

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

DANIELA MARIANO BARRETO

FISIOLOGIA DE *CHLORELLA SOROKINIANA* E
ANKISTRODESMUS DENSUS: efeitos e dinâmica de
nanopartículas de cobre

São Carlos-SP
2018

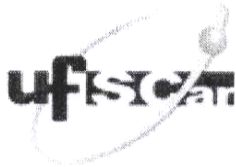
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE BOTÂNICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

FISIOLOGIA DE *CHLORELLA SOROKINIANA* E *ANKISTRODESMUS DENSUS*: efeitos e
dinâmica de nanopartículas de cobre

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, ao Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Dr.^a Ana Teresa Lombardi
Coorientadora: Dr.^a Alessandra E. Tonietto

São Carlos-SP
2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Daniela Mariano Barreto, realizada em 20/08/2018:

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi
UFSCar

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes
UFSCar

Prof. Dr. Adriano Polpo de Campos
UFSCar

Profa. Dra. Suzelei Rodgher
UNESP

Profa. Dra. Patricia Franklin Mayrink Nogueira
UNESP

*Dedico esta pesquisa aos meus
verdadeiros pais e ao meu eterno amor.*

AGRADECIMENTO

A Deus.

Aos meus tios, Sebastião Mauricio Alves e Tereza Mariano Alves por sempre me protegerem e me dar carinho e amor, desempenhando o verdadeiro papel de pais. Eu os amo muito e lhes devo tudo o que sou.

Ao João Paulo Pires Barreto, meu eterno amor, por sempre estar ao meu lado me apoiando e me ajudando a ser uma pessoa melhor.

À Dr^a Jandira Lira B. Talamoni por abrir meus caminhos e sempre me acolher como uma mãe, em todos os momentos.

À Dr^a Ana Teresa Lombardi pela oportunidade concedida, pela possibilidade de ampliação de conhecimento e por toda ajuda sem a qual dificilmente seria possível a concretização desse trabalho.

À coorientação da Dr^a Alessandra Emanuele Tonietto por todos os ensinamentos, principalmente os relacionados ao ISE, além dos incentivos, apoio e conselhos.

Ao Dr. Adriano Polpo de Campos e Rafael Catoia Pulgrossi do Departamento de Estatísticas/UFSCar por me apresentar o paradigma Bayesiano, que muito enriqueceu a pesquisa.

Ao Dr. Joaquim Araújo Nóbrega e a Dr^a Clarice Dias Britto Amaral do Departamento de Química/UFSCar pela disponibilidade em contribuir com as determinações do cobre (ICP-MS).

Ao Dr. Edson Roberto Leite e Everton Willian Rodrigues da Silva Oliveira do LIEC, Departamento de Química/UFSCar pela caracterização das nanopartículas.

Aos membros da banca examinadora por dedicaram seu tempo contribuindo para a melhoria dessa pesquisa.

Ao Carlos Aparecido Casali por todo apoio técnico e alegrias durante o trabalho.

A todos os meus amigos (as) do laboratório Adriano, Alex, Andrea, Camila, Douglas, Eduardo, Farid, Giseli, Graziela, Jaqueline, Jenna, Leonardo, Monica, Pedro, Rafael, Raquel, Renata, Silvia, Suleiman, Tamires e Vinicius que ajudaram direta ou indiretamente sua realização.

Às minhas amigas da graduação Amanda, Cintia e Paula que sempre estiveram comigo me apoiando e incentivando.

A CAPES - DS (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - demanda social), código financeiro 001, pela bolsa de estudos concedida.

Muitíssimo obrigada a todos (as), do fundo do meu coração, por tornarem este sonho possível.

SUMÁRIO

Resumo	12
Abstract	14
Lista de Figuras	16
Lista de Tabelas	20
Lista de Abreviaturas	22
Lista de Siglas	22
Lista de Símbolos	23
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	26
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
2.1 NANOTECNOLOGIA	30
2.2 COBRE E NANOPARTÍCULAS DE COBRE	32
2.3.INTERAÇÃO ENTRE ALGAS E NANOPARTÍCULAS E SUAS CONSEQUÊNCIAS	33
2.4 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS COM NANOPARTÍCULAS	37
3 OBJETIVOS	40
3.1 OBJETIVOS GERAIS	40
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	40
4 METODOLOGIA	42
4.1 MICROALGAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO	42
4.2 PARÂMETROS DO CRESCIMENTO ALGAL	43
4.3 PARÂMETROS DA FOTOSSÍNTESE	44
4.4 CURVA DE SATURAÇÃO LUMINOSA	46
4.5 PRODUTIVIDADE PRIMÁRIA BRUTA	47
4.6 SILANIZAÇÃO	48

4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS NPs-Cu	49
4.8 DISPERSÕES DE NPs-Cu	50
4.9 QUANTIFICAÇÃO DE COBRE	52
4.10 CARBOIDRATOS TOTAIS	55
4.11 PROTEÍNAS TOTAIS	55
4.12 LIPÍDIOS TOTAIS E CLASSES LIPÍDICAS	55
4.13 LIMPEZA DOS MATERIAIS	57
4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 CAPÍTULO 1: DINÂMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE COBRE EM CULTIVOS DA MICROALGA <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i>	62
5.2 CAPÍTULO 2: RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE <i>CHLORELLA SOROKINIANA</i> À NANOPARTÍCULAS DE COBRE	72
5.3 CAPÍTULO 3: <i>NANOPARTÍCULAS DE COBRE INTERFEREM NA VIABILIDADE CELULAR DE CHLORELLA SOROKINIANA MAS NÃO ALTERAM OS PROCESSOS FOTOSSINTÉTICOS</i>	80
5.4 CAPÍTULO 4: FOTOSSÍNTESE E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA MICROALGA <i>ANKISTRODESMUS DENSUS</i> EXPOSTA À NANOPARTÍCULAS DE COBRE	90
6 CONCLUSÕES FINAIS	106
REFERÊNCIAS	108

RESUMO

A comunidade fitoplanctônica é composta por microalgas que suportam as cadeias alimentares em ecossistemas aquáticos. Nesses ambientes elas são imersas numa matriz complexa de substâncias orgânicas e inorgânicas. Em algumas situações, estão ainda sujeitas à uma gama de resíduos de origem antrópica que acabam entrando nos ambientes aquáticos, como é o caso das nanopartículas (NPs). Em virtude das características únicas das NPs é intenso seu uso, mesmo que nem o uso, nem o descarte sejam regularizados por órgão competente. Estudos toxicológicos sobre o efeito de NPs no fitoplâncton têm resultados controversos. A toxicidade das NPs está relacionada à sua reatividade, que depende do tamanho das partículas, formação de agregados, disponibilidade de matéria orgânica, dentre outros fatores. Neste estudo, buscamos primeiramente entender sobre a dinâmica das NPs no meio de cultura algal e depois investigamos os efeitos fisiológicos de NPs de cobre (NPs-Cu) em duas clorófitas de água doce (*Chlorella sorokiniana* e *Ankistrodesmus densus*) expostas a concentrações nominais estimadas para o ambiente (0,57 a 12,70 $\mu\text{g L}^{-1}$) e acima destas (até 635,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Para isso analisamos parâmetros relacionados ao crescimento, fotossíntese e biomoléculas intracelulares sob condições controladas de laboratório em 72 h de exposição. Os resultados mostraram que o crescimento populacional foi afetado em ambas as espécies estudadas. Já a intensidade com que os processos fotossintéticos foram afetados variou conforme a microalga, *C. sorokiniana* foi mais resistente do que a *A. densus*, que mostrou reduções no rendimento quântico do fotossistema II e nas taxas de transporte de elétrons causando reduções significativas na produtividade primária desta microalga. A composição bioquímica (proteínas, carboidratos e lipídios) foi alterada na presença de NPs-Cu nas duas microalgas, mas em concentrações ambientalmente relevantes das NPs-Cu somente para carboidratos foi afetado. A síntese proteica foi estimulada nas maiores concentrações de NPs-Cu sugerindo a atuação de proteínas antioxidantes associadas à desintoxicação celular. Esse estudo é uma contribuição aos conhecimentos sobre a toxicologia de NPs em microalgas de água doce e sua possível consequência no ambiente natural.

Palavras-chave: Produtividade primária bruta. Carboidratos. Proteínas. Rendimento fotossintético. Taxa de transporte de elétrons.

ABSTRACT

The phytoplankton community is composed of microalgae that support food chains in aquatic ecosystems. In these environments they are immersed in a complex matrix of organic and inorganic substances. In some situations, they are still subject to a range of anthropogenic wastes that end up entering aquatic environments, such as nanoparticles (NPs). Due to the unique characteristics of NPs, their use is intense, even if neither use nor disposal is regularized by competent governmental agencies. Toxicological studies on the effect of NPs on phytoplankton have controversial results. The toxicity of NPs is related to their reactivity, which depends on the size of the particles, formation of aggregates, availability of organic matter, among other factors. In this study, we first sought to understand the dynamics of NPs in algal cultures and followed investigating on the physiological effects of copper NPs (NPs-Cu) on two freshwater Chlorophyta (*Chlorella sorokiniana* and *Ankistrodesmus densus*) exposed to nominal NPs-Cu concentrations estimated for the environment (0.57 to 12.70 $\mu\text{g L}^{-1}$) and above these (up to 635.0 $\mu\text{g L}^{-1}$). We analyzed parameters related to growth, photosynthesis and intracellular biomolecules under controlled laboratory conditions at 72 h cultures. The results showed that the population growth rate was affected in both microalgae species. The intensity of the photosynthetic processes varied according to the microalgae, with *C. sorokiniana* being more resistant than *A. densus* that presented reductions in photosystem II quantum yield, electron transport rates and consequently in the estimated gross primary productivity. The biochemical composition (proteins, carbohydrates and lipids) was affected in the presence of NPs-Cu in both microalgae, but at environmentally relevant concentrations of NPs-Cu only carbohydrates were affected. Protein synthesis was stimulated at the higher end of the NPs-Cu concentration range, suggesting the production of antioxidant proteins associated with cell detoxification. This study is a contribution to the knowledge of the toxicology of NPs to freshwater microalgae and their possible consequence in natural environment.

Keywords: Gross primary productivity. Proteins. Carbohydrates. Photosynthetic yield. Electron transport rate.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Escala nanométrica e micrométrica. (Adaptado de Marcone, 2011).

Figura 2- Número de trabalhos publicados em nanotoxicologia na Science Direct no período de 2007 a 2017. Símbolos: ● palavras-chave *nanoparticles and toxicity* e * *copper nanoparticles and toxicity*.

Figura 3- Fotografia do experimento em 72 horas de cultivo de *Chlorella sorokiniana*, os frascos são posicionados sobre agitadores magnéticos.

Figura 4- Representação esquemática de curva de saturação luminosa, com ilustração dos parâmetros ETR_{máx}, I_k e α .

Figura 5- Fluxograma dos processos para obtenção das frações do cobre para a quantificação em ICP-MS e ISE.

Figura 6- Curvas de calibração para os íons de cobre livre. Potencial (mv) em função do log da concentração do cobre livre (mol L^{-1}) em água ultrapura. Força iônica = $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (NaNO_3), pH=5,0. A: para *Chlorella sorokiniana* e em B: para *Ankistrodesmus densus*.

CAPÍTULO 1

Figura 1.1- Difratoograma de raios x de nanopartículas de cobre.

Figura 1.2- Microscopia eletrônica das NPs-Cu utilizadas neste estudo. Figuras A e B mostram a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Figuras C e D microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Figura 1.3- Concentração de íons de cobre ($\mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes materiais (vidro, policarbonato e frascos de vidro silanizados). As barras de erro indicam o desvio padrão (n= 3). * indica diferença estatística entre os tratamentos (ANOVA, $P < 0,05$).

Figura 1.4- A: Concentração do log Cu particulado. Equação: $y = 0,31 + 0,88x$, $r = 0,987$. Na Figura B: Concentração do log Cu livre, linha tracejada representa o controle. Na Figura C: Concentração do log Cu dissolvido. Ambas em função do log NPs-Cu nominal, ambos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

CAPÍTULO 2

Figura 2.1- A: Curvas de crescimento populacional ($\text{Ln células mL}^{-1}$) em função do tempo experimental (dias), no qual os símbolos se aplicam para as diferentes concentrações de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$) como segue: ■ controle (1,55); ○ 1,49; ○ 1,60; □ 4,98; △ 6,35; ▽ 7,54; ◁ 4,75; ▷ 9,07; ◊ 12,24; ♦ 45,79; ◇ 43,47; □ 40,40; △ 51,70; ▽ 72,30; ◁ 172,34; ▷ 160,46; × 305,88; ◇ 394,29; ● 392,94 e * 768,79 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu particulado. Figura B: Taxas de crescimento (μ, d^{-1}) em função do Log das concentrações de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$), a linha sólida representa as taxas de crescimento esperadas, e as linhas tracejadas são a região de credibilidade de 95% para as taxas de crescimento esperadas.

Figura 2.2- Densidade populacional (células mL^{-1}) em função do Log das concentrações de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$) em 72 h, a linha sólida representa a densidade populacional esperada e as linhas tracejadas são a região de credibilidade de 95% para a densidade populacional esperada.

Figura 2.3- Rendimento quântico máximo do fotossistema II ($\Phi_{\text{M-FSII}}$) (u.r.) em função do Log das concentrações de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$) em 72 h.

Figura 2.4- A: Concentração total de biomoléculas intracelulares em função do Log das concentrações de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$) em 72 h. Em A, carboidratos (pg célula^{-1}), em B, proteínas (pg célula^{-1}) e em C, lipídios (pg célula^{-1}). Para as Figuras A e B a linha sólida representa o valor esperado para o parâmetro analisado, e as linhas tracejadas são referentes à região de credibilidade de 95%.

CAPÍTULO 3

Figura 3.1- Viabilidade celular (células mL⁻¹) em A e em B células inviáveis (células mL⁻¹), em função do Log das concentrações de Cu particulado (µg L⁻¹) em 72 h.

Figura 3.2- Concentração de clorofila *a* (fg cel⁻¹) em função do Log das concentrações de Cu particulado (µg L⁻¹) em 72 h.

Figura 3.3- A: Rendimento quântico efetivo do fotossistema II (Φ'_{M-FSII}) (u.r.) em 72 h de exposição em função do Log da concentração de NPs-Cu particulado (µg L⁻¹). B: Valores de dissipações (u.r.) • dissipação fotoquímica (Q_p) e ○ dissipação não-fotoquímica relacionada ao calor (NPQ).

Figura 3.4- A: Curvas rápidas de saturação luminosa para o controle e os tratamentos em 72 h de exposição. Símbolos: ■ controle (1,55); ○ 1,49; ○ 1,60; □ 4,98; △ 6,35; ▽ 7,54; ◁ 4,75; ▷ 9,07; ◇ 12,24; ◆ 45,79; ◇ 43,47; □ 40,40; △ 51,70; ▽ 72,30; ◁ 172,34; ▷ 160,46; × 305,88; ◇ 394,29; ● 392,94 e * 768,79 µg L⁻¹ de Cu particulado (µg L⁻¹). B: Irradiância de saturação luminosa (I_k - µmol fótons m⁻² s⁻¹). C: Inclinação da curva de saturação luminosa (alfa - µmol ē m⁻² s⁻¹ [µmol fótons m⁻² s⁻¹]⁻¹). D: Taxa máxima de transporte de elétrons ($ETR_{r_{m\acute{a}x}}$ - µmol ē m⁻² s⁻¹).

CAPÍTULO 4

Figura 4.1- A: Células viáveis (células mL⁻¹); B: Fluorescência *in vivo* da clorofila *a* (URF); C: a taxa de crescimento dos cultivos (d⁻¹) em função da concentração de Cu livre (mol L⁻¹) em 72 h de cultivo. As barras de erro indicam o desvio padrão (n= 3).

Figura 4.2- A: Rendimento quântico do fotossistema II (u.r.) em 72 h de exposição para as várias concentrações de Cu livre (mol L⁻¹) testadas. Barras cinzas: rendimento quântico máximo (Φ_M , u.r.), e barras hachuradas: rendimento quântico efetivo (Φ'_M , u.r.). B: Valores de dissipações (u.r.), fotoquímica (Q_p) apresentado nas barras hachuradas e a dissipação não-fotoquímica (NPQ) nas barras cinzas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n= 3).

Figura 4.3- A: Curvas rápidas de saturação luminosa para o controle e os tratamentos em 72 h de exposição (ETR relativa em função da radiação fotossinteticamente ativa incidente, PAR). Símbolos: ■ controle ($2,0 \times 10^{-9}$); □ $2,1 \times 10^{-9}$; ○ $2,9 \times 10^{-9}$; △ $3,1 \times 10^{-9}$; ▽ $3,8 \times 10^{-9}$; ◁ $4,8 \times 10^{-9}$; ◇ $5,1 \times 10^{-9}$; ◇ $6,5 \times 10^{-9}$; * $7,2 \times 10^{-9}$ e * $8,4 \times 10^{-9}$ de Cu livre (mol L^{-1}). B: Irradiância de saturação luminosa ($I_k - \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). C: Inclinação inicial da curva de saturação luminosa ($\alpha - \mu\text{mol \u00e9 m}^{-2} \text{s}^{-1} [\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}]^{-1}$). D: Taxa relativa m\u00e1xima de transporte de el\u00e9trons ($\text{ETR}_{\text{m\u00e1x}} - \mu\text{mol \u00e9 m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As barras de erro indicam o desvio padr\u00e3o ($n=3$).

Figura 4.4- Taxa de transporte de el\u00e9trons absoluta ($\text{ETR}_a - \mu\text{mol \u00e9 [mg Chl a]}^{-1} \text{s}^{-1}$) no eixo esquerdo e produtividade prim\u00e1ria bruta ($P^B - \mu\text{mol C [mg Chl a]}^{-1} \text{s}^{-1}$) no eixo direito. Ambos em fun\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o de Cu livre (mol L^{-1}) com 72 h de exposi\u00e7\u00e3o. S\u00edmbolos: * ETR absoluta e ○ produtividade prim\u00e1ria bruta (P^B). As barras de erro indicam o desvio padr\u00e3o ($n=3$).

Figura 4.5- A: concentra\u00e7\u00e3o de prote\u00ednas totais (pg cel^{-1}), em B: concentra\u00e7\u00e3o carboidratos totais (pg cel^{-1}). Equa\u00e7\u00e3o da reta: $y = 0,28 + 2,09 \times 10^8 x$, $r=0,952$. Em C: concentra\u00e7\u00e3o de lip\u00eddios totais (pg cel^{-1}) e em D: raz\u00e3o prote\u00edna: carboidrato. Ambas em fun\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o de Cu livre (mol L^{-1}) com 72 h de exposi\u00e7\u00e3o. As barras de erro indicam o desvio padr\u00e3o ($n=3$).

Figura 4.6- As classes lip\u00eddicas (pg cel^{-1}) em fun\u00e7\u00e3o da concentra\u00e7\u00e3o de Cu livre (mol L^{-1}) com 72 h de exposi\u00e7\u00e3o. A: hidrocarbonetos alif\u00e1ticos (HC), B: lip\u00eddios m\u00f3veis em acetona (AMPL), C: fosfolip\u00eddios (PL), D: ester\u00f3is livres (ST), E: triacilglicer\u00f3is (TG) e F: alco\u00f3is alif\u00e1ticos livre (ALC). As barras de erro indicam o desvio padr\u00e3o ($n=3$).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Literatura com estudos sobre nanopartículas em microalgas.

Tabela 2- Concentrações nominais de NPs-Cu usadas nos experimentos. O controle recebeu adição de NPs-Cu.

CAPÍTULO 1

Tabela 1.1- Concentrações de Cu para cultivos de *Ankistrodesmus densus*. A letra C simboliza o controle.

Tabela 1.2- Concentrações de Cu para cultivos de *Chlorella sorokiniana*. A letra C simboliza o controle.

LISTA DE ABREVIATURAS

cel. célula
cels. células
Chl a. Clorofila a (chlorophyll a)
fg. Fentograma
FS. Fotossistema
Log. Logarítimo base 10
mv. milivolts
NPs. Nanopartículas
NPs-Cu. Nanopartículas de cobre
P:C. Razão proteína:carboidrato
pg. Picograma

LISTA DE SIGLAS

ABDI - Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial
ALC - Alcoóis alifáticos livre (Free aliphatic alcohol)
AMPL - Lipídios móveis em acetona (Acetone mobile polar lipids)
ANOVA-ONEWAY - Análise de variância simples
ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP - Adenosina trifosfato (Adenosine triphosphate)
BSA - Albumina sérica bovina (Bovine serum albumin)
CONAMA - Conselho Nacional de Meio Ambiente
DRX - Difração de raio x (Diffraction of x-ray)
ETRa - Taxa de transporte de elétrons absoluta (Absolute electron transport rate)
ETRr - Taxa relativa de transporte de elétrons (Relative rate of electron transport)
ETR_{Max} - Taxa máxima do transporte de elétrons (Maximum rate of electron transport)
FFA - Ácidos graxos livre (Free fatty acids)

HC - Hidrocarbonetos alifáticos (Aliphatic hydrocarbons)
IBVF - Instituto de Bioquímica Vegetal e Fotossíntese
ICP-MS - Espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (Inductively coupled plasma mass spectrometry)
ISE-Cu - eletrodo seletivo ao íon cobre (Ion-copper selective electrode)
KET- Etil cetona (Ketone)
MO - matéria orgânica
NADPH - Nicotinamida adenine dinucleotídeo fosfato reduzido (Nicotinamide adenine dinucleotide reduced phosphate)
OECD - Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (Organisation for Economic Co-Operation and Development)
PAM - Pulso de amplitude modulada (Pulse-Amplitude-Modulation)
PAR - Radiação fotossinteticamente ativa (Photosynthetically active radiation)
PL - Fosfolipídios (Phospholipids)
ST - Esteróis livres (Free sterols)
TG - Triacilgliceróis (Triacilgliceróis)
u.r.- Unidades relativas
URF - Unidades relativas de fluorescência
WE - Ésteres de cera (Wax esters)

LISTA DE SÍMBOLOS

μ Taxa específica de crescimento
C carbono
Cu cobre
 \bar{e} elétron (s)
 F'_m Fluorescência máxima em adaptação à luz
 F'_o Fluorescência mínima em adaptação à luz
 F_m Fluorescência máxima em adaptação ao escuro
 F_o Fluorescência mínima em adaptação ao escuro
 F_s Fluorescência em estado estável de transporte de elétrons

F_v	Fluorescência variável
I_k	Irradiância de saturação de luz
NPQ	Dissipação não-fotoquímica (Non-photochemical Quenching)
Q_A	Quinona A (Quinone)
Q_n	dissipação não-fotoquímica
Q_p	dissipação fotoquímica (Quenching photochemical)
α	Eficiência fotossintética
θ	theta
Φ_M	Rendimento quântico máximo
Φ'_M	Rendimento quântico efetivo

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVAS

O cobre é um micronutriente essencial para o fitoplâncton, pois tem lugar de destaque em enzimas e proteínas, como por exemplo a superóxido dismutase, citocromo c oxidase e plastocianina. Além disso, auxilia na sinalização/transcrição e transporte de proteínas, mobilização do ferro e fosforilação oxidativa (ROBINSON; WINGE, 2010).

O uso das nanopartículas (NPs) cresce exponencialmente devido às aplicações na indústria de eletrônicos e têxtil, na agricultura, biomedicina, usos ambientais e outros, usos esses que se devem às propriedades peculiares das NPs, tais como a alta reatividade (BAKER; TYLER; GALLOWAY, 2014). Mas, essas mesmas propriedades podem contribuir para a alta capacidade de adsorção e a interação das NPs com os organismos, mecanismos ainda pouco conhecidos. Isso quer dizer que a alta reatividade das NPs pode significar alta interação com materiais particulados e/ou livres no ambiente.

Sabe-se que uma das consequências do uso intensivo e descarte inapropriado de NPs é sua entrada nos ecossistemas aquáticos, seja como resíduo da produção ou uso por consumidores. As nanopartículas de cobre (NPs-Cu) possuem propriedades antimicrobianas e encontram extenso uso em tintas anti-incrustantes, desse modo contaminando diretamente os ecossistemas aquáticos (MELEGARI et al., 2013).

Diversos estudos mostram que a interação das microalgas com agentes tóxicos em geral provoca efeitos danosos, tais como o desequilíbrio na síntese de biomoléculas como carboidratos, proteínas e lipídios (SOUZA; KELLY, 2000; LAI et al., 2011; ROCHA et al., 2016a) que podem ser transferidos aos níveis tróficos seguintes (KULACKI et al., 2012; RIBEIRO et al., 2014). Alteração na composição de biomoléculas pode ter como consequência células de baixo valor nutricional, comprometendo o balanço energético dos ecossistemas (KILHAM et al., 1997).

Presentes no ambiente, as NPs estão sujeitas às mais diversas reações, como complexação com constituintes orgânicos e inorgânicos, adsorção em superfícies e interação com a biota (BAKER; TYLER; GALLOWAY, 2014; VALE et al., 2016), reações que podem afetar a interação dessas partículas com microalgas.

A literatura mostra haver dissolução de NPs no meio, liberando os íons dos elementos que as constituem (NAVARRO et al., 2008) e, portanto, NPs-Cu podem liberar íons cobre ao meio. Isso significa dizer que o efeito das NPs sobre a biota pode ser oriundo não somente das partículas, mas também dos íons liberados. Muitos autores atribuem a toxicidade das NPs à produção de espécies reativas de oxigênio desencadeada pela liberação de seus íons (NAVARRO et al., 2008; ARUOJA et al., 2009; BEHRA et al., 2013) e comparativamente, menor toxicidade é atribuída às NPs propriamente ditas (MELEGARI et al., 2013; COSTA et al., 2016).

De acordo com o que vem sendo relatado na literatura uma das causas da toxicidade do cobre em microalgas é sua estreita relação com a fotossíntese (LOMBARDI; MALDONADO, 2011), além de causar problemas nos mecanismos de reparação do estresse oxidativo (NAVARRO et al., 2008; MÜLLER; BEHRA; SIGG, 2016) e levar à degradação da clorofila *a* (EINICKER-LAMAS et al., 2002). Nanopartículas afetam a fisiologia algal, podendo inibir o crescimento em 16 a 85%, dependendo das NPs, das concentrações testadas e do tempo de exposição. A degradação da clorofila *a* induzida por espécies reativas de oxigênio também já foi registrada em estudos de NPs com microalgas (SAISON et al., 2010; BARHOUMI; DEWEZ, 2013; MELEGARI et al., 2013; CHELONI; MARTI; SLAVEYKOVA, 2016; EL-KASSAS; OKBAH, 2017). Além disso, as NPs podem reduzir a atividade do fotossistema II (FSII) (NAVARRO et al., 2008; SAISON et al., 2010), bem como alterar a transferência de elétrons na cadeia de transporte de elétrons da fotossíntese (COSTA et al., 2016).

Em ensaios ecotoxicológicos envolvendo microalgas, a maioria dos trabalhos utiliza altas concentrações de NPs (10^2 a 10^7 $\mu\text{g L}^{-1}$) e produz resultados com baixa representação em cenário ambiental real. São raros os estudos que usam concentrações de NPs que podem ser, de fato, encontradas no ambiente. Altas concentrações levam à agregação de NPs, alterando seu tamanho e também reatividade e portanto, sua interação com os materiais dissolvidos e particulados.

Considerando que os ecossistemas aquáticos são receptores de NPs, quer por descarte direto ou indireto e que organismos da comunidade fitoplanctônica como as microalgas interagem forte e diretamente com o ambiente e são facilmente afetados por mudanças naturais ou antrópicas no meio, a exposição das microalgas

às NPs pode resultar em efeitos deletérios que repercutirão sobre a teia trófica. Nossa hipótese é de que dada à alta reatividade de NPs-Cu, mesmo em concentrações ambientalmente relevantes a interação entre essas e as microalgas levará à alteração em respostas fisiológicas, tais como a fotossíntese e síntese de biomoléculas, além da taxa de crescimento populacional. Para verificar essa hipótese, usamos amplo espectro de concentrações de NPs-Cu, e estudamos não somente o efeito das NPs-Cu sobre a fisiologia algal, mas também a dinâmica dessas partículas no meio. Em nossa investigação incluímos concentrações ambientalmente relevantes de NPs e duas espécies de microalgas Chlorophyta cosmopolitas, de fácil e rápido cultivo, além de apresentarem diferentes sensibilidades, sendo que *Ankistrodesmus densus* é considerada mais sensível do que *Chlorella sorokiniana*. A nossa concentração mais alta ($\sim 6 \times 10^2 \mu\text{g L}^{-1}$) corresponde à mais baixa da maioria dos estudos que encontramos na literatura. Este é o primeiro relato dos efeitos de NPs-Cu em microalgas sob o aspecto fisiológico envolvendo a determinação de biomoléculas e o processo fotossintético, incluindo taxa de transporte de elétrons e estimativa da produtividade primária bruta, assim como o uso de concentrações de NPs que incluem valores estimados para o ambiente natural, que segundo Mueller, Nowack (2008) oscilam entre 0,60 a 12,70 $\mu\text{g L}^{-1}$. Este estudo é uma contribuição ao conhecimento da interação de nanopartículas de cobre com microalgas permitindo, por usarmos concentrações próximas às estimadas para ambientes naturais, uma compreensão de possíveis riscos que as NPs-Cu podem gerar ao ambiente como um todo.

Para melhor organização dos resultados esta tese foi dividida em quatro capítulos segundo apresentado abaixo.

Capítulo 1: Dinâmica das nanopartículas de cobre em cultivos da microalga Chlorella sorokiniana.

Capítulo 2: Respostas Fisiológicas de Chlorella sorokiniana à nanopartículas de Cobre.

*Capítulo 3: Nanopartículas de cobre interferem na viabilidade celular de *Chlorella sorokiniana* mas não alteram os processos fotossintéticos*

*Capítulo 4: Fotossíntese e composição bioquímica da microalga *Ankistrodesmus densus* exposta à nanopartículas de cobre.*

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma área inovadora em crescente desenvolvimento econômico e científico, e tem fornecido a base tecnológica para inovações em diversas áreas, como por exemplo: saúde, agricultura, energia, eletrônicos, dentre outras (GRILLO; ROSA; FRACETO, 2015), porém tudo isso não aconteceu de forma abrupta, muitas pesquisas embasaram essa nova revolução tecnológica (BONDARENKO et al., 2013) que vem se desenvolvendo a cada ano.

O marco fundamental da nanociência ocorreu há 59 anos quando em 29 de dezembro de 1959 o pesquisador americano Richard P. Feynman proferiu o seu famoso discurso intitulado de “There's Plenty of Room at the Bottom” (“Há muito espaço no fundo”), o qual apresentava ideias visionárias sobre a construção de objetos em escala nanométrica a partir da manipulação atômica (GODDARD III et al., 2007) e pode-se dizer que ele foi a primeira pessoa a imaginar a possibilidade (ou como é possível) um mundo tão pequenino.

Porém, somente na década de 1980 o termo nanotecnologia começou a se tornar popular graças ao pesquisador Kim Eric Drexley, quem de fato implementou as ideias propostas por Feynman a partir da publicação do livro “Vehicles of creation: the arrival of the nanotechnology” (“Veículos de criação: a chegada da era da nanotecnologia”) (TOLOCHKO, [s.d.]).

Atualmente a nanotecnologia é caracterizada pela manipulação de átomos até que as partículas tenham entre 1 e 100 nm em pelo menos uma de suas dimensões (OECD, 2009), conferindo a essas partículas propriedades únicas, como por exemplo: químicas, físicas, magnéticas e ópticas, além de serem mais reativas, pois possuem a razão área de superfície pelo volume maior do que a forma comum (THIT; SELCK; BJERREGAARD, 2013; BOTTERO et al., 2015; WANG et al., 2015; VALE et al., 2016). A Figura 1 apresenta uma comparação entre estruturas nanométricas e micrométricas.

Há dois tipos de nanopartículas, as naturalmente encontradas no ambiente decorrentes de processos como erosão e erupções vulcânicas e as intencionalmente

sintetizadas pelo Homem, tais como Cu, Fe, Zn, SiO₂, CeO₃, dentre uma infinidade delas (HARTLAND et al., 2012; GRILLO; ROSA; FRACETO, 2015).

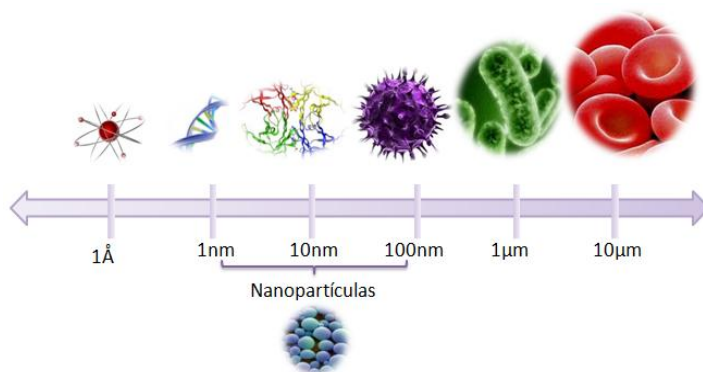


Figura 1- Escala nanométrica e micrométrica. (Adaptado de Marcone, 2011).

Apesar do pouco tempo a nanotecnologia não é mais considerada uma tecnologia emergente (BOTTERO et al., 2015), uma vez que já consta com mais de 4000 nanomateriais indexados (NANOWERK, 2018) e sintetizados, sendo que esse número praticamente dobrou nos últimos 6 anos.

As nanopartículas vêm se tornando imprescindíveis numa gama de produtos comumente utilizados (TSUZUKI, 2009), o que faz com que haja um aumento a cada ano desses nanomateriais, assim como investimentos. Segundo dados recentes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), o mercado mundial deverá movimentar em torno de R\$ 9 trilhões, com a comercialização de produtos nanotecnológicos, conseqüentemente tais produtos acabam sendo disponibilizados em quantidades crescentes para o ambiente, sobretudo para os ecossistemas aquáticos que são seus principais receptores (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010).

2.2 COBRE E NANOPARTÍCULAS DE COBRE

O cobre é um metal de transição com propriedade redox, podendo existir como Cu^{2+} (cúprico) ou como Cu^+ (cuproso) (YRUELA, 2005). Ele é um nutriente essencial em pequenas quantidades tanto para os animais quanto para o fitoplâncton, pois é componente de proteínas como a superóxido dismutase, amino oxidase, citocromo c oxidase, plastocianina e, além disso, auxilia na sinalização/transcrição proteínas, transporte, mobilização do ferro e fosforilação oxidativa (ANDERSEN, 2005; YRUELA, 2005; THIT; SELCK; BJERREGAARD, 2013; KROPAT et al., 2015). Esse metal também desempenha importante papel na prevenção e controle de condições patológicas (VALE et al., 2016).

Mundialmente, o cobre é o terceiro elemento mais utilizado e cerca de 66% é voltado para aplicações elétricas (VALE, 2018) devido ser um bom condutor, além de ser aplicado, em tubos de vácuo, cunhagem de moedas, esculturas, entre outras (NASCIMENTO et al., 2016). Porém o crescente uso e descarte inadequado possibilita sua entrada nos ecossistemas, colocando a biota em risco devido ao seu potencial tóxico quando em concentrações elevadas (ANDERSEN, 2005).

Nos ecossistemas aquáticos o fitoplâncton está em contato constante com as diversas substâncias orgânicas e inorgânicas presentes nesses ambientes, assim como o cobre que pode se tornar tóxico para esses organismos. Estudos demonstram que a toxicidade não está relacionada à concentração total, mas a fração lábil do metal que é amplamente responsável pela sua biodisponibilidade, além de apresentar elevada afinidade por ligantes orgânicos dissolvidos (TONIETTO et al., 2014; MÜLLER; BEHRA; SIGG, 2016).

Há uma variedade de nanopartículas sintetizadas e as de cobre não foram deixadas de fora dessa lista, tanto é que podemos encontrar no mercado as seguintes fases: Cu, CuO e Cu_2O . Essas nanopartículas têm sido alvo de constante investigação (WANG et al., 2011; MELEGARI et al., 2013; REGIER et al., 2015; WANG et al., 2015; CHELONI; MARTI; SLAVEYKOVA, 2016; MÜLLER; BEHRA; SIGG, 2016), principalmente pelo seu intenso uso e efeitos pouco conhecidos. As nanopartículas de cobre têm se destacado cada vez mais devido suas propriedades que as tornam aplicáveis em diversos produtos, como capacitores, tintas condutoras, materiais de alta condutividade térmica, catalisadores, eletrodos, miniaturização de

dispositivos eletrônicos, aditivos para lubrificantes, além de tintas anti-incrustantes em virtude de sua propriedade bactericida e fungicida (SAISON et al., 2010; MELEGARI et al., 2013; MÜLLER; BEHRA; SIGG, 2016; US Research Nanomaterials, Inc.).

Logo, percebemos o quão vastas são as fontes de cobre, inclusive das próprias nanopartículas que acabam chegando aos ecossistemas aquáticos comprometendo a vida local. Além disso, as NPs não podem ser quantificadas diretamente, apenas de forma indireta pela quantificação do metal que a constitui, tornando ainda mais difícil sua regulamentação pelos órgãos responsáveis.

Contudo os danos à biota desencadeados pelos íons de cobre provenientes das NPs ou mesmo pelas próprias NPs acabam resultando em mecanismos de toxicidade ainda enigmáticos para toxicologia clássica, uma vez que os mecanismos de ação ainda não estão totalmente elucidados e atuam de forma distinta dos metais comuns.

Portanto, apesar da nanotecnologia não ser mais considerada emergente, pode-se dizer que a nanotoxicologia, que envolve estudos toxicológicos com nanopartículas, ainda é incipiente e por isso estudos nessa área devem ser estimulados a fim de elucidar os efeitos aos organismos, principalmente aos que sustentam a cadeia trófica.

2.3 INTERAÇÃO ENTRE ALGAS E NANOPARTÍCULAS E SUAS CONSEQUÊNCIAS

A comunidade fitoplanctônica que compreende as microalgas, é uma das principais constituintes dos ecossistemas aquáticos, pois são os produtores primários que dão base para os níveis tróficos superiores e para outros ecossistemas (ODUM; BARRETT, 2007).

Após a entrada das NPs nesses ecossistemas, assim como qualquer elemento ou composto, encontram ambiente propício para diversas reações, como complexação com constituintes orgânicos e inorgânicos, sedimentação, adsorção em superfícies e interação com a biota, inclusive com as microalgas. Melegari et al. (2013) estudaram a toxicidade e o estresse oxidativo causado por NPs-CuO na

clorofícea *Chlamydomonas reinhardtii* e mostraram redução na densidade populacional e produção de carotenóides, além do aumento de espécies reativas de oxigênio.

Para que haja algum efeito das nanopartículas em microalgas, é imprescindível algum tipo de interação entre elas. A literatura tem mostrado os principais mecanismos de interação entre NPs e organismos (BAKER; TYLER; GALLOWAY, 2014; VALE et al., 2016). Tendo isso como base propomos que de modo geral, possa haver dois tipos de interação, a física e a química. Para a finalidade desta pesquisa, definimos a interação física como sendo relacionada ao contato direto da nanopartícula com a microalga, ainda que esse contato ocorra por ligações químicas, enquanto que a interação química está associada à liberação dos íons das NPs ocasionando assim um efeito tóxico secundário às NPs. Ambas as interações possuem o poder de desencadear danos oxidativos nas células, alterando aspectos do metabolismo e fisiologia celular. Propomos ainda que uma não exclui o efeito da outra, ou seja, interação física e química podem atuar de forma simultânea na célula.

Essas interações entre microalgas e NPs acabam sendo refletidas em diversos processos fisiológicos como a reprodução, a fotossíntese e na composição bioquímica, comprometendo o desenvolvimento celular. A reprodução celular de microalgas exposta às nanopartículas tem sido exaustivamente avaliada e na maioria dos casos é afetada em concentrações muito elevadas (BARHOUMI; DEWEZ, 2013; MELEGARI et al., 2013; CHELONI; MARTI; SLAVEYKOVACHELONI et al., 2016), enquanto que os processos fotossintéticos tem recebido menor atenção (NAVARRO et al., 2008; SAISON et al., 2010; COSTA et al., 2016) e, ainda, menor importância é dada à composição bioquímica das microalgas.

A interação microalgas e NPs pode causar danos no DNA/RNA, o que desregula as expressões gênicas (VALE et al., 2016), resultando na incapacidade de divisão celular, ineficiência fotossintética, além do desequilíbrio na síntese de biomoléculas, como carboidratos, lipídios e proteínas. Conseqüentemente tem-se células de valor nutricional alterados que podem ser transferidas aos demais níveis tróficos, provocando o desequilíbrio energético dos ecossistemas, que tendem a ficar comprometidos.

Além disso pode ocorrer a associação entre NPs e matéria orgânica (MO) presentes no ambiente, tais como as substâncias húmicas e os exudatos algais, aumentando a disponibilidade das NPs e conseqüentemente interferindo na toxicidade. Wang et al. (2015) observaram que a inserção de MO em cultivos microalgais expostos à NPs-Cu tornou as partículas mais disponíveis em solução. Segundo os autores, tal efeito decorreu de quelação e complexação das NPs com a MO que por competição deslocou os íons Cu anteriormente ligados à MO, liberando-os ao meio e aumentando a toxicidade. Resultados similares foram obtidos por Wang et al. (2011) ao expor *Microcystis aeruginosa* à NPs-CuO e MO.

Na Tabela 1 é apresentada uma síntese do que encontramos na literatura em relação à toxicidade de nanopartículas em microalgas, considerando a concentração usada e o parâmetro fisiológico analisado como resposta à exposição. Como podemos notar, não há trabalhos que abordem, simultaneamente, a resposta de microalgas quanto à sua composição bioquímica e a fotossíntese, em vista da relevância deste processo.

Desse modo, estudos envolvendo tais organismos e sua interação com as nanopartículas podem fornecer melhor entendimento desses mecanismos e auxiliar na manutenção do equilíbrio desses ecossistemas, além de fornecer informações para sua preservação e, principalmente, a regulamentação sobre o uso e descarte das nanopartículas.

Tabela 1- Literatura com estudos sobre nanopartículas em microalgas.

Organismo	Parâmetros analisados	NPs	[$\mu\text{g L}^{-1}$]	Referência
<i>C. vulgaris</i>	Crescimento Estresse oxidativo Fotossíntese	Fe_2O_3	$1,25 \times 10^4$ a $4,0 \times 10^5$	Barhoumi, Dewez (2013)
<i>C. reinhardtii</i>	Crescimento Estresse oxidativo Integridade da membrana	CuO	8,0 e $8,0 \times 10^2$	Cheloni, Marti, Slaveykova (2016)
<i>C. reinhardtii</i>	Atividade da esterase Crescimento Estresse oxidativo Fotossíntese	Cr_2O_3	10^4 a 10^7	Costa et al. (2016)
<i>L. majuscula</i>	Clorofila <i>a</i> Peso seco	Cu	2×10^3 e 4×10^4	El-Kassas, Okbah (2017)
<i>C. reinhardtii</i>	Atividade da esterase Estresse oxidativo Morfologia Viabilidade celular Pigmentos	CuO	10^2 e 10^6	Melegari et al. (2013)
<i>C. reinhardtii</i>	Fotossíntese	Cu	10^2 a 3×10^4	Müller, Behra, Sigg (2016)
<i>C. reinhardtii</i>	Fotossíntese	Ag	1,08 a $1,08 \times 10^8$	Navarro et al. (2008)
<i>C. reinhardtii</i>	Crescimento Estresse oxidativo Fotossíntese	CeO_2	$1,72 \times 10^3$ a $1,72 \times 10^4$	Röhder et al. (2014)
<i>C. reinhardtii</i>	Clorofila Crescimento Estresse oxidativo Morfologia	CuO	4×10^3 a 2×10^4	Saison et al. (2010)
<i>C. sorokiniana</i>	Crescimento Viabilidade celular Fotossíntese Bioquímica	Cu	$5,7 \times 10^{-1}$ a $6,35 \times 10^2$	Este estudo
<i>A. densus</i>	Crescimento Viabilidade celular Fotossíntese Bioquímica	Cu	$5,7 \times 10^{-1}$ a $6,35 \times 10^2$	Este estudo

2.4 ESTUDOS TOXICOLÓGICOS COM NANOPARTÍCULAS

Como resultado do intenso uso e descarte inapropriado de nanopartículas, a comunidade científica vem se preocupando cada vez mais em desenvolver pesquisas com a finalidade de compreender os efeitos dos nanomateriais em diversos grupos como: algas, bactérias, artrópodes, peixes, mamíferos, plantas, dentre outros (BONDARENKO et al., 2013; BAKER; TYLER; GALLOWAY, 2014; DA COSTA; SHARMA, 2016; EL-KASSAS; OKBAH, 2017; RANMADUGALA et al., 2017).

Em decorrência dessa ação podemos ver seus reflexos nas bases de dados que mostram uma quantidade cada vez maior de publicações envolvendo as NPs. Na Figura 2 apresentamos um gráfico gerado a partir do número de publicações apresentados pelo *Science Direct* ao utilizar como palavras-chave *nanoparticles and toxicity* e *copper nanoparticles and toxicity*. A busca foi realizada para os últimos 10 anos, no período de 2007 a 2017 e apenas para artigos de pesquisa.

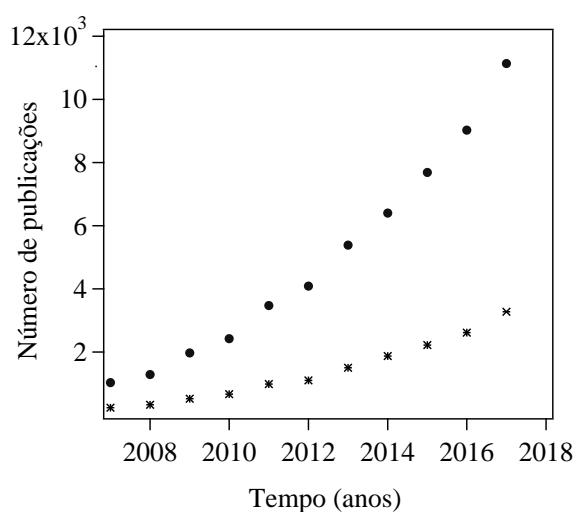


Figura 2- Número de trabalhos publicados em nanotoxicologia na Science Direct no período de 2007 a 2017. Símbolos: ● palavras-chave *nanoparticles and toxicity* e * *copper nanoparticles and toxicity*.

Fica evidente o quanto essa área está se desenvolvendo e, ainda, a comunidade científica tem pressionado os órgãos competentes para que medidas regulatórias

sejam desenvolvidas. Há vários países como Japão, Estados Unidos, União Europeia, inclusive o Brasil que estão engajados para que haja regulamentação do uso das nanopartículas, todavia ainda estamos em processo iniciais.

Em meados de 2010, a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI) começou a divulgar interesses sobre a nanotecnologia, visando seu potencial econômico. Três anos depois a ABDI divulgou um relatório sobre a regulação da nanotecnologia na área da saúde, que mostrava os passos iniciais nessa área. Expuseram também que o órgão regulador, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), ainda não havia definido uma legislação específica para a nanotecnologia, embora aprovasse produtos de base nanotecnológicas, com avaliações pontuais (ABDI, 2013). Vale informar que esse foi o último relatório publicado pela ABDI, no entanto nesses últimos anos a Agência tem se dedicado a entender as perspectivas desse cenário, bem como a melhor forma de aliar os interesses da academia e da indústria.

Em 2014 a ANVISA se viu pressionada e criou o Comitê Interno de Nanotecnologia com o objetivo de elaborar normas para avaliação e controle de produtos que utilizam nanotecnologia. Porém, até o momento não há nenhuma legislação divulgada sobre o tema. Para o Conselho Nacional de Meio Ambiente (CONAMA) não há resolução ou relatório publicado até o momento. A partir desse panorama geral, é possível avaliar o quão incipiente e defasada é a legislação brasileira para regulação da nanotecnologia.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Esta pesquisa teve como objetivo geral investigar sobre os efeitos de nanopartículas de cobre na fisiologia das Chlorophyta de água doce *Chlorella sorokiniana* e *Ankistrodesmus densus*. Para isso, primeiramente buscamos entender sobre a dinâmica das nanopartículas na cultura algal para cada uma das concentrações de exposição, que variaram entre aquelas passíveis de serem encontradas no ambiente e aquelas superiores a essas. Tendo nosso objetivo geral como meta, delineamos quatro objetivos específicos, cada qual correspondendo a um capítulo desta tese.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A seguir são apresentados os objetivos específicos correspondentes a cada um dos capítulos desenvolvidos nesse trabalho.

- ∞ Caracterizar as NPs-Cu e avaliar sua dinâmica na cultura da microalga *Chlorella sorokiniana*. Capítulo 1.
- ∞ Investigar a influência das nanopartículas de cobre na composição bioquímica (carboidratos, proteínas e lipídios totais) e crescimento populacional na microalga *Chlorella sorokiniana*. Capítulo 2.
- ∞ Estudar os efeitos das NPs-Cu na fotossíntese (Φ'_M , Q_p , NPQ, α , I_k , $ETR_{r_{\max}}$) e viabilidade celular de *Chlorella sorokiniana*. Capítulo 3.
- ∞ Examinar os efeitos das nanopartículas de cobre na microalga *Ankistrodesmus densus* sobre a composição bioquímica, fotossíntese e crescimento populacional. Capítulo 4.

4 METODOLOGIA

4.1 MICROALGAS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Os organismos utilizados nesta pesquisa foram *Chlorella sorokiniana* Shihira & Krauss e *Ankistrodesmus densus* Koršikov. *Chlorella sorokiniana* cepa 211-32 (classe Trebouxiophyceae) foi fornecida pelo Instituto de Bioquímica Vegetal e Fotossíntese (IBVF) da Universidade de Sevilla, Espanha e *Ankistrodesmus densus* (classe Chlorophyceae) foi obtida do Banco de Microalgas de Água Doce do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos, Brasil. Essas microalgas foram escolhidas para o presente trabalho porque são facilmente cultiváveis, possuem rápido crescimento e são consideradas cosmopolitas, além de apresentarem diferente sensibilidade, sendo que *Ankistrodesmus densus* tende a ser mais sensível do que *Chlorella sorokiniana*. O meio de cultivo utilizado foi o AAP (US-EPA, 2012) duas vezes concentrado, tendo a concentração de bicarbonato de sódio quadruplicada, tal enriquecimento foi necessário devido à característica oligotrófica desse meio. Água deionizada foi usada como base para a preparação do meio, que foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a 121°C. Utilizamos também o tampão HEPES (1,0 mmol L⁻¹) para manter o pH em torno de 7,5 (KNAUER, 1996).

Para os bioensaios, a concentração celular inicial tanto de *C. sorokiniana* quanto de *A. densus* foi 5x10⁴ células mL⁻¹ proveniente de cultura em fase de crescimento exponencial e cujo estado fisiológico se encontrava ótimo, condição confirmada pelo rendimento quântico máximo do fotossistema II (ϕ_M -FSII ~0,70) (LOMBARDI; MALDONADO, 2011). Todas as culturas foram mantidas sob condições controladas de luminosidade por diodos emissores de luz (LED) em 130 μ mol photons m⁻² s⁻¹ e fotoperíodo (12:12 h - claro:escuro) em temperatura de 24 \pm 1 °C.

Os bioensaios foram realizados em Erlenmeyer de vidro com capacidade de 500 mL contendo 250 mL de meio de cultura. Previamente esses frascos foram silanizados segundo Sundberg et al. (2003), a fim de reduzir adsorção dos metais na parede dos frascos.

As culturas foram agitadas com barras magnéticas apenas nos cultivos de *C. sorokiniana* em velocidade de 300 rpm por ~5 minutos a cada hora num período de 10 horas na fase clara do fotoperíodo durante todo tempo experimental. A agitação foi necessária para manter as NPs suspensas e a velocidade e frequência da agitação foi definida em termos de sobrevivência e saúde celular, pois a agitação em excesso provocava morte do cultivo. Testes prévios mostraram que os cultivos de *A. densus* não suportaram a agitação mesmo com tempo reduzido, assim a agitação foi realizada manualmente e se deu em duas ocasiões, a primeira na retirada de alíquotas para o monitoramento diário e a segunda às 15 h em todos os dias experimentais. Na Figura 3 é apresentada a fotografia do cultivo de *Chlorella sorokiniana* em 72 horas de exposição às NPs.



Figura 3- Fotografia do experimento em 72 horas de cultivo de *Chlorella sorokiniana*, os frascos são posicionados sobre agitadores magnéticos.

4.2 PARÂMETROS DO CRESCIMENTO ALGAL

O monitoramento da biomassa foi feito a cada 24 horas a partir do primeiro dia de exposição às NPs-Cu até 96 horas de cultivo e se encontravam em fase de crescimento exponencial durante esse período. O crescimento populacional e a viabilidade celular de *Chlorella sorokiniana* foram acompanhadas em citômetro (Muse® Cell Analyzer, Estados Unidos) que quantificam de acordo com tamanho e a fluorescência celular, natural da clorofila *a*. A confirmação da contagem deu-se em câmara de contagem (Fuchs-Rosenthal espelhada) sob microscópio óptico (Nikon, Japão). A observação ao microscópio é recomendada, pois permite detectar possíveis anomalias na morfologia celular, o que pode ocorrer antes de alteração na

taxa de crescimento ou outros parâmetros fisiológicos. Para *Ankistrodesmus densus* a viabilidade celular foi obtida de acordo com a metodologia descrita em Agustí, Sánchez (2002), que envolve a digestão de células em desequilíbrio homeostático utilizando as enzimas DNase I e Tripsina. Essa medida se deu em 72 horas de cultivo e foi quantificada em câmara de contagem (Fuchs-Rosenthal espelhada) sob microscópio óptico (Nikon, Japão).

Diariamente o pH foi monitorado (pHmetro Gehaka, Brasil), assim como realizadas análises de fluorescência da clorofila *a in vivo* (Fluorímetro Turner Designs-Trilogy, Estados Unidos) para ambas microalgas.

4.3 PARÂMETROS DA FOTOSSÍNTESE

Medidas de fluorescência da clorofila *a* em amostras dos cultivos foram realizadas usando a fluorimetria de amplitude de pulso modulada (Pulse Amplitude Modulated – PAM), empregando-se o equipamento PhytoPAM (Walz, Alemanha). Com esta técnica quantificamos o rendimento quântico máximo (células algais adaptadas ao escuro por 20 minutos) do fotossistema II diariamente, enquanto o rendimento quântico efetivo foi monitorado em 72 horas de cultivo.

Uma série de medidas de fluorescência em decorrência de excitações luminosas é realizada pelo equipamento para que seja possível os cálculos do rendimento quântico máximo (ou potencial fotossintético máximo) e efetivo (ou fotossíntese real, que poderá ocorrer mediante iluminação da microalga) do fotossistema II (FSII). Brevemente, tem-se que a fluorescência basal inicial produzida pelas células adaptadas ao escuro (F_0) é quantificada sob luz de baixa intensidade ($1 \mu\text{mol ftons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) de modo que se evita a redução do FSII. Em seguida obtém-se a fluorescência máxima (F_M) que é obtida pela aplicação de um pulso de luz saturante (0,2 s; $2000 \mu\text{mol ftons m}^{-2} \text{s}^{-1}$) gerado por fonte de luz halógena (EKE 150 w GX5.3, OSRAM) de modo a causar a total redução do *pool* acceptor de elétrons do FSII e por conseguinte induzir aumento do sinal de fluorescência do nível basal (F_0) para o nível máximo (F_M). Com esses parâmetros foi possível calcular a fluorescência variável ($F_v = F_M - F_0$) e o rendimento quântico máximo ($\Phi_M = F_v/F_M$). Após essas medidas inicia-se a quantificação das fluorescências análogas às obtidas no escuro, mas sob iluminação. Essas são

referidas como fluorescências efetivas. Para essas, um pulso de uma luz actínica ou fotossinteticamente ativa (PAR) de $130 \mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ é aplicado em uma al\u00edquota do cultivo a cada 20 s durante 10 min, o que alterou a fluoresc\u00eancia em estado est\u00e1vel (F_s) e permitiu a medida da fluoresc\u00eancia adaptada \u00e0 luz (F'_M) e conseq\u00fcentemente o rendimento qu\u00e2ntico efetivo (Φ'_M). A fluoresc\u00eancia m\u00ednima adaptada \u00e0 luz (F'_0) foi calculada segundo equa\u00e7\u00e3o apresentada em Oxborough e Baker (1997).

Os par\u00e2metros de fluoresc\u00eancia adaptados ao escuro e \u00e0 luz possibilitaram os c\u00e1lculos da dissipaa\u00e7\u00e3o fotoqu\u00edmica (por\u00e7\u00e3o de energia destinada \u00e0 fotoqu\u00edmica da fotoss\u00edntese), e dissipaa\u00e7\u00e3o n\u00e3o-fotoqu\u00edmica (energia perdida na forma de calor como mecanismo de defesa induzido por excesso de luz). Esses par\u00e2metros foram calculados segundo Juneau, Berdey, Popovic (2002) e Lombardi, Maldonado (2011). O branco de fluoresc\u00eancia foi obtido a partir da subtra\u00e7\u00e3o da fluoresc\u00eancia produzida em amostra de cultura filtrada em filtros de membrana de mistura de \u00e9steres (Fmaia, Brasil) com $0,20 \mu\text{m}$ de tamanho de poro.

$$F_v = F_M - F_0 \quad (1)$$

$$\Phi_M = \frac{F_M - F_0}{F_M} \quad (2)$$

$$\Phi'_M = \frac{F'_M - F_s}{F'_M} \quad (3)$$

$$Q_p = \frac{F'_M - F}{F'_M - F'_0} \quad (4)$$

$$NPQ = \frac{F_M - F'_M}{F'_M} \quad (5)$$

Onde,

Φ_M : rendimento qu\u00e2ntico m\u00e1ximo

Φ'_M : rendimento qu\u00e2ntico efetivo

F'_M : fluoresc\u00eancia m\u00e1xima em adapta\u00e7\u00e3o \u00e0 luz

F'_0 : fluoresc\u00eancia m\u00ednima em adapta\u00e7\u00e3o \u00e0 luz

F_M : fluoresc\u00eancia m\u00e1xima em adapta\u00e7\u00e3o ao escuro

F_0 : fluoresc\u00eancia m\u00ednima em adapta\u00e7\u00e3o ao escuro

F_s : fluoresc\u00eancia em estado est\u00e1vel de transporte de el\u00e9trons

F_v: fluorescência variável

Q_p: dissipação fotoquímica

NPQ: dissipação não-fotoquímica relacionada a dissipação de calor

4.4 CURVA DE SATURAÇÃO LUMINOSA

Curvas rápidas de saturação de luminosa foram obtidas em 72 horas de cultivo através do Phyto-PAM (Walz, Alemanha). Essas curvas consistem da relação entre taxas fotossintéticas (ou parâmetro equivalente, como taxa de liberação de O₂ ou assimilação de ¹⁴C) e a irradiância fotossinteticamente ativa (PAR). No nosso caso, a PAR variou de 0 a 1728 μmol fótons m⁻² s⁻¹ com pulsos executados a cada 20 segundos para cada intensidade luminosa, gerando valores de rendimento quântico efetivo por aproximadamente 8 minutos. Esses valores multiplicados pelo PAR nos forneceu a taxa de transporte de elétrons (ETR_r) (ENRÍQUEZ; BOROWITZKA, 2010) que foi por sua vez usada para a elaboração das curvas rápidas de saturação luminosa (ETR_r *versus* PAR). Feito isso, os dados foram ajustados segundo Platt, Gallegos, Harrison (1980), o que nos forneceu os parâmetros alfa, ETR_{máx} e I_k. Alfa (α), dado em μmol ã m⁻² s⁻¹[μmol fótons m⁻² s⁻¹]⁻¹ corresponde à inclinação da curva onde a intensidade luminosa PAR é o único fator que limita a fotossíntese, ETR_{máx}, a taxa máxima do transporte de elétrons (ETR_{r máx} - μmol ã m⁻² s⁻¹) e I_k representa a irradiância de saturação luminosa onde se inicia processo de fotoinibição (I_k - μmol fótons m⁻² s⁻¹), que é obtida da razão entre ETR_{r Máx} e α. Segue abaixo o esquema gráfico dos parâmetros da curva de saturação de luz.

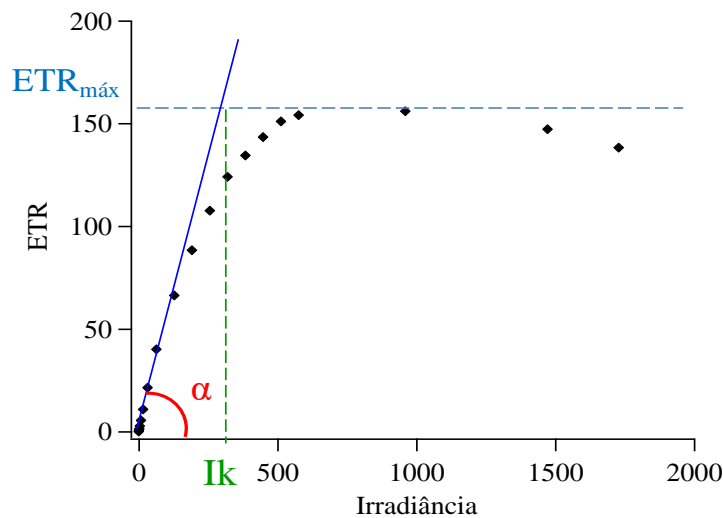


Figura 4- Representação esquemática de curva de saturação luminosa, com ilustração dos parâmetros $ETR_{máx}$, I_k e α .

4.5 PRODUTIVIDADE PRIMÁRIA BRUTA

Para *A. densus* a produtividade primária bruta foi calculada a partir da taxa de transporte de elétrons absoluta ($ETRa - \mu\text{mol } e^- [\text{mg Chl } a]^{-1} \text{ s}^{-1}$) e a absorção óptica da clorofila conhecida como *cross section* ($a^* - \text{m}^2 \text{ mg}^{-1}$) (KROMKAMP; FORSTER, 2003) pela equação (6) abaixo.

$$ETR = a^* \times 0,5 \times E \times \Phi'_M \quad (6)$$

Onde,

a^* : coeficiente da absorção óptica da clorofila, entre 400 a 700 nm

E : intensidade luminosa utilizada no cultivo ($\mu\text{mol } \text{fótons } \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)

Φ'_M : Rendimento quântico efetivo

O valor de 0,5 na multiplicação é resultante da convenção de que 50% da intensidade luminosa incide sobre o PSII e 50% sobre o PSI.

A produtividade primária bruta ($P^B - \text{mol } C [\text{mg Chl } a]^{-1} \text{ s}^{-1}$) foi estimada segundo descrito em Kromkamp, Forster (2003) e Morris et al. (2008) pela equação (7) apresentada abaixo.

$$P^B = ETR \cdot \Phi_e \quad (7)$$

Onde,

Φ_e : coeficiente de rendimento da fixação de carbono ($\text{mol C} [\text{mol elétrons}]^{-1}$)

ETR: é a ETR absoluta, calculada anteriormente.

O valor de Φ_e teórico foi assumido como sendo 0,2, pois segundo Morris et al. (2008) o PSII requer 5 elétrons para cada molécula de carbono fixada.

4.6 SILANIZAÇÃO

O processo de silanização visa redução da atração eletrostática que há entre a parede do frasco e as nanopartículas, evitando que estas fiquem adsorvidas nas paredes do frasco, tornando-as mais acessíveis às algas. Esse procedimento se faz necessário, uma vez que o agente tóxico deve necessariamente estar presente no meio para que possa exercer algum efeito. Devido à alta reatividade das NPs, a silanização é pertinente.

Um experimento prévio foi desenvolvido com a finalidade de verificar a eficiência da silanização quanto a reduzir problemas de adsorção das nanopartículas na parede dos frascos. Para isso utilizamos $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ NPs-Cu em água ultrapura e autoclavada e em frascos Erlenmeyer de vidro, com e sem a silanização, e de policarbonato. Todos com três réplicas. A quantificação do cobre livre foi feita por meio de ISE após a ultracentrifugação de 50 mL de amostra. O tempo de contato do cobre com os frascos silanizados e não silanizados foi 24 h.

Esse procedimento seguiu a metodologia descrita por Sundberg et al. (2003). Primeiramente, adicionou-se uma solução de ácido sulfúrico - H_2SO_4 (J.T.Baker, México) na concentração de $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ num volume suficiente para passar uniformemente em todo interior dos Erlenmeyers por 20 segundos, em seguida o ácido foi descartado e água deionizada foi usada para a tríplice lavagem desses frascos. Posteriormente, metanol - CH_3OH (J.T.Baker, México), acetona - CH_3CH_3 (Quemis, Brasil) e clorofórmio - CHCl_3 (Synth, Brasil) foram adicionados no interior

do frasco por 20 segundos cada, semelhante ao feito com o ácido sulfúrico. Após esse procedimento os recipientes foram secos com gás nitrogênio. Após os frascos secarem totalmente, uma solução de clorotrimetilsilano - C_3H_9ClSi (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) 5% (v/v) em acetona foi passada uniformemente por todo interior dos Erlenmeyers durante 20 segundos. Em seguida, o clorofórmio foi usado para enxaguar duas vezes o interior dos recipientes. Finalmente, os frascos foram secos com gás nitrogênio e tampados com filme plástico (parafilm "M"[®], BEMIS[®], Estados Unidos). Todos esses processos foram realizados em capela para exaustão de gases, além de luvas nitrílicas, óculos de proteção e máscara.

4.7 CARACTERIZAÇÃO DAS NPs-Cu

As nanopartículas de cobre (NPs-Cu) foram adquiridas da Sigma-Aldrich (CAS: 7440-50-8) e usadas para os testes do presente estudo. Os tamanhos das partículas variavam de 40 a 60 nm e 99,9% de pureza, de acordo com as especificações do fabricante. A caracterização das NPs-Cu foi realizada no Laboratório de Nanocaracterização e Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica da UFSCar, São Carlos (SP, Brasil), a fim de confirmar as especificações fornecidas pelo fabricante.

A análise do diâmetro médio e cristalinidade das NPs-Cu foi realizada por difração de raio x (DRX) utilizando-se o equipamento LAB X XRD – 6000 (Shimadzu, Japão) com radiação de $CuK\alpha$ ($\lambda = 0,154$ nm). Os dados foram coletados em 2θ variando de 20° a 80° com uma taxa de varrimento de varredura e tamanho do passo de $0,2^\circ/\text{min}$ e $0,02^\circ$, respectivamente. O cálculo do tamanho de cristalito foi realizado pela equação de Debye-Scherrer segundo Gorelik et al. (1963). Foi realizado também um procedimento que excluiu o efeito instrumental da técnica, resultando em medidas mais precisas do cristalito.

Equação de Debye-Scherrer:

$$D_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cos(\Theta)} \quad (8)$$

Onde:

D: tamanho de cristalito;

K: constante dependente da forma das partículas;
 β : largura na metade da altura do pico da difração;
 λ : comprimento de onda da radiação eletromagnética;
 θ : ângulo de difração.

A morfologia das NPs-Cu foram observadas em microscopia eletrônica de varredura (MEV) (FEI-Inspect F50, Estados Unidos) e microscopia eletrônica de transmissão (MET) (FEI-TECNAI G², Estados Unidos). As amostras foram dispersas em propanol em concentração de $\sim 1,5 \times 10^5 \mu\text{g L}^{-1}$ de NPs-Cu e posteriormente submetidas à ultrassom. Propanol foi utilizado a fim de reduzir a agregação da NPs, possibilitando melhor mensuração.

4.8 DISPERSÕES DE NPs-Cu

As quantificações das NPs-Cu foram realizadas de maneira indireta, a partir das determinações das concentrações do metal que a constitui (Cu). Assim determinamos as concentrações de cobre utilizando eletrodo íon seletivo específico para cobre (ISE-Cu) e espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS) para quantificar as NPs presentes no cultivos de *C. sorokiniana* e ISE-Cu para *A. densus*. Os valores obtidos podem ser visualizados no capítulo 1 desse trabalho. As técnicas de ICP-MS e ISE são detalhadas abaixo, no tópico “quantificação de cobre”.

Quanto às concentrações ambientais de NPs-Cu, não encontramos estimativa na literatura, mas Mueller, Nowack (2008) estimaram que a concentração de NPs-NPs-TiO₂ em rios e lagos da Suíça é da ordem de 9×10^{-9} a $2 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$. Assumimos, nesta pesquisa, a ordem de grandeza encontrada pelos autores para NPs-TiO₂ como sendo equivalente às NPs-Cu (0,57 a $12,70 \mu\text{g L}^{-1}$).

Todos os padrões de NPs-Cu foram manipulados em cabine de fluxo laminar (Veco, Brasil) e em atmosfera de nitrogênio para evitar sua oxidação e contaminação. As dispersões de nanopartículas foram sonicadas (sonicador ultrasônico-DES500, Brasil) por 30 minutos, a fim de reduzir a aglomeração e sedimentação (ARUOJA et al., 2009) antes do uso. As dispersões de NPs-Cu foram preparadas com água deionizada ultrapura ($\sigma = 18,1 \text{ M}\Omega\text{cm}$) e autoclavada. Na

Tabela 2 são apresentadas as concentrações nominais utilizadas em cada experimento.

Tabela 2- Concentrações nominais de NPs-Cu usadas nos experimentos. O controle não recebeu adição de NPs-Cu.

<i>C. sorokiniana</i> $\mu\text{g L}^{-1}$	<i>A. densus</i> $\mu\text{g L}^{-1}$
0,5	0,3
0,6	0,6
2,5	3,2
3,8	6,4
5,1	31,8
6,4	63,5
9,0	127,1
12,7	317,7
18,0	635,5
25,4	
38,1	
50,8	
63,5	
95,0	
127,1	
254,2	
381,3	
508,4	
635,5	

4.9 QUANTIFICAÇÃO DE COBRE

Na Figura 5 é apresentado um fluxograma resumido para o estudo da dinâmica do cobre no meio de cultura que considerou o cobre particulado, dissolvido e livre, proveniente das NPs-Cu e em seguida são descritas as metodologias para as diferentes frações do metal.

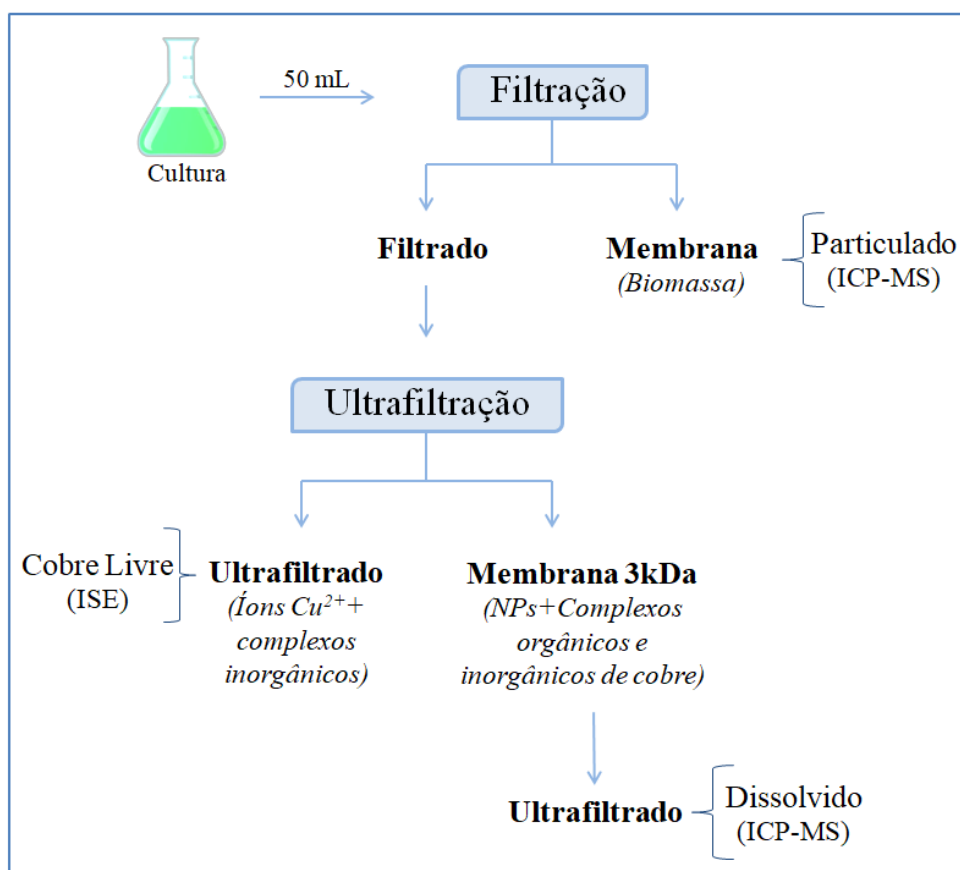


Figura 5- Fluxograma dos processos para obtenção das frações do cobre para a quantificação em ICP-MS e ISE.

Cobre particulado – ICP-MS

O cobre particulado, constituído de NPs-Cu e seus íons adsorvido e/ou absorvido na biomassa algal, foi determinado após 24 h de exposição em alíquotas de 50 mL para os cultivos de *C. sorokiniana*. Experimentos prévios indicaram que

após esse tempo a concentração permanecia constante, demonstrando estabilidade na liberação de íons da NPs em 24 h de cultivo, além da literatura indicar esse tempo para que ocorra o equilíbrio químico entre os componentes do meio e o metal estudado (KNAUER, 1996; DOMINGOS et al., 2011). Logo esse tempo foi necessário para que o estabelecimento do equilíbrio químico entre as NPs-Cu e os componentes do meio de cultivo. A amostra do cultivo foi filtrada em membrana de acetato de celulose com poro de 0,45 µm (Sartorius, Alemanha) previamente lavada com HCl 0,1 mol L⁻¹ e enxaguada com água ultrapura como descrito em Lombardi, Vieira, Sartori (2002). A porção retida na membrana, que corresponde ao metal presente na biomassa, sem distinção entre adsorvido e absorvido pela célula, ao que denominamos *metal particulado* foi destinada à quantificação do cobre pela técnica de espectrometria de massa com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS Agilent 8800, Tóquio, Japão). A digestão das membranas foi feita de acordo com a metodologia apresentada em Lombardi, Vieira, Sartori (2002) que tem como base água régia (3,0 mol L⁻¹ HNO₃/ 1,0 mol L⁻¹ HCl) preparada com ácidos ultrapuros (Fluka, Suíça), seguida de filtração para separar a membrana digerida do metal particulado, que enfim foi quantificado por ICP-MS. Branco analítico foi realizado usando as membranas de acetato de celulose pré-lavadas como citado acima.

Cobre livre – ISE

O cobre livre foi quantificado para as microalgas *C. sorokiniana* e *A. densus* após 24 h de cultivo. A porção filtrada, ou seja, a que passou através da membrana de 0,45 µm foi submetida ao processo de ultrafiltração, promovendo a separação dos íons cobre livre das nanopartículas e complexos inorgânicos. Os filtros de ultracentrifugação (Amicon® ultra15, 3kDa, Merck Millipore Ltd., Irlanda) usados foram submetidos à rotação de 4000 rpm (centrífuga Thermo Fisher Scientific, Sorvall Legend XTR, Alemanha), a 20 °C por 60 minutos ou até não haver redução no volume retido na membrana (DOMINGOS et al., 2011). A porção filtrada, ou seja, a que passou através da membrana (partículas < 3kDa) foi quantificada utilizando eletrodo de íon seletivo (ISE), em potenciômetro (Thermo Fisher Scientific, Orion Star A214, Singapura) com o eletrodo seletivo ao íon de cobre (Thermo Fisher Scientific, Orion 9429BN, Estados Unidos) junto a eletrodo de referência de junção dupla (Thermo Fisher Scientific, Orion 900200, Estados Unidos). A força iônica das

amostras foi ajustada para $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ com NaNO_3 de altíssima pureza (99,9% pureza, Sigma-Aldrich, Alemanha).

Padrão de cobre comercial para ICP (1000 mg L^{-1} , SpecSol[®], Brasil) foi utilizado para elaboração da curva de calibração (diluições seriadas) previamente à leitura das amostras, assim como um tampão metálico, no caso de cobre foi utilizado para ampliar o limite de detecção do sistema ISE. Com o auxílio do padrão de cobre, atingimos concentrações de cobre livre de $6,6 \times 10^{-13} \text{ mol L}^{-1}$ para os experimentos com *C. sorokiniana* e $4,3 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$ para *A. densus*. As curvas de calibração são apresentadas na Figura 6. A técnica encontra-se descrita em Tonietto et al. (2016).

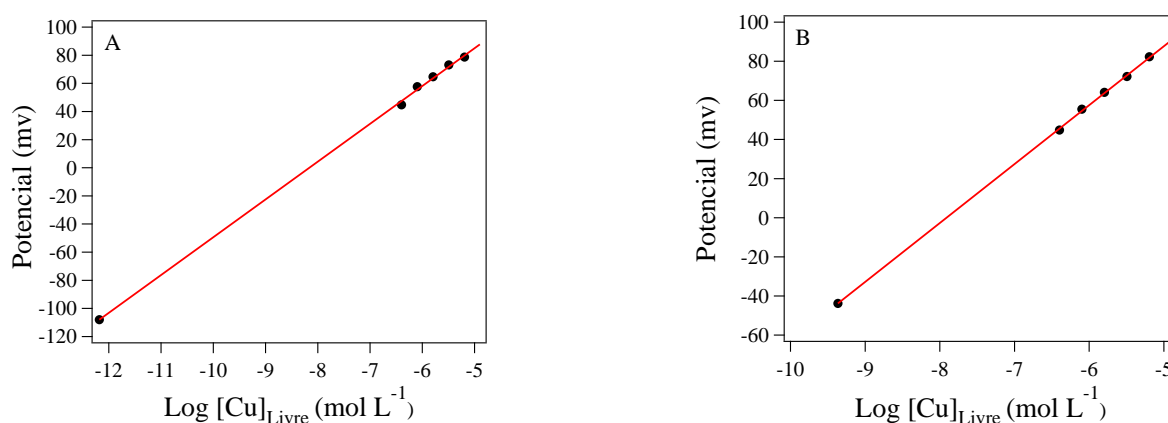


Figura 6- Curvas de calibração para os íons de cobre livre. Potencial (mv) em função do log da concentração do cobre livre (mol L^{-1}) em água ultrapura. Força iônica= $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (NaNO_3), $\text{pH}=5,0$. A: para *Chlorella sorokiniana* e em B: para *Ankistrodesmus densus*.

Cobre dissolvido – ICP-MS

Os cultivos de *C. sorokiniana* tiveram o cobre dissolvido quantificado com 24 h de cultivo. A porção retida nos filtros de ultracentrifugação (Amicon[®] ultra15, 3kDa, Merck Millipore Ltd., Irlanda) eram constituídas por NPs-Cu e complexos orgânico e inorgânico de cobre ($> 3 \text{ kDa}$). À essa porção foi adicionado HNO_3 2% ultrapuro (Fluka, Suíça) e se fez necessária a repetição do processo de ultrafiltração nas mesmas condições citadas acima (rotação de 4000 rpm, a $20 \text{ }^\circ\text{C}$ por 60 minutos ou até não haver redução no volume retido na membrana) (DOMINGOS et al., 2011).

Esse processo teve a finalidade de separar a fração < 3 kDa, ou seja a fração constituída de cobre dissolvido que se encontrava no meio de cultivo. Esse processo permitiu determinar a concentração do metal dissolvido utilizando ICP-MS. O limite de detecção para a técnica de ICP-MS foi $1,45 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹ de cobre.

4.10 CARBOIDRATOS TOTAIS

Alíquotas de 30 mL de cultura foram coletadas em 72 horas (fase exponencial de crescimento) para a determinação da concentração de carboidratos totais com base na metodologia descrita em Albalasmeh, Berhe, Ghezzehei (2013). Esse método tem como base o método do ácido sulfúrico sem adição de fenol, tendo glicose como padrão para a curva de calibração. As absorbâncias das amostras foram determinadas no comprimento de onda de 315 nm obtida em espectrofotômetro (NANOCOLOR uv/vis, Macherey-Nagel, Estados Unidos).

4.11 PROTEÍNAS TOTAIS

A extração de proteínas foi realizada segundo Rausch (1981) seguida da metodologia descrita por Bradford (1976) para determinação das proteínas totais. Utilizou-se o padrão de albumina bovina (BSA - Albumina sérica bovina) para elaboração da curva de calibração. As leituras das absorbâncias foram realizadas no espectrofotômetro (NANOCOLOR uv/vis, Macherey-Nagel, Estados Unidos) no comprimento de onda de 595 nm. Para esta análise foram coletadas alíquotas de 50 mL de cultura com 72 h de exposição.

4.12 LIPÍDIOS TOTAIS E CLASSES LIPÍDICAS

Lipídios totais foi determinado nos cultivos de *C. sorokiniana* segundo, Silva, Echeveste, Lombardi (2018), enquanto que para a microalga *A. densus* determinou-se além dos lipídios totais, as classes lipídicas de acordo com Parrish (1999).

Alíquotas de 50 mL foram filtradas em membrana de fibra de vidro (Sartorius, Alemanha) previamente calcinadas em mufla à 400 °C por 8 h (EDG equipamentos mod. 7000) em 72 h de cultivo. Essas membranas contendo a biomassa foram armazenadas submersas em clorofórmio sob atmosfera de nitrogênio em frascos de vidro previamente calcinados e lavados com metanol e clorofórmio. As amostras

foram conservadas em freezer (-20 °C) até o momento da extração e concentração dos lipídios (Parrish, 1999), diminuindo assim o potencial de contaminação.

O procedimento de extração dos lipídios totais estão de acordo Parrish (1999), no qual os filtros são macerados com solventes (metanol e clorofórmio) em frascos de Teflon[®] com o auxílio de um bastão de vidro. Para aumentar a eficiência da extração, as amostras foram sonicadas e posteriormente centrifugadas. O sobrenadante foi coletado com pipetas de Pasteur e guardado em frascos de vidros. Esse processo se repetiu três vezes até que os frascos foram armazenados em atmosfera de nitrogênio para evitar a oxidação dos lipídios. Todo e qualquer material de vidro que fosse entrar em contato com as amostras durante a conservação, extração, concentração e análise dos lipídios eram previamente calcinados e enxaguado com metanol e clorofórmio no momento de uso. No caso dos materiais de Teflon[®], fazia-se apenas o enxague metanol e clorofórmio no momento de uso. As amostras extraídas foram colocadas em balão de vidro e concentradas em um rotaevaporador com temperatura máxima de 25 °C.

Os procedimentos de quantificação foram diferentes para lipídios totais ou classes lipídicas, os quais são descritos a seguir.

Lipídios totais

Para os cultivos de *C. sorokiniana* foram determinados lipídios totais de acordo com a metodologia descrita em Silva, Echeveste, Lombardi (2018). O método prevê o uso de um padrão lipídico composto constituído por 4 classes: tripalmitina, monopalmitol, hexadecil e nonadecano que foram utilizadas para fins de calibração e, ao invés de múltiplos desenvolvimentos e procedimentos de migração de lipídios, um único solvente polar foi usado para migração dos lipídios e uma única varredura foi realizada. A migração dos lipídios foi realizada em bastões de quartzo Iatroscan inseridos em tanques de quartzo em temperatura e umidade controladas, tendo acetona (grau HPLC) como solvente. Foi utilizado o cromatógrafo TLC/FID (IATROSCAN MK-6/6s) para quantificação dos lipídios. O software Peak Simple versão 3.93 (SRI Instruments, Menlo Park, Califórnia, EUA) foi utilizado para quantificar os lipídios.

Classes lipídicas

Para *A. densus* foi realizada a determinação das classes lipídicas de acordo com o descrito em Parrish (1999) utilizando-se um cromatógrafo (IATROSCAN MK-6/6s). O processo constituiu-se do fracionamento dos lipídios em composições distintas de solventes, permitindo a separação pela polaridade dos lipídios. O primeiro fracionamento consistiu de hexano:dietiléter:ácido fórmico (98,95:1,0:0,05), separando hidrocarbonetos alifáticos (HC), ésteres de cera (WE) e etil cetona (KET, padrão interno). O segundo fracionamento se deu em hexano:dietiléter:ácido fórmico (79,0:10,0:1,0) que possibilitou a separação de triacilgliceróis (TG), ácidos graxos livre (FFA), alcoóis alifáticos livre (ALC) e esteróis livres (ST). Para o terceiro fracionamento utilizou-se acetona (100%), seguindo para o quarto fracionamento que utilizou clorofórmio:metanol:água (5,0:4,0:1,0) para separação, desses fracionamentos foi possível obter os lipídios móveis em acetona (AMPL) e fosfolipídios (PL). O software Peak Simple versão 4.54 (SRI Instruments, Menlo Park, Califórnia, EUA) foi utilizado para quantificar os lipídios.

4.13 LIMPEZA DOS MATERIAIS

Todos os materiais utilizados foram previamente lavados com detergente neutro e escova, posteriormente foram enxaguados com água da torneira e em seguida com água deionizada, no mínimo três vezes com cada uma das águas. Em seguida, os materiais utilizados no cultivo da alga foram deixados imersos em solução de HCl 10% (grau analítico) por sete dias e enxaguados com água deionizada e ultrapura, também três vezes. Enquanto que os materiais utilizados com as NPs-Cu e nas técnicas de ICP-MS e ISE foram imersos em HNO₃ 10% (grau analítico) pelo mesmo período (7 dias) e enxaguados três vezes com água deionizada e três vezes com água ultrapura. Os materiais secos foram condicionados em sacos plásticos duplos, a fim de reduzir contaminação. Os procedimentos de limpeza descritos anteriormente seguem as recomendações das técnicas limpas propostas por Campos, Bendo, Viel (2002) para reduzir contaminações para determinação de metais traços.

4.14 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos cultivos de *C. Sorokiniana* tiveram a análise estatística realizada sob o paradigma Bayesiano. Nesse caso, os parâmetros são considerados variáveis aleatórias, o que nos permite compará-las através de probabilidades. Dependendo do comportamento da variável, utilizamos modelos de regressão linear ou não linear para ajustar adequadamente a relação entre cada variável e o logaritmo natural da concentração de Cu particulado.

Ao invés do uso de três réplicas no experimento, optou-se pelo aumento na quantidade de concentrações sem o aumento do tamanho amostral. Este procedimento permite uma análise mais precisa entre as diferentes concentrações sem prejuízo da variabilidade experimental intrínseca a qualquer experimento. O controle foi feito com quatro réplicas.

Os cultivos de *A. densus* foram realizados com três réplicas experimentais de cada tratamento e foi utilizado o programa Sisvar, versão 5,6 (Ferreira 2014) para elaboração dos testes de normalidade, Tukey e ANOVA, com nível de significância de 0,05. Os gráficos foram feitos no programa Igor Pro 5.03.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CAPÍTULO 1

DINÂMICA DAS NANOPARTÍCULAS DE COBRE EM CULTIVOS DA MICROALGA *CHLORELLA SOROKINIANA*.

Resultados

Caracterização das NPs

A partir do difratograma de raio x (Figura 1.1) observa-se a presença de vários picos de difração, sendo que o padrão de difração das NPs-Cu foi indexado para cobre metálico, que apresenta os picos com maior intensidade relativa (Cu, $2\theta = 43,5^\circ, 50,6^\circ$ e $74,3^\circ$). Com base na ficha *ICSD-4349*, uma base de dados para a comparação de picos obtidos pela técnica de difração de raio x, as NPs-Cu apresentam estrutura cúbica de face centrada e grupo espacial *fm-3m*. O tamanho médio de cristalito para as amostras de NPs-Cu, foi de 30,92 nm. Além da fase majoritária ser cúbica, foi possível indexar também a presença de duas fases secundárias atribuídas à fácil oxidação das NPs-Cu, possivelmente pelo oxigênio presente no ambiente. As fases encontradas foram Cu_2O e CuO indexados com as fichas *ICSD-52043* e *ICSD-16025*, respectivamente.

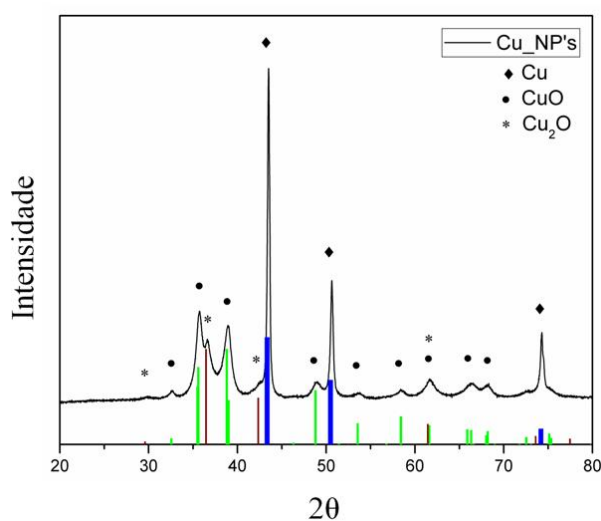


Figura 1.1- Difratograma de raios x de nanopartículas de cobre.

A morfologia e topologia das NPs-Cu, observadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) e de transmissão (MET) são apresentadas na Figura 1.2. Nas imagens observa-se aspectos nas bordas das partículas sugerindo indícios de estrutura lamelar (Figura 1.2D), como se estivessem sobrepostas umas às outras. Na Figura 1.2D, é possível dimensionar com mais facilidade a partícula com tamanho de acordo com os cálculos feitos pela difração de raio x.

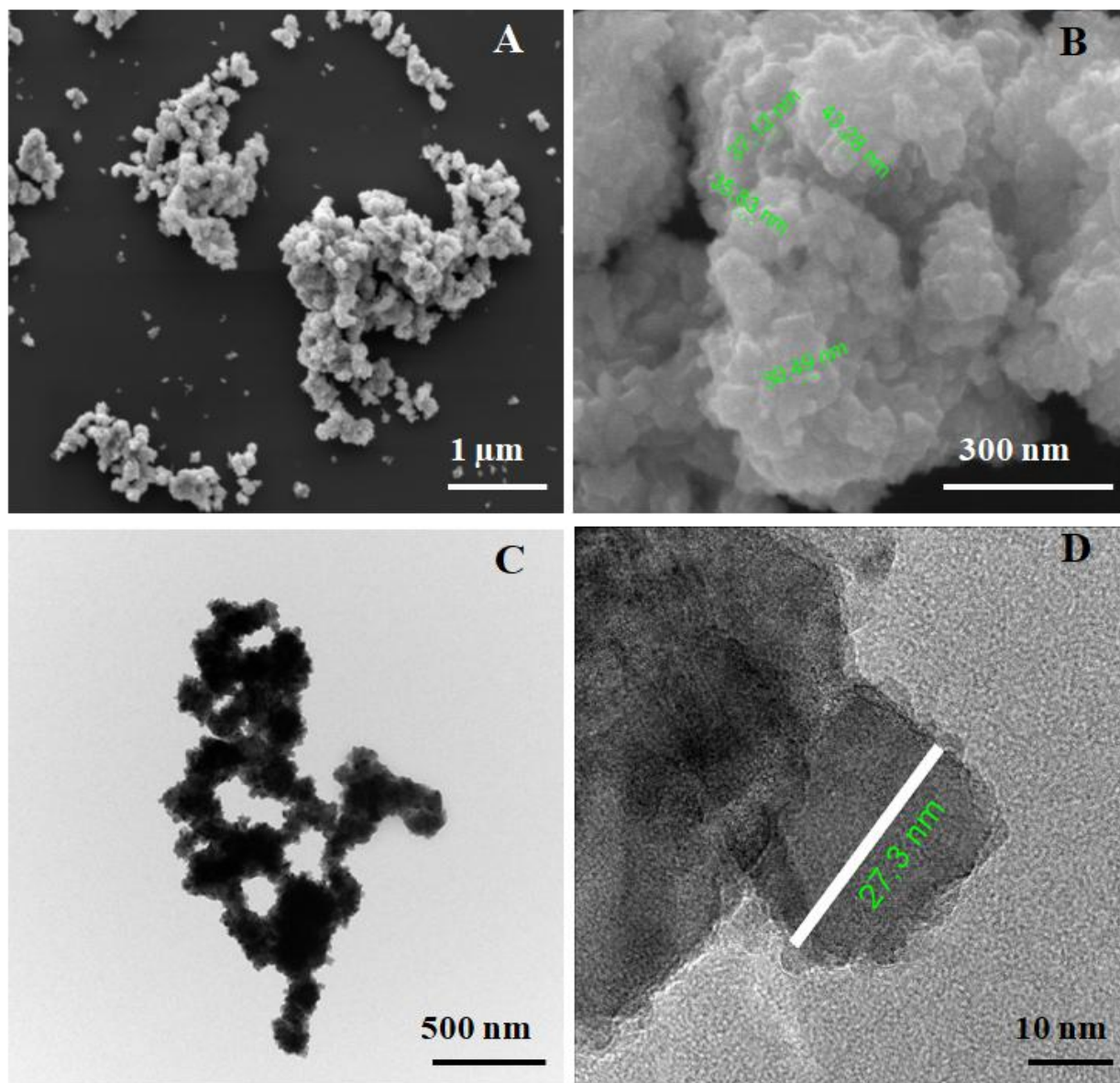


Figura 1.2- Microscopia eletrônica das NPs-Cu utilizadas neste estudo. Figuras A e B mostram a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Figuras C e D microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Dinâmica

Os resultados obtidos na avaliação da eficiência da silanização são apresentados na Figura 1.3. Este gráfico nos mostra que a concentração de íons livres provenientes das NPs foi significativamente maior nos frascos revestidos com silano, sugerindo que estes tendem a ser os mais indicados para estudos com NPs, nos quais a adsorção dos nanomateriais não é desejada.

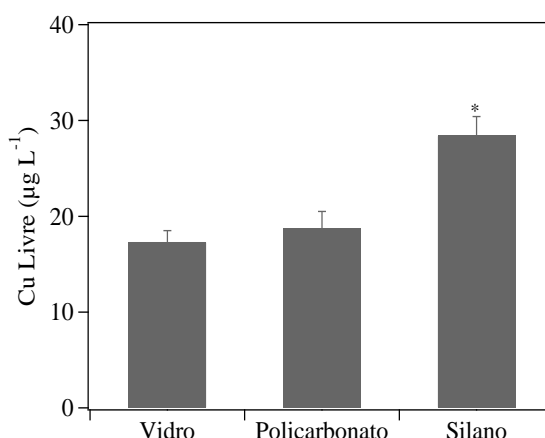


Figura 1.3- Concentração de íons de cobre ($\mu\text{g L}^{-1}$) em diferentes materiais (vidro, policarbonato e frascos de vidro silanizados). As barras de erro indicam o desvio padrão ($n= 3$). * indica diferença estatística entre os tratamentos (ANOVA, $p<0,05$).

A dinâmica das NPs no meio de cultivo e na biomassa é embasada nos resultados da determinação da concentração de cobre das NPs (item 4.9 da Metodologia), os quais são apresentados a seguir (Tabelas 1.1 e 1.2). Na Tabela 1.1 são apresentadas as concentrações de cobre livre quantificadas utilizando (ISE) para os cultivos de *A. densus*. Na Tabela 1.2 são apresentadas as concentrações de cobre determinadas utilizando ICP-MS e ISE para os cultivos de *C. sorokiniana*, sendo que para esta microalga foram determinados: o cobre particulado (adsorvido/absorvido na biomassa algal), o cobre livre e o cobre dissolvido no meio de cultivo.

Tabela 1.1- Concentrações de Cu para cultivos de *Ankistrodesmus densus*. A letra C simboliza o controle.

NP's nominal mol L ⁻¹	Cu iônico livre mol L ⁻¹	Cu iônico livre µg L ⁻¹
1,4x10 ⁻¹⁰ (C)	2,0x10 ⁻⁹ ± 71,x10 ⁻¹⁰ (C)	0,13 ± 0,05 (C)
5,0x10 ⁻⁹	2,1x10 ⁻⁹ ± 1,1x10 ⁻¹⁰	0,13 ± 0,01
1,0x10 ⁻⁸	2,9x10 ⁻⁹ ± 3,4x10 ⁻¹⁰	0,18 ± 0,02
5,0x10 ⁻⁸	3,1x10 ⁻⁹ ± 5,8x10 ⁻¹⁰	0,20 ± 0,04
1,0x10 ⁻⁷	3,8x10 ⁻⁹ ± 3,9x10 ⁻¹⁰	0,24 ± 0,02
5,0x10 ⁻⁷	4,8x10 ⁻⁹ ± 5,1x10 ⁻¹⁰	0,31 ± 0,03
1,0x10 ⁻⁶	5,1x10 ⁻⁹ ± 1,3x10 ⁻¹⁰	0,32 ± 0,01
2,0x10 ⁻⁶	6,5x10 ⁻⁹ ± 6,6x10 ⁻¹⁰	0,41 ± 0,04
5,0x10 ⁻⁶	7,2x10 ⁻⁹ ± 8,9x10 ⁻¹⁰	0,46 ± 0,06
1,0x10 ⁻⁵	8,4x10 ⁻⁹ ± 4,1x10 ⁻¹⁰	0,53 ± 0,02

Tabela 1.2- Concentrações de Cu para cultivos de *Chlorella sorokiniana*. A letra C simboliza o controle.

NPs nominal $\mu\text{g L}^{-1}$	Cu particulado $\mu\text{g L}^{-1}$	Cu dissolvido $\mu\text{g L}^{-1}$	Cu iônico livre $\mu\text{g L}^{-1}$
$0,53 \pm 0,03$ (C)	$1,55 \pm 0,01$ (C)	$0,24 \pm 0,02$ (C)	$0,27 \pm 0,01$ (C)
0,51	1,49	0,27	0,68
0,64	1,60	0,28	0,88
2,54	4,98	0,52	0,78
3,81	6,35	0,24	0,69
5,08	7,54	0,35	0,72
6,35	4,75	0,42	0,57
9,02	9,07	0,28	0,62
12,71	12,24	0,37	1,02
17,98	45,79	0,33	1,11
25,42	43,47	0,56	0,75
38,13	40,40	0,50	0,85
50,84	51,70	0,75	0,62
63,55	72,30	0,52	0,70
95,32	172,34	0,95	0,84
127,09	160,46	0,61	0,93
254,18	305,88	2,32	1,45
381,28	394,29	1,99	1,67
508,37	392,94	3,78	1,59
635,46	768,79	3,62	1,76

A figura 1.4A mostra a dinâmica das NPs-Cu em função da concentração nominal de NPs-Cu considerando sua migração para o material particulado. Com um coeficiente de correlação de 0,99 e coeficiente angular de 0,9, à medida que a concentração nominal de NPs-Cu aumentou, a concentração de NPs-Cu particulado aumentou na mesma proporção. A Figura 1.4B mostra a concentração de cobre livre e o cobre dissolvido é apresentado na Figura 1.4C.

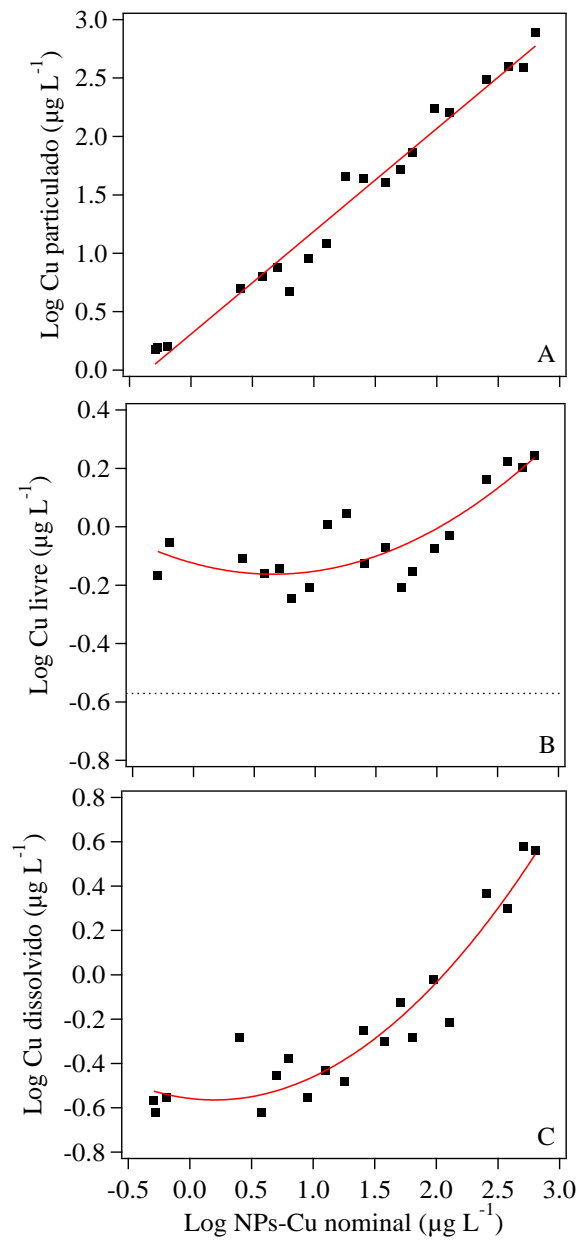


Figura 1.4- A: Concentração do log Cu particulado. Equação: $y = 0,31 + 0,88x$, $r = 0,987$. Na Figura B: Concentração do log Cu livre, linha tracejada representa o controle. Na Figura C: Concentração do log Cu dissolvido. Ambas em função do log NPs-Cu nominal, ambos em $\mu\text{g L}^{-1}$.

Discussão

Caracterização da NPs

As imagens de MEV e MET apresentaram tamanho inferior ao indicado pelo fabricante, porém em concordância com os cálculos feito pela difração de raio x. Müller, Behra, Sigg (2016) encontraram o mesmo tamanho (~30 nm) para as NPs-Cu, contudo em concentrações 1,7 vezes maiores do que as do presente estudo. Demonstramos também a possibilidade de formação de agregados que é uma característica intrínseca das NPs. Dalai et al. (2013) relatam que a formação de agregados é significativa em soluções da ordem de 10^{-5} a 10^{-4} mol L⁻¹. No presente estudo utilizamos concentrações de 10^{-9} a 10^{-5} mol L⁻¹, logo a influência na formação de agregados provavelmente foi intensificada apenas na última concentração testada.

A caracterização das nanopartículas em estudos toxicológicos é de extrema importância (HANDY; OWEN; JONES, 2008), pois auxilia na seleção de materiais que tenham o mínimo de diferença quanto ao tamanho das partículas, além de fornecer informações que possam fundamentar justificativas relacionadas aos efeitos da NPs na microalga. A importância do conhecimento quanto à formação de agregados em estudos de ecotoxicologia reside no efeito dessas formações sobre a toxicidade do material, uma vez que alterando a dimensão haverá alteração da superfície de contato, reatividade e propriedades (HASSELOV et al., 2008). Contudo, Müller, Behra, Sigg (2016) observaram que o aumento do tamanho da partícula não impede a liberação dos seus íons, sendo estes os principais alvos para explicar a toxicidade em microalgas.

Dinâmica

Quanto ao efeito da silanização encontramos que a concentração de íons livre proveniente das nanopartículas foi significativamente diferente nos frascos silanizados, correspondendo a 22,4% da concentração adicionada. Nos frascos de vidro não silanizados e no de policarbonato restou no meio apenas 14,73 e 13,6%, de íons livre respectivamente. Esses resultados mostram a importância da silanização em estudos com nanopartículas. Observamos ainda que ao inocular as microalgas no frasco silanizado, cerca de 100% da concentração nominal de NPs-

Cu adicionada foi quantificada como Cu particulado, ou seja encontrava-se adsorvido/absorvido na biomassa algal, sugerindo menor interação com a parede dos fracos. Essa adsorção pode ter ocorrido por atração eletrostática, uma vez que as microalgas tendem a possuir carga superficial negativa, enquanto que as NPs-Cu carga positiva (MOOS; BOWEN; SLAVEYKOVA, 2014; FOREST; COTTIER; POURCHEZ, 2015). De fato, mostramos que em 24 h de exposição às NPs-Cu aproximadamente 100% das concentrações nominais de NPs-Cu foram detectadas como cobre particulado. Nesse mesmo tempo a porção de cobre livre oriundo das NPs foi de apenas 0,23%, enquanto que Navarro et al. (2008) encontraram 1% de Ag⁺ livre em cultivos de *Chlamydomonas reinhardtii*.

O valor de cobre dissolvido obtido no presente estudo (0,47%) foi similar ao obtido por Müller, Behra, Sigg (2016), que encontraram 0,5% de cobre dissolvido com 2 horas de exposição, mas para concentração 1,7 vezes maior que a utilizada neste presente trabalho, porém esses pesquisadores usaram NPs revestidas, o que poderia justificar a necessidade do aumento na concentração por eles utilizada, já que a liberação do cobre enfrentaria primeiramente a barreira do revestimento.

A literatura mostra que a toxicidade das NPs é dependente dos metais de que são feitas e da dissolução do elemento, passando da forma particulada para a forma iônica dissolvida no meio, sendo que eles atribuem a toxicidade aos seu íons liberados (ARUOJA et al., 2009; BEHRA et al., 2013; MÜLLER, BEHRA, SIGG, 2016) mesmo a concentração livre ou dissolvida correspondendo a uma reduzida porção das NPs adicionadas.

O valor do pH do meio de cultivo influencia diretamente a dissolução das nanopartículas. Behra et al. (2015) observaram que a dissolução de NPs-Ag tendem a ser mais eficiente em valores baixos de pH (menores que 6). Como os nossos valores de pH variaram de 7,32 a 7,94 para *C. sorokiniana* e de 7,58 a 8,19 para *A. densus*, ambas com 24 h de exposição, acreditamos que foi devido a esse fator que a dissolução obtida no presente estudo foi baixa, contudo esses valores de pH são adequados para o crescimento das microalgas, de modo que os resultados obtidos tendem a ser mais realistas. Além disso conforme aumenta o tempo de exposição, as microalgas liberam matéria orgânica para o meio e essas promovem a dissolução dos íons das NPs (WANG et al., 2011; WANG et al., 2015).

No entanto, Navarro et al. (2008) relataram que os íons Ag^+ das NPs não podem explicar totalmente a toxicidade observada. Tais achados corroboram o obtido no presente estudo. Sugerimos então que a principal causa da toxicidade parece estar predominantemente associada a interação física, pois nossa melhor correlação foi obtida entre os teores de cobre nominal e particulado presente na biomassa, sendo este parâmetro utilizado como representante fiel da concentração de NPs-Cu adicionada. Contudo não podemos negligenciar a interação química que também apresentou boa correlação entre cobre nominal e o dissolvido.

Conclusão

O presente estudo mostrou que as NPs-Cu liberam seu íons, porém estes compreendem uma pequena porção no meio de cultivo (0,23% para o cobre livre e 0,5% para o cobre dissolvido), ou seja a interação química atuou de forma sutil. Mostramos também que aproximadamente 100% das NPs-Cu adicionadas foram transferidas do meio de cultura para as células em apenas 24 h de exposição, corroborando a hipótese de que a interação física contribui para a toxicidade.

Logo, podemos concluir que a toxicidade encontrada deve-se principalmente às NPs, portanto a interação física é a predominante, contudo os efeitos do cobre iônico não devem ser desconsiderados, pois a interação química também atua, porém com menor intensidade.

5.2 CAPÍTULO 2

RESPOSTAS FISIOLÓGICAS DE *CHLORELLA SOROKINIANA* À NANOPARTÍCULAS DE COBRE

Resultados

As curvas de crescimento da microalga (células mL⁻¹), plotadas com a densidade populacional das culturas em função do tempo experimental (dias), são apresentadas na Figura 2.1A. As taxas de crescimento (μ) em função da concentração de Cu particulado são mostradas na Figura 2.1B. Observa-se que o padrão de crescimento foi similar em todos os tratamentos e controles, com exceção das concentrações de NPs-Cu particulado na faixa de 306,00 a 769,00 $\mu\text{g L}^{-1}$.

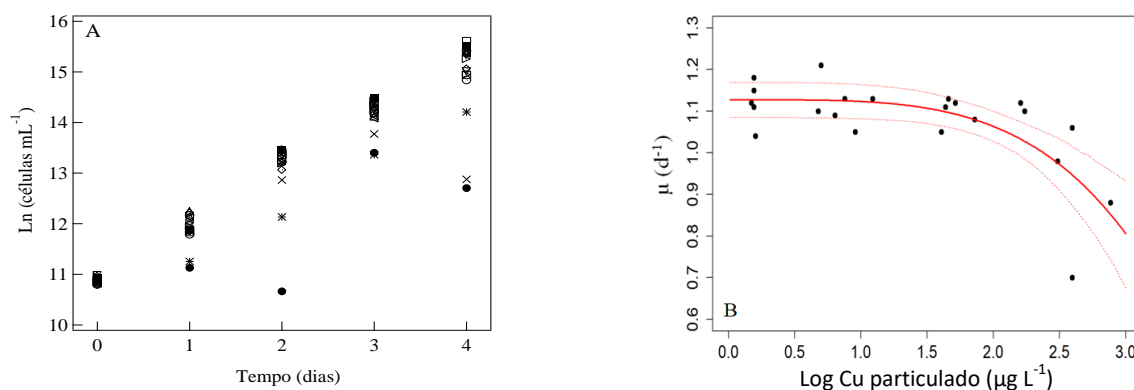


Figura 2.1- A: Curvas de crescimento populacional (Ln células mL⁻¹) em função do tempo experimental (dias), no qual os símbolos se aplicam para as diferentes concentrações de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$) como segue: ■ controle (1,55); ○ 1,49; ⊙ 1,60; □ 4,98; △ 6,35; ▽ 7,54; ◁ 4,75; ▷ 9,07; ⋄ 12,24; ⋄ 45,79; ⋄ 43,47; ◻ 40,40; △ 51,70; ▽ 72,30; ◁ 172,34; ▷ 160,46; × 305,88; ⋄ 394,29; ● 392,94 e * 768,79 $\mu\text{g L}^{-1}$ Cu particulado. Figura B: Taxas de crescimento (μ , d⁻¹) em função do Log das concentrações de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$), a linha sólida representa as taxas de crescimento esperadas, e as linhas tracejadas são a região de credibilidade de 95% para as taxas de crescimento esperadas.

Nessas concentrações, houve redução de biomassa, indicando que a capacidade de divisão das células foi afetada.

A Figura 2.2 mostra a densidade populacional (células mL⁻¹) em função do logaritmo natural da concentração de NPs-Cu particulado, onde a redução da biomassa é observada nas mais altas concentrações testadas. Não foram observadas anomalias morfológicas ao microscópio óptico.

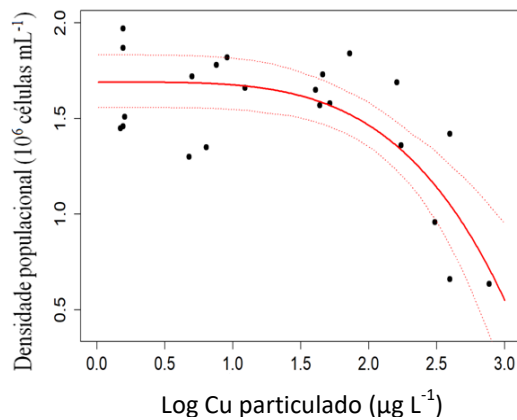


Figura 2.2- Densidade populacional (células mL⁻¹) em função do Log das concentrações de Cu particulado (µg L⁻¹) em 72 h, a linha sólida representa a densidade populacional esperada e as linhas tracejadas são a região de credibilidade de 95% para a densidade populacional esperada.

O rendimento quântico máximo do fotossistema II (Φ_{M-FSII}) mostrado na Figura 2.3 em função do logaritmo natural das concentrações de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$) em 72 h, indica que o aparato fotossintético não foi afetado por nenhuma das concentrações de NPs-Cu testadas, nem mesmo as mais altas.

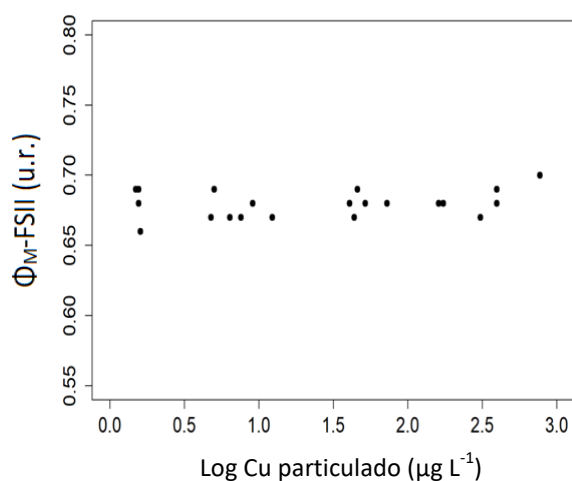


Figura 2.3- Rendimento quântico máximo do fotossistema II (Φ_{M-FSII}) (u.r.) em função do Log das concentrações de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$) em 72 h.

O conteúdo de carboidratos, proteínas e lipídios totais em função do logaritmo natural das concentrações de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$) é apresentado na Figura 2.4. Uma correlação de -0,64 para a concentração de carboidratos (Fig. 2.4A) indica uma tendência de redução desta biomolécula com o aumento de NPs-Cu no meio de cultura, diferentemente do que foi obtido para proteínas (Fig. 2.4B). Nessas observamos um aumento acentuado nas concentrações mais altas de NPs-Cu particulado (393,00 a 769,00 $\mu\text{g L}^{-1}$), e não em valores intermediários ou ambientalmente significativos. A produção e o acúmulo de lipídios não foram afetados pela faixa de NPs-Cu testada, como mostrado na Figura 2.4C.

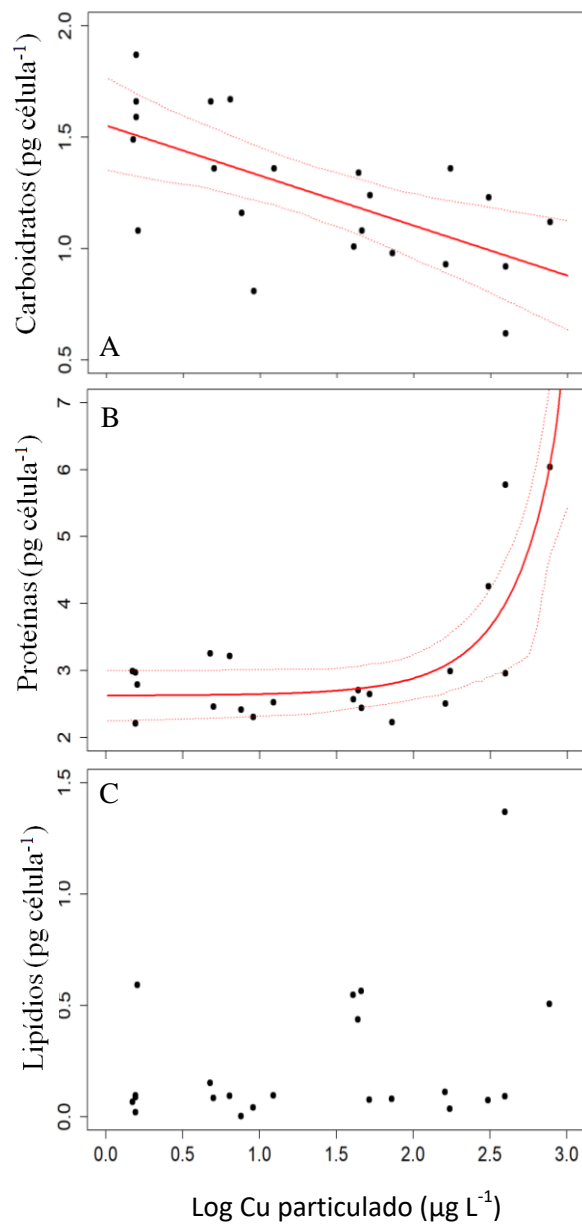


Figura 2.4- A: Concentração total de biomoléculas intracelulares em função do Log das concentrações de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$) em 72 h. Em A, carboidratos (pg célula^{-1}), em B, proteínas (pg célula^{-1}) e em C, lipídios (pg célula^{-1}). Para as Figuras A e B a linha sólida representa o valor esperado para o parâmetro analisado, e as linhas tracejadas são referentes à região de credibilidade de 95%.

Discussão

As taxas de crescimento foram similares entre o controle e tratamentos até 306,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ de NPs-Cu particulado, em oposição à tendência de redução nas maiores concentrações (393,00 a 769,00 $\mu\text{g L}^{-1}$ NPs-Cu) que alcançaram 40% de redução em relação ao controle. Esse resultado está de acordo com os dados da literatura, nos quais a redução da taxa de crescimento em microalgas expostas a NPs é obtida apenas em altas concentrações, cerca de 10^2 a 10^6 vezes maiores do que valores estimados para o ambiente. Barhoumi, Dewez (2013) mostraram uma redução de 48% na taxa de crescimento em culturas de *Chlorella vulgaris* expostas a $4,0 \times 10^5$ $\mu\text{g L}^{-1}$ de NPs- Fe_3O_4 . Melegari et al. (2013) também obtiveram inibição do crescimento em *Chlamydomonas reinhardtii* exposta a 10^6 $\mu\text{g L}^{-1}$ NPs-CuO, e El-Kassas, Okbah (2017) encontraram redução na densidade celular de culturas de *Lyngbya majuscula* quando expostas a 2×10^3 $\mu\text{g L}^{-1}$ NPs-Cu. Cheloni, Marti, Slaveykova (2016) obtiveram redução de ~68% do crescimento de *C. reinhardtii* quando as células foram expostas a 8×10^2 $\mu\text{g L}^{-1}$ de NPs-CuO. Esses autores justificam a inibição do crescimento como resultado da formação de espécies reativas de oxigênio desencadeadas principalmente por íons Cu liberados pela dissolução dos NPs. De acordo com os estudos citados, isso provavelmente levaria à oxidação de proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e pigmentos nas células, diminuindo a alocação de energia para a reprodução, corroborando o obtido no presente estudo.

O rendimento fotossintético máximo tem sido utilizado como um indicador do estado fisiológico das microalgas, especialmente quando expostas à metais traço em concentrações subletais (LOMBARDI; MALDONADO, 2011; ECHEVESTE; SÁNCHEZ; AGUSTÍ, 2014; BARRETO; LOMBARDI, 2016). No entanto, com *C. sorokiniana* na presente pesquisa, o rendimento máximo não sofreu alteração nem mesmo nos maiores concentrações de NPs-Cu testadas (769,00 $\mu\text{g L}^{-1}$). Isso indica que o aparato fotossintético dessa microalga foi preservado, mantendo sua capacidade fotossintética próxima ao ótimo. Os resultados de Navarro et al. (2008), Saison et al. (2010) e Costa et al. (2016) mostraram um decréscimo no rendimento fotossintético em concentrações extremamente elevadas de NPs, não importando seu elemento constituinte. Por exemplo, Navarro et al. (2008) investigaram *C.*

reinhardtii em concentrações de $360 \mu\text{g L}^{-1}$ de NPs-Ag, enquanto Saison et al. (2010) em $2 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$ de NPs-CuO e Costa et al. (2016) em $10^7 \mu\text{g L}^{-1}$ de NPs-Cr₂O₃. Eles sugeriram que os centros de reação do FSII foram danificados pelo estresse oxidativo induzido pela exposição às NPs, o que resultou em menor rendimento fotossintético. Segundo Reynolds (2006) em situações de limitação nutricional, as microalgas podem não completar o ciclo de divisão celular, no entanto, há uma tendência de preservação dos processos fotossintéticos. Com base em nossos resultados, propomos que a NPs-Cu possa ter bloqueado canais iônicos nas membranas celulares Baker, Tyler, Galloway (2014), de modo que, mesmo com nutrientes presentes no meio, a microalga possa ter sofrido alguma limitação nutricional interna. Essa proposta é, em nosso estudo, apoiada pelo fato de que quase todas as NPs-Cu adicionadas foram detectadas como NPs-Cu particulado, ou seja adsorvido/absorvido na biomassa algal.

Na presente pesquisa, o metabolismo de biomoléculas em *C. sorokiniana* foi afetado de diferentes maneiras pelas NPs-Cu. Os carboidratos diminuíram gradualmente à medida que a concentração de NPs-Cu foi aumentada, culminando em um valor de carboidratos 46,2% menor em elevadas concentrações de NPs-Cu particulado em comparação ao controle. Esta biomolécula foi a única que apresentou correlação negativa (-0,64) com a concentração de NPs-Cu particulado, ou seja, foi afetada mesmo em concentrações ambientalmente relevantes de NPs-Cu, chegando a 20,47% de redução para a maior concentração estimada para o ambiente. É possível que a degradação de moléculas orgânicas, como carboidratos, para liberar energia (LEHNINGER, 1985) possa ter sido necessária em células expostas a NPs-Cu, que com o possível bloqueio dos canais iônicos e consequente redução na absorção de nutrientes, precisou usar carboidratos como fonte de energia e, assim, manter os mecanismos essenciais da fotossíntese (Φ_M ótimo).

Ao comparar o ocorrido com a *Chlorella sorokiniana* e *Ankistrodesmus densus* (capítulo 4), podemos notar diferentes mecanismos de ação para lidar com a toxicidade das NPs-Cu. *C. sorokiniana* por ser mais resistente do que a *A. densus* conseguiu lidar com o danos causados pelas NPs obtendo energia de carboidratos para a manutenção de processos vitais como a fotossíntese, enquanto que a *A. densus* possivelmente, por ser mais sensível teve seus aparatos fotossintéticos

degradados já em baixas concentrações de NPs-Cu e apresentou o comportamento clássico de resposta toxicológica, como o acúmulo das moléculas de reserva, carboidratos e lipídios.

Vislumbra-se que a diminuição de carboidratos em concentrações ambientalmente relevantes de NPs-Cu pode levar à importantes consequências ecológicas. Considerando que microalgas são organismos base de teias alimentares aquáticas e suportam os níveis seguintes, alteração em sua composição poderá modificar o balanço energético nesses ambientes.

Os resultados da síntese protéica em concentrações elevadas de NPs-Cu particulado mostraram um tendência similar ao obtido por Rocha et al. (2016b) que relataram aumento de proteínas em altas concentrações de Cu. Os autores expuseram *Selenastrum gracile* a $8,3 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre e um aumento de 3,5 vezes no conteúdo de proteína foi obtido. Da mesma forma, Einicker-Lamas et al. (2002) obteve 1,5 vezes mais proteínas em *Euglena gracilis* exposta a $1,4 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu em relação ao controle. Os autores atribuíram esse acúmulo à incapacidade da célula se dividir na presença de Cu. De fato, segundo León-Saiki et al. (2018) a redução dos processos reprodutivos está diretamente relacionada à diminuição das reservas energéticas da microalga, condição confirmada pela redução de carboidratos no presente estudo. Assim como os autores, nesta pesquisa também não observamos diferenças no tamanho das células. Portanto, o acúmulo de proteínas nem sempre está relacionado à incapacidade de divisão celular, o que provavelmente levaria ao aumento do tamanho das células. Independente da taxa de crescimento ou concentrações de NPs-Cu particulado, as células de *C. sorokiniana* foram sempre similares em tamanho aos controles. Embora não saibamos qual classe de proteína foi estimulada em *C. sorokiniana*, sugerimos que não eram proteínas estruturais, pois isso tenderia a sustentar os valores da taxa de crescimento. O fato das proteínas aumentarem apenas nas concentrações mais elevadas de NPs-Cu sugere que as proteínas de ligação e/ou antioxidantes foram responsáveis pelo aumento observado, em vez das moléculas estruturais. Segundo Vale et al. (2016), enzimas como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase podem ser ativadas para neutralizar radicais livres devido à exposição às NPs, bem como enzimas antioxidantes em geral (MELEGARI et al., 2013; COSTA et

al., 2016). Metalochaperonas, proteínas responsáveis pelo movimento de íons metálicos intracelularmente (ROBINSON; WINGE, 2010) e metalotioneínas (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002), também foram detectadas em microalgas expostas aos íons Cu e podem contribuir para o aumento de proteínas em altos níveis de metal.

A falta de efeito na síntese lipídica obtida no presente estudo pode estar relacionada ao tempo de exposição e à amplitude de concentração de NPs-Cu utilizadas, provavelmente insuficientes para induzir modificações no acúmulo dessas biomoléculas, mas suficientes para o aumento de proteínas e redução de carboidratos. A literatura mostra que há uma tendência de aumento lipídico no estresse induzido por metal em microalgas (CHIA et al., 2013a; CHIA et al., 2013b; ROCHA et al., 2016b), no entanto, as concentrações que induzem o acúmulo de lipídios são em geral maiores e o tempo de exposição geralmente é maior do que o adotado no presente estudo.

Considerando que os NPs são de grande valor para a sociedade, mas podem, mesmo em concentrações tão baixas quanto $12,24 \mu\text{g L}^{-1}$ de NPs-Cu particulado, alterar a composição bioquímica do fitoplâncton, enfatizamos que o descarte e uso de NPs requer melhor controle por órgãos governamentais, buscando a preservação desses ambientes, e conseqüentemente da saúde humana.

Conclusão

Em concentrações tão baixas quanto $12,24 \mu\text{g L}^{-1}$ de NPs-Cu particulado, valor ambientalmente relevante, as NPs-Cu causaram redução de carboidratos, enquanto em concentrações mais altas levaram ao aumento de proteínas, possivelmente associadas à detoxificação, em detrimento das proteínas estruturais. Além disso, mostramos que as taxas de crescimento e a densidade celular nas culturas expostas ao NPs-Cu diminuíram em elevadas concentrações de NPs-Cu particulados, concentração 24 vezes maior do que os valores ambientalmente relevantes, mas em todas as concentrações de NPs-Cu o aparato fotossintético foi preservado.

5.3 CAPÍTULO 3

NANOPARTÍCULAS DE COBRE INTERFEREM NA VIABILIDADE CELULAR DE *CHLORELLA SOROKINIANA* MAS NÃO ALTERAM OS PROCESSOS FOTOSSINTÉTICOS

Resultados

A viabilidade celular é apresentada na Figura 3.1A e nota-se tendência de diminuição neste parâmetro nas maiores concentrações de NPs-Cu particulado (393,00 a 769,00 $\mu\text{g L}^{-1}$). Com aumento de células inviáveis, a Figura 3.1B confirma o efeito deletério nessas concentrações de NPs-Cu.

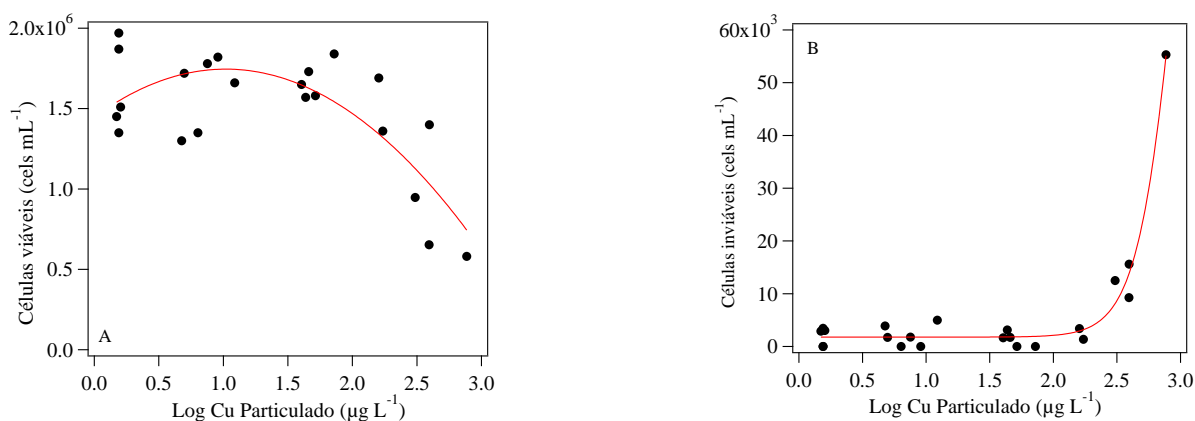


Figura 3.1- Viabilidade celular (células mL^{-1}) em A e em B células inviáveis (células mL^{-1}), em função do Log das concentrações de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$) em 72 h.

A concentração de clorofila *a* (fg cel^{-1}) plotada em função do logaritmo natural das concentrações de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$) após 72 h de exposição é apresentada na Figura 3.2, e pode-se notar uma tendência similar à viabilidade celular.

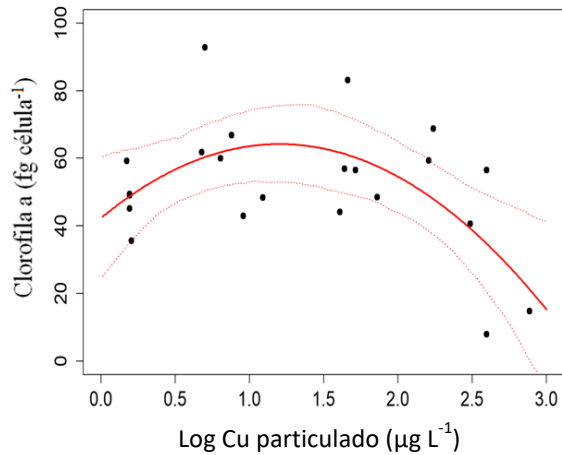


Figura 3.2- Concentração de clorofila a (fg cel^{-1}) em função do Log das concentrações de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$) em 72 h.

O rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Phi'_M\text{-FSII}$) está apresentado na Figura 3.3A e nota-se que não há prejuízos nesse parâmetro mesmo com o aumento das concentrações de NPs-Cu, mas uma tendência de estímulo no $\Phi'_M\text{-FSII}$ nessas concentrações.

Quanto às dissipações fotoquímicas (Q_p) e não-fotoquímicas (NPQ), apresentadas na Figura 3.3B, observa-se que as NPs-Cu não afetaram a alocação de energia, nem para os processos fotoquímicos, nem para os processos de dissipação não-fotoquímica de perda por calor.

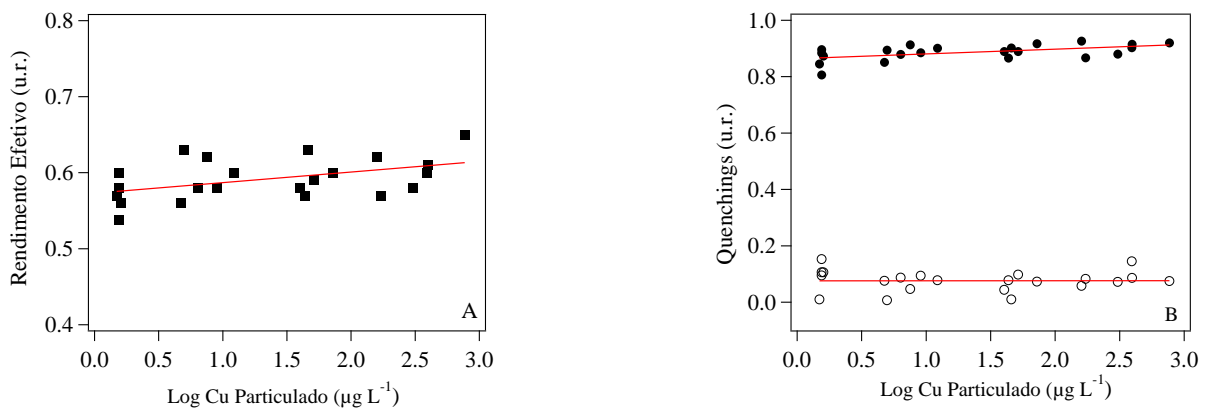


Figura 3.3- A: Rendimento quântico efetivo do fotossistema II ($\Phi'_M\text{-FSII}$) (u.r.) em 72 h de exposição em função do Log da concentração de NPs-Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$). B: Valores de dissipações (u.r.) ● dissipação fotoquímica (Q_p) e ○ dissipação não-fotoquímica relacionada ao calor (NPQ).

Na Figura 3.4A pode-se observar as curvas rápidas de saturação luminosa para os tratamentos. Em 3.4B mostra-se I_k , em 3.4C o parâmetro α e a $ETR_{m\acute{a}x}$ em 3.4D. Os valores de α , que se relaciona com a eficiência na captura da luz não sofreram alterações com o aumento das concentrações de nanopartículas. Os valores de I_k (irradiância de saturação luminosa) e $ETR_{m\acute{a}x}$ (taxa máxima de transporte de elétrons) mostraram que pode haver algum estímulo conforme aumento das concentrações de NPs.

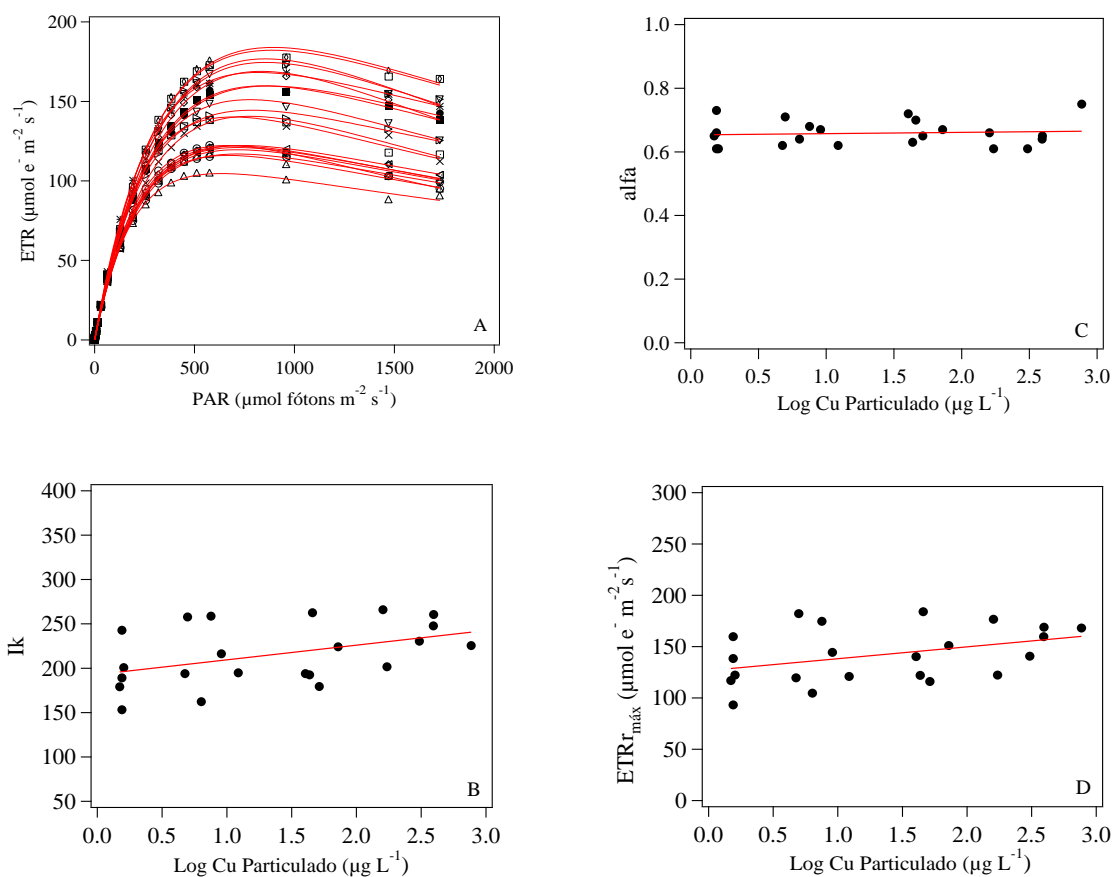


Figura 3.4- A: Curvas rápidas de saturação luminosa para o controle e os tratamentos em 72 h de exposição. Símbolos: ■ controle (1,55); ○ 1,49; ○ 1,60; □ 4,98; △ 6,35; ▽ 7,54; ◁ 4,75; ▷ 9,07; ◇ 12,24; ◆ 45,79; ◆ 43,47; □ 40,40; △ 51,70; ▽ 72,30; ◁ 172,34; ▷ 160,46; × 305,88; ◆ 394,29; ◆ 392,94 e * 768,79 $\mu\text{g L}^{-1}$ de Cu particulado ($\mu\text{g L}^{-1}$). B: Irradiância de saturação luminosa (I_k - $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). C: Inclina\u00e7\u00e3o da curva de luz (alfa - $\mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1} [\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}]^{-1}$). D: Taxa m\u00e1xima de transporte de el\u00e9trons ($\text{ETR}_{\text{m\u00e1x}}$ - $\mu\text{mol e}^{-} \text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

Discussão

A viabilidade celular é um parâmetro que fornece informações mais realista do que o total de células, uma vez que diferencia células vivas de células mortas, o que não ocorre com medidas comuns do total de biomassa. A viabilidade vem sendo utilizada como uma importante ferramenta no diagnóstico de estresse não apenas por metais (ECHEVESTE; SILVA; LOMBARDI, 2017) como também por nanopartículas (MELEGARI et al., 2013; BARRETO; LOMBARDI, 2016). Neste estudo a viabilidade celular apresentou redução de ~50% em ~306 $\mu\text{g L}^{-1}$ NPs-Cu particulado, enquanto que a mortalidade celular alcançou ~168% para essa mesma concentração, indicando o prejuízo à *Chlorella sorokiniana*. Melegari et al. (2013) encontraram redução de ~57% na viabilidade celular de *Chlamydomonas reinhardtii* apenas com $10^6 \mu\text{g L}^{-1}$ de NPs-CuO. Enquanto que Ranmadugala et al. (2017) obtiveram redução (~20%) na viabilidade de *Bacillus subtilis* exposta a 300 mg mL^{-1} ($3,0 \times 10^8 \mu\text{g L}^{-1}$) de NPs-FeO. Barhoumi, Dewez (2013) observaram que a viabilidade de *Chlorella vulgaris* reduziu significativamente ~48% quando exposta a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($4,0 \times 10^5 \mu\text{g L}^{-1}$) de NPs-Fe₃O₄. Os autores atribuem esses efeitos deletérios à formação de espécies reativas de oxigênio desencadeadas pela liberação de íons das NPs. Esses teriam causado peroxidação lipídica resultando na ruptura de membranas celulares. Vale salientar que é comum encontrar na literatura valores nominais das concentrações de nanopartículas.

A literatura mostra que a presença do cobre pode provocar inibição da fotossíntese, podendo esta ser associada à substituição do Mg^{2+} da clorofila pelo íon Cu^{2+} , o que poderia render um pigmento não-funcional (KÜPPER et al., 2002; LOMBARDI; MALDONADO, 2011), refletindo em reduções nos valores de rendimento quântico efetivo (Φ'_M). Contudo, no presente estudo observamos que não houve inibição do Φ'_M . Isso sugere que os centros de reação não foram negativamente afetados. Costa et al. (2016) encontraram diminuição no rendimento efetivo a $10^7 \mu\text{g L}^{-1}$ NPs-Cr₂O₃ para *C. reinhardtii* e atribuíram tal prejuízo ao estresse oxidativo desencadeado pelos íons de cromo das NPs, que por sua vez danificaram os centros de reação do FSII. Vale ressaltar que esses autores usaram concentrações da ordem de 10^5 vezes mais elevadas do que a nossa maior concentração, condicionando a microalga a uma situação extrema e incompatível

com a realidade. Além disso observamos que *Chlorella sp.* é, segundo a literatura mais resistente para muitos parâmetros fisiológicos, dentre eles os da fotossíntese do que *C. reinhardtii* (JUNEAU; BERDEY; POPOVIC, 2002).

Segundo Jerez et al. (2016), o rendimento efetivo pode ser um indicativo da aclimação do fotossistema II, ou seja, uma acomodação à condição imposta pelo meio de cultivo. Sendo assim é possível que os cultivos expostos às NPs-Cu não tiveram o FSII danificado, mesmo que a viabilidade celular já estivesse comprometida, sinalizando que esse estado ótimo fotossintético estava possivelmente ameaçado e que, provavelmente, um monitoramento além do período já amostrado nesta pesquisa poderia mostrar algum efeito nesse parâmetro.

A análise das dissipações fotoquímicas (Q_p) e não-fotoquímicas (NPQ) dizem sobre o direcionamento da energia absorvida pelo organismo fotossintético. Enquanto Q_p relaciona-se com a energia que foi direcionada para a fotoquímica da fotossíntese, NPQ é uma dissipação fotoprotetiva do excesso de energia luminosa absorvida, que de outra maneira poderia resultar em danos ao aparato fotossintético (MÜLLER; LI; NIYOGI, 2001). Portanto, juntos esses parâmetros contribuem para inferências sobre a saúde do processo fotossintético. Nesta pesquisa, os resultados mostraram tendência de aumento conforme as concentrações de nanopartículas foram aumentadas. Isso indica que pode ter havido estímulo do processo fotossintético, como corroborado pela tendência observada nos valores de $ETR_{máx}$. Por outro lado, Barhoumi, Dewez (2013) estimaram a fração de Q_A reduzida e encontraram 32% de aumento. Os autores atribuem tal resultado à inibição do fluxo no transporte de elétrons do FSII em direção ao *pool* de plastocianina na concentração de $4,0 \times 10^5 \mu\text{g L}^{-1}$ de NPs- Fe_3O_4 , onde observaram o efeito. Como no presente trabalho as concentrações utilizadas cerca de mil vezes menor, pontuamos que tal efeito seja dependente da concentração de NPs utilizadas, já que a tendência que mostramos foi sutil.

Os resultados das dissipações não-fotoquímicas (NPQ) indicam que as dissipações na forma de calor permaneceram baixas, com valor máximo de 0,15. Kromkamp et al. (2008) encontram 0,3 como valor máximo de NPQ em ambiente natural, ou seja duas vezes maior que o mais elevado obtido no presente trabalho. Sabe-se que alterações em NPQ tendem refletir problemas na fotossíntese ou de

seus componentes, estando associado à ineficiência na utilização da luz incidente (SANTOS; LOMBARDI, 2017). Valores elevados de NPQ são indicativo da ativação de mecanismos de proteção do FSII contra altas intensidades luminosas através do ciclo da xantofila (KROMKAMP et al., 2008; FIGUEROA; JEREZ; KORBEE, 2013). Assim, pode-se sugerir que nessas condições as nanopartículas não provocaram danos no complexo antena, logo a absorção de luz não foi comprometida. Mas, além disso, NPQ pode refletir a dissipação de calor associado à estresse celular ocasionado pela luz, porém aqui ele se manteve inalterando, assim como ocorreu com a mesma espécie *C. sorokiniana* exposta a uma simulação de gases da indústria cimenteira (CAMARGO; LOMBARDI, 2018), o que ressalta a característica resiliente dessa microalga.

As curvas rápidas de saturação luminosa são plotadas em função da luz disponível e podem detectar ajustes no funcionamento do aparato fotossintético, tais como a ativação e desativação do metabolismo do carbono, operação de mecanismos fotoprotetivos e ocorrência de fotoinibição (SCHREIBER et al., 1997; SERÔDIO et al., 2012). De modo geral, os parâmetros obtidos a partir das curvas rápidas de saturação luminosa (α , I_k e $ETR_{r_{m\acute{a}x}}$) informam sobre a performance fotossintética (RALPH; GADEMANN, 2005). Neste estudo mostramos que os processos fotossintéticos não foram negativamente afetados considerando toda a amplitude de concentrações testada, mas podem ter sido de alguma maneira, estimulados na presença das NPs, já que há uma inclinação na reta que ajusta os pontos na figura 3.4B (I_k) e 3.4D ($ETR_{r_{m\acute{a}x}}$).

O parâmetro α , que representa o coeficiente de captura e eficiência no uso da luz (RALPH; GADEMANN, 2005) permaneceu o mesmo em toda a amplitude de concentrações testadas. Isso quer dizer que mesmo que as NPs-Cu tenham sido adsorvidas/absorvidas na microalga, isso não ocasionou sombreamento às células e nem afetou a eficiência com que as células capturavam a luz, o que está diretamente relacionado ao pigmento fotossintético, clorofila *a*. Como NPQ (perda de calor via ciclo da xantofila) e Q_P não foram afetados, podemos concluir que os aparatos de captura de luz de *C. sorokiniana* estavam com funcionamento similar ao controle mesmo nas concentrações mais elevadas das NPs-Cu. Apesar dos resultados para os parâmetros fotossintéticos parecerem ótimos, sob elevadas

concentrações de Cu particulado, a síntese de clorofila *a* apresentou redução de ~70% em relação ao controle. Esse resultado nos permite sugerir que apesar da reduzida concentração de clorofila *a*, a atividade fotossintética nos tratamentos expostos às NPs-Cu estava sendo mantida semelhante ao controle, reforçando a plasticidade fisiológica da microalga *C. sorokiniana*.

Quanto à $ETR_{m\acute{a}x}$, que se associa à taxa de elétrons bombeados através da cadeia transportadora de elétrons (RALPH; GADEMANN, 2005) do FSII ao FSI, os resultados indicam que esta transferência encontrava-se em condições ótimas. Ao que mostra a figura 3.4D, pode ter havido um leve aumento no bombeamento de elétrons, entretanto isso parece não ter resultado em ganhos fotossintéticos, já que tanto o rendimento máximo (capítulo 2), como o rendimento operacional e o Q_P não foram afetados em qualquer das concentrações de NPs-Cu usadas.

I_k representa o valor de intensidade luminosa onde se inicia a saturação da fotossíntese. Neste estudo, o valor de I_k apresentou tendência similar àquela observada para a $ETR_{m\acute{a}x}$, de leve aumento. De acordo com a literatura (SAKSHAUG et al., 1997) sabemos que alguns fatores podem contribuir com o aumento do I_k e, dentre eles, cita-se o aumento de absorção de luz por pigmentos que fazem a dissipação de energia, como o aumento do NPQ via ciclo da xantofila. Xantofilas são pigmentos que absorvem a luz mas não a direcionam ao sistema antena e por isso são considerados pigmentos não fotossintéticos. Outro processo que poderia levar ao aumento de I_k é o fluxo cíclico de elétrons (FSI), mas com isso esperaríamos menores rendimentos fotossintéticos máximos e menores α , o que não ocorreu neste estudo. O empacotamento de moléculas de clorofila *a* também pode ser uma das causas de aumento do I_k , mas neste caso esperaríamos menor eficiência na captura de luz, dado pelo α , o que não ocorreu neste estudo. Portanto, a partir dos parâmetros básicos das curvas rápidas de saturação luminosa, podemos afirmar que as NPs-Cu não interferiram no processo fotossintético em *C. sorokiniana*.

Contudo, salientamos que conforme provam os dados de viabilidade celular, os cultivos expostos à elevadas concentrações de NPs estavam em senescência precoce. Extrapolando isso para ambientes naturais, teríamos um aumento de matéria orgânica em decomposição nos ambientes aquáticos e redução da

biomassa algal, podendo afetar os outros níveis tróficos. Os resultados obtidos sobre os efeitos das nanopartículas na fotossíntese de *C. sorokiniana* sugere que mesmo não afetando o processo fotossintético, há uma degradação celular. Isso indica que as nanopartículas não são neutras nos ecossistemas aquáticos, são reativas e podem interferir em processos relacionados à manutenção do equilíbrio desses ecossistemas.

Conclusões

A partir de $306 \mu\text{g L}^{-1}$ NPs-Cu particulado observou-se redução da viabilidade celular e o aumento da mortalidade celular, com possível degradação da clorofila. Todos os resultados do metabolismo fotossintético (Φ'_M , NPQ, Q_p , α , I_k e $ETR_{r_{\text{máx}}}$) direcionam para ausência de efeitos deletérios na fotossíntese em *C. sorokiniana* exposta à NPs-Cu, independente da concentração testada.

Com base no exposto pode-se concluir que a microalga estudada investiu, predominantemente nos processos fotossintéticos para sua sobrevivência, enquanto que a presença das NPs-Cu induziu severo aumento na mortalidade de *C. sorokiniana*.

5.4 CAPÍTULO 4

FOTOSSÍNTESE E COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA MICROALGA *ANKISTRODESMUS DENSUS* EXPOSTA À NANOPARTÍCULAS DE COBRE

Resultados

Na Figura 4.1A é apresentada a viabilidade celular, em 4.1B a fluorescência *in vivo* da clorofila *a* e em 4.1C a taxa de crescimento. Pode-se observar que as células viáveis reduziram significativamente (ANOVA, $p < 0,05$) a partir de $6,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ de cobre conforme aumentou-se a concentração de nanopartículas. Em relação à fluorescência da clorofila, nota-se que a partir de $2,1 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ de cobre livre inicia-se o processo de degradação da clorofila (ANOVA, $p < 0,05$), que se intensifica com o aumento da concentração de cobre livre, obedecendo um decaimento linear. A taxa de crescimento do cultivo foi estatisticamente diferente em relação ao controle e ao aumento da concentração de cobre livre no meio (ANOVA, $p < 0,05$).

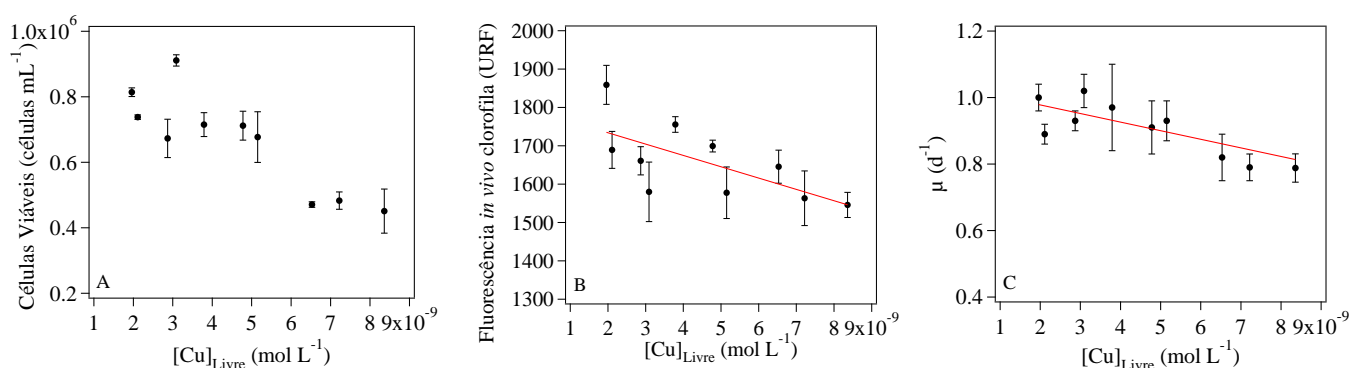


Figura 4.1- A: Células viáveis (células mL⁻¹); B: Fluorescência *in vivo* da clorofila *a* (URF); C: a taxa de crescimento dos cultivos (d⁻¹) em função da concentração de Cu livre (mol L⁻¹) em 72 h de cultivo. As barras de erro indicam o desvio padrão (n= 3).

Os rendimentos quânticos máximo e efetivo do fotossistema II estão apresentados na Figura 4.2. O rendimento máximo e efetivo apresentaram diferença estatística (ANOVA, $p < 0,05$) em relação ao controle a partir de $5,2 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ de cobre livre, sugerindo haver danos fotossintéticos (Fig. A). As dissipações fotoquímicas (Q_p) e não-fotoquímicas (NPQ), são apresentadas na Figura B. Nota-se que Q_p apresentou redução significativa já na concentração mais baixa de nanopartículas, mas manteve constância nas demais concentrações testadas. Porém, o NPQ aumentou significativamente (ANOVA, $p < 0,05$) em relação ao controle, indicando que a presença de cobre das NPs induziu a perda por processos não-fotoquímicos.

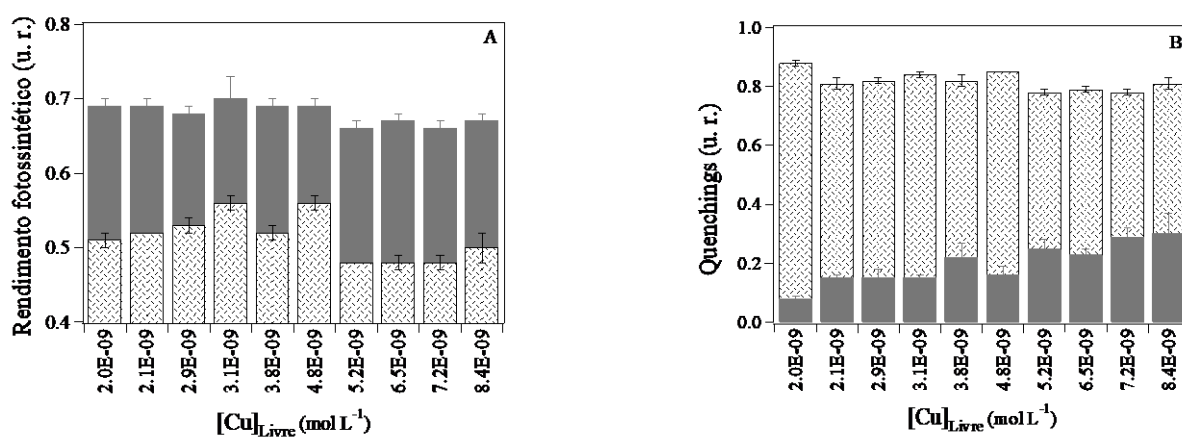


Figura 4.2- A: Rendimento quântico do fotossistema II (u.r.) em 72 h de exposição para as várias concentrações de Cu livre (mol L⁻¹) testadas. Barras cinzas: rendimento quântico máximo (Φ_M , u.r.), e barras hachuradas: rendimento quântico efetivo (Φ'_M , u.r.). **B:** Valores de dissipações (u.r.), fotoquímica (Q_p) apresentado nas barras hachuradas e a dissipação não-fotoquímica (NPQ) nas barras cinzas. As barras de erro indicam o desvio padrão (n= 3).

A Figura 4.3A mostra a curva rápida de saturação luminosa para cada um dos tratamentos e pode-se notar que houve prejuízo no aproveitamento da luz conforme aumentou-se a concentração de nanopartículas. Os parâmetros de I_k , α e $ETR_{m\acute{a}x}$,

obtidos a partir da curva de saturação de luz, confirmam o efeito desses danos ao processo fotossintético, principalmente nas maiores concentrações.

A eficiência de captura e aproveitamento da luz (α) (Figura 4.3C) sofreu reduções já nas concentrações iniciais de cobre livre, indicando prejuízos aos centros de reação dos fotossistemas. Na Figura 4.3B é apresentada a irradiância de

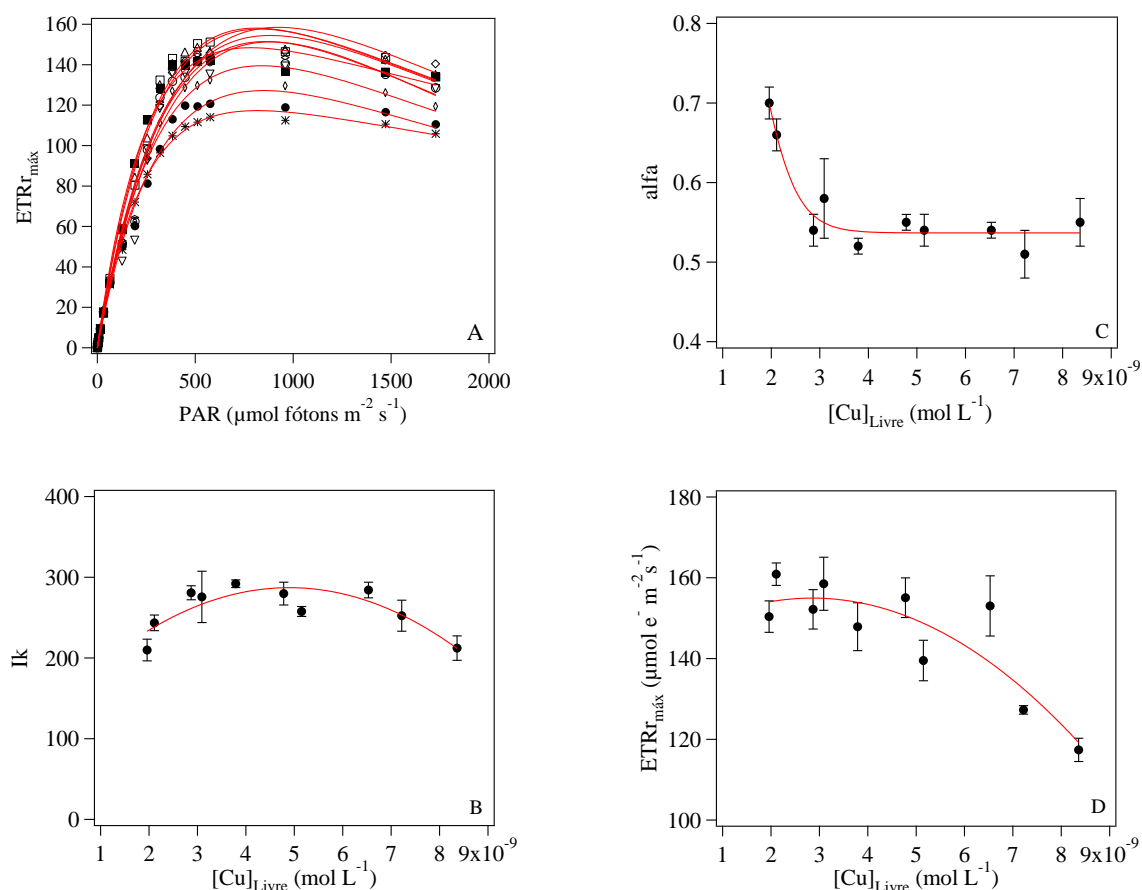


Figura 4.3- A: Curvas rápidas de saturação luminosa para o controle e os tratamentos em 72 h de exposição (ETR relativa em função da radiação fotossinteticamente ativa incidente, PAR). Símbolos: ■ controle ($2,0 \times 10^{-9}$); □ $2,1 \times 10^{-9}$; ○ $2,9 \times 10^{-9}$; △ $3,1 \times 10^{-9}$; ▽ $3,8 \times 10^{-9}$; ⋈ $4,8 \times 10^{-9}$; ⋄ $5,1 \times 10^{-9}$; ◇ $6,5 \times 10^{-9}$; ● $7,2 \times 10^{-9}$ e ✱ $8,4 \times 10^{-9}$ de Cu livre (mol L⁻¹). B: Irradiância de saturação luminosa (I_k - $\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}$). C: Inclinação inicial da curva de saturação luminosa (α - $\mu\text{mol \u00e9 m}^{-2} \text{s}^{-1} [\mu\text{mol f\u00f3tons m}^{-2} \text{s}^{-1}]^{-1}$). D: Taxa relativa m\u00e1xima de transporte de el\u00e9trons ($ETR_{m\u00e1x}$ - $\mu\text{mol \u00e9 m}^{-2} \text{s}^{-1}$). As barras de erro indicam o desvio padr\u00e3o ($n = 3$).

saturação luminosa (Ik). Esse parâmetro parece não ter sido afetado pelas NPs-Cu. Já as ETR_{rmáx} apresentam-se constantes nas concentrações iniciais e a partir de $7,2 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ observa-se seu decaimento, indicando que a taxa de transporte de elétrons foi comprometida nas maiores concentrações.

A ETR absoluta (ETRa) e a produtividade primária bruta (P^B) estão apresentadas na Figura 4.4 em função da concentração de Cu livre (mol L^{-1}) em 72 h de exposição. Nota-se, para ambos parâmetros, um comportamento constante nas concentrações iniciais, seguida de uma redução significativa (ANOVA, $p < 0,05$) na maior concentração testada ($6,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$). Esses resultados sugerem que houve comprometimento do transporte de elétrons entre o FSII e o FSI, resultando na redução da fixação de carbono.

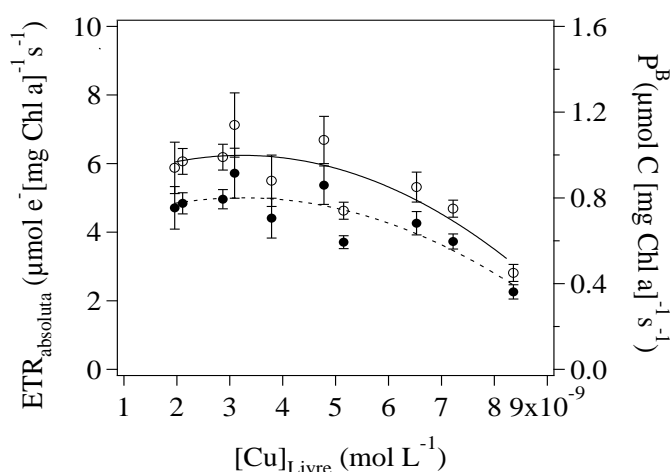


Figura 4.4- Taxa de transporte de elétrons absoluta (ETRa - $\mu\text{mol e}^- [\text{mg Chl a}]^{-1} \text{ s}^{-1}$) no eixo esquerdo e produtividade primária bruta (P^B - $\mu\text{mol C} [\text{mg Chl a}]^{-1} \text{ s}^{-1}$) no eixo direito. Ambos em função da concentração de Cu livre (mol L^{-1}) com 72 h de exposição. Símbolos: \bullet ETR absoluta e \circ produtividade primária bruta (P^B). As barras de erro indicam o desvio padrão ($n = 3$).

Os resultados de produção de biomoléculas totais são apresentados na Figura 4.5, na qual se tem a concentração de proteínas em A, carboidratos em B e lipídios em C. Pode-se notar o aumento significativo (ANOVA, $p < 0,05$) de proteínas e lipídios totais a partir de $6,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ de cobre livre, com aumentos de 1,7

vezes de proteínas e 2,3 vezes de lipídios, ambos em relação ao controle. O aumento de carboidratos conforme aumentou-se a concentração de NPs-Cu obedeceu a relação linear, diferente do ocorrido com as outras biomoléculas. A razão proteína: carboidrato (Figura D) apresentou redução de ~1,65 vezes a partir da $4,8 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ de cobre livre.

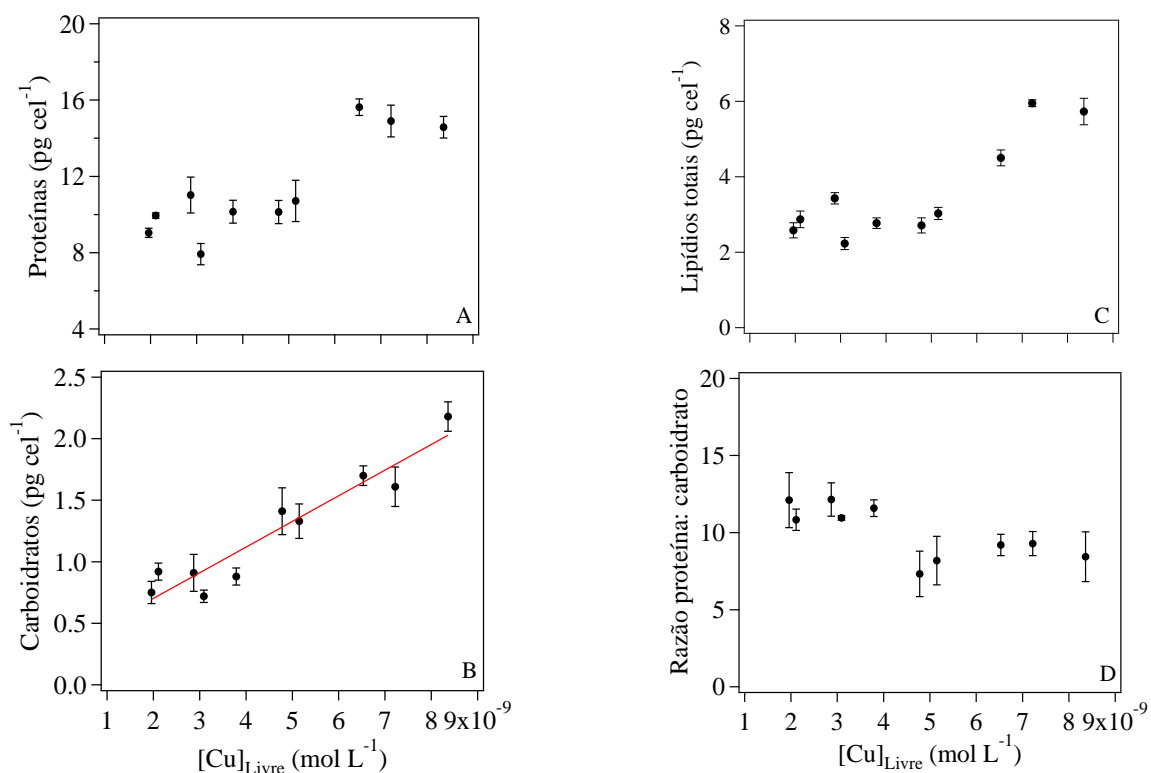


Figura 4.5- A: concentração de proteínas totais (pg cel⁻¹), em B: concentração carboidratos totais (pg cel⁻¹). Equação da reta: $y = 0,28 + 2,09 \times 10^8 x$, $r=0,952$. Em C: concentração de lipídios totais (pg cel⁻¹) e em D: razão proteína: carboidrato. Ambas em função da concentração de Cu livre (mol L⁻¹) com 72 h de exposição. As barras de erro indicam o desvio padrão (n= 3).

Na Figura 4.6 são apresentadas as classes lipídicas em função da concentração de Cu livre em 72 horas de exposição. Nas Figuras A, D e F são apresentados os lipídios neutros (HC, ST e ALC) que apresentaram aumento significativo (ANOVA, $p < 0,05$) de 1,59, 2,0, e 2,0 vezes, respectivamente, a partir de

$6,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ de Cu livre. Essa mesma concentração provocou aumento de triacilgliceróis (TG) (Figura E). Observa-se na Figura C elevada síntese de fosfolipídios (PL) que apresentou aumento de 8,78 vezes em $7,2 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ de Cu e os lipídios polares móveis em acetona (AMPL) (Figura B) que também são característicos de membranas, porém de organelas fotossintéticas, apresentou aumento de 2,2 vezes em relação ao controle, a partir de $6,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ de Cu livre.

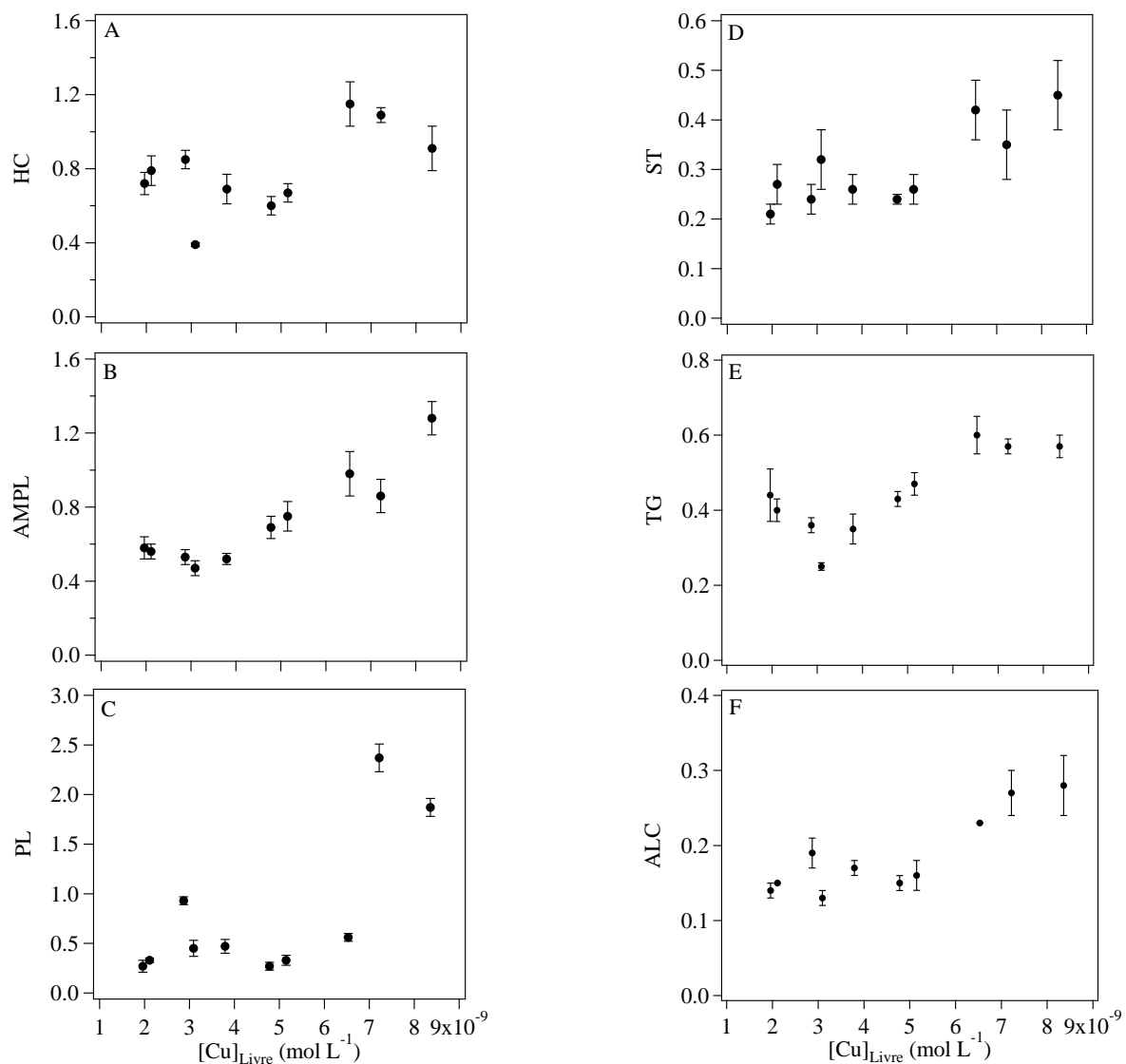


Figura 4.6- As classes lipídicas (pg cel^{-1}) em função da concentração de Cu livre (mol L^{-1}) com 72 h de exposição. A: hidrocarbonetos alifáticos (HC), B: lipídios móveis em acetona (AMPL), C: fosfolipídios (PL), D: esteróis livres (ST), E: triacilgliceróis (TG) e F: alcoóis alifáticos livre (ALC). As barras de erro indicam o desvio padrão ($n=3$).

Discussão

Os parâmetros de crescimento são *endpoints* amplamente utilizados como indicativos da saúde fisiológica em cultivos microalgais. No presente estudo eles forneceram informações importantes à respeito da fisiologia da microalga exposta às nanopartículas. Observa-se que os três parâmetros relacionados ao crescimento populacional como a viabilidade celular, a fluorescência *in vivo* da clorofila e a taxa de crescimento apresentaram reduções significativas, sendo elas de 42,3, 17,0 e 21,0%, respectivamente. Essas reduções foram provocadas nas maiores concentrações de cobre livre proveniente das nanopartículas. Porém, ao observar os dados da fluorescência *in vivo* da clorofila é notável a redução (~9,2%) já na primeira concentração de nanopartículas, tornando esse parâmetro o mais sensível.

Nossos resultados estão de acordo com os apresentados na literatura, que tem mostrado redução na concentração de clorofila quando microalgas são expostas à altas concentrações de NPs (Saison et al., 2010; Melegari et al., 2013; Costa et al., 2016). Saison et al. (2010) usou concentração de $0,02 \text{ g L}^{-1}$ ($2,51 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e Melegari et al. (2013) 100 mg L^{-1} ($1,26 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) de NPs-CuO, enquanto Costa et al. (2016) usaram concentrações de $6,58 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ de NPs-Cr₂O₃. Os autores usaram *Chlamydomonas reinhardtii* como organismo teste e atribuíram a redução de clorofila *a* à alterações nas funções intracelulares induzidas pela formação de espécies reativas de oxigênio, causando a degradação do pigmento fotossintético.

As concentrações de NPs-Cu que utilizamos nesta pesquisa são cerca de 10^7 vezes menor do que as comumente usadas em exposição de microalgas e, ainda assim, nossos resultados concordam com os relatos da literatura. Ressaltamos que a maioria das pesquisas constantes da literatura não determina a concentração das NPs utilizada, logo torna-se incerta a real concentração a que o organismo é exposto.

Relatos na literatura têm mostrado que reduções na viabilidade celular são comuns em microalgas expostas à nanopartículas, como por exemplo o encontrado nos trabalhos de Melegari et al. (2013) e Barhoumi, Dewez (2013). Melegari et al. (2013) encontraram redução de ~57% para *Chlamydomonas reinhardtii* com 1000 mg L^{-1} ($1,26 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) de NPs-CuO, enquanto que Barhoumi, Dewez (2013) obtiveram redução de ~48% para *Chlorella vulgaris* quando exposta a $400 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$

($1,73 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) de NPs-Fe₃O₄. Costa et al. (2016) obtiveram redução na densidade celular de *Chlamydomonas reinhardtii* exposta a 10,0 g L⁻¹ ($6,58 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) de NPs-Cr₂O₃. Um dos motivos que tem sido apontado na literatura para os efeitos deletérios das NPs em microalgas é a formação de espécies reativas de oxigênio, que por sua vez leva à oxidações de aparatos celulares, culminando na perda da homeostase celular (NAVARRO et al., 2008; WANG et al., 2016).

De modo geral, apesar da microalga *A. densus* mostrar-se mais sensível do que *C. sorokiniana* nesta pesquisa, nós obtivemos efeitos deletérios para ambas microalgas. Estes efeitos deram-se tanto na reprodução, quanto na viabilidade celular particularmente sob elevadas concentrações de NPs-Cu.

Fotossíntese

Os rendimentos fotossintéticos foram afetados pelas NPs-Cu a partir de 10^{-6} mol L⁻¹, que equivale a $5,2 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ de cobre livre no meio. O rendimento máximo (Φ_M) foi reduzido em ~4,4% enquanto o efetivo (Φ'_M) em 7,7%, sugerindo a ocorrência de danos ou desvios no metabolismo fotossintéticos nos cultivos. Assim como no presente estudo, Costa et al. (2016) também obtiveram redução no Φ'_M em *C. reinhardtii* exposta a 10,0 g L⁻¹ ($6,58 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹) de NPs-Cr₂O₃. Müller, Behra, Sigg (2016) não especificaram qual foi o rendimento quântico analisado, mas encontraram redução em relação ao controle com apenas uma hora de exposição de *C. reinhardtii* em concentrações de 1 a 100 μ M (10^{-6} a 10^{-4} mol L⁻¹) de NPs-Cu. Barhoumi, Dewez (2013) obtiveram 14% de redução no rendimento quântico máximo em *Chlorella vulgaris* exposta a 400 μ g mL⁻¹ ($1,73 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹) de NPs-Fe₃O₄. Röhder et al. (2014) mostraram que NPs-CeO₂, inibiu o Φ_M em *Chlamydomonas reinhardtii* exposta a 100 μ mol L⁻¹. Ainda que haja pouca dissolução de íons das NPs, a formação de espécies reativas de oxigênio desencadeada por esses íons parece ser a principal explicação para os efeitos tóxicos das NPs. Sendo que a degradação de cloroplastos pode ter sido resultante do estresse oxidativo, danificando os centros de reação do fotossistema II (COSTA et al., 2016), o que pode levar à prejuízos dos processos fotossintéticos.

Quanto à dissipação de energia fotoquímica (Q_p), que indica a porção de energia direcionada para a fotossíntese que segue aos centros de reação abertos do

FSII (JUNEAU; BERDEY; POPOVIC, 2002), obtivemos redução de 7,7% já na mais baixa concentração de cobre livre oriundo das NPs-Cu adicionada ($2,1 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹). Isso indica que houve alterações negativas na absorção de luz pelos centros de reação, separação de carga e transferência de elétrons para a plastoquinona (Q_A), primeiro acceptor de elétrons na cadeia transportadora de elétrons (LOMBARDI; MALDONADO, 2011). Assim como Juneau, Berdey, Popovic (2002), Herloy Bonzom, Gilbin, (2013) encontraram redução de Q_p em *C.reinhardtii* conforme aumentava a concentração de exposição ao cobre e ao urânio, respectivamente. A alteração na fotoquímica do FSII pelo metal foi um indicativo de perda da capacidade dos aparatos fotossintéticos para manter a Q_A em seu estado oxidado, fatos que corroboram o obtido no presente estudo.

As dissipações não-fotoquímicas (NPQ) estão associadas às perdas por calor e aumentaram conforme aumentou-se a concentração de cobre livre oriundo das nanopartículas (NPQ: 0,08 a 0,3). O referido aumento chegou a ser ~3,8 vezes o valor do controle para a maior concentração de cobre livre ($8,4 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹), ou seja, a perda por calor quase que quadruplicou. Assim pode-se inferir que o funcionamento do fotossistema II foi comprometido na presença das NPs-Cu, que perdeu a eficiência no uso da luz (SANTOS; LOMBARDI, 2017). Sabe-se que o aumento do NPQ reflete a necessidade da ativação do mecanismo de proteção do FSII contra altas intensidades luminosas (KROMKAMP et al., 2008). Por outro lado, Costa et al. (2016) ao expor *C. reinhardtii* a NPs-Cr₂O₃, encontraram redução no NPQ, que segundo os autores refletiu a incapacidade do FSII em se proteger através da dissipação de energia térmica.

Neste estudo, o aproveitamento da luz pelos cultivos microalgais foram obtidos a partir da curva rápida de saturação luminosa que nos informa à respeito de como as microalgas lidaram fotossinteticamente com a luz incidente em vista das condição imposta pelas NPs-Cu (RALPH; GADEMANN, 2005). Dessa forma foi possível confirmar as condições estressantes discutidas anteriormente.

O decréscimo da ETR_{r_{máx}} a partir de $7,2 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ significa que menor velocidade de bombeamento de elétrons através da cadeia transportadora de elétrons estava sendo processado, provavelmente devido à degradação dos centros de reação. Isso pode ter promovido a perda da capacidade dos fotossistemas em

utilizar a energia luminosa, como corroborado pelos valores de Q_p e NPQ. Esta redução na taxa de transferência de elétrons está de acordo com os resultados de Costa et al. (2016), em que observaram redução na ETRr em $10,0 \text{ g L}^{-1}$ ($6,58 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) de NPs-Cr₂O₃ para *C. reinhardtii*.

O parâmetro α , que diz respeito diretamente à eficiência de uso da luz (RALPH; GADEMANN, 2005), também confirma os danos ao FSII, uma vez que esse parâmetro foi reduzido logo nas concentrações mais baixas de nanopartículas ($2,9 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$). Assim, podemos sugerir que os cultivos expostos às nanopartículas não estavam aproveitando eficientemente a luz incidente, indicando que as NPs danificaram os pigmentos receptores de luz.

O parâmetro I_k fornece em qual intensidade luminosa há início de saturação da fotossíntese e em *A. densus* este parâmetro não foi afetado mesmo nas mais altas concentrações de NPs-Cu, provavelmente devido à ativação do ciclo da xantofila que promoveu a dissipação da energia luminosa na forma de calor, já que os centros de reação não estavam aproveitando a luz (Sakshaug et al., 1997).

A medida de ETR absoluta (ETRa), que considera a intensidade luminosa absorvida pela microalga e não apenas a luz incidente como é o caso da ETR relativa (KROMKAMP et al., 2008; JEREZ et al., 2016), fornece valores mais realistas desse processo. No presente estudo os valores de ETRa corroboram as condições estressantes causadas pelas nanopartículas. Nos cultivos de *Ankistrodesmus densus* a ETRa apresentou-se constante até $6,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ de cobre livre, quando ocorreu uma redução significativa. Isso sugere que a capacidade da alga lidar com a luz possa ter sido reduzida em concentrações elevadas do metal. Kromkamp, Forster (2003) relatam que alguns elétrons são fotossinteticamente gerados para serem utilizados na redução do nitrato, ao invés de serem usados para reduzir o CO₂, justificando a redução da P^B que obtivemos. A ETR pode estar relacionada à disponibilidade de nitrato no meio, como obtido por Cabello-Pasini et al. (2010). Segundo esses autores o aumento da concentração de nitrato no meio demandou mais energia (ATP) e potencial redutor (NADPH) para assimilação desse nutriente. Podemos extrapolar que a redução na demanda de elétrons pode estar relacionada à inabilidade de assimilação do nitrato por *A. densus* que estava com os

canais iônicos entupidos por NPs-Cu, o que fora observado por Baker, Tyler, Galloway (2014).

A produtividade primária bruta (P^B) teoricamente estimada a partir dos valores de ETRa e do coeficiente 0,2 ($\text{mol C} \cdot \text{mol elétrons}^{-1}$) foram constantes nas concentrações iniciais de NPs-Cu e reduziu pela metade em $6,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ de cobre livre, o que levou à redução da atividade do ciclo de Calvin, responsável pela fixação do carbono. Comparando os valores de P^B do nosso grupo controle com a literatura podemos observar que os nossos resultados são maiores que os de Kromkamp et al. (2008) e Morris et al. (2008) que obtiveram 7,9 e 4,8 vezes menos P^B em relação ao obtido no presente estudo, respectivamente. Essa diferença pode ser devido ao fato desses autores terem trabalhado com comunidade natural enquanto nós mantivemos o cultivo unialgal. Morris et al. (2008) relatam que amostras contendo sedimentos naturais podem ser um problema para estimar tanto a ETRa quanto a P^B devido à alta interferência por espalhamento devido à presença de material particulado de origem não algal, o que levaria à atenuação da luz rendendo valores incertos para o coeficiente específico da clorofila.

A fotossíntese é um processo vital para microalgas Chlorophyta como a *C. sorokiniana* e a *A. densus*, porém quando essas microalgas encontram-se na presença de NPs-Cu sua resposta fotossintética parece se mostrar dependente da plasticidade fisiológica da espécie estudada. Como apresentado no capítulo 3 *C. sorokiniana* manteve os processos fotossintéticos em pleno funcionamento mesmo sob elevadas concentrações de NPs-Cu, enquanto que *A. densus* não conseguiu manter nenhum estágio desse processo, provavelmente devido à sua maior sensibilidade.

Bioquímica

A composição bioquímica das microalgas pode refletir sua saúde fisiológica e isso é ainda mais importante quando consideramos a relevância ecológica deste estudo. Nossos resultados mostraram que a síntese proteica foi estimulada em quase duas vezes em comparação com o controle para a concentração de $6,5 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ de cobre livre. A tendência de aumento proteico em função do aumento na concentração de metais, também foi observada em outros estudos. Rocha et al.

(2016b) obtiveram aumento proteico de 3,5 vezes para *Selenastrum gracile* exposta a $8,3 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre, enquanto Einicker-Lamas et al. (2002) obtiveram ~1,5 vezes mais proteínas em *Euglena gracilis* exposta à $1,39 \times 10^4 \mu\text{g L}^{-1}$ de cobre em relação ao controle. Os autores atribuíram esse acúmulo à incapacidade da célula se dividir na presença do cobre, contudo isso teria gerado células maiores, o que não foi observado no presente estudo. Mas, ao relacionar os dados de viabilidade celular e síntese proteica podemos sugerir que as proteínas predominantes nessa concentração de NPs-Cu não foram estruturais, mas sim proteínas de detoxificação, uma vez que a reprodução celular já se mostrava comprometida nessas elevadas concentrações. Portanto, sugerimos que a classe proteica predominantemente sintetizada por *A. densus* nessas condições (elevadas concentrações de NPs-Cu) foi de proteínas ligadoras e/ou antioxidantes, responsáveis pela detoxificação celular. Vale et al. (2016), relatam que enzimas como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase podem ser ativadas para neutralizar radicais livres decorrentes de exposição às NPs. Metalochaperonas, proteínas responsáveis pelo transporte de cobre na célula (ROBINSON; WINGE, 2010) e metalotioneínas (COBBETT; GOLDSBROUGH, 2002) também já foram detectadas em microlagas expostas ao cobre.

A síntese de carboidratos foi duas vezes maior em $4,8 \times 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$ de cobre livre em comparação ao controle, enquanto que na última concentração esse aumento chegou a 3 vezes, tornando este parâmetro bioquímico o que mais variou frente à exposição de NPs. Já a concentração de lipídios totais aumentou em até 2,3 vezes nas maiores concentrações de cobre livre, sendo que a classe dos triacilgliceróis (TG), reserva energética da célula, aumentou 1,3 vezes em relação ao controle. A literatura mostra que há uma tendência de aumento de moléculas de reserva tais como carboidratos e lipídios trigliceróis em situações de estresse por metais (CHIA et al., 2013a, 2013b; ROCHA et al., 2016b), ou ainda por limitação nutricional (KILHAM et al., 1997; CHIA et al., 2013a; CHIA et al., 2013b; ROCHA et al., 2014).

A razão proteína:carboidrato (P:C) é considerada um indicador do estado fisiológico em microalgas e reflete estresse por limitação de nutrientes (KILHAM et al., 1997; LAI et al., 2011). No presente estudo obtivemos diminuição (~1,65 vezes)

nesse parâmetro a partir de $4,8 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ de cobre livre. Creditamos esta redução ao bloqueio do canais iônicos pelas NPs, como discutido em Baker, Tyler, Galloway (2014) que pode ter propiciado a condição de limitação nutricional intracelular, apesar do meio extracelular se encontrar repleto de nutrientes como garante o grupo controle.

Considerando que o acúmulo de moléculas energéticas como carboidratos e lipídios ocorre em situações de estresse fisiológico, propomos que isso possa ter sido causado por íons cobre liberados das NPs-Cu, fato corroborado por Navarro et al. (2008) em estudos com NPs-Ag. Contudo, não podemos negligenciar o mecanismo de ação das NPs, que as tornam bloqueadoras de canais iônicos das membranas celulares (BAKER; TYLER; GALLOWAY, 2014) e degradadoras de membranas celulares em microalgas (ZHAO et al., 2016). Se este mecanismo de fato ocorre, esperaríamos aumento de lipídios de membranas celulares, tal qual o ocorrido nesta pesquisa com fosfolipídios, uma classe de lipídios de membrana. O aumento da síntese de fosfolipídios (PL) e seu acúmulo de quase 9 vezes em relação aos controles fortalece a hipótese de Baker, Tyler, Galloway (2014) e aponta para o entupimento de canais iônicos ou outros problemas nas membranas em microalgas expostas às NPs-Cu. Os lipídios polares móveis em acetona (AMPL), que são presentes em membranas de organelas fotossintéticas e representativos de pigmentos (PARRISH; WANGERSKY, 1988; LOMBARDI; WANGERSKY, 1991), apresentou aumento de 2,2 vezes em relação aos controles. Com base no acima exposto, sugerimos que a síntese dos lipídios de membranas em *A. densus* foi intensificada na tentativa de reestruturar as membranas, possivelmente degradadas pelas nanopartículas e/ou com seus canais iônicos entupidos. Associando esses resultados aos de fotossíntese podemos ainda sugerir que foram ocasionados danos nas membranas dos cloroplastos, expondo os centros de reação, de modo que a célula não conseguiu lidar com a intensidade luminosa incidente, necessitando da ativação do mecanismo de liberação de calor pelo ciclo da xantofila, refletindo no maior NPQ que observamos.

Os hidrocarbonetos, esteróis e álcoolis alifáticos livres apresentaram aumento de 1,6 a 2,0 a partir de $6,5 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ de Cu livre. A combinação de limitação nutricional e toxicidade por metais pode levar ao desbalanço e aumento da

composição lipídica neutra (CHIA et al., 2013a; CHIA et al., 2015). Gardner et al. (2011) encontraram aumento de triacilgliceróis, lipídios neutros, para *Chlorella vulgaris* e, atribuíram tal resultado à limitação de nitrogênio. Haneda et al. (2015) encontraram aumento de triacilgliceróis após manipulação com cobre em *C. vulgaris*, provando que o estresse induziu o aumento de lipídios de reserva. Esses resultados corroboram o obtido no presente estudo. Se considerarmos que *A. densus* possa ter tido os canais iônicos bloqueados pelas NPs (interação física) e estar enfrentando toxicidade por íons cobre no meio (interação química), o aumento desses lipídios neutros concorda com o observado na literatura para estudos de limitação por nutrientes e de toxicidade por cobre.

A composição bioquímica das microalgas diz respeito ao seu valor nutricional e, de modo geral, podemos dizer que alterações nessa composição ocorreu em ambas as espécies estudadas, independente da sensibilidade da microalga. Entretanto, mecanismos distintos com relação aos carboidratos foram ativados. Enquanto *C. sorokiniana* utilizou os carboidratos como fonte energética para manter os processos fotossintéticos vitais, *A. densus* que já se encontrava com seus aparatos fotossintéticos degradados, acumulou carboidratos, uma molécula de reserva.

Com base no exposto constatamos o quanto as nanopartículas possuem efeitos significativos nos processos fotossintéticos e bioquímicos de *A. densus*. Em ambiente natural, são os produtores primários que suportam os demais níveis tróficos, além de serem responsáveis pela fixação de carbono. Mostramos neste estudo que a microalga reduziu sua capacidade de fotossintetizar e, conseqüentemente de fixar carbono, o que pode refletir em prejuízos não somente ao aquecimento global, mas também quanto ao suporte de níveis tróficos superiores em ambientes aquáticos naturais que recebam NPs-Cu. Ainda, a composição bioquímica, que informou sobre o valor nutricional de *A. densus*, mostrou-se comprometida na presença das nanopartículas. Portanto, é imprescindível aliar o desenvolvimento econômico à sustentabilidade, de modo que investigações dos efeitos de NPs devam ser entendidos a fim de verificar potenciais riscos que podem causar à biota.

Conclusão

Finalizamos este capítulo com a comprovação de que *Ankistrodesmus densus* não conseguiu manter os processos fotossintéticos, nem a fixação de carbono e nem os processos reprodutivos a partir de $2,1 \times 10^{-9}$ mol L⁻¹ de cobre livre.

A presença de NPs-Cu contribuiu para um desequilíbrio bioquímico, induzindo a síntese de proteínas, possivelmente relacionadas à detoxificação (e não proteínas estruturais) e acúmulo de carboidratos e lipídios, indicando a condição estressante induzida pelas NPs-Cu.

6 CONCLUSÕES FINAIS

Nossos resultados são uma contribuição para o melhor entendimento da dinâmica de nanopartículas de cobre considerando as microalgas e o meio no qual elas estão inseridas. Mostramos consequências na fisiologia das microalgas *C. sorokiniana* e *A. densus* que podem ser advindas tanto de interação física (bloqueamento de canais iônicos nas membranas celulares), quanto químicas (liberação de íons a partir dos materiais constituintes das NPs). Tendo como base as interações das NPs-Cu com *C. sorokiniana*, concluímos que em contato com a superfície biológica, cerca de 100% da NPs-Cu foram adsorvidas e/ou absorvidas nas primeiras 24 horas de exposição. Assumindo que essa mesma interação tenha ocorrido com *A. densus*, onde obtivemos aumento na síntese de fosfolipídios, responsáveis pela estrutura das membranas celulares, sugerimos que as membranas celulares poderiam estar sendo degradadas como resultado da interação física entre as NPs e a microalga.

A presença das NPs-Cu levou à redução significativa nos parâmetros relacionados ao crescimento populacional (taxa de crescimento e viabilidade celular) tanto nos cultivos de *C. sorokiniana*, como também nos de *A. densus*, diferentemente do ocorrido com os parâmetros relacionados à fotossíntese.

Quanto à composição bioquímica, observamos que diferentes concentrações de cobre foram necessárias para o aumento da síntese de proteínas nas microalgas, *C. sorokiniana* e *A. densus*. Concentração de NPs de $1,59 \text{ ugL}^{-1}$ Cu livre causou tal efeito em *C. sorokiniana*, enquanto que para *A. densus*, bastou $0,41 \text{ ugL}^{-1}$ de Cu livre, quatro vezes menos cobre. Associada à diminuição dos parâmetros de crescimento nas duas microalgas, esse resultado sugere que o aumento observado deve-se à proteínas de detoxificação e não proteínas estruturais.

A produção de carboidratos foi distinta nas microalgas, diminuindo em *C. sorokiniana* e aumentando em *A. densus*.

Mostramos ainda que em *A. densus*, como resultado da exposição às NPs-Cu, além do aumento na síntese da classe lipídica relacionada à manutenção de membranas celulares (PL e AMPL), aumentou também a classe lipídica de membranas de organelas fotossintéticas (AMPL).

Observamos comportamentos distintos nas microalgas também quanto ao funcionamento do aparato fotossintético. Enquanto em *C. sorokiniana* os processos fotossintéticos tiveram seu funcionamento similar ao controle, *A. densus* teve sua fotossíntese e parâmetros correlatos reduzidos, sugerindo que microalgas distintas podem apresentar diferentes estratégias para lidar com as NPs-Cu.

Mostramos que as microalgas responderam de maneira diferente ao mesmo toxicante, sendo que a espécie mais resistente (*C. sorokiniana*) ainda manteve seus processos fotossintéticos, apesar da composição bioquímica e reprodução já estarem comprometidas. *A. densus*, mais sensível do que *C. sorokiniana*, teve toda sua fisiologia afetada, inclusive os processos fotossintéticos. Portanto, a plasticidade fisiológica da espécie exposta foi fator determinante para a detecção dos efeitos das NPs-Cu.

De modo geral, obtivemos que, seja sensível ou resistente, a microalga exposta as NPs-Cu terá sua fisiologia alterada que poderá ser refletida na reprodução, nos processos fotossintéticos e/ou na composição bioquímica e em ambientes naturais isso acabará por refletir nos níveis tróficos superiores.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL (ABDI). Relatório de acompanhamento setorial. **Nanotecnologia na área da saúde: mercado, segurança e regulação**. Brasília, 2013. 50p.

AGUSTÍ, S.; SÁNCHEZ, C. Cell viability in natural phytoplankton communities quantified by a membrane permeability probe. **Limnology Oceanography**, v. 47, p. 818-828, 2002.

ALBALASMEH, A. A.; BERHE, A. A.; GHEZZEHEI, T. A. A new method for rapid determination of carbohydrate and total carbon concentrations using UV spectrophotometry. **Carbohydrate Polymers**, v. 97, n. 2, p. 253–261, 2013.

ANDERSEN, R. A. **Algal Culturing Techniques**. 1st Edition. Academic Press. ISBN: 0120884267. 596 p. 2005.

ARUOJA, V. et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 4, p. 1461-1468, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). *NBR12648: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)*. Rio de Janeiro, 2005. 24 p.

BAKER, T. J.; TYLER, C. R.; GALLOWAY, T.S. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organism. **Environmental Pollution**, v. 186, p. 257–271, 2014.

BARHOUMI, L.; DEWEZ, D. Toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on green alga *Chlorella vulgaris*. **BioMed Research International**, v.2013, 12p., ID647974, 2013.

BARRETO, D. M.; LOMBARDI, A.T. Environmentally relevant concentrations of TiO₂ nanoparticles affected cell viability and photosynthetic yield in the Chlorophyceae *Scenedesmus bijugus*. **Water Air Soil Pollut**, v.227, p.450, 2016.

BEHRA, R. et al. 2013. Bioavailability of silver nanoparticles and ions: from a chemical and biochemical perspective. **The Royal Society**, v. 10, n. 87, p.1-15, 2013.

BONDARENKO, O. et al. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. **Arch Toxicol**, v. 87, p.1181–1200, 2013.

BOTTERO, J.-Y. et al. Nanotechnology, global development in the frame of environmental risk forecasting. A necessity of interdisciplinary researches. **C. R. Geoscience**, v. 347, p. 35–42, 2015.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 243-254, 1976.

CABELLO-PASINI, A. et al. Effect of nitrate concentration and UVR on photosynthesis, respiration, nitrate reductase activity, and phenolic compounds in *Ulva rigida* (Chlorophyta). **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 363–369, 2010.

CAMARGO, C. C.; LOMBARDI, A. T. Effect of cement industry flue gas simulation on the physiology and photosynthetic performance of *Chlorella sorokiniana*. **Journal of Applied Phycology**, v. 20, p. 861-871, 2018.

CAMPOS, M. L. A. M.; BENDO, A.; VIEL, F. Métodos de baixo custo para purificação de reagentes e controle da contaminação para determinação de metais traços em águas naturais. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 808-813, 2002.

CHELONI, G.; MARTI, E.; SLAVEYKOVA, V. I. Interactive effects of copper oxide nanoparticles and light to green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 120-128, 2016.

CHIA, M.A. et al. Combined nitrogen limitation and cadmium stress stimulate total carbohydrates, lipids, protein and amino acid accumulation in *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae). **Aquatic Toxicology**, v. 160, p. 87-95, 2015.

CHIA, M.A. et al. Effects of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). **European Journal of Phycology**, v. 48, n. 1, p. 1–11, 2013a.

CHIA, M.A. et al. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. **Aquatic Toxicology**, v. 128-129, p. 171-182, 2013b.

COBBETT, C.; GOLDSBROUGH, P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. **Annual review of plant biology**, v. 53, p. 159–82, 2002.

COSTA, C. H. et al. Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Science of the Total Environment**, v. 565, p. 951-960, 2016.

DA COSTA, M. V. J.; SHARMA, P. K. Effect of copper oxide nanoparticles on growth, morphology, photosynthesis, and antioxidant response in *Oryza sativa*. **Photosynthetica**, v. 54, n. 1, p. 110-119, 2016.

DALAI, S. et al. Cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles and their detoxification in a freshwater system. **Aquatic Toxicology**, v.138, p.139:1-11, 2013.

DOMINGOS, R. F. et al. Bioaccumulation and Effects of CdTe/CdS Quantum Dots on *Chlamydomonas reinhardtii* Nanoparticles or the Free Ions? **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 7664–7669, 2011.

ECHEVESTE, P.; SÁNCHEZ, A.T.; AGUSTÍ, S. Tolerance of polar phytoplankton communities to metals. **Environmental Pollution** v. 185, p. 188-195, 2014.

ECHEVESTE, P.; SILVA, J. C.; LOMBARDI, A.T. 2017. Cu and Cd affect distinctly the physiology of a cosmopolitan tropical freshwater phytoplankton. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.143, p. 228-235, 2017.

EINICKER-LAMAS, M. et al. *Euglena gracilis* as a model for the study of Cu²⁺ and Zn²⁺ toxicity and accumulation in eukaryotic cells. **Environmental Pollution**, v. 120, n. 3, p. 779-786, 2002.

EL-KASSAS, H.Y.; OKBAH, M. A. E.-A. Phytotoxic effects of seaweed mediated copper nanoparticles against the harmful alga *Lyngbya majuscula*. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 15, n. 1, p. 41-48, 2017.

ENRÍQUEZ, S.; BOROWITZKA, M. A. The use of the fluorescence signal in studies of seagrasses and macroalgae. In: SUGGETT, D. J.; BOROWITZKA, M.; PRÁŠIL, O. (Eds.). **Chlorophyll a Fluorescence in Aquatic Sciences: Methods and Applications**. Developments in Applied Phycology. [s.l.] Springer Netherlands, p. 187–208, 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a Guide for its Bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia** [online], v. 38, n. 2, p. 109-112, 2014.

FIGUEROA, F. L.; JEREZ, C. G.; KORBEE, N. Use of in vivo chlorophyll fluorescence to estimate photosynthetic activity and biomass productivity in microalgae grown in different culture systems. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 41, n. 5, p. 801-819, 2013.

FOREST, V.; COTTIER, M.; POURCHEZ, J. Electrostatic interactions favor the binding of positive nanoparticles on cells: A reductive theory. **Nano Today**, v. 10, p. 677-680, 2015.

GODDARD III et al. **Handbook of nanoscience, engineering, and technology**. ISBN 0-8493-7563-0 Taylor & Francis Group CRC Press. Chapter 1: There's Plenty of Room at the Bottom: An Invitation to Enter a New Field of Physics. 2007.

GARDNER, R. et al. Medium pH and nitrate concentration effects on the accumulation of triacylglycerol in two members of the chlorophyta. **Journal of Applied Phycology**, v. 23, p. 1005–1016, 2011.

GORELIK, S. et al. X-ray diffraction and electro-optic analysis of metals. **Metallurgizdat**, p. 256, 1963.

GRILLO, R.; ROSA, A. H.; FRACETO, L. F. Engineered nanoparticles and organic matter: A review of the state-of-the-art. **Chemosphere**, v. 119, p. 608-619, 2015.

HANDY, R. D.; OWEN, R.; JONES, E. V. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 315–325, 2008.

HANEDA, R. N. et al. Biochemical Composition of *Chlorella Sorokiniana* Grown in a Novel Design of Hybrid Photobioreactor. **Microbial & Biochemical Technology**, v.7, n. 2, p. 76-82, 2015.

HARTLAND, A. et al. The Environmental Significance of Natural Nanoparticles. **Nature Education Knowledge**, v. 4, n. 8, p. 7, 2013.

HASSELOV, M. et al. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. **Ecotoxicology**, v.17, p.344 – 361, 2008.

HERLOY, O.; BONZOM, J. M.; GILBIN, R. Sensitivity evaluation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* to uranium by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. **Aquatic Toxicology**, v. 140-141, p. 288-94, 2013.

JEREZ, C. G. et al. Relation between light absorption measured by the quantitative filter technique and attenuation of *Chlorella fusca* cultures of different cell densities: application to estimate the absolute electron transport rate (ETR). **Journal of Applied Phycology**, v. 28, p.1635-1648, 2016.

JUNEAU, P.; BERDEY, E. L.; POPOVIC, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and

Chlamydomonas reinhardtii to copper. **Archives of Environment Contamination and Toxicology**, v. 42, p. 155-164, 2002.

KILHAM, S. et al. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. **Freshwater Biology**, v.38, p.591– 596, 1997.

KNAUER, K. **Interactions of trace metals (Cu, Zn and Mn) with freshwater phytoplankton**. (Zürich, Switzerland). Doctoral Thesis - Swiss Federal Institute of Technology Zürich, Switzerland, 1996.

KROMKAMP, J. C. et al. Estimating phytoplankton primary production in Lake IJsselmeer (The Netherlands) using variable fluorescence (PAM-FRRF) and C-uptake techniques. **European Journal of Phycology**, v. 43, n. 4, p. 327-344, 2008.

KROMKAMP, J. C.; FORSTER, R. M. The use of variable fluorescence measurements in aquatic ecosystems: differences between multiple and single turnover measuring protocols and suggested terminology. **European Journal of Phycology**, v. 38, n. 2, p. 103-112, 2003.

KROPAT, J. et al. Copper economy in *Chlamydomonas*: Prioritized allocation and reallocation of copper to respiration vs. photosynthesis. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 3;112(9):p. 2644-51, 2015.

KULACKI, K. J. et al. How do stream organisms respond to, and influence, the concentration of titanium dioxide nanoparticles? A mesocosm study with algae and herbivores. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 1, p.2414-2422, 2012.

KÜPPER, H. et al. Heavy metal induced inhibition of photosynthesis: targets of in vivo heavy metal chlorophyll formation. **Journal of Phycology**, v. 38, p. 429-44, 2002.

LAI, J. et al. Responses of the growth and biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 405, p. 6-17, 2011.

LEHNINGER, A. L. **Principles of Biochemistry**. Worth Publishers. ISBN: 978-0879011369. 725 p. 1985.

LEÓN-SAIKI, G. M. et al. The impact of day length on cell division and efficiency of light use in a starchless mutant of *Tetrademus obliquus*. **Algal Research**, v. 31, p. 387-394, 2018.

LOMBARDI, A. T.; WANGERSKY, P. J. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. **Marine ecology progress series**, v. 77, p. 39-47, 1991.

LOMBARDI, A. T.; MALDONADO, M. T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. **Photosynthesis Research**, v. 108, n. 1, p. 77-78, 2011.

LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A. H.; SARTORI, L. A. Mucilacinous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). **Journal of Phycology**, v. 38, p. 332–337, 2002.

MARCONE, G. P. S. 2011. **Avaliação de ecotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio e prata** (Campinas, SP). 207 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

MELEGARI, S. P. et al. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v.142-143, p. 431-440, 2013.

MOOS, N. V.; BOWEN, P.; SLAVEYKOVA, V. I. Bioavailability of inorganic nanoparticles to planktonic bacteria and aquatic microalgae in freshwater. **Environmental Science: Nano**, v. 1, p. 214-232, 2014.

MORRIS, E. P. et al. Coupling between photosystem II electron transport and carbon fixation in microphytobenthos. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 50, p. 301-311, 2008.

MUELLER, N. C.; NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. **Environmental Science & Technology**, v.42, n.12, p.4447-4453, 2008.

MÜLLER, E.; BEHRA, R.; SIGG, L. Toxicity of engineered copper (Cu⁰) nanoparticles to the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Chemistry**, v. 13, p. 457–463, 2016.

MÜLLER, P.; LI, X. P.; NIYOGI, K. K. Non-Photochemical Quenching. A Response to Excess Light Energy. **Plant Physiology**, v. 125, p. 1558–1566, 2001.

NANOWERK, 2018. Disponível em: <<https://www.nanowerk.com/nanomaterial-database.php>>. Acessado em 26 de junho de 2018.

NASCIMENTO, J. M. et al. Estudo da remoção do íon cobre por meio de bioadsorção usando Biomassa de levedura (*Saccharomyces cerevisiae*). **CETEM/MCTIC**, 2016. Disponível em: <<http://mineralis.cetem.gov.br/handle/cetem/1961?mode=full>>. Acessado em 26 de junho de 2018.

NAVARRO, E. et al. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 23, p. 8959-896, 2008.

ODUM, E. P.; BARRETT, G. W. **Fundamentos de Ecologia**. 5° ed. São Paulo: Cengage Learning. 612p. 2007.

ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT (OECD). Nanotechnology: an overview based on indicators and statistics (DST1/DOC (2009)7-JT03267289). 2009. 112p.

OXBOROUGH, K.; BAKER, N. R. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and Fv'/Fm' without measuring Fo'. **Photosynthesis Research**, v. 54, n. 1989, p. 135–142, 1997.

PARRISH, C. C. 1999. Determination of total lipid, lipid classes and fatty acids in aquatic samples. In: M. T Arts; B. C. Wainman (eds); **Lipids in Freshwater Ecosystems**. Springer New York. p. 4-20, 1999.

PARRISH, C. C.; WANGERSKY, P. J. Iatroscan-measured profiles of dissolved and particulate marine lipid classes over the scotian slope and in bedford basin. **Marine Chemistry**, v. 23, p.1-15, 1988.

PASCHOALINO, M. P. ; MARCONE, G. P. S. ; JARDIM, W.F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421-430, jan. 2010.

PLATT, T.; GALLEGOS, C. L.; HARRISON, W. G. Photoinhibition of photosynthesis in natural assemblages of marine phytoplankton. **Journal of Marine Research**, v. 38, p. 103-111, 1980.

RALPH, P. J.; GADEMANN, R. Rapid light curves: A powerful tool to assess photosynthetic activity. **Aquatic Botany**, v. 82 p. 222–237, 2005.

RANMADUGALA, D. et al. The effect of iron oxide nanoparticles on *Bacillus subtilis* biofilm, growth and viability. **Process Biochemistry**, v. 62, p. 231-240, 2017.

RAUSCH, T. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. **Hidrobiologia**, v. 78, p. 237–251, 1981.

REGIER, N. et al. Effects of copper-oxide nanoparticles, dissolved copper and ultraviolet radiation on copper bioaccumulation, photosynthesis and oxidative stress in the aquatic macrophyte *Elodea nuttallii*. **Chemosphere**, v. 128, p. 56-61, 2015.

REYNOLDS, C. S. **The Ecology of Phytoplankton**. Cambridge University Press. ISBN: 9780521605199. 552 p. 2006.

RIBEIRO, F. et al. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. **Science of the Total Environment**, v. 466–46, p. 232–241, 2014.

ROBINSON, N. J.; WINGE, D. R. Copper Metallochaperones. **Annual Review of Biochemistry**, v. 79, p. 537-562, 210. doi:10.1146/annurev-biochem-030409-143539.

ROCHA, G. S. et al. Effect of copper contaminated food on the life cycle and secondary production of *Daphnia laevis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 133 p. 235-242, 2016a.

ROCHA, G. S. et al. Copper affects biochemical and physiological responses of *Selenastrum gracile* (Reinsch). **Ecotoxicology**, v. 25, n. 8, p. 1468-1477, 2016b.

ROCHA, G. S. et al. Growing *Scenedesmus quadricauda* in used culture media: is it viable? **Journal of Applied Phycology**, v. 27, n. 1, p. 171-178, 2014.

RÖHDER, L. A. et al. Influence of agglomeration of cerium oxide nanoparticles and speciation of cerium(III) on short term effects to the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 121-130, 2014.

SAISON, C. et al. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 96, n. 2 p. 109-114, 2010.

SAKSHAUG, E. et al. Parameters of photosynthesis: definitions, theory and interpretation of results. **Journal of Plankton Research**, v.19, p.1637-1670, 1997.

SANTOS, A. C.; LOMBARDI, A. T. Growth, photosynthesis and biochemical composition of *Haematococcus pluvialis* at various pH. **Journal Algal Biomass Utilization**, v. 8, p. 1-15, 2017.

SCHREIBER, U. et al. Assessment of Photosynthetic Performance of Prochloron in *Lissoclinum patella* in hospite by Chlorophyll Fluorescence Measurements. **Plant & Cell Physiology**, v. 38, n. 8, p. 945-951, 1997.

SERÔDIO, J. et al., Efficiency of photoprotection in microphytobenthos: role of vertical migration and the xanthophyll cycle against photoinhibition. **Aquatic Microbial Ecology**, v. 67, p. 161-175, 2012.

SILVA, J. C., ECHEVESTE, P.; LOMBARDI, A. T. Higher biomolecules yield in phytoplankton under copper exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 161, p. 57-63, 2018.

SOUZA, F. M. L. D.; KELLY, G. J. Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae. **Aquaculture**, v.181, p.311-329, 2000.

SUNDBERG, M. et al. Silanized surfaces for in vitro studies of actomyosin function and nanotechnology applications. **Analytical Biochemistry**, v. 323, n. 1, p. 127-138, 2003.

THIT, A.; SELCK, H.; BJERREGAARD H. F. Toxicity of CuO nanoparticles and Cu ions to tight epithelial cells from *Xenopus laevis* (A6): Effects on proliferation, cell cycle progression and cell death. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p.1596–1601, 2013.

TOLOCHKO, N. K. History of nanotechnology. **Encyclopedia of Life Support Systems**. [s.d.] Disponível em:< <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C05/E6-152-01.pdf>>. Acesso: 27 de junho de 2018.

TONIETTO, A. E. et al. *Cylindrospermopsis raciborskii* (cyanobacteria) exudates: Chemical characterization and complexation capacity for Cu Zn Cd and Pb. **Water research**, v. 49, p. 381-390, 2014.

TONIETTO, A. E. et al. Copper and cadmium complexation by *Cylindrospermopsis raciborskii* exudates. **Water Science and Technology**, v.73, n. 10, p. 2544-2551, 2016.

TSUZUKI, T. 2009. Commercial scale production of inorganic nanoparticles. **International Journal of Computational Materials Science and Surface Engineering**, v. 4, n. 5-6, p. 347-373, 2009.

UNITED STATION ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (US-EPA). *Ecological effects test guidelines OCSP 850.4500: algal toxicity*. EPA 712-C-006. United States of America, 2012.

US Research Nanomaterials, Inc. Disponível em: <<https://www.usano.com/inc/sdetail/18475>>. Acesso: 28 de junho de 2018.

VALE, Disponível em: <<http://www.vale.com/brasil/PT/business/mining/copper/Paginas/default.aspx>>. Acesso: 27 de junho de 2018.

VALE, G. et al. Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: A critical overview. **Aquatic Toxicology**, v. 170, p. 162-174. 2016.

WANG, D. et al. Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: The nanoparticles, the ions, or a combination of both? **Journal of Hazardous Materials**, v. 308, p. 328-334, 2016.

WANG, L.F. et al. Copper release from copper nanoparticles in the presence of natural organic matter. **Water Research**, v. 68, p. 12-23, 2015.

WANG, Z. et al. Toxicity and Internalization of CuO Nanoparticles to Prokaryotic Alga *Microcystis aeruginosa* as Affected by Dissolved Organic Matter. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 6032–6040, 2011.

YRUELA, I. Copper in plants. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v. 17, n. 1, p. 145-156, 2005.

ZHAO, J. et al. Interactions of CuO nanoparticles with the algae *Chlorella pyrenoidosa*: Adhesion, uptake and toxicity. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 9, p. 1297-305, 2016.