômico das Artemias produzidas em regiões salineiras do Rio Grande do Norte. *Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*, Londrina, V. 2, N. 31.

Ihsanullah; Abbas, A.; Al-Amer, A. M.; Laoui, T.; Al-Marri, M. J.; Nasser, M. S.; Khraisheh, M.; Atieh, M. A. (2016). Heavy metal removal from aqueous solution by advanced carbon nanotubes: Critical review of adsorption applications. *Separation and Purification Technology*, 157, 141–161. doi:10.1016/j.seppur.2015.11.039.

Jackson, B. P.; Bugge, D.; Ranville, J. F.; Chen, C. Y. (2012). Bioavailability, Toxicity, and Bioaccumulation of Quantum Dot Nanoparticles to the Amphipod *Leptocheirus plumulosus*. *Environmental Science & Technology*, 46(10), 5550–5556. doi:10.1021/es202864r.

Jain, P. K.; Huang, X.; El-Sayed, I. H.; El-Sayed, M. A. (2008). Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine. *Accounts of Chemical Research*, 41(12), 1578–1586. doi:10.1021/ar7002804.

Jensen, A. C. (1918). Some observations on *artemia gracilis*, the brine shrimp of Great Salt Lake. *The Biological Bulletin*, 34(1), 18–[32]–1. doi: 10.2307/1536246.

Jin, R.; Charles Cao, Y.; Hao, E.; Métraux, G. S.; Schatz, G. C.; Mirkin, C. A. (2003). Controlling anisotropic nanoparticle growth through plasmon excitation. *Nature*, 425(6957), 487–490. doi:10.1038/nature02020.

Ju-Nam, Y.; Lead, J. R. (2008). Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Science of The Total Environment*, 400(1-3), 396–414. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.06.042.

Kakani, L. S. *Engineering Materials*, 540 p, 2014. Editora: New Age International Publishers.

Kellogg, V.A. (1906). A new *Artemia* and its life conditions. *Science*, 594–596.

Kelly, K. L.; Coronado, E.; Zhao, L. L.; Schatz, G. C. (2003). The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *The Journal of Physical Chemistry B*, 107(3), 668–677. doi:10.1021/jp026731y.

Khallil, A.M.; Abdel-Sater, A.M. (1992). Fungi from Water, Soil and Air Polluted by the Industrial Effluents of Manquabad Superphosphate Factory (Assiut, Egypt). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 363 – 386.

Kubiliute, R. et al. (2013). Ultra-pure, water-dispersed Au nanoparticles produced by femtosecond laser ablation and fragmentation. *International Journal of Nanomedicine*, 2601–2611. doi:10.2147/ijn.s44163.

Lanone, S.; Andujar, P.; Kermanizadeh, A.; Boczkowski, J. (2013). Determinants of carbon nanotube toxicity. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(15), 2063–2069. doi: 10.1016/j.addr.2013.07.019.

Lavens, P.; Léger, P.; Sorgeloos, P. (1989). Manipulation of the fatty acid profile in *Artemia* offspring produced in intensive culture systems. *European Aquaculture Society*, 731-740.

Lavens, P.; Sorgeloos, P. (1996). Manual on the Production and Use of Live Food for Aquaculture. FAO Fisheries Technical Paper 361, 295 p.

Li, P.; Li, J.; Wu, C.; Wu, Q.; Li, J. (2005). Synergistic antibacterial effects of  $\beta$ -lactam antibiotic combined with silver nanoparticles. *Nanotechnology*, 16(9), 1912–1917. doi:10.1088/0957-4484/16/9/082.

Li, Q.; Xie, B.; Hwang, Y. S.; Xu, Y. (2009). Kinetics of C<sub>60</sub> Fullerene Dispersion in Water Enhanced by Natural Organic Matter and Sunlight. *Environmental Science & Technology*, 43(10), 3574–3579. doi: 10.1021/es803603x.

Lignos, I.; Maceiczky, R.; deMello, A. J. (2017). Microfluidic Technology: Uncovering the Mechanisms of Nanocrystal Nucleation and Growth. *Accounts of Chemical Research*, 50(5), 1248–1257. doi: 10.1021/acs.accounts.7b00088.

Lijteroff, R.; Lima, L.; Prieri, B. (2009). Uso de líquenes como bioindicadores de contaminação atmosférica en la ciudad de San Luis, Argentina. *Rev. Int. Contam. Ambient.*, 111-120.

Liz-Marzán, L. M. (2004). Nanometals: Formation and Color. *Materials Today*, 7(2), 26–31. doi: 10.1016/s1369-7021(04)00080-x.

Logaranjan, K.; Raiza, A. J.; Gopinath, S. C. B.; Chen, Y.; Pandian, K. (2016). Shape- and Size-Controlled Synthesis of Silver Nanoparticles Using Aloe vera Plant Extract and Their Antimicrobial Activity. *Nanoscale Research Letters*, 11(1). doi:10.1186/s11671-016-1725-x.

López, G.R.M. (2012). El recurso de Artemia de Argentina: Biodiversidad y uso en acuicultura. Dissertação de doutoramento apresentada à Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade de Valência, 257 p.

Lovern, B.S.; J. Strickler, R.J.; Klaper, R. (2007). Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nanoC60, and C60HxC70Hx). *Environ. Sci. Technol.*, 4465- 4470.

Lowry, G. V.; Gregory, K. B.; Apte, S. C.; Lead, J. R. (2012). Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Environmental Science & Technology*, 46(13), 6893–6899. doi:10.1021/es300839e.

Luna, J. S.; Santos, A. F.; Lima, M. R. F.; Omena, M. C.; Mendonça, F. A. C.; Bieber, L. W.; Sant'ana, A. E. G. (2005). A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 199-206. <https://www.embrapa.br/agroenergia/vitrine>.

Lundström, I.; Svensson, S. (2002). Natural nanosystems. *Current Applied Physics*, 17–21.

Ma, J.; Wong, H.; Kong, L. B.; Peng, K. W. (2003). Biomimetic processing of nanocrystallite bioactive apatite coating on titanium. *Nanotechnology*, 14(6), 619–623. doi:10.1088/0957-4484/14/6/310.

Maher, W.; Krikowa, F.; Ellwood, J.M.; Raber, G.; Foster, S. (2015). Measurement of arsenic species in environmental, biological fluids and food samples by HPLC-ICPMS and HPLC-HG-AFS. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 30(10), 2129–2183. doi:10.1039/c5ja00155b.

Mahony, J. O.; Nolan, K.; Smyth, M. R.; Mizaikoff, B. (2005). Molecularly imprinted polymers—potential and challenges in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta*, 534(1), 31–39. doi: 10.1016/j.aca.2004.07.043.

Manfra, L.; Canepa, S.; Piazza, V.; Faimali. (2016). Lethal and sublethal endpoints observed for *Artemia* exposed to two reference toxicants and na ecotoxicological concern Organic compound. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 60–64. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.08.017.

Marinelli, L. A.; Monteiro, R. M.; Ambrósio, D. J.; Branciforti, C. M.; Kobayashi, M.; Nobre, D. A. (2008). Desenvolvimento de Compósitos Poliméricos com Fibras Vegetais Naturais da Biodiversidade: Uma Contribuição para a Sustentabilidade Amazônica. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, vol. 18, nº 2, p. 92-99.

Marsh, J. N.; Partlow, K. C.; Abendschein, D. R.; Scott, M. J.; Lanza, G. M.; Wickline, S. A. (2007). Molecular imaging with targeted perfluorocarbon nanoparticles: Quantification of the concentration Dependence of Contrast Enhancement for Binding to Sparse Cellular Epitopes. *Ultrasound in Medicine & Biology*, 33(6), 950–958. doi:10.1016/j.ultrasmedbio.2006.12.00.

Martin, W. J.; Davis, E. G. (2001). An Updated Classification of the Recent Crustacea. Natural History Museum of Los Angeles County. NO. 39 Science Series.

Medina C; Santos-Martinez, M. J.; Radomski, A.; Corrigan, O. I.; Radomski, M. W. (2007). Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance. *British Journal of Pharmacology*, 50(5):552-8.

Melo, A.C.L.; Silva, A.C. (2008). Influência de métodos de digestão e massa de amostra na recuperação de nutrientes em resíduos orgânicos. *Química Nova*, 556-561.

Melo, C. P.; Pimenta, M. Nanociências e nanotecnologia. Parcerias Estratégicas/Centro de Gestão e Estudos Estratégicos. – nº 18 (agosto 2004). – Brasília: CGEE, 2004, p. 9-21.

Mesaric, T.; Gambardella, C.; Milivojevi, T.; Faimali, M.; Drobne, D.; Falugie, C.; Makovec, D.; Jemeca, A.; Sepci, K. (2015). High surface adsorption properties of carbon-based nanomaterials are responsible for mortality, swimming inhibition, and biochemical responses in *Artemia salina* larvae. *Aquatic Toxicology*, 121–129.

Mesko, F.M.; Costa, C.V.; Picoloto, S.R.; Bizzi, A.C.; Mello, A.P.(2016). Halogen Determination in Food and Biological Materials using Plasmabased Techniques: Challenges and Trends of Sample Preparation. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 31(6), 1243–1261. doi:10.1039/c5ja00488h.

Meyer, B. N., Ferrigni, N. R., Putnan, J. E., Jacobsen, L. B., Nichols, D. E., Mcl. Aughlin, J. (1982). Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Journal of Medical Plant Research*, 31-34.

Michael, A. S.; Thompson, C. G.; Abramovitz, M. (1956). *Artemia salina* as a Test Organism for Bioassay. *Science*, 123(3194), 464–464. doi:10.1126/science.123.3194.464.

Michalet, X.; Pinaud, F. F.; Bentalila, A. L.; Tsay, M. J.; Doose, S.; Li, J. J.; Sundaresan, G.; Wu, M. A.; Gambhir, S. S.; Weiss, S. (2005). Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science*, 307(5709), 538–544. doi:10.1126/science.1104274.

Milačić, R.; Zuliani, T.; Vidmar, J.; Bergant, M.; Kalogianni, E.; Smeti, E.; Skoulikidis, N.; Ščančar, J. (2019). Potentially toxic elements in water, sediments and fish of the Evrotas River under variable water discharges. *Science of The Total Environment*, 648, 1087–1096. doi: 10.1016/j.scitotenv.2018.08.123.

Mojica-Sánchez, C. L. (2017). CNT@Ag0@Ln<sup>3+</sup> como fase fotônica ativa para nanocompósitos poliméricos impressos molecularmente. *Exame de Qualificação de Doutorado*, Ciência de Materiais, Recife.

Mojica-Sánchez, L. C. Desenvolvimento de dispositivo híbrido para monitoramento ambiental usando reconhecimento de molécula-alvo em polímeros molecularmente impressos com marcador fotônico nanoestruturado. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais. Recife, 2018. 132f.

Mojica-Sánchez, L. C. Nanocompósitos Híbridos Luminescentes Formados por Nanotubos de Carbono, Complexos de Lantanídeos e Polivinil Butiral. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2013. 117f.

Monserrat, J. M.; Martínez, P. E.; Geracitano, L. A.; Lund Amado, L.; Martinez Gaspar Martins, C.; Lopes Leães Pinho, G.; Chaves, S.I.; Ferreira-Cravo, M.; Ventura-Lima, J.; Bianchini, A. (2007). Pollution biomarkers in estuarine animals: Critical review and new perspectives. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 146(1-2), 221–234. doi: 10.1016/j.cbpc.2006.08.012.

Monserrat, J. M.; Monserrat, L. A. G.; Bianchini, A. (2003). Current and Future Perspectives Using Biomarkers to assess Pollution in Aquatic Ecosystems. *Comments on Toxicology*, 9, 255-269.

Moorad, A.J.; Mayer, S.M.; Simovich, A. M. (1997). Extraction of DNA from anostracan cysts (Crustacea, Branchiopoda) for use in RAPD-PCR analyses. *Hydrobiologia*, 159–162.

Moore, N.M. (2006). Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment International*, 967–976. doi: 10.1016/j.envint.2006.06.014.

Moore, N.M.; Depledge, H. M.; Readman, W.J.; Leonard, P. R.D. (2004). An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutation Research*, 247–268.

Mota Klein, V.L. Identificação de linhagens de artemia sp. no nordeste do Brasil. *Ciência Agrônoma (Brasil)*. (1996) V. 27(1/2) p.17-22. CIBAGRO H184Ubicación: 25-R00964.

Muñoz, J., Amat, F., Green, A.J., Figuerola, J. & Gómez, A. (2013) Bird migratory flyways influence the phylogeography of the invasive brine shrimp *Artemia franciscana* in its native American range. *PeerJ*, 1: e 200.

Muñoz, J.; Gómez, A.; Figuerola, J.; Amat, F.; Rico, C.; Green, A. J. (2014). Colonization and dispersal patterns of the invasive American brine shrimp *Artemia franciscana* (Branchiopoda: Anostraca) in the Mediterranean region. *Hydrobiologia*, 726(1), 25–41. doi:10.1007/s10750-013-1748-6.

Muñoz, J.; Gómez, A.; Green, J. A.; Figuerola, J.; Amat, F.; Rico, C. (2010). Evolutionary Origin and Phylogeography of the Diploid Obligate Parthenogen *Artemia parthenogenetica* (Branchiopoda: Anostraca). *PLoS ONE*, 1-9.

Mura, G.; Brecciaroli, B. (2004). Use of morphological characters for species separation within the genus *Artemia* (Crustacea, Branchiopoda). *Hydrobiologia*, 520(1-3), 179–183. doi: 10.1023/b: hydr.0000027721.85736.05.

Nadkarni, R. A. (1984). Applications of microwave oven sample dissolution in analysis. *Analytical Chemistry*, 56(12), 2233–2237. doi:10.1021/ac00276a056.

Narciso, C. F. L. (2000). *Biologia e cultivo de Artemia sp. (Crustacea, Branchiopoda): sua utilização em aquicultura*. Cascais: Câmara Municipal, 2000. 94 p.

Ngô, C.; Van de Voorde, M. (2014). *Nanotechnology in a Nutshell: From Simple to Complex Systems*. Chapter 2-Making Nano-Objects, 23-26. doi:10.2991/978-94-6239-012-6.

Nóbrega, J. A.; Santos, M. C.; de Sousa, R. A.; Cadore, S.; Barnes, R. M.; Tatro, M. (2006). Sample preparation in alkaline media. *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, 61(5), 465–495. doi:10.1016/j.sab.2006.02.006.

Nogueira, P.; Paino, I.; Zucolotto, V. (2013). Nanosilver: Propriedades, Aplicações e Impactos na Saúde Pública e Meio Ambiente. *Vigilância Sanitária Em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia*, 1(4), 59-71.

NRC. A Research Strategy for Environmental, Health, and Safety Aspects of Engineered Nanomaterials; The National Academies Press: Washington, DC, 2012.

OECD, 2012. Important Issues on Risk Assessment of Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 33.

Ogello, O.E.; Kembenya, E.; Cecilia Muthoni Githukia, M. C.; Betty, M.N.; Munguti, M.J.(2014).The occurrence of the brine shrimp, *Artemia franciscana* (Kellog 1906) in Kenya and the potential economic impacts among Kenyan coastal communities. *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies* 2014; 1(5): 151-156.

Oomen, A. G.; Steinhäuser, K. G.; Bleeker, E. A. J.; van Broekhuizen, F.; Sips, A.; Dekkers, S.; Wijnhoven, P. D. S.; Sayre, P. G. (2018). Risk assessment frameworks for nanomaterials: Scope, link to regulations, applicability, and outline for future directions in view of needed increase in efficiency. *NanoImpact*, 9, 1–13. doi: 10.1016/j.impact.2017.09.001.

Pandey, P.; Rawtani, D.; Agrawal, K.Y. (2016). Nanoelectronics and Materials Development. Chapter 2- Aspects of Nanoelectronics in Materials Development, Published by Intech, 22-39.

Parveen, F.; Sannakki, B.; Mandke, V.M.; Pathan, M.H. (2016). Copper nanoparticles: Synthesis methods and its light harvesting performance. *Solar Energy Materials & Solar Cells*, 371–382. doi:10.1016/j.solmat.2015.08.033.

Paschoalino, P.M.; Marccone, S.P.G.; Jardim, F.W. (2010). Os nanomateriais e a questão ambiental. *Quimica. Nova*,421-430.

Pastoriza-Santos, I.; Liz-Marzán, L. M. (2008). Colloidal silver nanoplates. State of the art and future challenges. *Journal of Materials Chemistry*, 18(15), 1724.doi:10.1039/b716538b.

Patil, S.S.; Utkarsha, A.; Shedbalkar, U.; Truskewycz, A.; Chopade, A. B.; Ball, S.A. (2016). Nanoparticles for environmental clean-up: A review of potential risks and emerging solutions. *Environmental Technology & Innovation*, 10–21.

Peng, X.; Li, Y.; Luan, Z.; Di, Z.; Wang, H.; Tian, B.; Jia, Z. (2003). Adsorption of 1,2-dichlorobenzene from water to carbon nanotubes. *Chemical Physics Letters*, 376(1-2), 154–158. doi:10.1016/s0009-2614(03)00960-6.

Persoone, G.; Sorgeloos, P. (1980). General aspects of the ecology and biogeography of *Artemia* p. 3 - 24. In: The brine shrimp *Artemia*. Vol. 3. Ecology, Culturing, Use in Aquaculture. Persoone, G., P. Sorgeloos, O. Roels, and E. Jaspers (Eds). Universa Press, Wetteren, Belgium. 456 p.

Peyrot, C.; Gagnon, C.; Gagné, F.; Wilkinson, K. J.; Turcotte, P.; Sauvé, S. (2009). Effects of cadmium telluride quantum dots on cadmium bioaccumulation and metallothionein production in the freshwater mussel, *Elliptio complanata*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 150(2), 246–251. doi:10.1016/j.cbpc.2009.05.002.

Piccinno, F.; Gottschalk, F.; Seeger, S.; Nowack, B. (2012). Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(9). doi:10.1007/s11051-012-1109-9.

Pigliucci, M. (2005). *Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now?* *Trends in Ecology & Evolution*, 20(9), 481–486. doi:10.1016/j.tree.2005.06.001.

Pimenta, L. P. S.; Pinto, G. B.; Takahashi, J. A.; Silva, L. G. F.; Boaventura, M. A. D. (2003). Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine*, 209-212.

Pitkethly, M. J. (2004). Nanomaterials – the driving force. *Materials Today*, 7(12), 20–29. doi: 10.1016/s1369-7021(04)00627-3.

Polte, J. (2015). Fundamental growth principles of colloidal metal nanoparticles – a new perspective. *CrystEngComm*, 17(36), 6809–6830. doi:10.1039/c5ce01014d.

Pretti, C.; Oliva, M.; Di Pietro, R.; Monni, G.; Cevasco, G.; Chiellini, F.; Pomelli, C.; Chiappe, C. (2014). Ecotoxicity of pristine graphene to marine organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 138–145.

Provasoli, L.; Shiraishi, K.; Lance, R.J. (1959). Nutritional idiosyncrasies of artemia and ticiopus in monoxenic culture. Part IV. The Arthropoda: Crustacea and Chelicerata, 250-261.

Prylutskyy, I.Y.; Petrenko, I.V.; Ivankov, I.O.; Kyzyma, A.O.; Bulavin, A. L.; Litsis, O.O.; Evstigneev, P.M.; Cherepanov, V.V.; Naumovets, G.V.; Ritter, U. (2014). On the Origin of C60 Fullerene Solubility in Aqueous Solution. *Langmuir*, 30(14), 3967–3970. doi: 10.1021/la404976k.

Rahmani, R.; Mansouri, B.; Johari, A.S.; Azadi, N.; Davari, B.; Asghari, S.; Dekani, L. (2016). Trophic transfer potential of silver nanoparticles from *Artemia salina* to *Danio rerio*. *AAEL Bioflux*, 100-104.

Ramos, K.; Gómez-Gómez, M. M.; Cámara, C.; Ramos, L. (2016). Silver speciation and characterization of nanoparticles released from plastic food containers by single particle ICPMS. *Talanta*, 151, 83–90. doi:10.1016/j.talanta.2015.12.071.

Rand, G. M.; Wells, P. G.; McCarty, L. S. (1995). Em *Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment*, Rand, G. M., ed.; 2nd ed., Taylor & Francis: Washington, cap. 1.

Rattner, B.; Heath, A. (2002). Environmental Factors Affecting Contaminant Toxicity In Aquatic And Terrestrial Vertebrates. *Handbook of Ecotoxicology, Second Edition*. doi: 10.1201/9781420032505.ch23.

Rattner, H. (2004). Nanotecnologia, sociedade e meio ambiente / Paulo Roberto Martins (org.)? São Paulo: Xamã, 2006. 344 p.

Roberts, A. P.; Mount, A. S.; Seda, B.; Souther, J.; Qiao, R.; Lin, S.; Ke, C. P.; Rao, M. A.; Klaine, S. J. (2007). In vivo Biomodification of Lipid-Coated Carbon Nanotubes by *Daphnia magna*. *Environmental Science & Technology*, 41(8), 3025–3029. doi:10.1021/es062572a.

Rodriguez-Mozaz, S.; Marco, P.M.; Alda, L.J.M.; Barceló, D. (2004). Biosensors for environmental applications: Future development trends. *Pure and Applied Chemistry*, 76(4), 723–752. doi: 10.1351/pac200476040723.

Rodriguez-Narvaez, O. M.; Peralta-Hernandez, J. M.; Goonetilleke, A.; Bandala, E. R. (2017). Treatment technologies for emerging contaminants in water: A review. *Chemical Engineering Journal*, 323, 361–380. doi:10.1016/j.cej.2017.04.106.

Ruebhart, D. R., Cock, I. E., & Shaw, G. R. (2008). *Brine shrimp bioassay: Importance of correct taxonomic identification of Artemia (Anostraca) species. Environmental Toxicology*, 23(4), 555–560. doi:10.1002/tox.20358.

Sahoo, N. G.; Rana, S.; Cho, J. W.; Li, L.; Chan, S. H. (2010). Polymer nanocomposites based on functionalized carbon nanotubes. *Progress in Polymer*

Sajanlal, P. R.; Sreeprasad, T. S.; Samal, A. K.; Pradeep, T. (2011). Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions. *Nano Reviews*, 2(1), 5883. doi: 10.3402/nano.v2i0.5883.

Salari Joo, H.; Kalbassi, M. R.; Yu, I. J.; Lee, J. H.; Johari, S. A. (2013). Bioaccumulation of silver nanoparticles in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Influence of concentration and salinity. *Aquatic Toxicology*, 140-141, 398–406. doi:10.1016/j.aquatox.2013.07.003.

Sallenave, R. F.; Vicari, C. B.; Borba, M. (2016). Pilares cerâmicos na implantodontia: revisão de literatura. *Cerâmica*, 62(363), 305–308 doi: 10.1590/0366-69132016623632026.

Sambrook, J.; Fritsch E. F.; Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor. 21p.

Sánchez, L. C. M. Desenvolvimento de dispositivo híbrido para monitoramento ambiental usando reconhecimento de molécula-alvo em polímeros molecularmente impressos com marcador fotônico nanoestruturado / Lizeth Carolina Mojica Sánchez.

– 2018. 132 f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Ciência de Materiais. Recife, 2018.

Sánchez, M. I.; Varo, N.; Matesanz, C.; Ramo, C.; Amat, J. A.; Green, A. J. (2013). Cestodes change the isotopic signature of brine shrimp, *Artemia*, hosts: Implications for aquatic food webs. *International Journal for Parasitology*, 43(1), 73–80. doi:10.1016/j.ijpara.2012.11.003.

Santos, C. P. Atividade  $\beta$ -D-N- acetilglucosaminidásia de enzimas imobilizadas extraídas da *Artemia franciscana* e possíveis aplicações biotecnológicas. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2008. 85 f.

Santos, M.M.L.; Souza, C.R.; Anunciação, S.D.; Viana, V.C. Z; Souza Santos, C. L.V. (2017). Análise de metais em sedimentos de manguezal do Rio Passa Vaca, Salvador, Brasil. *Acta Brasiliensis* 1(2): 1-7, 2017.

Sau, T. K.; Rogach, A. L. (2010). Nonspherical Noble Metal Nanoparticles: Colloid-Chemical Synthesis and Morphology Control. *Advanced Materials*, 22(16), 1781–1804. doi:10.1002/adma.200901271.

Scheiner, S. M. (1993). Genetics and Evolution of Phenotypic Plasticity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24(1), 35–68. doi:10.1146/annurev.es.24.110193.000343.

Scown, T. M.; van Aerle, R.; Tyler, C. R. (2010). Review: Do engineered nanoparticles pose a significant threat to the aquatic environment? *Critical Reviews in Toxicology*, 40(7), 653–670. doi:10.3109/10408444.2010.494174.

Seaton, A.; Donaldson, K. (2005). Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small. *The Lancet*, 18, 923.

Sheir, S. K.; Galal-Khallaf, A.; Mohamed, A. H.; Mohammed-Geba, K. (2018). Morphological and molecular clues for recording the first appearance of *Artemia*

franciscana (Kellogg, 1906) in Egypt. *Heliyon*, 4(12), e01110. doi:10.1016/j.heliyon.2018.e01110.

Shi, B.; Zhuang, X.; Yan, X.; Lu, J.; Tang, H. (2010). Adsorption of atrazine by natural organic matter and surfactant dispersed carbon nanotubes. *Journal of Environmental Sciences*, 22(8), 1195–1202. doi: 10.1016/s1001-0742(09)60238-2.

Shvedova, A.; Castranova, V.; Kisin, E.; Schwegler-Berry, D.; Murray, A.; Gandelsman, V.; Baron, P. (2003). Exposure to Carbon Nanotube Material: Assessment of Nanotube Cytotoxicity using Human Keratinocyte Cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 66(20), 1909–1926. doi: 10.1080/713853956.

Sikder, M.; Lead, J. R.; Chandler, G. T.; Baalousha, M. (2018). A rapid approach for measuring silver nanoparticle concentration and dissolution in seawater by UV–Vis. *Science of The Total Environment*, 618, 597–607. doi:10.1016/j.scitotenv.2017.04.055.

Som, C.; Berges, M.; Chaudhry, Q.; Dusinska, M.; Fernandes, T. F.; Olsen, S. I.; Nowack, B. (2010). The importance of life cycle concepts for the development of safe nanoproducts. *Toxicology*, 269(2-3), 160–169. doi: 10.1016/j.tox.2009.12.012.

Sorgeloos, P. 1980. Life history of the brine shrimp *Artemia*. In: Persoone, G.; Sorgeloos, P.; Roels, O.; Jaspers, E. eds. *The brine shrimp Artemia*, Vol. 1-3. Universa Press, Wetteren, Belgium: XIX-XXIII.

Sorgeloos, P.; Dhert, P.; Candreva, P. (2001). Use of the brine shrimp, *Artemia* spp., in marine fish larviculture. *Aquaculture*, 147-159.

Soundarapandian, p.; Saravanakumar, G. (2009). Effect of Different Salinities on the Survival and Growth of Artemina Spp. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 20-22.

Sousa, A. R.; Borges Neto, W.; Poppi, J.R.; Baccan, N.; Cadore, S. (2006). Classificação de água de coco processada e natural por meio de HCA, PCA e teores de íons metálicos determinados por ICP OES. *Química Nova*, 654-656.

Sousa, F. L. N. Filmes super-hidrofóbicos biomimetizados a partir de estruturas hierárquicas da superfície de folhas de espécies vegetais da caatinga. 2017. 73f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2017.

Souza, E. S. Desenvolvimento de filmes compósitos para aplicação antibacteriana bioinspirados na superfície super-hidrofóbica de plantas. 2019. 97f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2019.

Souza Silva, S. T.; Santa-Cruz, P. A., Dispositivo pré-concentrador com parte ativa viva para análise de traços de micropoluentes em água e respectivo processo de funcionamento, Patente depositada no INPI BR102020003546-0, 20/02/2020

Souza Filho, G. A.; Fagan, B. S. (2007). Funcionalização de nanotubos de carbono. *Química Nova*, 1695-1703.

Sulochana, S.; Krishnamoorthy, P.; Sivaranjani, K. (2012). Synthesis of Silver Nanoparticles using Leaf Extract of *Andrographis paniculata*. *Journal of Pharmacology and Toxicology*, 7: 251-258. doi:10.3923/jpt.2012.251.258.

Sun, Y. (2002). Shape-Controlled Synthesis of Gold and Silver Nanoparticles. *Science*, 298(5601), 2176–2179. doi:10.1126/science.1077229.

Sunjog, K.; Kolarević, S.; Kračun-Kolarević, M.; Višnjić-Jeftić, Ž.; Skorić, S.; Gačić, Z.; Lenhardt, M.; Vasić, N.; Vuković-Gačić, B. (2016). Assessment of status of three water bodies in Serbia based on tissue metal and metalloid concentration (ICP-OES) and genotoxicity (comet assay). *Environmental Pollution*, 213, 600–607. doi:10.1016/j.envpol.2016.03.008.

Svensson, B.-M.; Mathiasson, L.; Martensson, L.; Bergstrom, S. (2005). *Artemia salina* as test organism for assessment of acute toxicity of leachate water from

landfills. *Environmental Monitoring and Assessment*, 102(1-3), 309–321. doi: 10.1007/s10661-005-6029-z.

Tang, S.; Cai, Q.; Chibli, H.; Allagadda, V.; Nadeau, J. L.; Mayer, G. D. (2013). Cadmium sulfate and CdTe-quantum dots alter DNA repair in zebrafish (*Danio rerio*) liver cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 272(2), 443–452. doi:10.1016/j.taap.2013.06.004.

Tavana M.; Kalbassi M. R.; Abedian Kenari A.; Johari S. A. (2014). Assessment of assimilation and elimination of silver and TiO<sub>2</sub> nanoparticles in *Artemia franciscana* in different salinities. *Oceanography* 5:91-103.

Taylor, L. R.; Caldwell, S.G.; Bentley, G.M. (2005). Toxicity of algal-derived aldehydes to two invertebrate species: Do heavy metal pollutants have a synergistic effect? *Aquatic Toxicology*, 20–31.

Tekade, R. K.; Tekade, M.; Kumar, M.; Chauhan, A. S. (2014). Dendrimer-stabilized smart-nanoparticle (DSSN) platform for targeted delivery of hydrophobic antitumor therapeutics. *Pharmaceutical Research*, 32(3), 910–928. doi: 10.1007/s11095-014-1506-0.

Thamilselvi, V.; Radha, K. V. (2017). Silver Nanoparticle loaded corncob adsorbent for effluent treatment. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 5(2), 1843–1854. doi:10.1016/j.jece.2017.03.020.

Tizol-Correa, A. R. Contribución a la caracterización molecular citogenética, morfometría y bioquímica del camarón de salmuera *Artemia* de Cuba y Sur de México. La Paz, B.C.S., Tesis, 2006, 102 f.

Treece, D.G. (2000). *Artemia* Production for Marine Larval Fish Culture. *Southern Regional Aquaculture Center*, 1-8.

Triantaphyllidis, V.G.; Criel, J.R.G.; Abatzopoulos, J.T.; Thomas, M.K.; Peleman, J.; Beardmore, A.J.; Sorgeloos, P. (1997). International Study on *Artemia*. LVII.

Morphological and molecular characters suggest conspecificity of all bisexual European and North African *Artemia* populations. *Marine Biology*, 477- 487.

Triassi, M.; Alfano, R.; Illario, M.; Nardone, A.; Caporale, O.; Montuori, P. (2015). Environmental Pollution from Illegal Waste Disposal and Health Effects: A Review on the “Triangle of Death.” *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(2), 1216–1236. doi:10.3390/ijerph120201216

Van Stappen, G. (2002). “Chapter IV: Zoogeography” in: *Artemia: Basic and Applied Biology*, eds Th. J. Abatzopoulos, J. A. Beardmore, J. S. Clegg, and P. Sorgeloos (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers) 171–224.

Vanhaecke, P.; Siddall, S. E.; Sorgeloos, P. (1984). International study on *Artemia*. XXXII. Combined effects of temperature and salinity on the survival of *Artemia* of various geographical origin. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 80(3), 259–275. doi:10.1016/0022-0981(84)90154-0.

Varó, I.; Redón, S.; Garcia-Roger, E. M.; Amat, F.; Guinot, D.; Serrano, R.; Navarro, J. C. (2015). Aquatic pollution may favor the success of the invasive species *A. franciscana*. *Aquatic Toxicology*, 161, 208–220. doi:10.1016/j.aquatox.2015.02.008.

Vaz Jr, S. (2010). *Análise Química Instrumental e sua Aplicação em Controle de Qualidade de Biocombustíveis*. Brasília, DF: Embrapa: Agroenergia, 20 p. (Embrapa Agroenergia. Circular Técnica, 03).

Vaz, E. C. R. Nanotubos de carbono funcionalizados como dispositivos nanoestruturados conversores de luz (DNCL). Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN. Química Fundamental, 2015. 181f.

Ventura, R. R. C.; Mello-Patiu, A. C.; Mejdalani, G. *Diversidade biológica dos Prostostomados*. v.3 - M.4 / Carlos Renato Rezende Ventura. – Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, 2008. 154p.

Vigneshwaran, N.; Ashtaputre, N. M.; Varadarajan, P. V.; Nachane, R. P.; Paralikar, K. M.; Balasubramanya, R. H. (2007). Biological synthesis of silver nanoparticles using the fungus *Aspergillus flavus*. *Materials Letters*, 61(6), 1413–1418. doi:10.1016/j.matlet.2006.07.042.

Vinatea, J. E. (1994). Artemia: um ser vivo excepcional. Panorama da aquicultura. Rio de Janeiro, v.4, n.25, p.8-9.

Wang, L.; Chen, W.; Xu, D.; Sup, S. B.; Zhu, Y.; Sun, F.; Liu, L.; Peng, C.; Jin, Z.; Xu, C.; Kotov, N. (2009). Simple, Rapid, Sensitive, and Versatile SWNT-Paper Sensor for Environmental Toxin Detection Competitive with ELISA. *Nano Letters*, 9(12), 4147–4152. doi:10.1021/nl902368r.

Wang, Y.; Mao, Z.; Zhang, M.; Ding, G.; Sun, J.; Du, M.; Liu, Q.; Cong, Y.; Jin, F.; Zhang, W.; Wang, J. (2019). The uptake and elimination of polystyrene microplastics by the brine shrimp, *Artemia parthenogenetica*, and its impact on its feeding behavior and intestinal histology. *Chemosphere*. doi:10.1016/j.chemosphere.2019.05.267.

Weisz, P. B. (1947). The histological pattern of metameric development in *Artemia salina*. *Journal of Morphology*, 81(1), 45–95. doi:10.1002/jmor.1050810103.

West-Eberhard, M. J. (1989). *Phenotypic Plasticity and the Origins of Diversity*. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 20(1), 249–278. doi:10.1146/annurev.es.20.110189.001341.

Westphal, E.; Rocha, R.C.T.; Winnischofer, H.; Zanchet, D. (2006). Estudo do mecanismo de formação de nanopartículas triangulares de prata a partir de soluções coloidais. *29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*.

Williams, D. F. (2009). On the nature of biomaterials. *Biomaterials*, 30(30), 5897–5909. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.07.027.

Wimmer, A.; Markus, A. A.; Schuster, M. (2019). Silver Nanoparticle Levels in River Water: Real Environmental Measurements and Modeling Approaches—A

Comparative Study. *Environmental Science & Technology Letters*. doi:10.1021/acs.estlett.9b00211.

Wu, H.-C.; Chang, X.; Liu, L.; Zhao, F.; Zhao, Y. (2010). Chemistry of carbon nanotubes in biomedical applications. *Journal of Materials Chemistry*, 20(6), 1036–1052. doi: 10.1039/b911099m.

Wu, Y.; Li, X.; Steel, D.; Gammon, D.; Sham, L. J. (2004). Coherent optical control of semiconductor quantum dots for quantum information processing. *Physica E: Low-Dimensional Systems and Nanostructures*, 25(2-3), 242–248. doi:10.1016/j.physe.2004.06.023.

Yao, K.; Lv, X.; Zheng, G.; Chen, Z.; Jiang, Y.; Zhu, X.; Wang, Z.; Cai, Z. (2018). Effects of carbon quantum dots on aquatic environments: Comparison of toxicity to organisms at different trophic levels. *Environmental Science & Technology*. doi:10.1021/acs.est.8b04235.

Yu, S.; Chow, G. M. (2004). Carboxyl group (–CO<sub>2</sub>H) functionalized ferrimagnetic iron oxide nanoparticles for potential bio-applications. *Journal of Materials Chemistry*, 14(18), 2781–2786. doi:10.1039/b404964k.

Zanchet, D.; Hall, B. D.; Ugarte, D. (2000). Structure Population in Thiol-Passivated Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 104(47), 11013–11018. doi:10.1021/jp0017644.

Zarbin, A. J. G. Química de (nano) materiais. *Química Nova*, v. 30, n. 6, p. 1469–1479, 2007.

Zhang, L.; Petersen, E. J.; Zhang, W.; Chen, Y.; Cabrera, M.; Huang, Q. (2012). Interactions of <sup>14</sup>C-labeled multi-walled carbon nanotubes with soil minerals in water. *Environmental Pollution*, 166, 75–81. doi: 10.1016/j.envpol.2012.03.008.

Zhang, T.; Han, S.; Guo, W.; Hou, F.; Liu, J.; Yan, X.; Chen, S.; Liang, J. (2019). Continuous carbon nanotube composite fibers for flexible aqueous lithium-ion

batteries. *Sustainable Materials and Technologies*, 20, e00096. doi:10.1016/j.susmat.2019.e00096.

Zhang, X.-F.; Liu, Z.-G.; Shen, W.; Gurunathan, S. (2016). Silver Nanoparticles: Synthesis, Characterization, Properties, Applications, and Therapeutic Approaches. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9), 1534. doi:10.3390/ijms17091534.

Zhao, X.; Liu, R. (2012). Recent progress and perspectives on the toxicity of carbon nanotubes at organism, organ, cell, and biomacromolecule levels. *Environment International*, 40, 244–255. doi:10.1016/j.envint.2011.12.003.

Zheng, B.; Shi-Chun, S. (2013). Review of the biogeography of *Artemia* Leach, 1819 (Crustacea: Anostraca) in China. *International Journal of Artemia Biology*, Vol 3, No 1: 20-50.

Zheng, B.; Sun, C-S. (2008). Taxonomic consideration of eight Chinese bisexual *Artemia* populations, based on the morphology of frontal knob and gonopod and the result of cross-breeding tests. *Zootaxa*, 25–44.

Zheng, X.; Zhu, L.; Yan, A.; Wang, X.; Xie, Y. (2003). Controlling synthesis of silver nanowires and dendrites in mixed surfactant solutions. *Journal of Colloid and Interface Science*, 268(2), 357–361. doi:10.1016/j.jcis.2003.09.021.

Zhu, Y.; Zhao, Q.; Li, Y.; Cai, X.; Li, W. (2006). The Interaction and Toxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes with *Stylynychia Mytilus*. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6(5), 1357–1364. doi:10.1166/jnn.2006.194.



LABORATÓRIO DE CULTIVO E ECOTOXICOLOGIA - LACE



## APÊNDICE A - PROTOCOLO DE DESCONTAMINAÇÃO DA ÁGUA DO MAR

A água do mar utilizada para eclosão dos cistos foi proveniente da Praia de Tamandaré, localizada no litoral sul do estado de Pernambuco. Essa água é transportada para Departamento de Oceanografia (DO) - UFPE em carros Pipa e depositada em caixas d'água de 5000 L e 1000 L, onde inicialmente é submetida ao processo de cloração. Neste processo, o cloro granulado é diluído numa concentração de  $3,8 \text{ mgL}^{-1}$ , deixando-se em repouso por 24 horas sem aeração. Após este período, é colocado pontos de aeração na água do mar clorada para que o cloro evapore. Em seguida, a água do mar clorada é filtrada com filtro cilíndricos de polipropileno de  $5 \mu\text{m}$  e passada novamente pelo processo de cloração. Para conferir se todo o cloro foi evaporado, é utilizado teste de aquário e caso seja confirmado a presença de cloro na água, espera-se por mais tempo a saída do cloro. Antes do uso a água é novamente filtrada pelo mesmo processo descrito acima e a armazenada em galões de plástico para diversos tipos de uso, entre os quais para eclosão de cistos de artêmias.

## **APÊNDICE B - SEQUÊNCIA DIDÁTICA: NANOTECNOLOGIA A TRANSPOSIÇÃO DO SABER ACADÊMICO AO SABER ESCOLAR**

O que a pesquisa nos legou no âmbito do aprender a ensinar?

Sabe-se que enquanto pesquisadores nosso objetivo maior é difundir, divulgar o que o conhecimento nos revelou. Pensando enquanto pesquisadora/educadora, tomei a liberdade de construir este capítulo para que a descoberta que hoje se consolida, chegue até nossos estudantes.

A escola, na Educação Básica, representa o *locus* do saber formal e a sala de aula, corresponde ao espaço onde este saber é construído e sistematizado, com base nos conhecimentos científicos e nos conhecimentos prévios dos estudantes. Neste processo dialético em que a concepção do saber acontece pela relação entre o que é ensinado e o que é aprendido, é de relevância destacar o papel do professor como mediador do conhecimento, uma vez que este é o profissional responsável pela transposição didática do conhecimento científico em conhecimento escolar.

De acordo com Chevallard (1991) a transposição didática corresponde a um procedimento pedagógico em que conteúdos acadêmicos são transformados em conteúdo de ensino e aprendizagem. Neste processo, o professor pode fazer uso de estratégias metodológicas diferentes para ensinar um conteúdo científico.

Desse modo, passamos agora a criar possibilidades para dialogar com esses jovens sobre como este conhecimento foi produzido e o que podemos fazer para que os estimule também a desenvolver gosto pela descoberta do novo, do que ainda não conhecemos. E neste contexto, a sequência didática foi a estratégia metodologia escolhida para transpor um dos saberes específicos desta pesquisa, uma vez que é a metodologia de ensino que vem sendo vivenciada nas formações continuada promovidas pela Secretaria de Educação de Pernambuco desde 2013.

Apontada como uma das mais relevantes estratégias de transposição do conhecimento científico, a sequência didática, vem sendo recomendada ao professor da Rede Pública Estadual, usá-la como uma das ferramentas pedagógicas de ensino para vivenciar os conteúdos formais em sala de aula.

Considerada como uma sequência de atividades progressivas, planejadas, dirigidas por um tema, um objetivo geral ou por uma produção (MASSERON,1996) a elaboração e aplicação desta atividade didática deve partir do seguinte pressuposto:

- Do conhecimento prévio dos estudantes sobre determinado conteúdo formal.
- Do mapeamento das informações que os estudantes precisam aprender sobre o conteúdo vivenciado.
- Da organização da aprendizagem a partir do grau de complexidade e do objeto de estudo, adequando os conteúdos ao nível de desenvolvimento do aluno.
- Da definição da trajetória de aprendizagem a ser empregada para transformar as capacidades dos estudantes, provocando um conflito cognitivo e promovendo a atividade mental.
- Por fim, do incentivo ao desenvolvimento a atitude favorável e motivadora em relação a aprendizagem dos novos conteúdos, ajudando o estudante a adquirir habilidade alusiva com o aprender a aprender que lhe permita ter autonomia em sua aprendizagem.

A sequência didática descrita nesta seção apresenta conteúdos relacionados com o cotidiano dos estudantes. Nela os alunos poderão perceber que a Química é um componente curricular importante para sua formação cidadã, pois tem proporcionado ao homem uma melhor qualidade de vida (longevidade e conforto), através do desenvolvimento de técnicas e produtos que visem a busca para elucidação de problemas ambientais entre outros. Por outro lado, os nanomateriais que fazem parte da constituição de equipamentos, como televisões, celulares, entre outros e alguns produtos, tais como creme dental, fármacos, tintas etc. quando descartados de forma inadequada no ambiente, podem ocasionar consequências danosas.

## SEQUÊNCIA DIDÁTICA

### 1. EIXOS TEMÁTICOS

QUÍMICA	BIOLOGIA
I: Propriedades dos Materiais	I: Interações com os Seres Vivos.
II: Constituição dos Materiais	
III: Transformações dos Materiais	

### 2. COMPONENTE CURRICULAR: Química e Biologia

3. **ANO:** 1<sup>o</sup>; 2<sup>o</sup>; 3<sup>o</sup> do Ensino Médio.

4. **TEMPO:** Quatro aulas de 50 minutos.

5. **TEMAS:** O uso de nanomateriais na fabricação de produtos industrializados: causas, consequências e formas de detecção nos ecossistemas aquáticos. O papel de bioindicadores na detecção de micropoluentes.

### 6. CONTEÚDOS:

QUÍMICA	BIOLOGIA
Compostos Químicos	Integrando a diversidade biológica
Ligações Químicas	Questões Ambientais e Sustentabilidade
Processos de oxi-redução	Saúde Ambiental
Transformações químicas	
Propriedades dos nanomateriais	
Estratégias de detecção da presença de nanomateriais nos ecossistemas aquáticos	

### 7. Expectativas de aprendizagens:

QUÍMICA	BIOLOGIA
EA4; EA46; EA30; EA60; EA65; EA67; EA84	EA5; EA14; EA17

**8. OBJETIVOS:**

- Conceituar e listar nanomateriais que podem ser encontrados em produtos do cotidiano;
- Identificar propriedades de materiais em escala nano;
- Conhecer os tipos de estratégias (organismos vivos ou instrumentos) utilizados na detecção de nanomateriais em matrizes aquáticas;
- Identificar os tipos de transformações físicas e químicas que podem sofrer os nanomateriais quando descartados de forma inadequada nos ecossistemas aquáticos;
- Relacionar as possíveis consequências ocasionadas pelas transformações físicas e químicas de nanomateriais em ambientes aquáticos, nos organismos inclusive no homem;
- Emitir juízo de valor a respeito da produção e da aplicação de nanomateriais em produtos industrializados, reconhecendo quais os benefícios e efeitos que podem ocasionar nos ambientes aquáticos, nos animais e no homem.

**9. RECURSOS DIDÁTICOS:**

- Vídeos **Tudo sobre Nanotecnologia**  
*<https://www.youtube.com/watch?v=GtBVnlhHheg> e 5 invenções da nanotecnologia* *<https://www.youtube.com/watch?v=9cO4Ze3Ccmk>*
- Livros didáticos
- Xerox de textos (entrevistas e reportagens): Texto 1: **O que é nanotecnologia**, do professor *Cylon Gonçalves da Silva*; Texto 2: **O futuro é nanotecnológico**, do professor *Petrus Santa Cruz*; Texto 3: **Nanotecnologia une diferentes visões de ciência**, da professora *Susana Dias*; Texto 4: **A fabricação de nanoestruturas**, do professor *Roberto Belisário*; Texto 5: **Vantagens e riscos da nanotecnologia ao meio ambiente**, da professora *Sara Nani*.
- Reportagem **sensor de poluentes**  
*<https://www.youtube.com/watch?v=EqgXub2kG-k> (acessado em: 04.07.2019)*
- Computador.
- Datashow.

- Cartolinas.
- Pilotos.

## 10. METODOLOGIA

### 1ª Etapa

- Inicie a atividade fazendo, no grande grupo, uma sondagem do que os estudantes sabem a respeito do que sejam nanomateriais e nanotecnologia e registre as falas dos estudantes na lousa.
- Exiba o vídeo **Nanotecnologia o que é isso.** <https://www.youtube.com/watch?v=GtBVnlhHheg> (acessado em: 04.07.2019).
- Separe os estudantes em pequenos grupos, distribua cartolinas e pilotos e solicite que escreva quais as informações principais do vídeo **Nanotecnologia o que é isso**, trouxe de diferente para seu conhecimento, no campo da química e apresente no grande grupo
- Sistematize o conteúdo curricular: nanomateriais (propriedades) com slides fazendo uma relação entre a concepção prévia dos estudantes, as informações apresentadas por eles sobre o vídeo e o conteúdo curricular.

### 2ª Etapa

- Divida a turma em grupos pequenos e solicite aos estudantes que realizem uma lista de pelo menos cinco produtos que eles pressuponham que sejam fruto da nanotecnologia, depois requisitem que apresentem no grande grupo as suas listas.
- Exiba o vídeo **5 invenções da nanotecnologia** <https://www.youtube.com/watch?v=9cO4Ze3Ccmk> (acessado em: 04.07.2019) e em seguida promova um debate no grande grupo sobre as considerações do papel da nanotecnologia na aplicação de produtos industrializados a partir da exposição do vídeo.

### 3ª Etapa

- Separe os estudantes em equipes e distribua textos de entrevistas/reportagens sobre nanotecnologia realizadas com pesquisadores desta área (Anexos: **Texto 1:** O que é nanotecnologia; **Texto 2:** O futuro é

nanotecnológico; **Texto 3:** Nanotecnologia une diferentes visões de ciência; **Texto 4:** A fabricação de nanoestruturas; Texto 5: Vantagens e riscos da nanotecnologia ao meio ambiente).

- Atividade para casa: Solicite que cada equipe estude o texto recebido e sistematizem as principais informações em forma do gênero textual folder.
- Exiba a reportagem sobre nanotecnologia <https://www.youtube.com/watch?v=EqgXub2kG-k> (acessado em: 04.07.2019). Realize uma roda de conversa sobre a reportagem exibida entre os estudantes, solicitando que discutam qual o papel do professor/pesquisador, qual a importância desta pesquisa para a sociedade e escreva algumas medidas preventiva que vocês possam aplicar para evitar a entrada de contaminantes/poluentes nos Ecossistemas Aquáticos e apresentem para a turma, através de pequenas frases.
- Peça aos estudantes que se reúna em pequenos grupos e realize em casa uma pesquisa sobre os possíveis micropoluentes que podem ser encontrados nos ecossistemas aquáticos e como podem ser detectados. Depois solicite que apresente no grande grupo.

#### **4ª Etapa**

- Aula expositiva sobre os principais instrumentos, técnicas e bioindicadores (particularmente o microcrustáceo artêmias) na detecção de micropoluentes (analitos) nos ecossistemas aquáticos.
- Incursões pedagógicas: Levar os estudantes ao Departamento de Química Fundamental da UFPE, para conhecer equipamentos usados na detecção de micropoluentes (analitos) em Ecossistemas Aquáticos; e ao Espaço Ciência, para conhecer tipos de transformações químicas e propriedades de nanomateriais a partir da exibição de experimentos pelos monitores. Os estudantes, posteriormente deverão em equipes escrever um relatório sobre as informações obtidas nas excursões e posteriormente entregar.

### **11.AVALIAÇÃO**

Formativa e processual a partir dos seguintes instrumentos avaliativos: 1) Produção do gênero textual folder em equipe; 2) Elaboração e apresentação de

relatórios; 3) entrega e apresentação em equipe de pesquisas realizadas; 4) prova objetiva.

## 12. REFERÊNCIAS

Chevallard, Y. La tranposición didáctica: Del saber sabio al saber enseñado. Traduzida por Claudia Gilman. Editora Aique: Buenos Aires. 1991.

Baptista, D.F.; Buss, D.F.; Egler, M. Macroinvertebrados como bioindicadores de ecossistemas aquáticos contaminados por agrotóxicos. In: PERES, F., and MOREIRA, JC. orgs. *É veneno ou é remédio?: agrotóxicos, saúde e ambiente* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003. p. 157-175. ISBN 85-7541-031-8.

MASSERON, C. (1996) Présentation. *Pratiques*, 92: 3-4.

PERNAMBUCO. Secretaria de Educação do Estado de Pernambuco. Conteúdos de Biologia por bimestre para o ensino médio com base nos Parâmetros Curriculares do estado de Pernambuco. Disponível em [http://www.educacao.pe.gov.br/portal/upload/galeria/7801/Conteudos\\_de\\_Biologia\\_EM.pdf](http://www.educacao.pe.gov.br/portal/upload/galeria/7801/Conteudos_de_Biologia_EM.pdf). Acessado em 05.07.2019.

PERNAMBUCO. Secretaria de Educação do Estado de Pernambuco. Conteúdos de Química por bimestre para o ensino médio com base nos Parâmetros Curriculares do estado de Pernambuco. Disponível em [http://www.educacao.pe.gov.br/portal/upload/galeria/7801/Conteudos\\_de\\_Quimica\\_EM.pdf](http://www.educacao.pe.gov.br/portal/upload/galeria/7801/Conteudos_de_Quimica_EM.pdf). Acessado em 05.07.2019.

PERNAMBUCO. Secretaria de Educação. Parâmetros para a educação básica do Estado de Pernambuco: parâmetros curriculares de Biologia: Ensino Médio. Recife, 2013. Disponível em [http://www.educacao.pe.gov.br/portal/upload/galeria/4171/biologia\\_parametrosem.pdf](http://www.educacao.pe.gov.br/portal/upload/galeria/4171/biologia_parametrosem.pdf). Acessado em 05.07.2019.

PERNAMBUCO. Secretaria de Educação. Parâmetros para a educação básica do Estado de Pernambuco: parâmetros curriculares de Química: Ensino Médio. Recife,

2013. Disponível em [http://www.educacao.pe.gov.br/portal/upload/galeria/4171/quimica\\_parametrosem.pdf](http://www.educacao.pe.gov.br/portal/upload/galeria/4171/quimica_parametrosem.pdf). Acessado em 05.07.2019.

Vettorello, G. et al. (2017). Micropoluentes em água – o novo desafio Emergente. Caderno Pedagógico, Lajeado, v. 14, n. 1, p. 72-83. ISSN 1983-0882.

Reportagem **sobre nanotecnologia- Bom dia Brasil**  
<https://www.youtube.com/watch?v=EggXub2kG-k>. Acessado em 04.07.2019.

Vídeo **Nanotecnologia o que é isso.**  
<https://www.youtube.com/watch?v=GtBVnlhHheg>. Acessado em 04.07.2019.

Vídeo **5 invenções da nanotecnologia**  
<https://www.youtube.com/watch?v=9cO4Ze3Ccmk>. Acessado em 04.07.2019.

**ANEXOS COMPLEMENTARES**

<http://www.comciencia.br/dossies172/reportagens/nanotecnologia/nano10.htm>

**TEXTO 1****O que é nanotecnologia?**

*Professor Cylon Gonçalves da Silva*

Há mais de 2.500 anos, alguns filósofos gregos se perguntavam se a imensa variedade do mundo que nos cerca não pode ser reduzida a componentes mais simples. A própria palavra átomo vem daquele tempo e significa "indivisível". A última fração da matéria, segundo esses filósofos o "tijolo" fundamental de tudo o que existe, não poderia mais ser dividida em outras partes mais simples. Podemos fazer uma comparação elementar, apenas para fins didáticos. Em uma padaria, você encontra uma grande variedade de pães, bolos, biscoitos, tortas, todos produzidos a partir de um pequeno número de ingredientes: farinha, fermento, manteiga, óleo, açúcar, chocolate etc... Muitas vezes, os ingredientes de pães diferentes são os mesmos, apenas mudam suas quantidades relativas e a forma de preparação. Da mesma maneira, quando olhamos o mundo a nossa volta, vemos uma variedade incrível de seres vivos e objetos inanimados, de um grão de areia a galáxia, de um vírus a uma baleia. Quantos tipos de "ingredientes" diferentes são necessários para produzir esse mundo?

Entre os gregos e a nossa época, muito se aprendeu sobre o universo. Sabemos, hoje, que o mundo que nos é familiar é formado por átomos, não exatamente aqueles imaginados inicialmente, mas que com eles compartilham o papel de "tijolos" fundamentais. Aprendemos que, ao contrário do que diz seu nome, eles são, de fato, divisíveis (mas isto é uma história para outra ocasião). Os átomos são formados por um núcleo positivo, onde reside praticamente toda sua massa, e por elétrons, negativos, que circulam em torno do núcleo. Sabemos, também, que ocorrem naturalmente no universo apenas noventa e dois tipos de átomos diferentes. Estes tipos podem ser classificados pelo número de prótons (partículas sub-atômicas de carga elétrica positiva) contidos em seus núcleos. Sabemos ainda que esses átomos podem não ser o fim da história, pois pode haver no universo partículas ou alguma forma de energia ainda não descobertas - ou pode ser que nossas teorias sobre o universo precisem algum dia ser revisadas, se esses novos "ingredientes" não forem encontrados. Tudo isto é parte do mundo fascinante da pesquisa científica - cada pergunta respondida leva a novas perguntas. Em ciência, as respostas raramente são definitivas, mas as perguntas perduram.

A certeza científica de que tudo é feito de átomos é muito recente. Há apenas cerca de cem anos, os cientistas obtiveram evidências fortes de que a velha hipótese atômica, formulada há dois e meio milênios, corresponde à realidade da natureza. No decorrer do século XIX, os químicos foram, aos poucos se convencendo de que a melhor maneira de explicar quantitativamente reações químicas é supondo que essas se dão entre unidades bem definidas de cada composto. Alguns físicos, já quase no final do século XIX, formularam uma teoria "estatística" da matéria, na qual se busca explicar o comportamento dos corpos com os quais lidamos quotidianamente pelo comportamento dessas pequenas unidades "invisíveis" da matéria, os átomos e as moléculas (moléculas são átomos do mesmo tipo ou de tipos diferentes, fortemente ligados entre si, formando novas entidades, com propriedades físico-químicas distintas). Essas teorias foram recebidas, inicialmente, com grande ceticismo pela própria comunidade científica. Por que tanta dificuldade para aceitar uma idéia velha de milênios?

O problema é que átomos são muito pequenos, medem menos de um centésimo de bilionésimo de metro, e obedecem a leis físicas bastante diferentes daquelas com as quais estamos acostumados no nosso mundo familiar. O seu tamanho é tal que não podem ser vistos diretamente. Instrumentos especiais tiveram de ser desenvolvidos antes que fosse possível "ver" um átomo. Um dos mais práticos desses instrumentos, o microscópio de tunelamento, somente foi inventado na década de 1980. Seus inventores, Heinrich Rohrer e Gerd Binnig, dos laboratórios da IBM em Zürich, Suíça, ganharam o prêmio Nobel por seus trabalhos. O funcionamento desse microscópio depende das leis da mecânica quântica, que governam o comportamento dos átomos e moléculas. Portanto, a existência de átomos e as leis da natureza no mundo atômico tiveram de ser pacientemente descobertas a partir de experimentos especialmente concebidos. Este processo levou décadas e envolveu grandes cientistas.

Instrumentos como o microscópio de tunelamento e outros estendem nossa "visão" até tamanhos na faixa de bilionésimo de metro. Um bilionésimo de metro chama-se "nanômetro", da mesma forma que um milésimo de metro chama-se "milímetro". "Nano" é um prefixo que vem do grego antigo (ainda os gregos!) e significa "anão". Um bilionésimo de metro é muito pequeno. Imagine uma praia começando em Salvador, na Bahia, e indo até Natal, no Rio Grande do Norte. Pegue um grão de areia nesta praia. Pois bem, as dimensões desse grão de areia estão para o comprimento desta praia, como o nanômetro está para o metro. É algo muito difícil de imaginar. Mesmo cientistas que trabalham com átomos todos os dias, precisam de toda sua imaginação e muita prática para se familiarizar com quantidades tão pequenas.

Ainda antes dos cientistas desenvolverem instrumentos para ver e manipular átomos individuais, alguns pioneiros mais ousados se colocavam a pergunta: o que aconteceria se pudéssemos construir novos materiais, átomo a átomo, manipulando diretamente os tijolos básicos da matéria? Um desses pioneiros foi um dos maiores físicos do século XX: Richard Feynman. Feynman, desde jovem, era reconhecido como um tipo genial. Uma de suas invenções foi o primeiro uso de processadores paralelos do mundo. Em Los Alamos, na época do desenvolvimento da primeira

bomba nuclear, havia a necessidade de se realizarem rapidamente cálculos muito complexos. Feynman, então, teve a idéia de dividir os cálculos em operações mais simples, que podiam ser realizadas simultaneamente, e encheu uma sala com jovens secretárias, cada qual operando uma máquina de calcular (naquela época não havia computadores, nem calculadoras eletrônicas, e as contas tinham de ser feitas à mão, ou com calculadoras mecânicas limitadas às mais simples operações aritméticas).

Hoje em dia, essa mesma ideia é usada em computadores de alto desempenho, com microprocessadores substituindo as jovens secretárias! Em 1959, em uma palestra no Instituto de Tecnologia da Califórnia, Feynman sugeriu que, em um futuro não muito distante, os engenheiros poderiam pegar átomos e colocá-los onde bem entendessem, desde que, é claro, não fossem violadas as leis da natureza. Com isso, materiais com propriedades inteiramente novas, poderiam ser criados. Esta palestra, intitulada "Há muito espaço lá embaixo" é, hoje, tomada como o ponto inicial da nanotecnologia. A idéia de Feynman é que não precisamos aceitar os materiais com que a natureza nos provê como os únicos possíveis no universo. Da mesma maneira que a humanidade aprendeu a manipular o barro para dele fazer tijolos e com esses construir casas, seria possível, segundo ele, manipular diretamente os átomos e a partir deles construir novos materiais que não ocorrem naturalmente. Um sonho? Talvez, há quarenta anos atrás. Mas, como o próprio Feynman dizia em sua conferência, nada, nesse sonho, viola as leis da natureza e, portanto, é apenas uma questão de conhecimento e tecnologia para torná-lo realidade. Hoje, qualquer toca-disco de CD's é uma prova da verdade do que Feynman dizia. Os materiais empregados na construção dos lasers desses toca-discos não ocorrem naturalmente, mas são fabricados pelo homem, camada atômica sobre camada atômica.

O objetivo da nanotecnologia, seguindo a proposta de Feynman, é o de criar novos materiais e desenvolver novos produtos e processos baseados na crescente capacidade da tecnologia moderna de ver e manipular átomos e moléculas. Os países desenvolvidos investem muito dinheiro na nanotecnologia. Mais de dois bilhões de dólares por ano, se somarmos os investimentos dos Estados Unidos, Japão e União Européia. Países como Coréia do Sul e Taiwan, que têm sido muito melhor sucedidos que o Brasil na utilização de tecnologias modernas para gerar bons empregos e riquezas para seus cidadãos, também estão investindo centenas de milhões de dólares nessa área. Nanotecnologia não é uma tecnologia específica, mas todo um conjunto de técnicas, baseadas na Física, na Química, na Biologia, na ciência e Engenharia de Materiais, e na Computação, que visam estender a capacidade humana de manipular a matéria até os limites do átomo. As aplicações possíveis incluem: aumentar espetacularmente a capacidade de armazenamento e processamento de dados dos computadores; criar novos mecanismos para entrega de medicamentos, mais seguros e menos prejudiciais ao paciente dos que os disponíveis hoje; criar materiais mais leves e mais resistentes do que metais e plásticos, para prédios, automóveis, aviões; e muito mais inovações em desenvolvimento ou que ainda não foram sequer imaginadas. Economia de energia, proteção ao meio ambiente, menor uso de matérias primas escassas, são

possibilidades muito concretas dos desenvolvimentos em nanotecnologia que estão ocorrendo hoje e podem ser antevistos.

No Brasil, a nanotecnologia ainda está começando. Mas, já há resultados importantes. Por exemplo, um grupo de pesquisadores da Embrapa, liderados pelo Dr. L. H. Mattoso, desenvolveu uma "língua eletrônica", um dispositivo que combina sensores químicos de espessura nanométrica, com um sofisticado programa de computador para detectar sabores. A língua eletrônica da Embrapa, que ganhou prêmios e está patenteada, é mais sensível do que a própria língua humana. Ela é um produto nanotecnológico, pois depende para seu funcionamento da capacidade dos cientistas de sintetizar (criar) novos materiais e de organizá-los, camada molecular por camada molecular, em um sensor que reage eletricamente a diferentes produtos químicos. Você pode imaginar alguns usos para uma língua eletrônica? Para saber mais, visite a página [www.cnpdia.embrapa.br](http://www.cnpdia.embrapa.br). Não é só na Embrapa, entretanto, que se faz nanotecnologia no Brasil. O mesmo acontece nas principais universidades e centros de pesquisa do país.

Aplicações em catálise - isto é, na química e na petroquímica, em entrega de medicamentos, em sensores, em materiais magnéticos, em computação quântica, são alguns exemplos da nanotecnologia sendo desenvolvida no Brasil. O que precisamos agora é aprender a transformar todo este conhecimento em riquezas para o país.

A nanotecnologia é extremamente importante para o Brasil, por que a indústria brasileira terá de competir internacionalmente com novos produtos para que a economia do país se recupere e retome o crescimento econômico. Esta competição somente será bem sucedida com produtos e processos inovadores, que se comparem aos melhores que a indústria internacional oferece. Isto significa que o conteúdo tecnológico dos produtos ofertados pela indústria brasileira terá de crescer substancialmente nos próximos anos e que a força de trabalho do país terá de receber um nível de educação em ciência e Tecnologia muito mais elevado do que o de hoje. Este é um grande desafio para todos nós.

<http://sitehistorico.ibict.br/Sala-de-Imprensa/clipping-c-t-1/2015/30-04-2015>

## TEXTO 2

# O futuro é nanotecnológico

**Petrus Santa Cruz**

Quando em 2005 apresentei a palestra *Nanotecnologia e Responsabilidade Social*, no V Fórum Social Mundial, em Porto Alegre, o canadense Pat Mooney, do grupo ETC, estava presente e distribuía panfletos, traduzidos para o português, com conteúdo falacioso, para induzir a formação de uma opinião pública contrária a pesquisas em nanotecnologia no Brasil. Ao perceber, perguntei “a serviço de quem ele estava agindo”, já que seu país continuaria pesquisas na área e nós passaríamos a ser potenciais compradores, caso interrompêssemos nossas pesquisas prematuramente. A resposta foi desconcertada.

Dez anos após este episódio, estando finalmente o País em sintonia com as ondas de inovação de nações desenvolvidas, corremos o risco da desconstrução de um cenário promissor em C&T&I. Refiro-me ao Projeto de Lei 6.741/2013, do Deputado Sarney Filho, com impacto na pesquisa, inovação e produção em nanotecnologia no Brasil. De forma desastrosa, quer por ignorância (no sentido técnico da palavra), quer por interesses econômicos de terceiros, a legislação proposta pode resultar na involução de uma trajetória promissora.

Durante muito tempo, políticas públicas equivocadas e descontinuidades de ações levaram o Brasil a defasagens tecnológicas, nos caracterizando como exportador de commodities e importador de produtos de alto valor agregado. Por não termos investido no momento certo na microeletrônica (durante a quarta onda de inovação), por exem-

plo, hoje precisamos exportar 22 toneladas de minério de ferro para importarmos o equivalente a 1 kg de circuitos integrados. Da interrupção de programas estratégicos, destacamos a separação e purificação das Terras-Raras: 50 anos depois, importamos insumos caríssimos, indispensáveis à indústria, cuja matéria prima, encontrada no País, não é aproveitada.

Agora estamos vivendo a sexta onda de inovação, conforme classifica a Harvard Business School, caracterizada pela nanotecnologia, e o Brasil está finalmente em sintonia com a comunidade internacional, graças a esforços de mais de uma década de inédito diálogo entre o Poder Executivo e a sociedade, resultando em condições favoráveis para a organização da comunidade científica em torno do tema, seguido por instrumentos como a Lei Federal de Inovação, induzindo a aproximação da academia com empresas. Em suma, ações articuladas de curto e longo prazo, para um País tecnologicamente mais independente.

Num contexto defasado cronológica e conceitualmente, o Projeto de Lei 6.741 retrocede ao início deste século, quando os britânicos quiseram propor uma trégua no desenvolvimento da nanotecnologia, mas rapidamente a Royal Society se manifestou, convencendo o Governo de que o caminho era inapropriado. Concluiu-se que a legislação utilizada para o controle de produtos utilizando tecnologias convencionais era compatível com produtos de base nanotecnológica: não é pelo fato das novas propriedades passarem a vir da escala das estruturas, no lugar de virem de novas composições, que se necessita-

va de legislação específica.

Com mais de dez anos de atraso, o Brasil volta a discutir uma legislação defasada inclusive do ponto de vista técnico. Hoje se constatou que as nanotecnologias levam a produtos que, além de inovadores, são obtidos com menos produção de rejeitos, menos gastos de energia, com aplicações exitosas em áreas que incluem energias limpas, monitoramento ambiental e saúde humana – em particular na oncologia, tanto no setor de diagnóstico, quanto no setor de remediação, através de processos e fármacos inovadores. Enquanto isso, em carta aberta, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) aponta o Brasil como o país que mais utiliza agrotóxicos no mundo – muitos já banidos de outros países pelo risco associado ao desenvolvimento de câncer.

O Projeto de Lei 6.741 vem na contramão, confundindo os leigos pela sucessão de equívocos, como se um novo material obtido pelo controle do tamanho das estruturas precisasse ser controlado por legislação diferente da aplicada a um novo material obtido por mudanças em sua composição química!

Será que vamos reproduzir erros, tornando-nos futuros importadores de produtos de base nanotecnológica, vítimas de uma má legislação encoberta por aparentes “boas intenções”?

E fica a pergunta: a quem beneficiaria esta lei?

✉ **Petrus Santa Cruz** é professor do Departamento de Química Fundamental da UFPE, vice-coordenador da Rede SisNano (MCTI) da UFPE, coordenador da Rede Nanobiotec-Brasil 36 (CAPES)

<http://www.comciencia.br/dossies172/reportagens/nanotecnologia/nano09.htm>

### TEXTO 3

#### **Nanotecnologia une diferentes visões de ciência**

*Professora Susana Dias*

As relações entre nanociência e nanotecnologia reproduzem em nível nanométrico as mesmas relações entre ciência básica e as aplicações tecnológicas do conhecimento científico. Manipulando átomos e moléculas, pesquisadores anunciam a possibilidade de criar medicamentos mais eficazes, materiais mais resistentes, computadores com maior capacidade de armazenamento e diversos benefícios sócio-ambientais. "Saber é poder", lembrando desta frase do filósofo inglês Bacon, Mauro Lúcio Leitão Condé, professor do Curso de Especialização em História da Ciência na Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), comenta que "a idéia moderna de ciência como transformadora da natureza apresenta grandes implicações econômicas e a nanotecnologia está neste epicentro".

Quando se fala das pesquisas em nanotecnologia geralmente se distinguem os objetos de estudo, as técnicas utilizadas e os diferentes produtos que serão gerados (nanomagnetismo, metais ultrafinos, drogas nanocristalinas, nanofibras poliméricas e outros). Mas não são apenas estas as diferenças que existem entre as pesquisas. Segundo Condé, existe também uma diversidade de idéias sobre o que é o fazer científico, presentes nos diferentes campos da nanotecnologia. "Neste século, muitos pesquisadores ainda fazem ciência a partir do paradigma clássico. A nanotecnologia, por exemplo, avança em algumas direções, mas ainda permanece em parte presa ao pensamento clássico quando o assunto é a racionalidade científica e a fragmentação do conhecimento".

Ainda existe a idéia da ciência como produtora de uma verdade única e esta idéia ainda orienta a produção de conhecimentos no campo científico, comenta Condé. Porém, a maioria dos cientistas que trabalha com a matemática, por exemplo, pensa a ciência como a busca por uma verdade pontual, a busca pela resposta a certas perguntas, diz o pesquisador. "A matemática define-se muito mais como uma atividade de criação do que como de descoberta ou revelação", conclui. A coexistência de pesquisas que se orientam por múltiplos paradigmas da ciência - que marcaram os séculos XVII, XIX e XX - é uma marca da produção científica multidisciplinar, como a nanotecnológica. Walter Carnielli, diretor do Centro de Lógica, Epistemologia e História da Ciência (CLE), da Unicamp, comenta que "isso não é um problema, não é erradode errado na coexistência dos múltiplos paradigmas dentro da mesma comunidade científica, mas é preciso perceber que existem diferenças que têm que ser reconhecidas".

A nanotecnologia agrega práticas e métodos das ciências naturais e das ciências formais. As ciências formais independem do empirismo, de laboratórios, de experimentação, diferenciando-se das ciências naturais porque lidam com problemas que "existem apenas na cabeça dos cientistas, não têm substância, não se alimentam, são feitos apenas de de hipóteses e de suas conseqüências",

comenta Carnielli. Os sistemas computacionais e os softwares são produtos bastante interessantes das ciências formais. Recentemente, a filosofia tem se dedicado a estudar os problemas que emergem das ciências formais e que envolvem, entre outras áreas, a matemática, as ciências cognitivas, a semiótica, a semiologia e a lógica.

A lógica, por exemplo, se transformou na linguagem básica das ciências formais. Em outras áreas, como na física tradicional, a linguagem utilizada baseia-se largamente no paradigma do cálculo diferencial de Isaac Newton e Gottfried Leibniz do século XVII, diz Carnielli. Essa mudança na linguagem produziu mudanças também nos referenciais das pesquisas, que passaram a depender de questões ligadas ao tempo, à sincronicidade e à assincronicidade, aos agentes e à ética formal, e às lógicas que investigam o que é crer e conhecer o que é consistência e coerência. Todas estas questões precisam ser pesquisadas e conhecidas para serem criados os sistemas computacionais, explica Carnielli. E acrescenta "um dos focos de estudo das ciências formais é o que pode e o que não pode ser expresso por um sistema, o que a matemática, a lógica, e em particular o computador podem ou não expressar, ou seja, os limites que determinam o campo da cientificidade". O reconhecimento do valor epistêmico dos sistemas computacionais tem sido cada vez maior a partir de resultados apresentados por pesquisas como as do campo nanotecnológico, que utilizam simulações computacionais para demonstrar o comportamento de átomos e moléculas. Pesquisadores da Unicamp e USP que descreveram o comportamento dos átomos de nanofios de ouro - um material estratégico para a fabricação de componentes de computadores - alcançaram êxito e precisão graças aos cálculos e simulações realizadas em computadores. Além disso, conseguiram informações inusitadas sobre a organização dos átomos, tornando ainda mais expressiva a importância da simulação por computadores. Ela têm, inclusive, antecipado a própria experiência em grande parte das pesquisas. O uso dos produtos das ciências formais - como os softwares - por pesquisas das ciências naturais podem propiciar economia de tempo e dinheiro.

A inauguração das ciências formais pode ser associada à emergência da geometria não euclidiana de Lobachevsky-Bolyai-Gauss, no século XIX. Essas ciências propõem objetos desvinculados de uma realidade empírica, que "não existiriam" se fossem levados em consideração os referenciais antigos: uma reta que não é reta, um círculo que não é redondo, retas tais que por um ponto fora delas passa mais de uma paralela, ou nenhuma paralela, comenta o filósofo. A física, somente muito tempo depois, passou a utilizar a geometria não euclidiana. De maneira análoga, o século XX concebeu as lógicas não-clássicas. Carnielli conta que começou estudando as lógicas não clássicas, que na época eram consideradas as mais exóticas, "sempre tive a crença de que algum dia isso seria importante, apesar de parecerem naquele momento heterodoxias absurdas. Hoje, estas lógicas são utilizadas na engenharia de software e na teoria de bancos de dados. "O quanto dessa ciência formal será possível utilizar e de que forma?", pergunta Carnielli, para afirmar que essa é uma das inquietações que movimenta hoje a filosofia das ciências formais.

<http://www.comciencia.br/dossies172/reportagens/nanotecnologia/nano05.htm>



## TEXTO 4

### A fabricação de nanoestruturas

*Professor Roberto Belisário*

Para fabricar artefatos extremamente diminutos, podem ser necessárias técnicas bastante diferentes das usadas para objetos macroscópicos. Para a nanotecnologia, que utiliza objetos com diâmetros de até alguns poucos átomos, há várias técnicas possíveis, dependendo do que se quer construir.

Uma muito usada aproveita o fenômeno do crescimento por deposição: quando um gás é colocado na presença de um objeto sólido, em certos casos as moléculas do gás depositam-se lentamente na sua superfície (chamada substrato), fazendo crescer estruturas minúsculas. Trata-se de um fenômeno que acontece naturalmente, quando o gás e o substrato são escolhidos de forma adequada. O processo pode ser tão lento que as moléculas se depositam uma por uma, como é o caso das técnicas usadas em nanotecnologia. A forma e o tamanho da nanoestrutura obtida podem ser controlados com precisão. É possível, assim, obter artefatos na forma de fitas (nanofitas), quando o substrato tem a forma de uma superfície plana; de esferas; ou ainda de tubos (nanotubos), quando o substrato tem a forma de diminutas partículas. As estruturas obtidas não são necessariamente feitas do mesmo material que o gás original (ou seja, constituídas das mesmas moléculas ele), pois o processo pode envolver reações químicas que alteram a molécula. As dimensões estão tipicamente entre um e algumas dezenas de nanômetros (um nanômetro é igual a um milionésimo de milímetro).

### **Nanofitas e nanotubos**

Um exemplo dessa técnica aparece nas pesquisas com as nanofitas feitas no Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos (Ufscar), em São Paulo. Segundo o pesquisador Edson Roberto Leite, essas nanofitas são feitas de óxido de estanho (SnO<sub>2</sub>) e têm largura de cerca de 50 nanômetros, espessura de 10 nanômetros e comprimento de alguns milhares de nanômetros. Uma das aplicações possíveis é

como sensores de substâncias químicas, como monóxido de carbono (CO) e NO<sub>x</sub> em escapamento de carros. Outra utilidade vem da capacidade de as nanofitas aumentarem a condutividade elétrica e térmica de alguns materiais, como o vidro ou polímeros, quando elas são inseridas e espalhadas dentro de uma matriz constituída desses materiais.

Como se constrói fitas tão diminutas? O gás necessário para a deposição é obtido aquecendo-se óxido de estanho (SnO<sub>2</sub>) a 1100 graus. O SnO<sub>2</sub> evapora, só que não na forma original, mas como monóxido de estanho (SnO). Este SnO é o gás que irá se depositar no substrato. O processo é feito na presença de carbono, cujo papel é servir de catalisador (facilitador) do processo de evaporação. A deposição forma uma finíssima película sobre o substrato - a nanofita. Nessa deposição, o SnO sofre uma reação química, e o depósito é feito na forma original, SnO<sub>2</sub>.

Um processo semelhante havia sido desenvolvido por pesquisadores nos Estados Unidos em 2001, publicado na revista *Science* (vol. 291, pág. 1974), mas no qual não se usava o catalisador de carbono. Segundo Edson Leite, o grupo da UFSCar foi o primeiro a conseguir reproduzir os resultados daquela pesquisa, com algumas modificações - como o uso do carbono - o que elevou a eficiência do método (por exemplo, conseguiram usar uma temperatura 300 graus menor do que no processo norte-americano). O trabalho da UFSCar foi publicado em 2002 na revista *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* (volume 2, página 125).

Os nanotubos são obtidos por uma técnica do mesmo tipo. Nanotubos de carbono são uma das maiores estrelas da nanotecnologia, pois a cada ano vem se descobrindo mais e mais utilidades para eles. Segundo Edson Leite, trata-se do material com maior resistência mecânica (resiste à deformação e à quebra) conhecido atualmente. Eles podem ser usados para construir circuitos lógicos, do tipo usado em computadores comuns - no ano passado, conseguiu-se construir o primeiro desses circuitos usando nanotubos de carbono. Essas estruturas são também capazes de conter hidrogênio dentro de si e, por isso, podem ser um meio de guardar essa substância de uma forma segura, para o caso de se usá-la como combustível (o hidrogênio é altamente inflamável e, em depósitos tradicionais, pode explodir). Além disso, é um material condutor. Assim, como as nanofitas, podem dar condutividade elétrica a materiais isolantes, quando são inseridos e espalhados no seu interior.

Para se obter um nanotubo, o substrato necessário tem a forma de pequeninas partículas. Essas partículas já são, por si só, artefatos nanotecnológicos, tendo que ser elas também construídas por técnicas especiais. Esses substratos também servem como catalisadores, sendo por isso chamados nanocompostos catalisadores. Já o gás pode ser alguma substância que contenha carbono em sua molécula. Através de reações químicas entre o gás e as substâncias de que são feitas as nanopartículas, o carbono é depositado ao redor destas. O processo é tal que o material depositado toma naturalmente a forma de diminutos tubos, ao redor das nanopartículas. O diâmetro do nanotubo será determinado pelo diâmetro da nanopartícula. Em geral, está entre 1 e 1,5 nanômetros.

### **Nanopartículas e nanofios**

Nem todos os artefatos nanotecnológicos são construídos por deposição. As nanopartículas catalisadoras usadas para o crescimento dos nanotubos são formadas por decomposição de uma substância submetida a temperaturas muito altas. De acordo com Edson Leite, na UFSCar, essa substância é um polímero que tem, espalhados dentro de si, íons (átomos carregados eletricamente) de algum metal adequado, como ferro ou cobalto, além de uma matriz de sílica ou de óxido de titânio. Submetido a alta temperatura, esse material se decompõe e produz um óxido (de silício, por exemplo), e mais as nanopartículas que serão usadas no crescimento dos nanotubos.

Os pesquisadores da Ufscar fizeram um pedido de patente desse processo para a Fapesp (Fundação para o Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo). Segundo Edson Leite, algumas indústrias nacionais também manifestaram interesse na técnica.

Uma técnica inteiramente diferente é usada para produzir filamentos nanométricos no Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), em Campinas. A principal motivação para se estudar essas estruturas é que, segundo se imagina, aparelhos eletrônicos nanotecnológicos deverão conter, entre outras coisas, partes na forma de fios. Como o ouro resiste muito bem à corrosão, usa-se esse metal para fazer essas nanoestruturas. Segundo Daniel Ugarte, líder dessas pesquisas no LNLS, a técnica para a obtenção desses nanofios consiste basicamente em fazer vários buracos diminutos em uma chapa muito fina. A parte entre dois buracos próximos toma a forma de um filamento composto de alguns átomos de espessura. Os buracos, eles próprios com alguns nanômetros de diâmetro, são feitos por feixes ("jatos") de elétrons, obtidos de um microscópio eletrônico.

Na verdade, os pesquisadores do LNLS observaram que esses nanofios "esticam-se" antes de se quebrarem e, logo antes do rompimento, chegam à espessura de um único átomo. Para provocar esse rompimento, os cientistas fazem vários buracos na placa, até que ela se torne muito fraca e os espaços entre os orifícios (os nanofios) comecem a se partir.

<http://www.comciencia.br/dossies172/reportagens/nanotecnologia/nano04.htm>



## TEXTO 5

### **Vantagens e riscos da nanotecnologia ao meio ambiente**

*Professora Sara Nani*

A manipulação da matéria na escala nanométrica, num bilionésimo de metro, tem produzido efeitos positivos na área ambiental. As resinas magnéticas têm a capacidade de remover metais de um meio aquoso, o que pode ser utilizado no tratamento de efluentes. As nanopartículas são capazes de remover contaminantes onde não há eficácia de outros processos químicos. Há quem defenda a nanotecnologia como a garantia de que o mundo atingirá, enfim, o desenvolvimento sustentável. Ao mesmo tempo que as vantagens dessa tecnologia são nítidas para o meio ambiente, alguns especialistas começam a atentar para o impacto dos nanomateriais na saúde do ser humano e na natureza.

#### **Nanopartículas**

As nanopartículas carregam a promessa de solucionar problemas ambientais. Um projeto coordenado pelo professor e pesquisador Paulo César de Moraes, da Universidade de Brasília (UnB), futuramente poderá ser usado no processo de despoluição de águas que receberam derramamento de óleo. Desde janeiro de 2001, 20 pesquisadores da UnB, da Universidade Federal de Goiás (UFG) e da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ) trabalham no desenvolvimento de compósitos magnéticos (materiais que resultam de dois ou mais materiais), para serem utilizados na remoção de óleo derramado em água, e de uma tecnologia de remoção da mistura de óleo e compósito usando campo magnético externo. O projeto está sendo financiado com recursos do Fundo Nacional do Petróleo (CTPetro) administrado pela Financiadora de Estudos e Projetos (Finep).

O projeto utiliza uma matriz de polímero poroso na forma de micro-esferas, no qual são depositadas nanopartículas magnéticas através de síntese química. As micro-esferas poliméricas têm sua superfície externa tratada quimicamente para que se comporte de forma hidrofóbica. Assim, quando são colocadas numa mistura de água e óleo, as micro-esferas fogem da fase aquosa para as manchas (ou fases) de óleo. Nas manchas de óleo, as micro-esferas hidrofóbicas tendem a se dispersar homogeneamente, formando o que os cientistas chamam de fluido reológico. Como as micro-esferas são magnéticas porque contêm nanopartículas magnéticas em sua estrutura nanoporosa, elas são atraídas por um ímã e acabam arrastando consigo o óleo, que também se comporta hidrofobicamente. “Esse comportamento é a base

para as estratégias de retirada de óleo [petróleo ou derivados] da água, e poderá auxiliar na implementação de tecnologias de despoluição de águas após o derramamento dessas substâncias”, explica Moraes.

Segundo o pesquisador, o projeto já está sendo testado no Departamento de Engenharia Mecânica da UnB. “Testes preliminares em um pequeno canal d’água estão produzindo resultados bastante promissores”, afirma Moraes. Ele explica que os testes finais deverão ser realizados em uma bancada de testes com espelho d’água de cerca de 2,5 metros quadrados. O projeto, na forma como foi concebido, não prevê a realização de testes de campo. Porém, a equipe envolvida nesse trabalho aguarda a parceria com empresas privadas para uma próxima etapa no desenvolvimento da tecnologia, na qual a prática será contemplada.

### **Nanocatalisadores**

O desenvolvimento de nanocatalisadores também contribui para retirar do ambiente substâncias poluentes, como os compostos do petróleo. O professor Jairton Dupont, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), desenvolveu nanocatalisadores que diminuem a concentração de compostos aromáticos durante as fases de refino do petróleo. Eles são úteis a um processo de catálise que resulta no ciclo-hexano, molécula menos danosa ao meio ambiente. Dessa forma, a combustão de motores à gasolina é mais completa e não deixa no ar resíduos poluentes, que podem ser cancerígenos e contribuir para a formação da chuva ácida.

Os nanocatalisadores foram formulados pelo Laboratório de Catálise Molecular da UFRGS, e são constituídos de grupos de 300 átomos de irídio (elemento químico com diâmetro médio de dois nanômetros, ou dois milionésimos do milímetro). Esses grupos recebem o nome de nanoclusters e são eficientes para substituir os dispendiosos processos industriais nas refinarias para eliminar os compostos aromáticos. Até fevereiro deste ano, o projeto contou com financiamento do CTPetro. Dupont agora está negociando a produção em escala comercial com uma grande empresa.

### **Riscos**

Ainda é bastante incipiente a discussão sobre os aspectos negativos da nanotecnologia no meio ambiente. Porém, na metade do mês de março, numa reunião realizada na US Environmental Protection Agency (EPA), órgão do governo dos Estados Unidos para a proteção do meio ambiente, pesquisadores relataram que foram encontradas nanopartículas no fígado de animais usados em pesquisas. Segundo a EPA, elas podem vazar em células vivas e, talvez, entrar na cadeia alimentar através de bactérias.

Os cientistas reclamam que o uso comercial do carbono em escala 185anométrica não possui regulamentações, ou um corpo de leis para supervisionar essa nova tecnologia. Mesmo sem esse cuidado, empresas já estão produzindo toneladas de nanomateriais para que sejam usados como catalisadores, em cosméticos, tintas, revestimentos e tecidos. Outro agravante apontado por eles é o fato de que alguns materiais são compostos familiares que nunca foram

comercializados, enquanto outros materiais são produzidos a partir de elementos atômicamente modificados que não existem na natureza. Portanto, seus efeitos negativos são ainda desconhecidos pelos cientistas. Por exemplo, algumas das novas formas de carbono, como nanotubos, estão sendo produzidas pela primeira vez.

“A nanotecnologia, incluindo a nanobiotecnologia, tem sido divulgada pelas indústrias e pelos governos como a próxima revolução industrial, a maior e a mais rápida do mundo. Mais de 450 empresas dedicadas à nanotecnologia já estão no mercado produzindo uma gama de produtos da ‘nano velha’, como partículas usadas em cosméticos e atomizadores, e produtos da ‘nano nova’, como chips, sensores e novas formas de carbono. É preciso que o setor industrial se empenhe para que as preocupações relativas à saúde e ao meio ambiente não se desviem do progresso da nanotecnologia”, afirmaram os pesquisadores na reunião da EPA. A US National Science Foundation estima que, dentro de dez anos, todo o setor de semicondutores e a metade do setor farmacêutico dependerão da nanotecnologia e que, até 2015, o mercado global envolvido por ela será de um trilhão de dólares.



## ANEXO A - ETAPA DE ECLOSÃO E EXPERIMENTO DE SOBREVIVÊNCIA

### ETAPA DE ECLOSÃO

Nesta etapa, foram utilizadas tanto soluções salinas sintéticas preparadas com água destilada e cloreto de sódio (NaCl) de pureza analítica (PA) não iodado, quanto água do mar proveniente da Praia de Tamandaré - PE, descontaminada (apêndice 1).

As soluções salinas sintéticas foram preparadas com água destilada e cloreto de sódio (NaCl) de pureza analítica (PA) não iodado, medido em balança analítica de precisão. Com auxílio de um densímetro com agulha interna (Figura 1), foi possível elaborar uma tabela correlacional com os valores da densidade e da salinidade. (Tabela 1).

Figura 1- Densímetro.



Fonte: AUTORA (2020).

Tabela 1 - Correlação entre os valores da salinidade e da densidade.

SALINIDADE (mg L <sup>-1</sup> )	DENSIDADE (g L <sup>-1</sup> )
0	< 1.010
10	< 1.010
30	1.014
35	1.023
60	1.029
120	1.030

Fonte: AUTORA (2020).

Para a eclosão das larvas naupliares foi utilizado um recipiente de forma cônica (Figura 2: A e B). Em cada eclosão foram utilizados de 0,3 a 0,5 g de cistos de *Artemia* sp adquiridos de loja aquarista, procedentes das salinas de MacaúRN/BR. Dependendo do tipo de recipiente foi utilizado 0,5 ou 1 L de água do mar descontaminada ou solução salina sintética de (35 g L<sup>-1</sup>), nos quais os cistos foram depositados, incubados e submetidos à aeração artificial, durante um período que variou entre 24h a 72h em pH em de 8,5 (SORGELOOS, et al. 2001), para induzir a eclosão.

Figura 2 (A e B) - Recipientes de eclosão dos cistos.



Fonte: AUTORA (2020).

O sistema de eclosão foi iluminado por lâmpada halógena da marca Osram, com 70 w de potência, disposta a uma distância que permitiu uma radiação controlada de aproximadamente 1000 lux, aferida por Luxímetro Minipa modelo MLM-1011, para ajudar na eclosão das larvas e, posteriormente, para separá-las das cascas dos cistos, já que as mesmas, apresentam fototropismo positivo, movimento de certos organismos vivos em direção a estímulos luminosos.

O calor emitido pela lâmpada foi utilizado para manter a temperatura da água entre 25 e 27 °C, enquanto que a temperatura ambiente do laboratório foi controlada em torno de 22 °C. A luminosidade foi controlada por luxímetro Digital MIm-1010 Minipa e a temperatura foi monitorada com auxílio de termômetro duas vezes ao dia; uma no período da manhã e outra no final da tarde.

Sempre que necessário o pH foi ajustado para 8,5 adicionando-se lentamente carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) diluído em água salina de concentração 35 g L<sup>-1</sup>, mantendo sempre a agitação durante e após o ajuste, com a finalidade de deixar a solução homogeneizada e o pH na faixa ideal, para se obter o máximo de eclosão.

As larvas naupliares eclodiram entre 48 e 72 horas, média do tempo necessário para chegar à fase Ínstar I. Ínstar é o estágio larval que ocorre entre duas mudas, desde a eclosão da larva até ao fim da última fase larval, ou seja, é o estágio de desenvolvimento da larva ao longo do tempo até atingir a sua maturidade sexual (SOJACK, 1995).

As larvas ínstar I, após a eclosão foram depositadas em outro recipiente com solução salina de 35 g L<sup>-1</sup> ou submetidas às mesmas condições abióticas descritas acima, durante 24 horas. Após o período de um dia, as larvas naupliares agora já nas fases de ínstars II e III foram cuidadosamente separadas e transferidas com auxílio de pipeta de *Pasteur*, para um recipiente de retirada de sal e permaneceram neste recipiente por cerca de 30 minutos, de forma a minimizar o efeito do sal. Para em seguida, serem submetidas a experimento de sobrevivência ou de exposição ao micropolvente modelo NP Ag.

## EXPERIMENTO DE SOBREVIVÊNCIA

Neste experimento, foram realizados três testes. A Figura 3 (A e B) representam os sistemas onde estes foram desenvolvidos.

Figura 3 (A e B) - Recipientes utilizados nos experimentos de sobrevivência.



Fonte: AUTORA (2020).

Para a efetivação dos bioensaios em que as larvas naupliares foram utilizadas como concentrador vivo para incorporação de Np Ag, testes de sobrevivência com estas larvas, desprovidas de alimentação, foram realizados para conhecer o comportamento desses animais em diferentes condições abióticas e consequentemente, identificar a melhor condição de sobrevivência.

Os ínstares II e III provenientes do experimento de eclosão, foram submetidos a diferentes concentrações salinas e pH, conforme descrito na tabela 2.

Tabela 2 – Resumo das condições dos Experimentos de Sobrevivência.

PARÂMETROS	CONDIÇÃO
Tipo de teste	Estático sem renovação de água
Recipiente teste	Recipientes de vidro; Placas de multiwel com 24 poços
Total de recipientes testes utilizados	60; 18
Total de volume de cada amostra teste	4 mL ; 2 mL
Água de diluição ou Água do mar	Água destilada ou Água do mar descontaminada
Quantidade de NaCl em cada concentração-teste	0 g; 0,5 g; 1,0 g; 1,5 g; 1,75 g; 3,0 g; 4,5 g; 6,0 g; 9,0 g
Concentrações-teste (mg L <sup>-1</sup> )	0; 10; 20; 30; 35; 60; 90; 120; 180
Número de concentrações teste	06; 03 incluindo o controle
Número de réplicas/concentração	10
Fases naupliares	Ínstares II e III
Número de larvas naupliares/recipiente	05; 04
Número total de larvas utilizadas	300; 72; 108
Alimentação durante o ensaio	Não
Temperatura de incubação	25 a 27 ± 1° C
Qualidade de luz	Luz quente, tipo halógena
Intensidade luminosa	1000 lux
Fotoperíodo	12 h luz; 12 h escuro
pH	8,5
Duração do teste	48 h; 72 h
Valor medido	Percentual de mortalidade ou sobrevivência em cada concentração teste
Resposta	Mortalidade ou sobrevivência

Fonte: AUTORA (2020).

Todo o procedimento experimental foi realizado dentro de uma câmara de fluxo laminar vertical classe 100 com o vidro parcialmente fechado e filtro EPA. As larvas naupliares utilizadas nesses experimentos não foram alimentadas.



## ANEXO B - PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA

(PASSO A PASSO)

- 1) Recolher aproximadamente **50mg** de tecido da amostra e lavá-lo **2 vezes** com **500µl** de **Tris-EDTA** (composto por 20mM de Tris-HCl em pH 8.0 + 100 mM de EDTA).
- 2) Em um tubo com a amostra, adicionar **300µl** de **tampão de extração** na amostra e macerá-la. Em seguida, colocar mais **392µl** desse mesmo tampão (volume final do tampão deve ser de 692µl).
- 3) No mesmo tubo, adicionar **1,75~2µl** de **SDS 20%** e **7µl** de **proteínase K** a 10mg/ml na amostra de modo que a concentração final seja: 0.05% SDS e 100µg/ml de proteínase K.
- 4) Incubar o tubo com a amostra no banho-maria a **50 °C** por **2 horas** e, em seguida, a **37 °C** por **12 horas** (overnight).
- 5) No dia seguinte, adicionar na amostra **700µl** de **fenol** e homogeneizar no termoshaker a **70 rpm** por **1 hora** (no caso de se almejar alto peso molecular) ou agitar no vórtex (quando a finalidade for exclusivamente PCR, sem necessidade de alto peso molecular).
- 6) Levar o tubo à centrifuga, configurada em **13500 rpm** e **20°C**, durante **15 minutos**.
- 7) Transferir, com ponteira cortada, o sobrenadante para um novo tubo e adicionar **700µl** de **PCI** (25:24:1) e homogeneizar por alguns minutos no termoshaker.
- 8) Repetir o procedimento da **etapa 6**.

- 9) Novamente, transferir o sobrenadante, com ponteira cortada, para um novo tubo e adicionar **700µl** de **clorofórmio**. Homogeneizar no vórtex ou no termoshaker, de acordo com o objetivo (**ver a etapa 5**).
- 10) Repetir o procedimento da **etapa 6**.
- 11) Transferir, mais uma vez, o sobrenadante (com ponteira cortada), para um novo tubo de 1,5ml e adicionar **1000µl** de **etanol absoluto**. Deixar em repouso por **30 minutos**.
- 12) Após o repouso, agitar o tubo manualmente (não usar o vórtex se almejar peso molecular) e em seguida centrifugar a **13500 rpm** a **22 °C** por **30 minutos**.
- 13) Observar, no fundo do tubo, um precipitado formado chamado **pellet**. Em seguida, descartar o etanol em um Becker (sem remover o pellet) e adicionar **500µl** de **etanol a 70%**, lavando toda a parede do tubo durante a adição.
- 14) Centrifugar, em **13500 rpm** e **20°C**, por **10 minutos**.
- 15) Descartar no Becker o etanol a 70% cuidadosamente e secar o pellet à temperatura ambiente.
- 16) Ressuspender a amostra em aproximadamente **50µl** de **TE**.

#### Preparação de alguns reagentes:

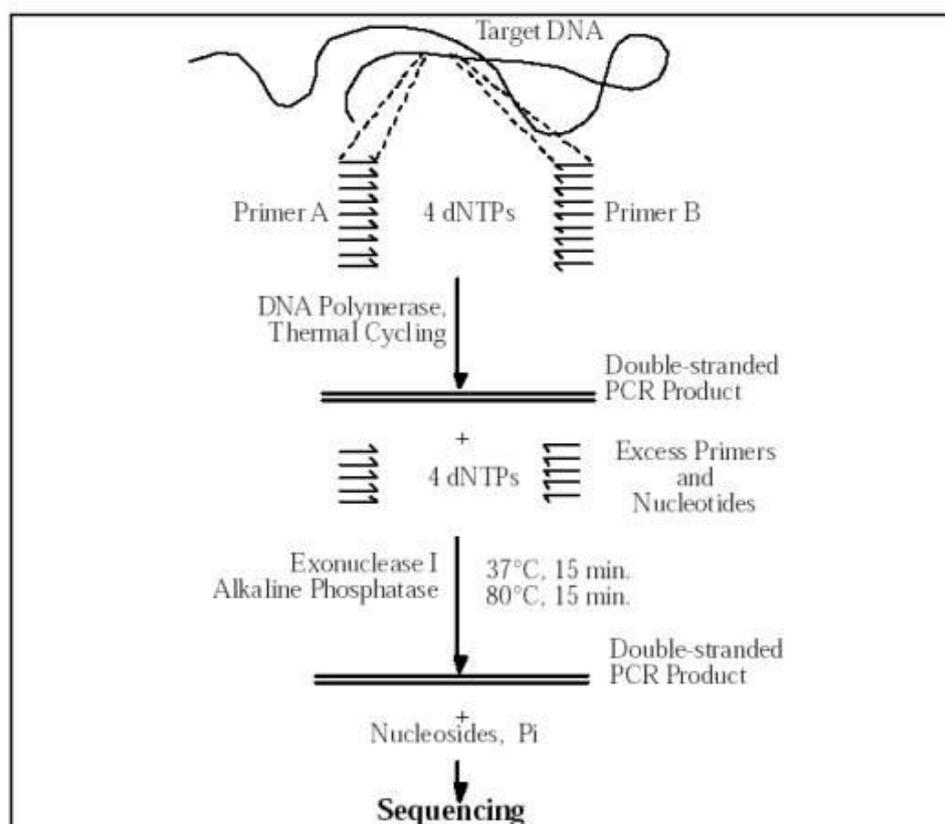
Tampão de extração	PCI:	Cuidados a serem tomados:
(100mM de NaCl + 20mM de Tris-HCl em pH = 8.0) + 100mM de EDTA): P/ 100ml de tampão de extração: - 10ml de NaCl a 1M - 2ml de Tris-HCl a 1M - 10ml de EDTA a 100mM - 78ml de H <sub>2</sub> O (destilada e autoclavada)	- 350µl de fenol - 336µl de clorofórmio - 14µl de álcool  Homogeneizar por 5 minutos antes de usar	- sempre utilizar luvas durante todo o experimento;  - manusear o fenol em condições apropriadas por conta do odor forte;  - as etapas 5, 7, 9 e 11 devem ser utilizadas ponteiros com filtro para evitar a oxidação e descalibragem da pipeta devido ao fenol;  - deixar as amostras equilibradas dentro da centrífuga para evitar a descalibragem da balança.



## ANEXO C - PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO DE PRODUTOS DE PCR COM EXO/SAP PARA SEQUENCIAMENTO

Baseado em Exonuclease I, Shrimp Alkaline Phosphatase PCR Purification Protocol da **Amersham Pharmacia Biotech**

Figura 1- Purificação de produtos de PCR com Exo/SAP.



Método de purificação de produtos de PCR que utiliza Exonuclease I (Exo I) para digerir excesso de primers e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) para degradar excesso de nucleotídeos provenientes da PCR (Figura 1).

A reação de PCR faz uso de dois primers, dNTPs e DNA polimerase para produzir múltiplas cópias de uma seqüência de DNA específica. Quando a reação termina a maior parte dos primers e dNTP permanece intacta, e, se não retirados, irão interferir no sequenciamento. As enzimas Exonuclease I (Exo I) e Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) removem estes materiais indesejados. Depois deste procedimento o sequenciamento é feito normalmente.

## MATERIAIS NECESSÁRIOS

<b>E70073Z Exonuclease I</b>	<b>E70092X Shrimp Alkaline Phosphatase</b>
10 unidades/ $\mu$ l em	1 unidade/ $\mu$ l em
20 mM Tris.HCl (pH 7.5)	25 mM Tris.HCl (pH 7.6)
5 mM 2-mercaptoetanol	1 mM MgCl <sub>2</sub>
50% glicerol	0.1 mM ZnCl <sub>2</sub>
	50% glycerol
	Suplementada com 10X SAP Dilution Buffer
	200 mM Tris pH 8.0
	100 mM MgCl <sub>2</sub>

Todas as misturas de nucleotídeos devem ser armazenadas a -20 °C e colocadas em gelo quando em uso.

## PROTOCOLO

### 1. Para cada reação de PCR:

DNA amplificado por PCR	5 $\mu$ l
Exonuclease I (10 unidades/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 unidade/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
TOTAL	7 $\mu$ l

- Misture e incube a 37 °C por 30-45 min.
- Inative as duas enzimas aquecendo a 80 °C por 15 minutos.

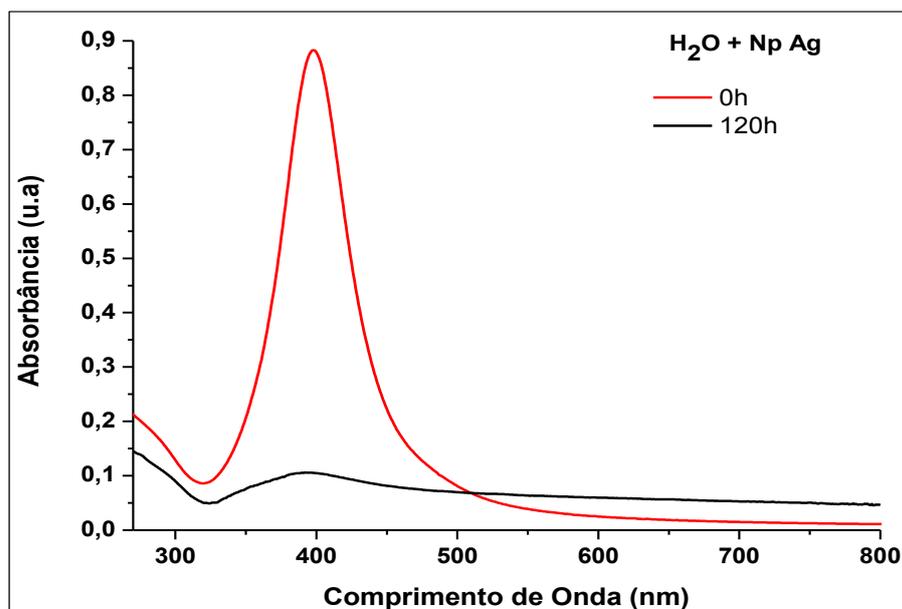
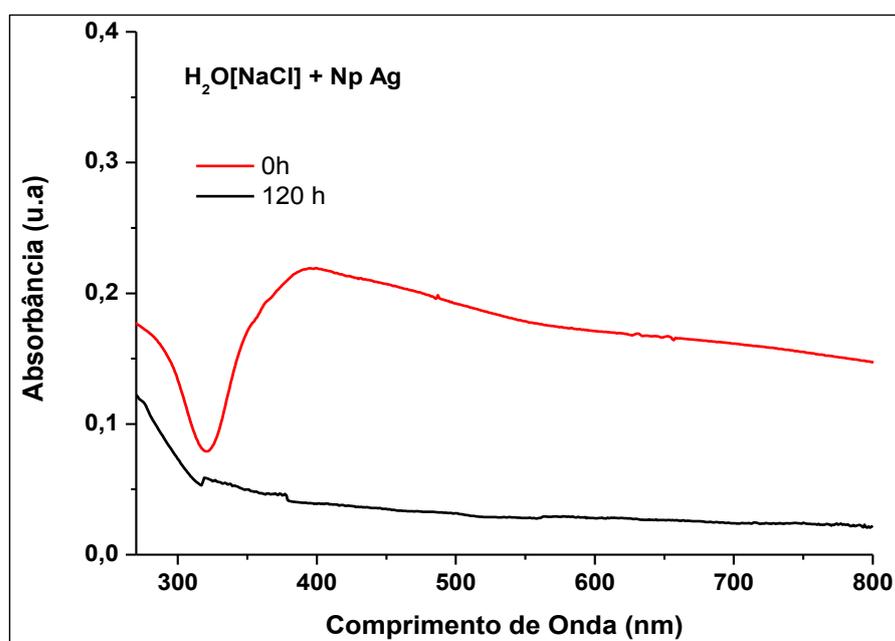
O DNA está pronto para ser utilizado em uma reação de sequenciamento.

#### **1. Mix para várias reações de PCR:**

Exonuclease I (10 unidades/ $\mu$ l)	100 partes
Shrimp Alkaline Phosphatase (1 unidade/ $\mu$ l)	100 partes
10X SAP Dilution Buffer	50 partes
Água deionizada	250 partes
TOTAL	500

- Utilize quantidades iguais de mix e DNA amplificado por PCR em cada reação (ex.: 5  $\mu$ l de mix para cada 5  $\mu$ l de DNA amplificado por PCR).
- Misture e incube a 37 °C por 30-45 min.
- Inative as duas enzimas aquecendo a 80 °C por 15 minutos.

O DNA está pronto para ser utilizado em uma reação de sequenciamento.

**ANEXO D - ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS DO SISTEMA H<sub>2</sub>O D + NP AG. E  
ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS DO SISTEMA H<sub>2</sub>O [NaCl] + NP AG.**ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS DO SISTEMA H<sub>2</sub>O D + NP AG.ESPECTRO DE ABSORÇÃO UV-VIS DO SISTEMA H<sub>2</sub>O [NaCl] + NP Ag.



## ANEXO E - PROTOCOLO DE SÍNTESE DE NP AG

A síntese de NP Ag foi realizada por via química, utilizando-se como precursor metálico uma solução de nitrato de prata ( $\text{AgNO}_3$ )  $1 \text{ mmolL}^{-1}$ . Como agente redutor e estabilizante foi utilizado solução de borohidreto de sódio  $2 \text{ mmolL}^{-1}$  ( $\text{NaBH}_4$ ).

Inicialmente foram pesados 4,4 mg de  $\text{AgNO}_3$  e 1,8mg de  $\text{NaBH}_4$ . Em seguida, cada uma das substâncias foi solubilizada em 25 mL de água Milli-Q, respectivamente e acondicionadas em balões volumétricos com capacidade de 25 mL. Posteriormente, 25 mL de  $\text{NaBH}_4$   $2 \text{ mmolL}^{-1}$  foi depositado em um béquer e levado a um agitador em banho de gelo e deixou-se homogeneizar por 20 minutos, em seguida foram adicionados gota a gota 7 mL de  $\text{AgNO}_3$   $1 \text{ mmolL}^{-1}$  e mantido em agitação por 120 minutos.

A etapa final dessa reação é sinalizada quando a coloração da solução se torna amarelo-dourada, evidenciando a formação de nanoestruturas de prata metálica.

O produto coloidal obtido foi mantido e armazenado em frascos âmbar como filtro para proteção contra luz de menores comprimentos de onda, para utilização em análises posteriores.



## **ANEXO F - PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO DE AMOSTRA BIOLÓGICA PARA ANÁLISE EM ESPECTROSCOPIA DE RAIOS X POR DISPERSÃO EM ENERGIA (EDS)**

As larvas naupliares, caracterizadas por Espectroscopia de Raios X por Dispersão em Energia (EDS), foram submetidas as seguintes etapas de preparação de amostras biológicas:

### **1. ETAPA DE FIXAÇÃO**

Inicialmente, os náuplios depois de expostos ao micropoluento modelo NP AG, foram coletados e fixado em solução de Karnovsky (constituída por GA= 2,5% + 4% FA + 0,1 M de solução tampão Cacodilato de sódio, pH 7,4) a temperatura ambiente.

### **2. LAVAGEM DAS AMOSTRAS**

Após o processo de fixação, as amostras foram lavadas três (3) vezes em um período de 10 minutos, em solução tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, com a finalidade de remover o excesso do fixador.

### **3. ETAPA DE PÓS-FIXAÇÃO**

Nesta etapa, as amostras foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio a 1%, contendo solução tampão Cacodilato de sódio, pH 7,4, durante 1 horas em temperatura ambiente em total escuridão.

#### 4. LAVAGEM DAS AMOSTRAS

As amostras são novamente lavadas em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, três (3) vezes em um período de 10 minutos.

#### 5. DESIDRATAÇÃO DAS AMOSTRAS

As amostras foram submetidas a desidratação em etanol PA numa série crescente de: 30%; 50%; 70%; 90%, três (3) vezes em 10 minutos e em 100%, três (3) vezes, sendo que cada vez de 10 minutos.

#### 6. PONTO CRÍTICO

Após a desidratação, as amostras foram acondicionadas em um recipiente metálico em forma de “gaiolinha” e conduzidas à câmara de CPD, onde a gaiolinha metálica foi depositada e mergulhada em um pequeno volume de álcool 100% PA. Em seguida, a câmara foi isolada e quando a temperatura em seu interior atingiu entre 4 e 5 °C, começou-se a injetar CO<sub>2</sub> líquido, no qual foram realizadas várias substituições até o etanol ser removido completamente.

#### 7. MONTAGEM DOS ESPÉCIMENS

Depois de terem sido submetidos a etapa de Ponto Crítico, os animais foram retirados da gaiolinha metálica e montados em *subs* em fita de carbono dupla face e em lamínula de vidro fixadas em *sutb* por fita de carbono dupla face.

#### 8. METALIZAÇÃO DOS ESPÉCIMENS

Após a montagem, os espécimens foram levados a Metalizadora Fine Coat Ion sputter JFC-1100, onde foram metalizados com uma camada de ouro e paládio.



## **ANEXO G - PROTOCOLO DE PROCESSAMENTO DE AMOSTRA BIOLÓGICA PARA ANÁLISE EM ESPECTROSCOPIA RAMAN**

As larvas naupliares, caracterizadas por Espectroscopia Raman, foram submetidas às seguintes etapas de preparação de amostras biológicas:

### **1. ETAPA DE FIXAÇÃO**

Inicialmente, os náuplios depois de expostos ao micropolvente modelo nanotubos de carbono (NTC), foram coletados e fixados em solução de formaldeído a 10 %, a temperatura ambiente.

### **2. LAVAGEM DAS AMOSTRAS**

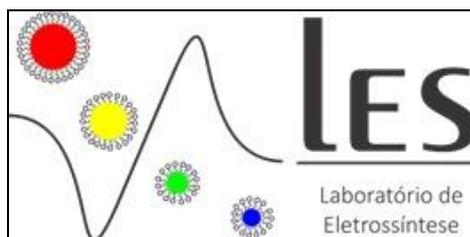
Após o processo de fixação, as amostras foram lavadas três (3) vezes em um período de 10 minutos, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,4, com a finalidade de remover o excesso do fixador.

### **3. DESIDRATAÇÃO DAS AMOSTRAS**

As amostras foram submetidas a desidratação em etanol PA numa série crescente de: 30%; 50%; 70%; 90%, três (3) vezes em 10 minutos e em 100%, três (3) vezes, sendo que cada vez de 10 minutos. Em seguida, a desidratação em etanol e acetona PA, volume a volume, três (3) vezes em um período de 10 minutos. Por fim, as amostras foram submetidas apenas em acetona PA, três (3) vezes em um período de 10 minutos.

#### 4. EMBIBIÇÃO OU INFILTRAÇÃO

Após o processo de desidratação as amostras foram embebidas/infiltradas em resina Épon, que é comercializada em 'kit', contendo os componentes e as proporções de preparo dos reagentes. Depois as amostras foram emblocadas e levadas a estufa a uma temperatura de 60 °C por 72 horas, para polimerização da resina. Após este processo, as amostras foram levadas a um ultramicrótomo da marca Leica, onde foram submetidas a cortes semi-finos, de 0,5 µm por navalhas de vidros. Os cortes das amostras foram depositados em lâminas de vidro, para posterior análise em Espectroscopia Raman.



## ANEXO H - PROTOCOLO DE SÍNTESE DE CdZnTe

### Reagentes e soluções:

Ácido tioglicólico (GSH,  $\geq 98\%$ , Sigma Aldrich);  $\text{NaClO}_{4(aq)}$  a  $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ ; grafite em pó ( $< 20 \text{ mm}$ , Aldrich); telúrio elementar ( $99,98\%$ , Aldrich); cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) e cloreto de zinco ( $\text{CdCl}_2$ ) ( $99,99\%$ , Sigma Aldrich).

### Equipamentos e materiais:

Potenciostato/galvanostato Autolab PGSTAT30; célula de cavidade (Figura 1); vidro sinterizado; grafite em barra; agitador e barra magnética; chapa aquecedora.

### Metodologia de síntese:

A síntese eletroquímica de nanopartículas de CdZnTe foi realizada na célula de cavidade. A montagem da célula de cavidade foi realizada com a introdução da barra de grafite na cavidade da célula, de modo que apenas um pequeno espaço, suficiente para adição do precursor calcogenado e do vidro sinterizado, fosse deixado. Foram adicionados à cavidade  $30 \text{ mg}$  de  $\text{C}_{(\text{grafite})}$  e  $0,05 \text{ mmol}$  de telúrio elementar, homogeneizados previamente, e o sistema foi submetido a prensagem por 10 minutos.

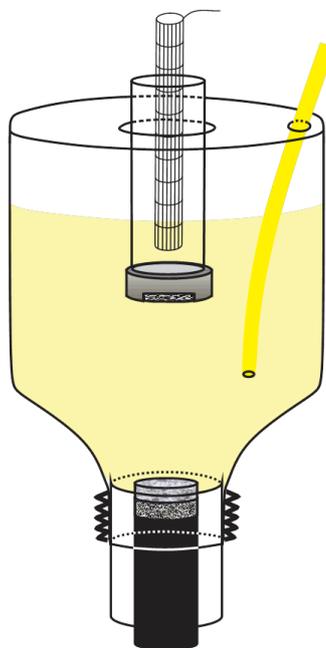
A solução contendo os precursores metálicos ( $\text{Cd}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ ) e o estabilizante (ácido tioglicólico - TGA) foi preparada a partir da dissolução dos sais cloreto de cádmio ( $\text{CdCl}_2$ ) e cloreto de zinco ( $\text{ZnCl}_2$ ) em  $10 \text{ mL}$  de solução aquosa de perclorato de sódio ( $\text{NaClO}_4$ )  $0,2 \text{ M}$ , seguida da adição de  $33,6 \text{ }\mu\text{L}$  de TGA ( $0,48 \text{ mmol}$ ). O pH da solução foi regulado para  $7,0$  usando solução aquosa de  $\text{NaOH}$   $0,2 \text{ mol L}^{-1}$  e o volume completado para  $25 \text{ mL}$  com  $\text{NaClO}_4$ .

Após a prensagem, a cavidade foi fechada através da introdução do vidro sinterizado, previamente imerso em água destilada. Em seguida, a parte superior da

célula de cavidade foi encaixada e a solução contendo o estabilizante foi adicionada. O compartimento anódico (solução  $\text{NaClO}_4$   $0,2 \text{ mol.L}^{-1}$  + grade inox) foi separado da solução  $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  por uma membrana Nafion®.

A eletrossíntese ocorreu sob atmosfera inerte de argônio, à corrente constante ( $i = -30 \text{ mA}$ ), durante 500 segundos. Após a reação, os QDs sintetizados foram aquecidos a, aproximadamente,  $95^\circ \text{ C}$  durante 30 minutos. A proporção dos precursores utilizada para síntese do QDs de Cd:Zn foi de 1:1:, em  $\text{pH}=9,0$ .

Figura 2- Cella de cavidade usada para síntese de CdZnTe-TGA,

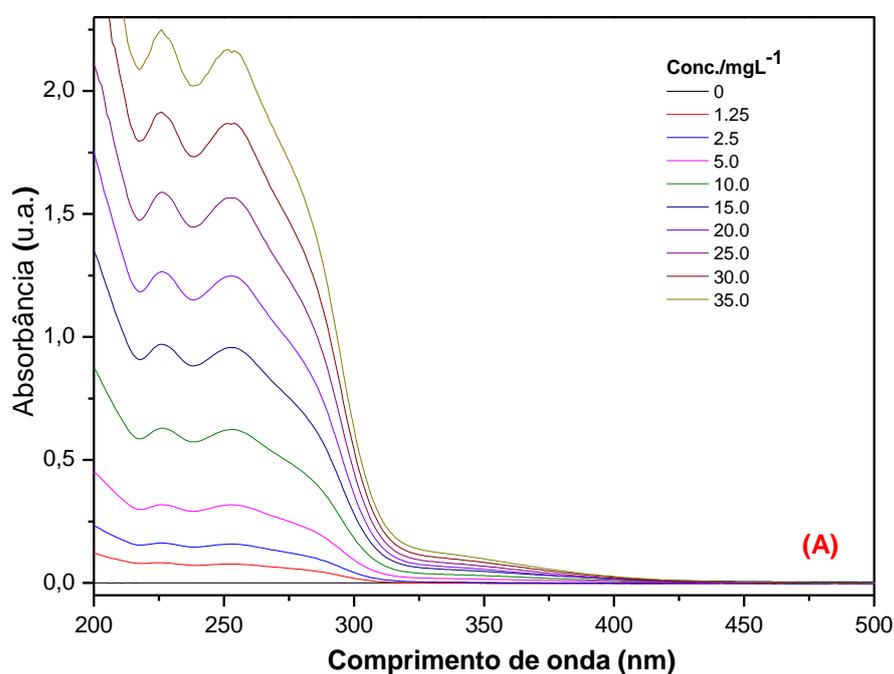


## ANEXO I - EXPERIMENTO PARALELO: BIOENSAIO EMPREGANDO FÁRMACO OLANZAPINA (OLZ)

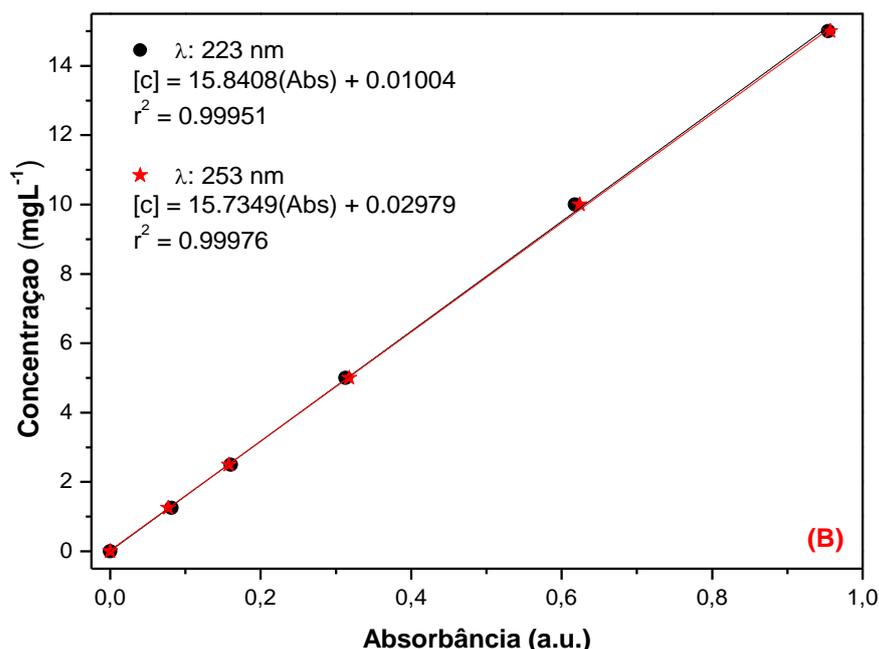
### Espectrometria de Absorção Molecular na Região do Ultravioleta Visível (UV-Vis)

As Figuras 1 e 2 representam, respectivamente, os espectros de absorção molecular na região UV-Vis das soluções-testes de OLZ de 0 mg L<sup>-1</sup> a 35 mg L<sup>-1</sup> e as curvas de calibração. Nos espectros pode ser visualizado duas bandas de absorção, uma em 226 nm e outra em 253 nm, correspondentes possivelmente a dois tipos de polimorfos. Na figura 1 (B) é observado o coeficiente de regressão linear cujo valor obtido foi de 0,99 indicando que há uma boa correlação entre a equação da reta e as concentrações avaliadas.

Figura 1 – A: Espectros de absorção molecular na região UV-Vis da Olanzapina em diferentes concentrações; B: Curvas de calibração para 226 nm e 253 nm.



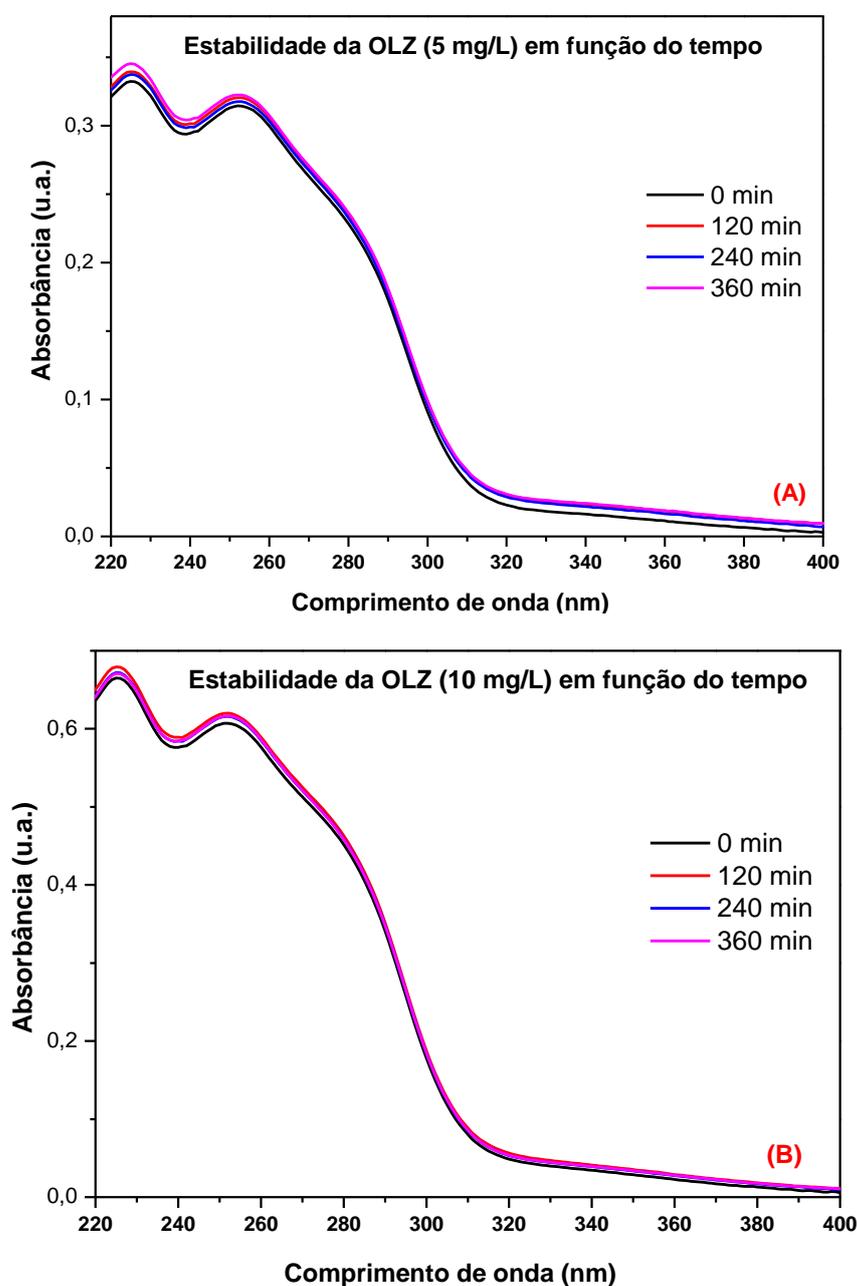
Fonte: AUTORA (2020).



Fonte: AUTORA (2020).

Os espectros de absorção molecular na região do UV-Vis das soluções-testes de 5 mg L<sup>-1</sup> e de 10 mg L<sup>-1</sup> de OLZ, para o período de 0 a 360 minutos, estão representados, respectivamente, nas Figuras 2 (A) e (B). Foi observado que os espectros das referidas soluções-testes apresentaram comportamentos semelhantes, sinalizando que ambas as soluções foram estáveis durante 360 minutos, ou seja, não foram afetadas pelo fator ambiental luminosidade e conseqüentemente, não sofreram degradação. Além disso, foi verificado que em todas as condições testadas a condição de iluminação para a exposição ao fármaco não possui influência na estrutura da OLZ, uma vez que não houve variações significativas do máximo de absorção.

Figura 2 - Espectros de absorção molecular na região do UV-Visível das soluções-testes de Olanzapina no período de 0 a 360 minutos (A: 5 mg L<sup>-1</sup> e B: 10 mg L<sup>-1</sup>).

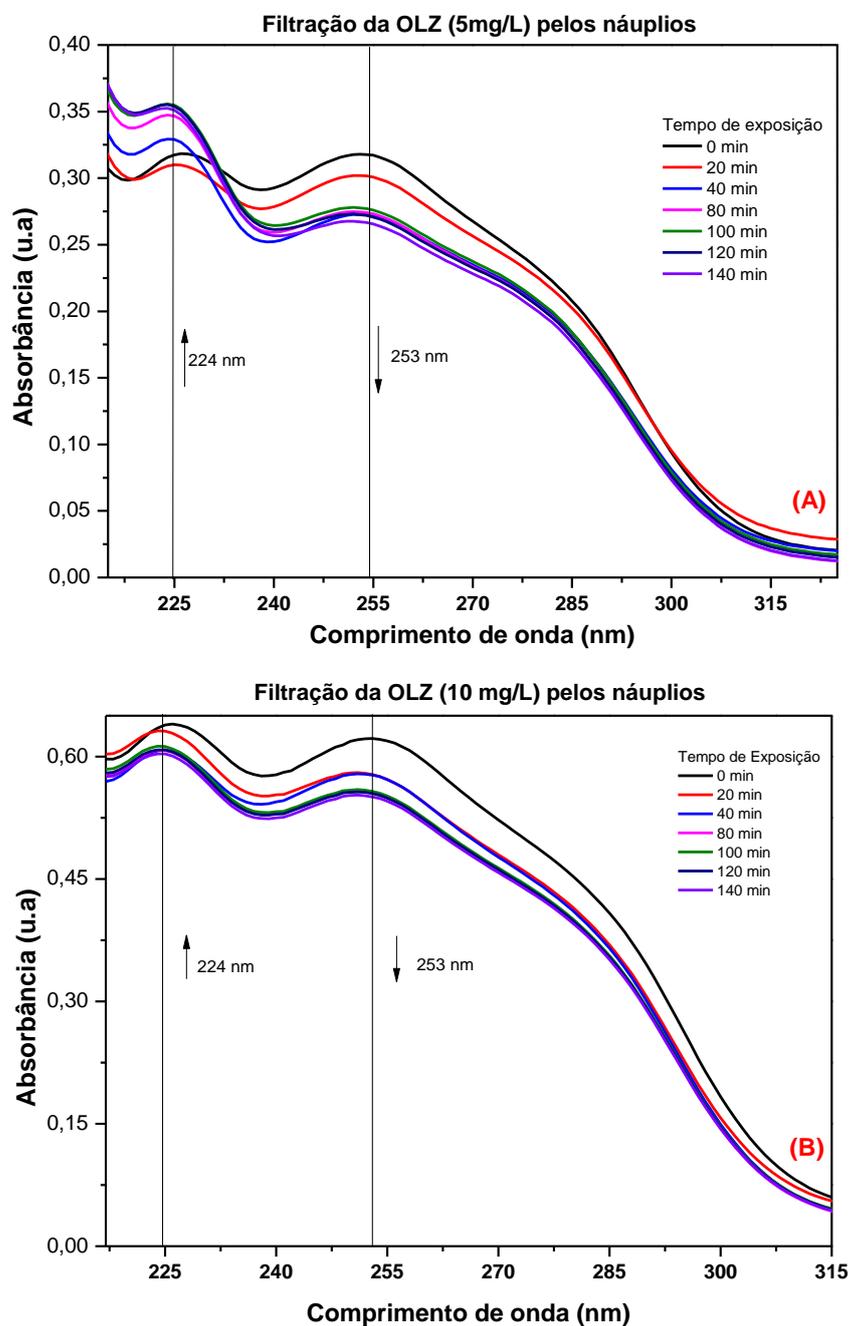


Fonte: AUTORA (2020).

A análise dos filtrados referentes as concentrações de 5 mg L<sup>-1</sup> e de 10 mg L<sup>-1</sup> de OLZ, foi realizada a partir da visualização dos espectros obtidos pela espectrometria de absorção na região do UV-vis Figuras 3 (A) e (B). Os espectros obtidos demonstram comportamentos complementares entre si e revelaram que a partir de 20 minutos de exposição ao fármaco, as larvas naupliares, iniciaram o

processo de filtragem e concentração do micropoluentes, uma vez que houve uma diminuição das bandas de absorção em 226 nm e 253 nm.

Figura 3 – Espectros de absorção molecular na região do UV-Visível das soluções-testes de olanzapina em diferentes tempos de exposição a náuplios (A: 5 mg L<sup>-1</sup> e B: 10 mg L<sup>-1</sup>).



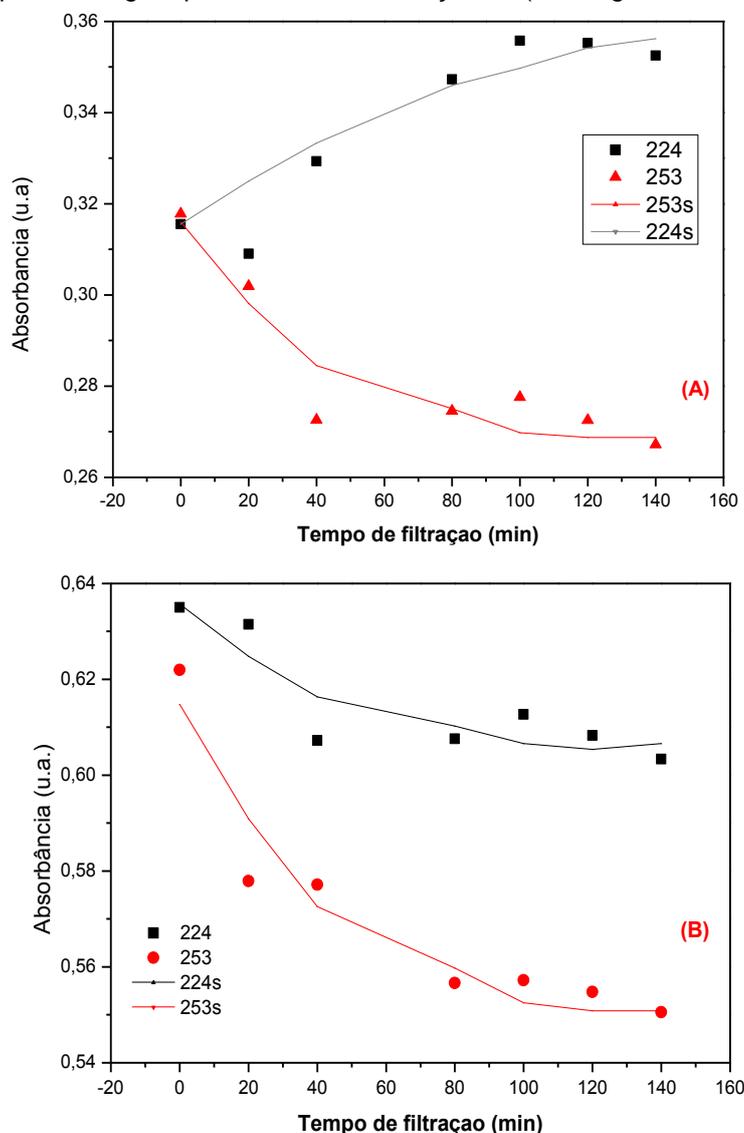
Fonte: AUTORA (2020).

As curvas de exposição da OLZ na concentração de 5 mg·L<sup>-1</sup>, entre o período de 40 e 80 min, demonstram a ocorrência de dois processos concorrentes. Um em que os valores de absorbância no comprimento de onda de 253 nm diminuem em

função do tempo de filtração, até a estabilização assintótica, indicando o consumo do fármaco; e, outro, no qual o comprimento de onda em 226 nm, anteriormente acompanhado, sofreu deslocamento para 224 nm, seguido pelo aumento do valor de absorvância, sendo um indicativo da geração de metabólitos (Figuras 3A e 4A).

Para as curvas de exposição da OLZ na concentração de  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  ocorreram fenômenos semelhantes, ou seja, houve diminuição da banda de absorção em 253 nm, referente ao polimorfo ativo da OLZ e da banda de absorção em 224 nm, relacionada também ao metabólito, seguindo o mesmo platô (Figuras 3B e 4B).

Figura 4- Gráfico exibindo processos de diminuição e aumento do valor de absorvância da olanzapina em função do tempo de filtração para as na concentração de (A:  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  e B:  $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ).



Fonte: AUTORA (2020).

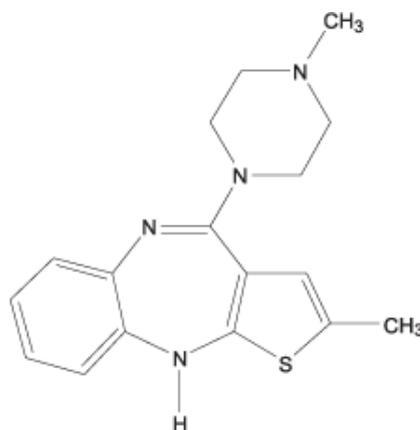
Entre o intervalo de 100 e 140 min de exposição, pode-se perceber uma diferença mínima de absorção, tanto na concentração de 5 mg L<sup>-1</sup> como na de 10 mg L<sup>-1</sup>, sugerindo que as larvas naupliares entram num período de estabilização do processo de filtração, o que provavelmente indica, um estado de saturação do concentrador vivo (Figuras 3 A e B).

Por fim, apesar da formação de metabólitos terem continuado a ocorrer a partir da ingestão da OLZ pelo concentrador vivo, parte do fármaco continuou a ser acumulado no corpo do animal. Fato semelhante foi obtido por Croghan (1958) em seus estudos sobre o mecanismo de regulação osmótica em artêmias salinas: fisiologia do intestino. Neste estudo, ele demonstrou que esses microcrustáceos, deglutiram rapidamente o meio, e retiraram a água do lúmem intestinal e concentraram o corante.

O presente experimento fez parte de estudos paralelos a dos nanocontaminantes abordados na tese, e serão utilizados em aplicações previstas como perspectivas.

### **Sobre o Fármaco olanzapina (OLZ) utilizado no experimento**

A Olanzapina (OLZ) é um fármaco psicotrópico, quimicamente conhecido como 2-metil-4 - (4-metil-1-piperazinil) -10H-tieno (2,3-b) (1,5) benzodiazepina, cuja fórmula molecular é C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>S e peso molecular de 312,44. Atua como fármaco neuroléptico, inibidor de funções psicomotoras.



Fórmula estrutural da olanzapina

Fonte: RÉGO (2010)

Obtida pela primeira vez em 1982, na Inglaterra, por um grupo de pesquisadores da indústria farmacêutica Eli Lilly and Company<sup>®</sup> a partir de modificações estruturais do fármaco clozapina, a OLZ se tornou um dos fármacos amplamente estudados e utilizados no tratamento de distúrbios psicóticos entre outros transtornos, devido a sua eficiência terapêutica quando comparados com outros fármacos, usados em tratamento com mesma finalidade (TRAN et al., 1997).

A ampla utilização deste psicotrópico atípico em pesquisas e em tratamentos de saúde como o da esquizofrenia, em tratamento contra dores, entre outros, tem levado à detecção da OLZ em matrizes ambientais aquáticas (GRACIA-LOR et al., 2011; YUAN et al., 2013).

Na pesquisa de Hiriyanna et al. (2008) a respeito de produtos de degradação da OLZ sob condições de estresse oxidativo, foram relatados a formação de três produtos e a sua não degradação quando foi submetida a estresse leve, ou hidrólise ácida ou básica. Foram verificadas que as duas impurezas isoladas, submetidas a estresse térmico, foram produtos de degradação resultantes da oxidação do anel tiofeno. Rao et al. (2011) propuseram uma via de degradação oxidativa (forma polimórfica-I) tanto na substância como no fármaco, para a formação e identificação destas impurezas. Foram identificadas duas impurezas: a hidroximetilideno-tiona e a acetoximetilideno-tiona, provenientes de amostras de OLZ envelhecidas e submetidas ao estresse térmico. Os resultados sugerem que as impurezas são degradação devido a oxidação e da abertura do anel do tiofeno.

Karpińska et al. (2012) estudaram a fotodegradação da OLZ sob condições ambientais simuladas e perceberam que não houve mudança em seu espectro UV-Visível durante o processo de irradiação, levando-os a supor que o fármaco apresenta estabilidade e resistência à radiação UV. Por outro lado, os autores também perceberam que as reações entre contaminantes naturais aquáticos e matéria orgânica dissolvida em uma matriz natural, poderiam estar atuando como fotossensibilizadores naturais em águas superficiais e provocando a fotodegradação da OLZ. Regulska; Karpińska (2012) analisaram a degradação fotocatalítica da OLZ em suspensão aquosa de dióxido de titânio e verificaram que o fármaco sofreu degradação em soluções de águas fluviais; além disso, foi também verificado que esse fármaco foi submetido a irradiação em luz ultravioleta (simulando a luz solar) e

houve degradação sob a condição fotocatalítica com a formação de produtos de baixo peso molecular.

Gracia-Lor et al. (2012) investigaram a ocorrência e comportamento de produtos farmacêuticos em estações de tratamento de águas residuais situadas na província de Castellon e demonstraram que os analgésicos, antiinflamatórios, reguladores lipídicos, antibióticos quinolona e macrolídeo e que estes produtos foram eficientemente removidos. Alguns antibióticos, ansiolíticos e antiulcerosos foram detectados apenas nos efluentes. E que o fármaco psicotrópico olanzapina, foi encontrado em forma de traços tanto nas águas residuárias dos afluentes como nas dos efluentes.

Em contrapartida, Al-Khazrajy et al. (2016) fizeram uma pesquisa baseada na priorização de riscos dos produtos farmacêuticos ativos encontrados em ambientes aquáticos e terrestres nas cidades do Iraque: Bagdá, Mosul e Basrah, considerando-se a forma de entrada, seus potenciais efeitos tóxicos sobre os ecossistemas, as comunidades bacterianas e a saúde humana revelou uma lista de 23 compostos de alto risco, entre os quais os antibióticos foram os classificados como os de mais alta prioridade; na lista de fármacos relacionados encontra-se a OLZ, no qual foi identificada como um dos fármacos de elevado potencial de risco ambiental.

## Referências

Gracia-Lor, E.; Sancho, J. V.; Hernández, F. (2011). Multi-class determination of around 50 pharmaceuticals, including 26 antibiotics, in environmental and wastewater samples by ultra-high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1218(16), 2264–2275. doi:10.1016/j.chroma.2011.02.026.

Gracia-Lor, E.; Sancho, J. V.; Serrano, R.; Hernández, F. (2012). Occurrence and removal of pharmaceuticals in wastewater treatment plants at the Spanish Mediterranean area of Valencia. *Chemosphere*, 87(5), 453–462. doi:10.1016/j.chemosphere.2011.12.025.

Rêgo, F. J.; Moura, I. J.; Moita, C. G. (2010). Determinação de olanzapina em formulações farmacêuticas por espectrofotometria: desenvolvimento e validação. *Química Nova*, Vol. 33, No. 2, 471-477.

Rao, P. S.; Ray, U. K.; Hirianna, S. G.; Rao, S. V.; Sharma, H. K.; Handa, V. K.; Mukkanti, K. (2011). Identification of oxidative degradation impurities of Olanzapine drug substance as well as drug product. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56(2), 413–418. doi: 10.1016/j.jpba.2011.05.003.

Tran, P. V.; Hamilton, S. H.; Kuntz, A. J.; Potvin, J. H.; Andersen, S. W.; Beasley, C., Jr.; Tollefson, G. D. (1997). Double-blind comparison of olanzapine versus risperidone in the treatment of schizophrenia and other psychotic disorders. *Journal of Clinical Psychopharmacology*, 17(5), 407-418. doi:10.1097/00004714-199710000-00010.

Yuan, S.; Jiang, X.; Xia, X.; Zhang, H.; Zheng, S. (2013). Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere*, 90(10), 2520–2525. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.10.089.

Karpińska, J.; Sokół, A.; Bernatowicz, A.; Szulęcka, A.; Kotowska, U. (2012). Studies on photodegradation of levomepromazine and olanzapine under simulated environmental conditions. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 11(10), 1575. doi:10.1039/c2pp25068c.

Regulska, E.; Karpińska, J. (2012). Photocatalytic degradation of olanzapine in aqueous and river waters suspension of titanium dioxide. *Applied Catalysis B: Environmental*, 117-118, 96–104. doi:10.1016/j.apcatb.2012.01.003.

Al-Khazrajy, O. S. A.; Boxall, A. B. A. (2016). Risk-based prioritization of pharmaceuticals in the natural environment in Iraq. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(15), 15712–15726. doi:10.1007/s11356-016-6679-0.