

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

Efeitos de nanopartículas magnéticas sobre a microalga  
*Raphidocelis subcapitata*

DANIELA CORREIA DE MELO

São Carlos – SP  
2016

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

Efeitos de nanopartículas magnéticas sobre a microalga  
*Raphidocelis subcapitata*

DANIELA CORREIA DE MELO

ORIENTADORA: PROFESSORA Dr<sup>a</sup>. MARIA DA GRAÇA GAMA MELÃO  
CO-ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup>. JAQUELINE PÉROLA DE SOUZA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

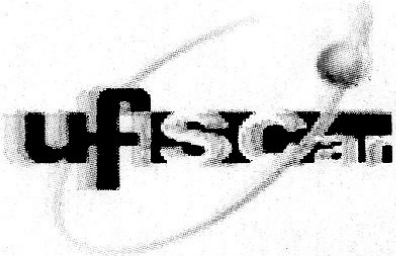
São Carlos – SP  
2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar  
Processamento Técnico  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

M528e Melo, Daniela Correia de  
Efeitos de nanopartículas magnéticas sobre a  
microalga *Raphidocelis subcapitata* / Daniela Correia  
de Melo. -- São Carlos : UFSCar, 2017.  
151 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de  
São Carlos, 2016.

1. Estresse oxidativo. 2. Composição bioquímica. 3.  
Fitoplâncton. 4. Nanopartículas. 5. Parâmetros de  
fluorescência da clorofila. I. Título.

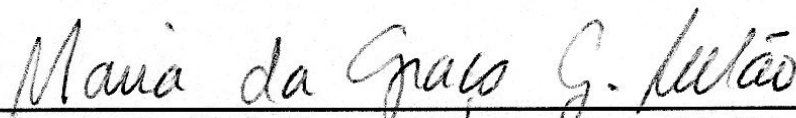


---

**Folha de Aprovação**

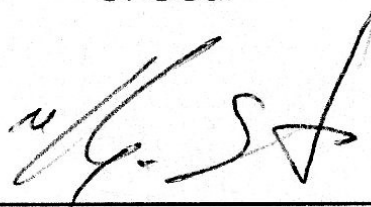
---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Daniela Correia de Melo, realizada em 27/10/2016:



---

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão  
UFSCar



---

Prof. Dr. Hugo Miguel Preto de Moraes Sarmiento  
UFSCar

  
Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda  
IQSC/USP

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Francisco e Ana, à minha irmã Natália e ao Bernardo, eternas fontes de amor, carinho e motivação.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES pela bolsa concedida. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP pelo apoio financeiro (Processo Nº 2014/14139-3 e Nº 2016/00753-7).

Ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos.

À Professora e orientadora Dr<sup>a</sup> Maria da Graça Melão pelas contribuições, incentivo e paciência durante o desenvolvimento deste trabalho e pelas oportunidades e contribuição ao meu crescimento pessoal e científico.

À Dr<sup>a</sup> Jaqueline Pérola de Souza pela co-orientação e ajuda inestimável no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço a amizade, generosidade e paciência desde o início da minha jornada científica.

Ao Professor Dr<sup>o</sup> Laudemir Carlos Varanda pela colaboração durante o desenvolvimento deste trabalho e pelas sínteses, caracterizações e análises das nanopartículas utilizadas.

À Professora Dr<sup>a</sup> Ana Teresa Lombardi por ter cedido o laboratório, pelas valiosas contribuições e ajuda para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Professor Dr<sup>o</sup> Hugo Sarmento pelas contribuições, apoio e ajuda inestimáveis durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Laboratório de Plâncton e Laboratório de Biodiversidade e Processos Microbianos, especialmente Lays e Giseli Swerts pela ajuda e apoio.

Ao Laboratório de Biotecnologia de Algas, em especial Daniela, Jaqueline, Graziela e Eduardo por todo apoio, paciência e ajuda.

Ao Grupo de Materiais Coloidais do Instituto de Química de São Carlos, principalmente aos doutorandos João e Caio pela ajuda com as caracterizações das nanopartículas e quantificação dos metais.

Ao Grupo de Nanomedicina e Nanotecnologia do Instituto de Física de São Carlos.

Às minhas amigas de São Carlos, especialmente Jaqueline, Yeda, Ana Carla, Melina e Lays e aos amigos de Cuiabá, Márcio, Giovanna, Tatiana, Rita e Eduardo pelo apoio e incentivo.

Agradeço em especial aos meus pais, minha irmã e minha avó pelos conselhos, apoio, motivação, amor e carinho incondicionais.

Agradeço em especial ao Benardo pelo amor, carinho, paciência e por estar ao meu lado nos momentos mais difíceis.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

A nanotecnologia tem-se desenvolvido rapidamente nas últimas décadas, sendo caracterizada como a quarta revolução industrial. No mercado atual é crescente o uso de produtos que incorporam nanotecnologias. As nanopartículas (NPs) são caracterizadas como materiais com tamanho entre 1 a 100 nm em pelo menos uma das suas dimensões, que possuem grande área superficial e propriedades físico-químicas distintas de seu material de origem. Em especial, as nanopartículas magnéticas são de grande interesse na ciência de materiais, sendo investigadas suas aplicações em biotecnologia/biomedicina, ressonância magnética, armazenamento de dados, catálise, processos de remediação ambiental entre outros. No entanto, os riscos do desenvolvimento de novos nanomateriais para o meio ambiente ainda são pouco explorados e pesquisas que normatizam seu uso ainda são incipientes. Dessa forma, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar os efeitos de nanopartículas magnéticas para uma espécie de fitoplâncton de água doce, a microalga *Raphidocelis subcapitata*. As NPs utilizadas foram NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetita); NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (hematita com cobre adsorvido) e NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (ferrita de cobalto). Além de parâmetros tradicionalmente utilizados em ecotoxicologia aquática como densidade celular e conteúdo de clorofila *a*, também foram avaliados a composição bioquímica (proteína, lipídeos e carboidratos) dessa microalga, parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e estresse oxidativo induzido pela produção de espécies reativas ao oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species* - ROS). Nossos estudos indicam que somente concentrações elevadas, acima de 50 mg L<sup>-1</sup>, das nanopartículas magnéticas alteraram a resposta fisiológica da microalga, e nesse caso aumentaram as concentrações de lipídeos e proteínas. Os parâmetros de fluorescência da clorofila e o estresse oxidativo induzido pela geração de ROS, no geral mostraram-se sensíveis às NPs, principalmente



nas concentrações mais elevadas de NPs. Portanto, a aplicação e utilização de NPs magnéticas e NPs bimetálicas em ambientes aquáticos pode ser considerada segura para a cloroficea *Raphidocelis subcapitata* desde que em concentrações baixas.

Palavras-chave: estresse oxidativo; composição bioquímica; fitoplâncton; nanopartículas; parâmetros de fluorescência da clorofila.

## ABSTRACT

Nanotechnology has developed rapidly in recent decades, characterized as the fourth industrial revolution. In the current market, the use of products that incorporate nanotechnology is ascending. The nanoparticles (NPs) are characterized as materials with 1 to 100 nm at least one of its dimensions, which have large surface area and physico-chemical properties distinct from their source material. In particular, the magnetic nanoparticles are of great interest in materials science, and their applications are investigated in biotechnology / biomedicine, magnetic resonance imaging, data storage, catalysis, environmental remediation process and others. However, the risks of the development of new nanomaterials for the environment are still underexplored and research that regulates its use is still incipient. Thus, this study aimed to evaluate the effects of magnetic nanoparticles on one kind of freshwater phytoplankton, the microalgae *Raphidocelis subcapitata*. NPs used were Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs (magnetite); Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NPs (hematite with adsorbed copper) and CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NPs (cobalt ferrite). Besides traditionally used parameters in aquatic ecotoxicology as cell density and chlorophyll *a* content, were also evaluated the biochemical composition (protein, lipids and carbohydrates) of this microalgae, fluorescence parameters of chlorophyll *a* and oxidative stress induced by the production of reactive oxygen species (ROS). Our studies indicate that only high concentrations, higher than 50 mg L<sup>-1</sup>, of magnetic nanoparticles modified the physiologic response of microalgae, in which case increased concentrations of lipids and proteins. The chlorophyll fluorescence parameters and oxidative stress induced by ROS in general were sensitive to NPs, particularly in higher concentrations. Therefore, the implementation and use of magnetic and bimetallic NPs in aquatic environments can be considered safe for chloroficea *Raphidocelis subcapitata* since in low concentrations.

Keywords: oxidative stress; biochemical composition; phytoplankton; nanoparticles;  
Chlorophyll fluorescence parameters.

## LISTA DE FIGURAS

### 1. INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1. Produção de nano-resíduos (Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009). NPs = nanopartículas. .... 19
- Figura 2. Microalga *Raphidocelis subcapitata*. Fonte: <http://algalweb.net/index.pqr.htm> ..... 20

### CAPÍTULO 1. COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA MICROALGA *Raphidocelis subcapitata* NA PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

- Figura 1. Fluorescência de *Raphidocelis subcapitata* obtida por meio de citometria de fluxo. Através do parâmetro SSC-H 90° (dispersão lateral) versus a intensidade de fluorescência detectada no canal FL3-H (fluorescência vermelha) foi possível identificar as células algais. Onde: *beads* é o padrão interno (esferas fluorescentes de 6 µm) ..... 32
- Figura 2. Curva de crescimento de *Raphidocelis subcapitata* em meio LC Oligo. A densidade celular é expressa pelo logaritmo natural (Ln) das concentrações (células mL<sup>-1</sup>) a cada 24 horas durante 9 dias. Médias ± Desvio Padrão de n=4.....43
- Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de magnetita (NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) (A, B, C e D) com diâmetro médio ao redor de 20 nm.....45
- Figura 4. Difratomia de raios X da nanopartícula de magnetita (NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>). Abaixo, encontram-se os padrões de difração (JCPDS).....46
- Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de hematita com íons cobre adsorvidos (NP Cu- Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) (A, B, C e D) com diâmetro médio ao redor de 80 nm.....47
- Figura 6. Difratomia de raios X da nanopartícula de hematita (NP α-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Abaixo, encontram-se os padrões de difração (JCPDS).....48
- Figura 7. Energia dispersiva de raios X (Energy Dispersive Spectroscopy, EDS) para as NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. (A) NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e padrão amorfo. (B) padrão amorfo. (C) NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. .....50
- Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de ferrita de cobalto (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) (A, B, C, D) com diâmetro médio ao redor de 20 nm.....51
- Figura 9. Difratomia de raios X da nanopartícula de ferrita de cobalto (NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>). Abaixo, encontram-se os padrões de difração (JCPDS).....52
- Fig 10. Fotomicrografias de *Raphidocelis subcapitata* (aumento 400x) com 96 horas de exposição às nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. A. controle; B. alga com NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (100 mg L<sup>-1</sup>); C. alga com NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (50 mg L<sup>-1</sup>). D. alga com NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (100 mg L<sup>-1</sup>). As setas

vermelhas	evidenciam	os
aglomerados.....		56

Figura 11. Classes lipídicas nas células da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta à diferentes concentrações de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. (a) HC hidrocarboneto alifático e SE/WE estéril éster/éster de cera (b) TAG triacilglicerol; ALC álcool alifático livre; ST esterol. (c) FFA ácido graxo livre; AMPL lipídeos polares móveis em acetona e PL fosfolípídeo. Em cada classe lipídica, os asteriscos indicam que há diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05) de acordo com one-way ANOVA e Teste de Tukey.....65

Figura 12. Classes lipídicas nas células da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta à diferentes concentrações de nanopartículas de Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (a) HC hidrocarboneto alifático e SE/WE estéril éster/éster de cera (b) TAG triacilglicerol; ALC álcool alifático livre; ST esterol. (c) FFA ácido graxo livre; AMPL lipídeos polares móveis em acetona e PL fosfolípídeo. Em cada classe lipídica, os asteriscos indicam que há diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05) de acordo com one-way ANOVA e Teste de Tukey.....68

Figura 13. Classes lipídicas nas células algais da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta à diferentes concentrações de nanopartículas de CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. (a) HC hidrocarboneto alifático e SE/WE estéril éster/éster de cera (b) TAG triacilglicerol; ALC álcool alifático livre; ST esterol. (c) FFA ácido graxo livre; AMPL lipídeos polares móveis em acetona e PL fosfolípídeo. Em cada classe lipídica, os asteriscos indicam que há diferença estatisticamente significativa em relação ao controle (p<0,05) de acordo com one-way ANOVA e Teste de Tukey.....71

## CAPÍTULO 2. FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* E ESTRESSE OXIDATIVO NA MICROALGA *Raphidocelis subcapitata* NA PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Figura 1. Fluorescência do indicador de produção de ROS - DCF (2', 7' – diclorofluoresceína) nas células algais de *Raphidocelis subcapitata* detectada no canal FL1 (Fluorescência verde). (a) controle em 96 horas. (b) células algais com 50 mg L<sup>-1</sup> de NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> em 96 horas.....111

Figura 2. Densidade celular (cel mL<sup>-1</sup>) da microalga *Raphidocelis subcapitata* na presença de nanopartículas magnéticas em relação ao tempo de exposição (horas). (a) NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. (b) NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (c) NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>..... 114

Figura 3. Conteúdo de clorofila *a* (pg cel<sup>-1</sup>) em *Raphidocelis subcapitata* sob diferentes concentrações (mg L<sup>-1</sup>) de nanopartículas magnéticas por 96 horas. a. NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. b. NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. c. NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. (\*) indica diferença significativa entre o controle e tratamentos (p<0,05).....117

Figura 4. Fluorescência mínima (Fo) e Fluorescência máxima (Fm) em *Raphidocelis subcapitata* em 48 e 96 h. (a) e (b) NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. (c) e (d) NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. (e) e (f) NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. (\*) indica diferenças significativas da fluorescência mínima (Fo) entre controle e tratamento e (\*) indica diferenças

significativas da fluorescência máxima (Fm) entre controle e tratamento ( $p < 0,05$ ). Quadrados em preto e azul representam a média  $\pm$  desvio padrão para  $n=4$ . (Fo e Fm em unidades arbitrárias).....119

Figura 5. Rendimento Quântico Máximo ( $\phi_m = F_v/F_m$ ) em *Raphidocelis subcapitata* sob diferentes concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de nanopartículas magnéticas em 0, 24, 48, 72 e 96 horas. (a) NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . (b) NP  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ . (c) NP  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ . (Fv/Fm em unidades arbitrárias - u.a.). Todos os dados do  $\phi_m$  entre controle e tratamento foram submetidos ao Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ; média  $\pm$  desvio padrão para  $n=4$ ).....121

Figura 6. Parâmetros de fluorescência (unidades arbitrárias) da microalga *Raphidocelis subcapitata* submetidas às NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  em 48 e 96 horas. (a) Rendimento quântico efetivo ( $\phi_m' = F'm-Fs/F'm$ ). (b) Complexo de evolução do oxigênio (Fo/Fv). (c) Dissipação fotoquímica (Qp). (d) Dissipação não-fotoquímica (Qn). (e) Dissipação não-fotoquímica relacionada principalmente a dissipação de calor (NPQ). (\*) indica diferenças significativas entre controle e tratamento em 48 horas. (\*) indica diferenças significativas entre controle e tratamento em 96 horas ( $p < 0,05$ ). Quadrados em preto e círculos em vermelho representam a média  $\pm$  desvio padrão para  $n=4$ .....124

Figura 7. Parâmetros de fluorescência (unidades arbitrárias) da microalga *Raphidocelis subcapitata* submetidas às NPs  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  em 48 e 96 horas. (a) Rendimento quântico efetivo ( $\phi_m' = F'm-Fs/F'm$ ). (b) Complexo de evolução do oxigênio (OEC = Fo/Fv). (c) Dissipação fotoquímica (Qp). (d) Dissipação não-fotoquímica (Qn). (e) Dissipação não-fotoquímica relacionada principalmente a dissipação de calor (NPQ). (\*) indica diferenças significativas entre controle e tratamento em 48 horas. (\*) indica diferenças significativas entre controle e tratamento em 96 horas ( $p < 0,05$ ). Quadrados em preto e círculos em vermelho representam a média  $\pm$  desvio padrão para  $n=4$ .....127

Figura 8. Parâmetros de fluorescência (unidades arbitrárias) da microalga *Raphidocelis subcapitata* submetidas às NPs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  em 48 e 96 horas. (a) Rendimento quântico efetivo ( $\phi_m' = F'm-Fs/F'm$ ). (b) Dissipação fotoquímica (Qp). (c) Dissipação não-fotoquímica (Qn). (d) Dissipação não-fotoquímica relacionada principalmente a dissipação de calor (NPQ). (e) Complexo de evolução do oxigênio (OEC). (\*) indica diferenças significativas entre controle e tratamento em 48 horas. (\*) indica diferenças significativas entre controle e tratamento em 96 horas ( $p < 0,05$ ). Quadrados em preto e círculos em vermelho representam a média  $\pm$  desvio padrão para  $n=3$ .....129

Figura 9. Nível relativo de Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) (%) em *Raphidocelis subcapitata* sob diferentes concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de nanopartículas magnéticas após 0, 24, 48, 72 e 96 horas. (a) NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . (b) NP  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ . (c) NP  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ . (\*) indica diferença significativa entre o controle e tratamentos ( $p < 0,05$ ). Barras verticais representam a média  $\pm$  desvio padrão para  $n=3$ .....132

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1. COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA MICROALGA *Raphidocelis subcapitata* NA PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Tabela 1. Tamanho hidrodinâmico médio (THM = d.nm), Índice de Polidispersividade (PDI) e Potencial Zeta( $\zeta$ ) (mV) das nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (CN = concentração nominal em mg L<sup>-1</sup>) em 0 e 96 horas de exposição da microalga *Raphidocelis subcapitata*.....54

Tabela 2. Fração particulada de íons ferro, cobre e cobalto das NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> em *Raphidocelis subcapitata*.....55

Tabela 3. Média  $\pm$  Desvio Padrão da concentração de clorofila *a* (pg cel<sup>-1</sup>) e taxa de crescimento (d<sup>-1</sup>) da microalga *Raphidocelis subcapitata* em diferentes concentrações nominais de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (mg L<sup>-1</sup>) após 96 horas de exposição. Letras distintas em cada coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p<0.05).....58

Tabela 4. Composição bioquímica (proteínas, carboidratos e lipídeos totais) da microalga *Raphidocelis subcapitata* em meio LC Oligo após 96h de exposição às nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. P/C (razão proteína e carboidrato). Letras distintas em cada coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre controles e tratamentos e entre tratamentos (p<0,05). Média  $\pm$  Desvio de n=4.....61

### CAPÍTULO 2. FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* E ESTRESSE OXIDATIVO NA MICROALGA *Raphidocelis subcapitata* NA PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

Tabela 1. Parâmetros da fluorescência da clorofila.....108

## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>17</b>
<b>CAPÍTULO 1: COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA MICROALGA <i>Raphidocelis subcapitata</i> NA PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....</b>	<b>21</b>
RESUMO.....	22
ABSTRACT.....	24
1.Introdução.....	25
2. Objetivos.....	28
3. Material e métodos.....	29
3.1 Cultivo da microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i> .....	29
3.2 Síntese das nanopartículas magnéticas.....	30
3.3 Caracterização das nanopartículas magnéticas.....	32
3.4 Análise dos metais.....	33
3.5 Curva de crescimento e ensaio de sensibilidade da microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i> .....	35
3.6 Exposição da microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i> às nanopartículas magnéticas.....	37
3.7 Biomassa (clorofila a) e Taxa de Crescimento.....	39
3.8 Conteúdo de proteínas, carboidratos, lipídeos totais e classes lipídicas.....	40
3.9 Análises Estatísticas.....	42
4. Resultados.....	43
4.1 Curva de crescimento e ensaio de sensibilidade da microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i> .....	43
4.2 Caracterização das nanopartículas.....	45
4.3 Análise dos metais.....	54
4.4 Exposição da microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i> às nanopartículas magnéticas.....	56
4.5 Biomassa (clorofila a) e Taxa de Crescimento.....	56
4.6 Conteúdo de proteínas, carboidratos, lipídeos totais e classes lipídicas.....	58
5. Discussão.....	72
6. Conclusões.....	86
Referências.....	87
<b>CAPÍTULO 2. FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA A E ESTRESSE OXIDATIVO NA MICROALGA <i>Raphidocelis subcapitata</i> NA PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....</b>	<b>94</b>
RESUMO.....	95
ABSTRACT.....	97
1. Introdução.....	99



2. Objetivos .....	102
3. Material e métodos .....	103
3.1 Exposição da microalga <i>Raphidocelis subcapitata</i> às nanopartículas magnéticas.....	103
3.2 Determinação da densidade celular.....	104
3.3 Biomassa (clorofila a) .....	105
3.4 Eficiência fotossintética de <i>Raphidocelis subcapitata</i> na presença de nanopartículas magnéticas.....	106
3.5 Estresse oxidativo induzido pela produção de Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS)109	
3.6 Análises Estatísticas .....	112
4. Resultados .....	113
4.1 Densidade celular .....	113
4.2 Biomassa (Clorofila a) .....	114
4.3 Eficiência fotossintética de <i>Raphidocelis subcapitata</i> na presença de nanopartículas magnéticas.....	117
4.4 Estresse oxidativo induzido pela formação de Espécies Reativas ao Oxigênio (Reactive Oxygen Species - ROS).....	130
5. Discussão.....	133
6. Conclusões .....	144
Referências.....	146
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>149</b>
<b>Referências.....</b>	<b>151</b>

## APRESENTAÇÃO

Diante da ampla utilização das nanopartículas magnéticas em diversos setores (biomedicina, produção de biocombustíveis e remediação de ambientes contaminados, entre outros), são essenciais estudos ecotoxicológicos que avaliem seus efeitos nos ecossistemas. Além de indicadores de toxicidade tradicionalmente utilizados no estudo de espécies fitoplanctônicas, tais como taxa de crescimento e conteúdo de clorofila *a*, o presente trabalho abrange também os efeitos de nanopartículas magnéticas de magnetita, ferrita de cobalto e hematita com cobre adsorvido na composição bioquímica e na fisiologia da microalga *Raphidocelis subcapitata*. Foram avaliados os conteúdos de proteína, carboidrato, lipídeos totais e classes lipídicas e, ainda, parâmetros da fluorescência da clorofila *a* e indução de espécies reativas ao oxigênio.

O presente trabalho foi dividido em 2 capítulos:

**Capítulo 1.** COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA MICROALGA *Raphidocelis subcapitata* NA PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

**Capítulo 2.** FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *a* E ESTRESSE OXIDATIVO NA MICROALGA *Raphidocelis subcapitata* NA PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

## INTRODUÇÃO GERAL

As ideias sobre manipulação da matéria em pequena escala introduzidas pelo prêmio Nobel Richard Feynman para a Sociedade Americana de Física no ano de 1959 em uma palestra intitulada “*There’s Plenty of room at the room*” (Há muito espaço dentro do espaço) são consideradas os passos iniciais do advento da nanotecnologia. Definida como controle e reestruturação da matéria na ordem de nanômetros, a nanotecnologia possui duas abordagens: “top down”, na qual estruturas maiores são reduzidas à nanoescala e, “bottom up” também denominada nanotecnologia molecular, na qual os materiais são produzidos a partir de átomos ou componentes moleculares (Sanchez e Sobolev, 2010).

Nanopartículas são definidas como partículas com ao menos uma das suas dimensões possuindo tamanho entre 1 a 100 nm, com propriedades distintas dos materiais com mesma composição química e em escala não-nanométrica. As principais áreas de aplicação incluem a eletrônica, fotônica, dispositivos eletrônicos, cosméticos, lubrificantes, produtos farmacêuticos, entre outros (Nel et al., 2006; Auffan et al., 2009).

Para toxicologistas e biólogos as nanopartículas são definidas como partículas inferiores a 250 nm que podem assumir caminhos não definidos no organismo (Krug e Wick (2011). Para Riehemann et al. (2009) uma definição importante foi apresentada pela *US National Nanotechnology Initiative*, a qual resume que a nanotecnologia está preocupada com materiais e sistemas cujas estruturas e componentes exibem novas e significantes propriedades físicas, químicas e biológicas devido ao seu tamanho em nanoescala.

Os materiais magnéticos são caracterizados por exibir uma resposta a um campo magnético aplicado, sendo classificados em 5 tipos principais: ferromagnéticos,

paramagnéticos, diamagnéticos e antiferromagnéticos. Os materiais com ferro e cobalto estão entre os ferromagnéticos, quando um campo magnético é aplicado, os dipolos magnéticos alinham-se ao longo da direção a esse campo magnético. O óxido de ferro é encontrado comumente na natureza nas formas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) e maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), sendo a magnetita o óxido de ferro magnético mais comum. As nanopartículas magnéticas possuem propriedades físicas, químicas, térmicas e mecânicas únicas e, dessa forma, apresentam elevado potencial de aplicações. Tais como: fluidos magnéticos, catálises, biomedicina, armazenamento magnético de energia e armazenamento de informação magnetoeletrônica (spintrônica) (Hasany et al., 2012; Issa et al., 2013).

O rápido desenvolvimento nanotecnológico, diante da infinidade de aplicações dos nanomateriais, oferece diversos benefícios e, concomitantemente, contribui para a produção de um novo tipo de resíduo que podem contaminar o ambiente, tendo em vista que há poucas informações sobre o descarte correto desses produtos (Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009).

A figura 1 mostra a produção de nano-resíduos a partir da nanotecnologia, com ênfase na necessidade de monitoramento contínuo do destino dos nanoprodutos, sugerindo a reciclagem como uma forma de reduzir nano-resíduos liberados no ambiente. Resíduos de cosméticos, tintas e produtos farmacêuticos podem liberar nanopartículas de forma direta; produtos têxteis e revestimentos podem formar compósitos; nanopartículas metálicas podem liberar íons tóxicos (lixiviação) e outros nanoprodutos podem ser eliminados como misturas complexas ou suspensões contendo nanopartículas (Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009).

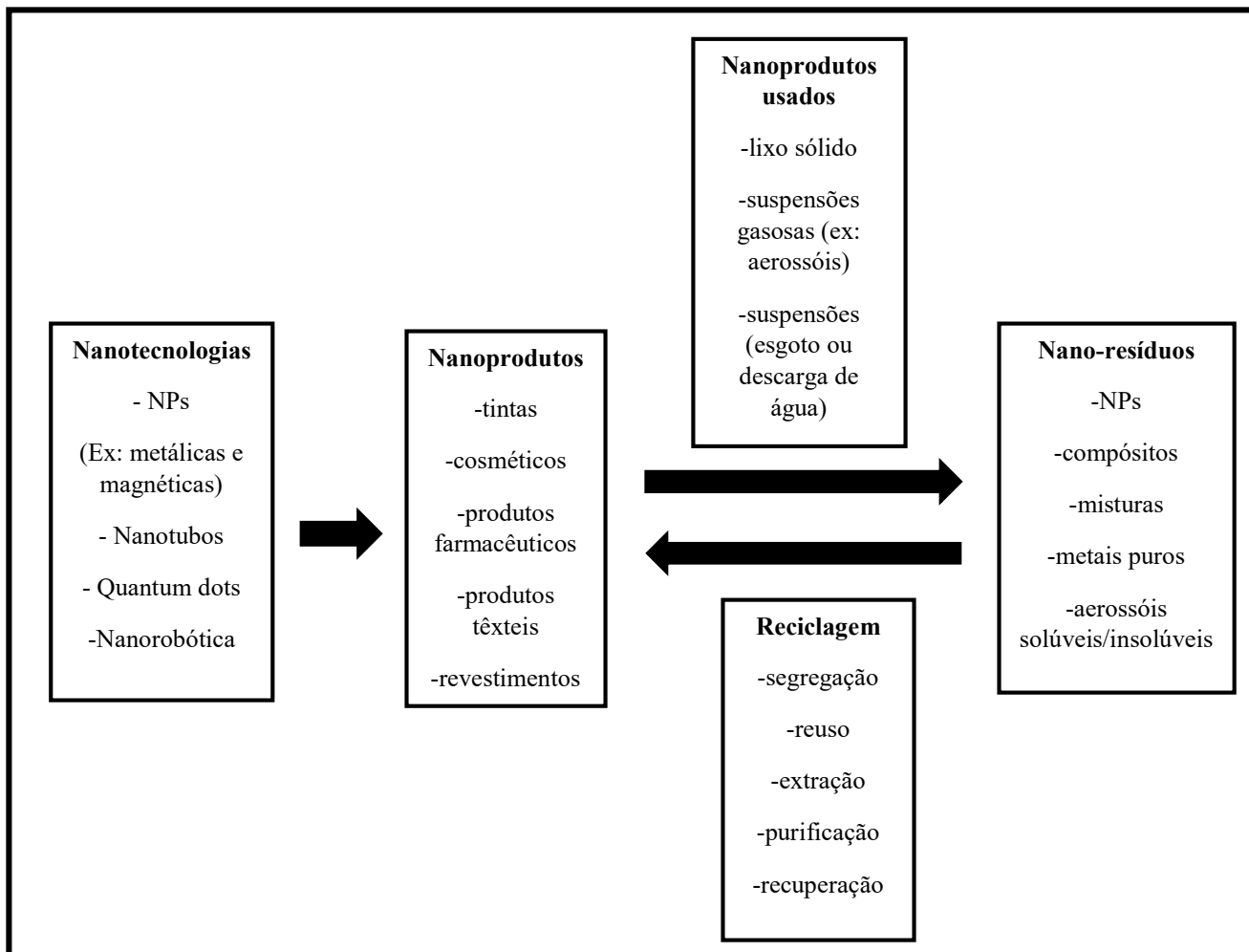


Figura 1. Produção de nano-resíduos (Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009). NPs = nanopartículas.

Diante do exposto, possíveis efeitos nocivos causados pela liberação de nanomateriais devem ser investigados (Moore, 2006). A ecotoxicologia avalia a causa dos efeitos de tóxicos de agentes físicos e químicos sobre organismos vivos e, inclui as vias de transferência desses agentes e suas interações com o ambiente (Boudou e Ribeyre, 1997). Recentemente, os efeitos das nanopartículas em ambientes aquáticos têm sido discutidos, uma vez que esses materiais podem ser utilizados em sistemas de água doce como resultado da sua utilização em sensores tecnológicos e limpeza de resíduos provenientes da indústria e medicina (Lovern e Klaper, 2005).

Devido ao curto tempo de geração e facilidade de cultivo, as microalgas fornecem uma avaliação rápida de respostas à poluentes, sendo intensamente utilizadas em ecotoxicológica aquática. A espécie modelo, *Raphidocelis subcapitata* (Korshikov) (Hindak, 1990) (Figura 2) é recomendada na padronização de ensaios toxicológicos por várias agências nacionais (como a Associação Brasileira de Normas Técnicas, ABNT, 2011) e internacionais (como a *Organization for Economic Co-operations and Development*, OECD, 2002).



Figura 2. Microalga *Raphidocelis subcapitata*. Fonte: <http://algalweb.net/indext pqr.htm>

**CAPÍTULO 1: COMPOSIÇÃO BIOQUÍMICA DA MICROALGA *Raphidocelis subcapitata* NA PRESENÇA DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**

## RESUMO

Atualmente os nanomateriais estão em crescente desenvolvimento e há previsões para aumento em sua produção e aplicação em diversas áreas. Concomitantemente, o risco de liberação desses produtos no ambiente é relevante. As nanopartículas magnéticas apresentam inúmeras aplicações em biomedicina, tecnologia e meio ambiente, sendo utilizadas em tratamentos e diagnósticos e terapias potenciais, processos de biorremediação ambiental, como tratamento de águas subterrâneas e de solos contaminados, e na produção de biocombustíveis para o incremento do conteúdo lipídico em células algais e maior eficiência na colheita de algas. Nos ambientes aquáticos, o comportamento e as interações das nanopartículas (NPs), principalmente as bimetálicas, com os organismos ainda não foram estudados de maneira aprofundada. Dessa forma, o presente trabalho teve como objetivo a avaliação dos efeitos de nanopartículas magnéticas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e de nanopartículas magnéticas bimetálicas (hematita com íons cobre adsorvidos ( $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ ) e ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) sobre a biomassa da microalga clorofícea *Raphidocelis subcapitata* através de análises da concentração de clorofila *a* e de sua composição bioquímica (conteúdo de proteínas, carboidratos, lipídeos totais e classes lipídicas). Os resultados mostraram que as NPs estudadas não afetaram significativamente a concentração de clorofila *a* nas células algais. No entanto, nas maiores concentrações utilizadas, o conteúdo de proteínas aumentou significativamente em relação ao controle, tanto para as nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  quanto para as nanopartículas de  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ . O conteúdo de carboidratos nas células algais tiveram aumento significativo para aquelas submetidas à  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$  das duas NPs bimetálicas. O conteúdo de lipídeos totais também sofreu aumento significativo quando as células algais foram expostas às nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ ), de  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  ( $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ ).



<sup>1</sup>) e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ). Os fosfolipídeos (PL) e lipídeos polares móveis em acetona (AMPL) representam as classes lipídicas que mais contribuíram para o incremento de lipídios nas células algais. Nossos resultados indicam que somente concentrações elevadas das nanopartículas magnéticas são capazes de alterar a resposta fisiológica da microalga e, neste caso aumentar as concentrações de lipídeos e proteínas. Portanto, a aplicação e utilização de NPs magnéticas e NPs bimetálicas em ambientes aquáticos pode ser considerada segura para a espécie de microalga chloroficea *Raphidocelis subcapitata*.

Palavras-chave: clorofila *a*; proteínas; carboidratos; lipídeos; classes lipídicas, nanopartículas, microalga.

## ABSTRACT

Nanomaterials are rapidly developing and there are forecasts for increase in production and application in several areas. There is therefore a serious risk of release of these products in the environment. Magnetic nanoparticles (NPs) have numerous applications in biomedicine, technology and environmental remediation. In aquatic environments, the behavior and interactions of NPs, especially the bimetallic ones, with the biota have not yet been fully clarified. This study aims to evaluate the effects of magnetic NPs of magnetite ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NP) and two bimetallic magnetic NPs, hematite with adsorbed copper ions ( $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  NP) and cobalt ferrite ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  NP), in the microalgae *Raphidocelis subcapitata* through analysis of chlorophyll *a* and biochemical composition. The results showed that the studied nanoparticles did not significantly affect the content of chlorophyll *a*. However, at the highest concentrations used, protein content increased significantly compared to control, for  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NP and  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  NP. Carbohydrate content had a significant increase in algal cells exposed to  $50 \text{ mg L}^{-1}$  of  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  NP and  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  NP. Total lipids content increased significantly when algal cells were exposed to  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  NP ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ ),  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  NP ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ) and  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  NP ( $20 \text{ mg L}^{-1}$ ). Phospholipids (PL) and acetone mobile polar lipids (AMPL) were the lipid classes that most contributed to the increase of lipids in algal cells. Our results indicate that only high concentrations of magnetic NPs were able to alter the physiological response of microalgae, increasing in this case, lipid and protein concentrations in the algal cells.

Keywords: chlorophyll *a*; proteins; carbohydrates; lipids; lipid classes, nanoparticles, microalgae.

## 1.Introdução

Nanopartículas (NPs) são definidas como materiais que apresentam tamanho entre 1 e 100 nm em pelo menos uma de suas dimensões. Possuem propriedades físico-químicas e mecânicas únicas em função da escala reduzida, distintas daquelas encontradas nos materiais de origem ou em grande escala (Nel et al., 2006; Nowack e Bucheli, 2007; Auffan et al., 2009; Römer et al., 2011; Tejamaya et al., 2012).

Nanopartículas magnéticas são amplamente utilizadas em processos de remediação ambiental, como por exemplo, para remoção de metais pesados na água e de contaminantes em solos poluídos (Tang e Lo, 2013). Hao et al. (2010), mostraram que um complexo nano-absorvente de nanopartículas de magnetita (NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) foi capaz de remover até 98% do íon  $\text{Cu}^{2+}$  da água poluída de um rio, mantendo 15 ciclos de adsorção-dessorção eficientes. Além disso, Hu et al. (2005), mostraram a capacidade de remoção de cromo de águas residuais pelo método de adsorção e separação magnética empregando a NP  $\gamma\text{-Fe}_3\text{O}_4$ .

Diversos mecanismos, como a deposição parcial de metais secundários, têm sido utilizados para modificar a superfície de NP de ferro. A adição de metais, como o cobre, resulta em NPs bimetálicas com grande interesse comercial para tratamentos de águas subterrâneas e de solos contaminados. Sabe-se que essa adição pode mudar a taxa de dissolução e a estrutura eletrônica do ferro e, conseqüentemente, exercer mecanismos distintos de toxicidade (Kim et al., 2014).

Nanopartículas magnéticas, principalmente  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , também apresentam inúmeras aplicações em medicina e podem contribuir para a evolução de diagnósticos e de terapias potenciais devido ao seu comportamento sob diferentes tipos de campos magnéticos. Ao gerar energia térmica sob um campo magnético alternado, por exemplo, essas NPs podem ser usadas em células cancerosas, já que essas apresentam

termotolerância distinta em relação às células saudáveis. Além disso, o efeito da quimioterapia pode ser combinado ao tratamento por hipertermia ao construir um sistema de liberação do fármaco pelo aumento do calor.

As NPs de magnetita podem também induzir especificamente a autofagia de células tumorais, e com o uso de um campo magnético externo, podem ser direcionadas a um determinado órgão ou tecido e, ainda, ligar-se a enzimas, proteínas, nucleotídeos e anticorpos. Portanto, o supermagnetismo das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  as tornam ideais para pesquisas em diversas áreas, tais como, ressonância magnética, separação celular, reparação tecidual, hipertermia de fluido magnético e catálise, fluidos biológicos (Rajiv et al., 2016; Yu et al., 2014; Khan et al., 2012). No entanto, seus efeitos no ambiente ainda devem ser investigados em função do amplo espectro de utilização dessas partículas atrelado ao rápido desenvolvimento da nanotecnologia (Käkinen et al., 2013; Gottschalk, 2010; Nel et al., 2006; Gupta e Gupta, 2005; Oberdorster et al., 2005).

Devido ao grande potencial para a aplicação de NPs magnéticas em processos de remediação de ambientes aquáticos é de grande importância o conhecimento dos aspectos ecotoxicológicos envolvendo o fitoplâncton e as NPs, bem como a compreensão dos efeitos da biodisponibilidade do ferro sobre a fisiologia de microalgas. A importância ecológica do fitoplâncton reside no fato desses organismos serem produtores primários das cadeias alimentares aquáticas, dos quais organismos de níveis tróficos superiores são dependentes. Além disso, microalgas possuem capacidade para acumulação de lipídeos (Kadar et al., 2012), sendo utilizadas como matéria-prima na produção de biodiesel (Sarma et al., 2014). O uso de NPs para induzir o acúmulo intracelular de lipídeos e para otimizar processos de produção de biomassa de microalgas, juntamente com a extração lipídica são responsáveis por grande parte dos custos na produção de biodiesel (Kim et al., 2013; Lee et al., 2014; Duraiarasan et al., 2016).

A caracterização da composição bioquímica (lipídeos, carboidratos e proteínas) e da biomassa microalgal fornecem dados relevantes para a utilização mais eficiente das microalgas (Servaites et al., 2012). A biomassa produzida por microalgas pode originar produtos relacionados à saúde, aditivos alimentares, biocombustíveis, entre outros. Ademais, a grande demanda de biocombustíveis tem impacto no fornecimento de alimentos, áreas cultiváveis e florestas tropicais (Markou et al., 2012).

Microalgas do filo Chlorophyta (algas verdes) são importantes componentes do fitoplâncton, com fundamental papel na disponibilidade de oxigênio molecular na Terra em função da fotossíntese. As algas verdes contêm pigmentos de clorofilas *a* e *b*, xantofilas e carotenos, sendo o amido a principal forma de reserva. A espécie desse estudo, *Raphidocelis subcapitata*, é unicelular e apresenta distribuição cosmopolita em solos e corpos de água doce (Ohse, 2007; Vidotti e Rollemberg, 2004). A microalga *R. subcapitata* é amplamente recomendada como organismo teste em ensaios ecotoxicológicos devido à sua sensibilidade a impactos ambientais em ecossistemas aquáticos (OECD, 2002; ABNT, 2002).

## 2. Objetivos

O presente estudo teve como objetivos principais:

- i) Avaliar a toxicidade de NPs de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), de NPs hematita com íons cobre adsorvidos ( $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ ) e de NPs de ferrita cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) para a microalga *R. subcapitata* através da avaliação da biomassa (clorofila *a*) e taxa de crescimento;
- ii) Verificar se as NPs magnéticas podem interferir no metabolismo da espécie estudada levando a alterações em sua composição bioquímica como conteúdo de proteínas, carboidratos, lipídeos totais e classes lipídicas.

### 3. Material e métodos

#### 3.1 Cultivo da microalga *Raphidocelis subcapitata*

A microalga *Raphidocelis subcapitata* (Chlorophyceae) foi obtida no Laboratório de Biotecnologia de Algas (Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP). Os cultivos-estoque foram preparados em meio LC Oligo (Afnor, 1980) (Tabela 1) com o uso de água ultra-pura (Barnstead Easypure Rodi, USA). Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave por 20 min a 121°C, em Erlenmeyers de policarbonato de 500 mL de capacidade contendo 250 mL de meio LC Oligo. Após 24 horas, o meio foi inoculado com  $5 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> de *Raphidocelis subcapitata* em fase exponencial de crescimento em cabine de fluxo laminar (Pachane, Brasil). Os cultivos-estoque foram submetidos à agitação manual periódica, intensidade luminosa com lâmpadas de LED de 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro), temperatura de 24±1°C e pH 7,0.

A partir dos cultivos-estoques foram estabelecidas pré-culturas sob as mesmas condições acima mencionadas. Após um período de 72 horas, as pré-culturas foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 min (centrífuga Eppendorf 5702R) e as células foram contadas em hemocitômetro (câmara de Neubauer espelhada, Boeco, Alemanha) sob microscópio óptico (Leica DMLS). Dessa forma, foram obtidos os inóculos utilizados para obtenção da curva de crescimento da espécie estudada nos ensaios de sensibilidade e de toxicidade (preliminares e definitivos).

Tabela 1. Meio de cultura LC Oligo (AFNOR, 1980).

Solução	Reagente	Quantidade (mg)	Preparo
1	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	4 000	Em 100 mL de água destilada
2	$\text{KNO}_3$	10 000	Em 100 mL de água destilada
3	$\text{MgSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	3 000	Em 100 mL de água destilada
4	$\text{K}_2\text{HPO}_4$	4 000	Em 1000 mL de água destilada
5	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	30	Em 1000 mL de água destilada
	$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot \text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	60	
	$\text{H}_3\text{BO}_3$	60	
6	$\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1 625	Em 1000 mL de água destilada
	$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	6 250	
	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6 250	
7	$\text{NaHCO}_3$	15 000	Em 1000 mL de água destilada

### 3.2 Síntese das nanopartículas magnéticas

As nanopartículas magnéticas utilizadas nos ensaios foram: magnetita (NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), hematita com cobre absorvido ( $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ ) e ferrita de cobalto (NP  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ). As três NPs foram sintetizadas e caracterizadas pelo Grupo de Materiais Coloidais do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, SP.

A síntese das NPs de magnetita em sistema aquoso foi realizada segundo Qu et al. (1999), sendo baseada na redução controlada de íons ferro (III) em meio aquoso. Esta síntese apresenta a vantagem de não necessitar da aplicação de atmosfera de nitrogênio e



de precursores organometálicos tóxicos e caros, além de um bom rendimento e considerável controle de características morfológicas (Marciello et al., 2013). Sob agitação constante, uma solução de cloreto de ferro (III) em meio ácido foi misturada a uma solução aquosa de sulfito de sódio seguindo a razão molar de  $[Fe^{3+}] / [SO_3^{2-}] = 3$ . A essa mistura foi adicionado um volume conhecido de hidróxido de sódio, de maneira a permitir uma concentração de excesso de base ( $[OH^-]_{exc}$ ) variando de 0,2 até  $2 \times 10^{-4}$  mol/L, obtida através da seguinte relação:

$$[OH^-]_{exc} = [NaOH] - (3[Fe^{3+}]_{total} + [HCl])$$

O volume final da solução foi ajustado para 200 mL com adição de água. Nestas condições, os íons sulfitos inicialmente se complexam com os íons férricos, formando  $Fe^{2+}$ , e, com a adição de base, promoveu-se a precipitação de magnetita ( $Fe_3O_4$ ). Então, o sistema foi aquecido a 90 °C por 18 horas. O período de envelhecimento a 90 °C controla o tamanho das nanopartículas e, principalmente, sua cristalinidade. A síntese foi conduzida em balão de três bocas com aquecimento constante controlado por uma manta térmica acoplada a um controlador de temperatura e um termopar imerso no sistema de reação.

Nanopartículas de hematita com íons cobre adsorvidos e ferrita de cobalto (NP Cu- $Fe_2O_4$  e NP Co $Fe_2O_4$ ) foram sintetizadas de maneira similar ao descrito para as amostras de magnetita. Entretanto, não foi utilizada a solução de sulfito de sódio e os cátions metálicos foram adicionados diretamente como íons divalentes através de soluções aquosas de cloretos de cobre (II) e cloreto de cobalto (II).

### 3.3 Caracterização das nanopartículas magnéticas

A avaliação da forma e do tamanho das NPs foi realizada por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Uma gota de suspensão de nanopartículas diluída em etanol foi adicionada sob o porta amostras (grid de cobre previamente recoberto com filme - Formvar<sup>®</sup>) e um filme fino de carbono depositado por pulverização catódica (*sputtering*). O porta amostra foi seco sob vácuo por 24 horas e levado ao microscópio JEM 2100 – JEOL, operando a 200 kV para obtenção das imagens.

A fase cristalina das amostras foi analisada por difratometria de raios X (DRX) utilizando-se o difratômetro de raios X D8 Advance da Bruker pelo método do pó. Uma pequena quantidade da amostra foi seca em estufa a 100°C, homogeneizada em almofariz de ágata e colocada sob o porta amostras para difração. As medidas foram realizadas no intervalo de 10 a 80 °C em 2 $\theta$  utilizando radiação K $\alpha$  do cobre (1,5418 Å) com velocidade de varredura de 0,020°/0,2 segundos.

Para a determinação de cobre nas NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> utilizou-se o detector de energia dispersiva de raios X (do inglês *Energy Dispersive Spectroscopy*, EDS) (Oxford Instruments). Para tal, um feixe de elétrons foi condensado para iluminar uma determinada área da amostra mantendo a densidade de corrente (pA/cm<sup>2</sup>) constante para os dois espectros obtidos; o primeiro é constituído de uma área de carbono amorfo sem nanopartículas e o segundo refere-se a área com as NPs. Desse modo, como o porta amostra do MET contém cobre, a contagem do sinal do porta amostra foi descontado do sinal das NPs para obter um resultado qualitativo da presença de cobre na amostra de óxido de ferro(III) e cobre (II) (NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>).

Amostras das nanopartículas de hematita com cobre adsorvido e ferrita de cobalto foram analisadas por Espectrometria de Absorção Atômica (do inglês *Atomic Absorption*

*Spectrometry* -AAS, Perkin Elmer, PinAACLE 900T, EUA) para determinação da proporção de metais em cada NP.

Caracterizações do tamanho hidrodinâmico médio (diâmetros nanômetros - d.nm), Índice de Polidispersividade (PDI) e Potencial Zeta (mV) foram avaliadas para as todas as NPs em estudo nos meios de exposição no início e no final dos testes (0 e 96 horas). Essas análises foram realizadas através de Espalhamento de luz dinâmico (do inglês *Dinamic Light Scatering* DLS) no equipamento Malvern spectrometer Nano ZS90 no Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia do Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo.

### 3.4 Análise dos metais

A determinação da concentração dos metais particulados e dissolvidos foi realizada ao início (0 hora) e final (96 horas) da exposição das microalgas às NPs. As análises foram feitas para o controle (meio de cultivo LC Oligo na presença de células algais), concentrações de exposição (meio de cultivo LC Oligo com adição de NPs e células algais) e seus respectivos brancos (meio de cultivo LC Oligo na presença de NPs sem adição das células algais) e, ainda, para o branco com apenas o meio de cultivo LC Oligo (na ausência de NPs e células algais). As análises para determinação da concentração dos metais foram realizadas apenas para quatro concentrações nominais utilizadas para exposição das microalgas às NPs. Para NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> - as concentrações nominais adicionadas aos meios de cultivos LC Oligo foram 1,0; 5,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>. Para NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - as concentrações nominais adicionadas aos meios de cultivos LC Oligo foram 0,1; 1,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup> e para NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - as concentrações nominais adicionadas aos meios de cultivos LC Oligo foram 0,65; 5,0; 10,0; 100,0 mg L<sup>-1</sup>.

As análises foram realizadas em 20 mL filtrados dos meios de exposição em filtros de membrana de acetato de celulose de 0,2  $\mu\text{m}$  diâmetro de poro (Sartorius, Alemanha) previamente lavados em  $\text{HNO}_3$  1 mol  $\text{L}^{-1}$  durante 24 horas, enxaguados abundantemente com água ultra-pura e secos em estufa por 48 horas. Dessa forma, a fração particulada depositada nos filtros foi armazenada a  $-20^\circ\text{C}$  e a fração dissolvida armazenada em frascos de polipropileno a  $4^\circ\text{C}$  para posterior análise por Espectrometria de Absorção Atômica (AAS, Perkin Elmer, PinAACLE 900T, EUA).

As amostras foram submetidas à digestão ácida em frascos de Teflon<sup>®</sup> com tampa rosca. Também foi realizada a digestão do filtro puro (sem NP e algas como branco). A liberação dos íons presentes nas partículas foi realizada pela adição de  $\text{HNO}_3$  e  $\text{HCl}$  (3:1, água régia), sendo utilizados  $\text{HCl}$  37% concentrado (Qhemis) e  $\text{HNO}_3$  concentrado 69~70% (J.T. Baker). Após, a adição da água régia as amostras foram colocadas em estufa a  $60^\circ\text{C}$  por 24 horas para digestão completa das partículas e dos filtros (solução de digestão) (Lombardi et al, 2002). Em balões volumétricos foram adicionados 3 mL de água ultra-pura, 200  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) concentrado, solução de digestão e, depois, água ultra-pura até completar o volume final de 25 mL. A adição do  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi necessária para dissolver a matéria orgânica das amostras a fim de evitar danos ao espectrômetro utilizado nas análises.

Para as amostras da fração dissolvida foram adicionados  $\text{HNO}_3$  concentrado 69~70% (J.T. Baker). Tanto para a fração particulada quanto para a dissolvida a concentração final de  $\text{HNO}_3$  foi de 2%. Dessa forma, as amostras foram analisadas em Espectrômetro de Absorção Atômica (AAS, Perkin Elmer, PinAACLE 900T, EUA) no Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo (USP), São Carlos, SP.

Antes do início das leituras das amostras foram feitas curvas de calibração para cada metal, utilizando-se os padrões de 1 mg  $\text{L}^{-1}$  de ferro, cobre e cobalto para AAS

(Fluka® Analytical, Sigma-Aldrich). As razões molares Fe:Cu (Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) e Fe:Co (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) foram determinadas por AAS usando as soluções estoque originais das NPs. Dessa forma, somente o ferro foi determinado para as NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, sendo que as concentrações de cobre e cobalto foram estabelecidas a partir da razão Fe:Cu e Fe:Co obtidas nas análises por AAS das soluções originais das NPs.

A determinação da concentração dos metais (ferro, cobre e cobalto) particulados e dissolvidos nas amostras foi reportada em gramas por célula. A partir das curvas de calibração dos metais ferro, cobre e cobalto foi possível obter equações logísticas para a determinação da concentração dos metais particulados a partir dos valores de absorbância.

### *3.5 Curva de crescimento e ensaio de sensibilidade da microalga Raphidocelis subcapitata*

A curva de crescimento da espécie *Raphidocelis subcapitata* foi obtida nas mesmas condições dos cultivos-estoque em quatro réplicas. O aumento do número de células foi monitorado a cada 24 horas através de contagens em hemocitômetro (Improved Neubauer – Bright Line) sob microscópio óptico (Leica DMLS) durante 9 dias.

A sensibilidade dos cultivos de *R. subcapitata* foi monitorada anteriormente a cada ensaio definitivo. Para tal, o cloreto de sódio (NaCl) foi utilizado como substância de referência, tendo como critério de escolha o menor dano ao meio ambiente e à saúde humana (ABNT,2011). Foram utilizadas as seguintes concentrações de NaCl: 0 (controle); 0,5; 2,0; 3,5; 5,0 e 6,5 g L<sup>-1</sup> (equivalente a 0; 8,55x10<sup>-3</sup>; 3,42x10<sup>-2</sup>; 6,00x10<sup>-2</sup>; 8,50x 10<sup>-2</sup> e 1,11x 10<sup>-1</sup> mol L<sup>-1</sup>, respectivamente). O ensaio de sensibilidade foi realizado em tréplica com duração de 96 horas e sob as mesmas condições dos cultivos estoque.

Nos ensaios de sensibilidade e ensaios toxicológicos (preliminares e definitivos) a determinação da densidade celular algal ( $\text{cel mL}^{-1}$ ) foi efetuada em um citômetro fluxo (Gazol, 1999; Stauber 2002, Sarmento et al., 2008, Peniuk et al., 2016). Para estas determinações, a cada 24 horas, alíquotas de 1,8 mL das culturas algais foram fixadas em solução de formol 10% (concentração final de 1%) por 10 min no escuro, congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise através de citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) equipado com laser de íon-argônio azul de 15 mW com excitação no comprimento de onda de 488 nm. Antes da leitura, foram adicionados à amostra 10  $\mu\text{L}$  de padrão interno constituído de esferas fluorescentes de 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Fluoresbrite carboxylate microspheres; Polysciences, Warrington, Pensilvânia, EUA). As amostras foram lidas em alta velocidade (aproximadamente  $60 \mu\text{L min}^{-1}$ ) com a contagem de cerca de 10.000 eventos (número de células algais). Através do parâmetro SSC-H  $90^{\circ}$  (dispersão lateral, com intensidade de luz de 488 nm dispersa em ângulos retos) versus a intensidade de fluorescência detectada no canal FL3-H (fluorescência vermelha que detecta a clorofila) foi possível contar a microalga *R. subcapitata* (seguindo o mesmo procedimento descrito por Sarmento et al., 2008). Para a aquisição dos dados foi utilizado o software CellQuest Pro BD. Para tratamento dos dados foi utilizado o software FlowJo V10.0 (Treestar.com, EUA) (Figura1).

Para os testes de sensibilidade os valores de IC50 (concentração inibitória média - inibição de 50% do crescimento das células algais (ABNT, 2011) em 96 horas de exposição foram determinados através do programa computacional ICp (Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: The Inhibition Concentration versão 2.0, ano 1993).

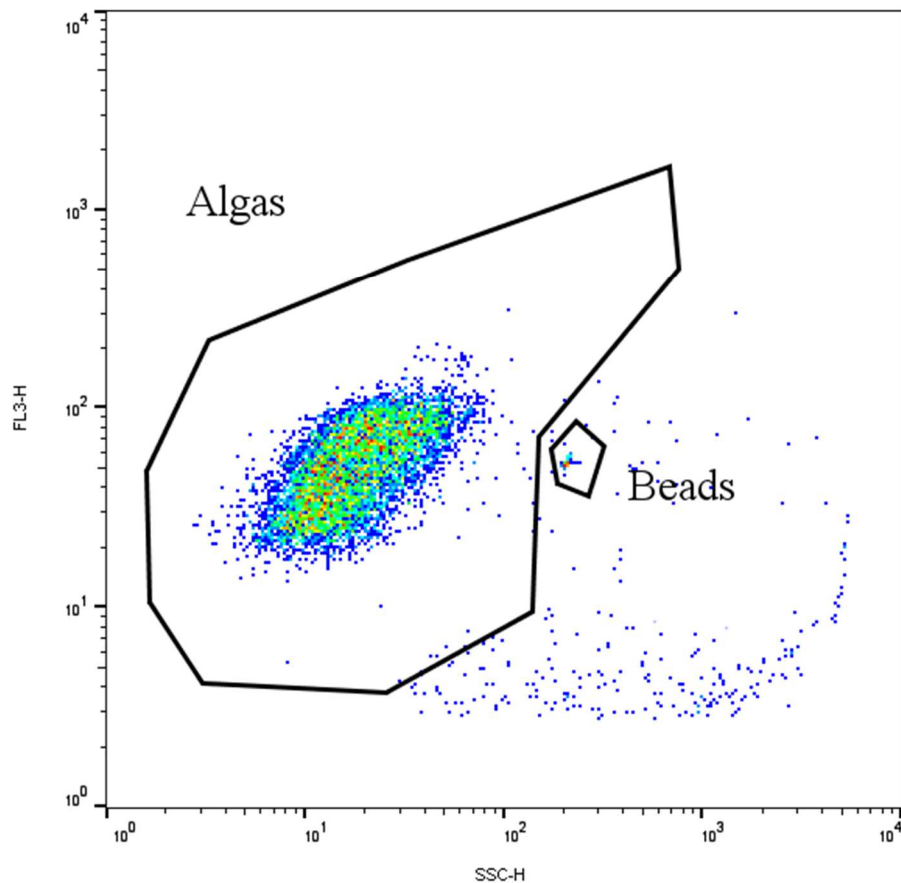


Figura 1. Fluorescência de *Raphidocelis subcapitata* obtida por meio de citometria de fluxo. Através do parâmetro SSC-H 90° (dispersão lateral) versus a intensidade de fluorescência detectada no canal FL3-H (fluorescência vermelha) foi possível identificar as células algais. Onde: *beads* é o padrão interno (esferas fluorescentes de 6 µm).

### 3.6 Exposição da microalga *Raphidocelis subcapitata* às nanopartículas magnéticas

Microalgas em fase exponencial de crescimento foram expostas durante 96 horas às seguintes concentrações nominais de nanopartículas de magnetita (NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): 0 (controle); 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup> (0; 4,32x10<sup>-6</sup>; 2,16x10<sup>-5</sup>; 4,32x10<sup>-5</sup>; 8,60x10<sup>-5</sup>; 2,16x10<sup>-4</sup> e 4,32x10<sup>-4</sup> mol L<sup>-1</sup>, respectivamente). Para as NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - as concentrações utilizadas foram: 0 (controle); 0,1; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 mg L<sup>-1</sup> (0;

$4,18 \times 10^{-7}$ ;  $4,18 \times 10^{-6}$ ;  $2,09 \times 10^{-5}$ ;  $4,18 \times 10^{-5}$ ;  $8,36 \times 10^{-5}$  e  $2,09 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente). Já para as NPs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  - as concentrações utilizadas foram 0 (controle); 0,65; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0  $\text{mg L}^{-1}$  ( $0$ ;  $2,77 \times 10^{-6}$ ;  $8,52 \times 10^{-6}$ ;  $2,13 \times 10^{-5}$ ;  $4,26 \times 10^{-5}$ ;  $8,52 \times 10^{-5}$  e  $2,13 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ , respectivamente). Tais concentrações foram estabelecidas a partir de ensaios preliminares que avaliaram a inibição do crescimento celular a partir de concentrações crescentes das nanopartículas. Os limites testados nos ensaios preliminares com as NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  foram de  $0,01 \text{ mg L}^{-1}$  a  $200,0 \text{ mg L}^{-1}$  ( $4,18 \times 10^{-8}$  a  $8,52 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ), com as NPs  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  foram de  $0,001$  a  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$  ( $4,26 \times 10^{-9}$  a  $2,09 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ) e, com as NPs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  os limites foram de  $0,01$  a  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  ( $1,0 \times 10^{-8}$  a  $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ ).

Os ensaios toxicológicos definitivos foram feitos com quatro réplicas e um branco (meio de cultivo e nanopartícula na ausência de algas) para cada concentração por um período de 96 horas. O controle consistiu em meio de cultivo sem adição de NP. Os ensaios, assim como os cultivos-estoque, foram preparados em meio LC Oligo e água ultra-pura, sendo em seguida, esterilizados em autoclave ( $121^\circ\text{C}$  por 20 min). Foram utilizados Erlenmeyers de policarbonato de 500 mL de capacidade com 250 mL de meio cultivo. Após 24 horas, o meio foi inoculado (inóculos obtidos das pré-culturas) com  $5 \times 10^4 \text{ cel mL}^{-1}$  de *R. subcapitata* em fase exponencial de crescimento em cabine de fluxo laminar. Os ensaios foram realizados sob condições controladas com intensidade luminosa de  $130 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro), temperatura de  $24 \pm 1^\circ\text{C}$  e pH 7,0.

Após 96 horas de exposição, alíquotas de 1,8 mL foram retiradas para a determinação da densidade celular através do citômetro de fluxo. Para tal, foram utilizados os mesmos procedimentos mencionados nos ensaios de sensibilidade.



Os materiais utilizados nos ensaios toxicológicos foram lavados com detergente neutro e, depois de secos, foram depositados em recipientes com solução de HCl 10% (ácido clorídrico) por um período de 5 a 7 dias. Em seguida, foram enxaguados abundantemente em água da torneira e em água destilada (ABNT, 2011).

Soluções estoque das NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> foram dispersas em sonicador de banho por 15 min a 40 KHz para o preparo das soluções de exposição. Estas também foram sonicadas por 15 min antes de serem adicionadas ao meio de cultivo. A solução estoque da NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> foi dispersa através de sonicador de ponta UNIQUE (Unique Group, Indaiatuba, Brasil) por 20 min fixado em potência de 20%, pois a mesma não foi fornecida em meio aquoso. Todas as soluções de trabalho foram preparadas em água ultra-pura autoclavada (121°C por 20 min).

### 3.7 Biomassa (clorofila *a*) e Taxa de Crescimento

Para a determinação da concentração de clorofila *a*, análises da intensidade de fluorescência de *R. subcapitata* foram realizadas através de Fluorimetria (Fluorímetro Turner Designs-Trilogy, EUA). Para isso, foram coletados 3 mL de cada amostra das microalgas expostas às nanopartículas por 0 e 96 h. O branco para o controle apresentava apenas meio LC Oligo. Para os tratamentos, o branco consistiu em meio LC Oligo e nanopartículas nas concentrações correspondentes de exposição.

As intensidades da fluorescência obtidas por fluorimetria foram utilizadas para o cálculo final da concentração de clorofila *a* (*in vivo*) da alga *R. subcapitata*. Para isso utilizou-se uma curva de calibração que relaciona a intensidade da fluorescência *in vivo* (variável dependente) e a concentração de clorofila *a* extraída com dimetilsulfóxido

(variável independente) para uma espécie de microalga de referência (*Chlorella sorokiniana*).

A Taxa de Crescimento foi determinada de acordo com a equação logística abaixo partir dos valores de densidade celular ( $\text{cel mL}^{-1}$ ), estabelecidos por citômetro de fluxo, e obtidos em 0 e 96 horas (OECD, 2002):

$$\mu_{i-j} = \frac{\text{Ln}B_j - \text{Ln}B_i}{t_j - t_i} \quad \text{d}^{-1}$$

Onde:  $\mu_{i-j}$  é a taxa de crescimento do momento  $i$  a  $j$ ;  $t_i$  e  $t_j$  são o tempo inicial e final do teste (0 e 96 h), respectivamente.  $B_i$  e  $B_j$  são a biomassa inicial e final ( $\text{cel/mL}$ ) no tempo  $i$  e  $j$ , respectivamente.

### *3.8 Conteúdo de proteínas, carboidratos, lipídeos totais e classes lipídicas*

Após 96 horas de exposição às nanopartículas magnéticas, amostras dos meios algais e dos brancos (10 mL) foram centrifugados a 1500 rpm por 15 min para as análises de proteínas e carboidratos. Para as análises lipídicas foram filtrados 100 mL de cultura algal em filtros de fibra de vidro de  $0,45 \mu\text{m}$  de poro previamente calcinados através de compressor filtrador (bomba à vácuo).

A quantificação do conteúdo de proteínas foi realizada de acordo com Bradford (1976) e a extração segundo Rausch (1981), tendo sido utilizado como padrão a Albumina Sérica Bovina (BSA). A determinação do conteúdo de carboidratos totais foi realizada

segundo Liu et al. (1973), utilizando-se glicose como padrão. As leituras das amostras de proteína e de carboidrato foram feitas em espectrofotômetro (HACH DR 5000, EUA) a 595 nm e 485 nm, respectivamente.

A extração de lipídeos foi realizada utilizando-se o método Folch et al. (1957) e modificado por Parrish (1999), com o uso de clorofórmio/metanol/água (2:1:0,5). Água ultra-pura foi utilizada com adição de clorofórmio, sendo este removido com o auxílio de um funil de separação. As amostras das células algais filtradas foram maceradas, sonicadas em sonificador de ponta em potência máxima de 99% (Unique Group, Indaiatuba, Brasil) durante 5 min, centrifugadas a 4400 rpm durante 5 min. Cada amostra foi submetida ao procedimento de extração por três vezes, sendo que na segunda e na terceira extrações, utilizou-se apenas 2 mL de clorofórmio, pois há o risco de ocorrer metilação (ligação ou substituição de um grupo metila sobre os substratos) caso o metanol seja adicionado nessa etapa. Anteriormente à realização das análises lipídicas, as amostras foram concentradas em rotaevaporador até aproximadamente 700 µL e transferidas para tubos de cromatografia. Nessa etapa, as amostras foram concentradas para 500 µL com o uso de nitrogênio gasoso ultrapuro.

Os materiais utilizados foram previamente lavados com detergente neutro, enxaguados em água da torneira e em água ultra-pura. Em seguida, os materiais resistentes ao calor foram calcinados em forno mufla a 400°C por 4 a 8 horas. Antes das análises todos os materiais utilizados foram lavados com metanol e clorofórmio por três vezes.

Para a identificação das classes lipídicas, 30 µL de cada amostra extraída foram adicionados à capilares de sílica (Chromarods-SIII). Posteriormente, os capilares foram focalizados em acetona 100%. A separação cromatográfica das classes lipídicas foi realizada em três etapas em diferentes sistemas de solventes (Parrish, 1987).

A determinação da composição lipídica foi realizada por cromatografia de camada delgada com detecção por ionização em chama através do equipamento Iatroscan™ Mark VI TLC - FID (Iatron Laboratories, Inc., Tóquio, Japão) nas seguintes condições analíticas: fluxo de hidrogênio de 174 mL min<sup>-1</sup>, fluxo de ar 2 L min<sup>-1</sup> e velocidade de leitura de 4 mm s<sup>-1</sup>.

Para quantificação e identificação das classes lipídicas HC (hidrocarboneto alifático), SE/WE (estéril éster/ésteres de cera), KET (cetona), TAG (triacilglicerol), FFA (ácido graxo livre), ALC (álcool alifático livre); ST (esterol); AMPL (lipídeos polares móveis em acetona) e PL (fosfolipídios), estas foram comparadas a posição e área dos picos dos seguintes padrões lipídicos, respectivamente: n-nonadecano, colesterol palmitato, n-hexadecano 3-ona, gliceril tripalmitato, ácido palmítico, 1-hexanodecanol, colesterol, 1-monopalmitoil-rac-glicerol e 1,2-di-O-hexadecil-sn-glicerol-3-fosfatidilcolina. Todos os padrões lipídicos foram adquiridos da Sigma-Aldrich. A composição das classes lipídicas foi feita de acordo com as áreas dos picos registrados pelo software PeakSimple versão 4.44 (SRI Instruments, Menlo Park, Califórnia, EUA).

### *3.9 Análises Estatísticas*

Os resultados foram testados para normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade da variância (Teste de Levene). Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância one-way ANOVA e Teste de Tukey para comparação entre as médias do controle em relação aos tratamentos, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) em todas as análises.

## 4. Resultados

### 4.1 Curva de crescimento e ensaio de sensibilidade da microalga *Raphidocelis subcapitata*

De acordo com a curva de crescimento, a fase exponencial do crescimento da microalga *R. subcapitata* foi observada entre o 1º e 3º (Figura 2). A taxa de crescimento diário, calculada através da mesma equação logística apresentada para o cálculo da taxa de crescimento, foi igual a 1,01 entre o 1º e 2º dia e foi de 1,25 entre o 2º e 3º dia. Entre o 3º e 4º dia, essa taxa diminuiu para 0,56 e entre o 4º e 5º dia para 0,40.

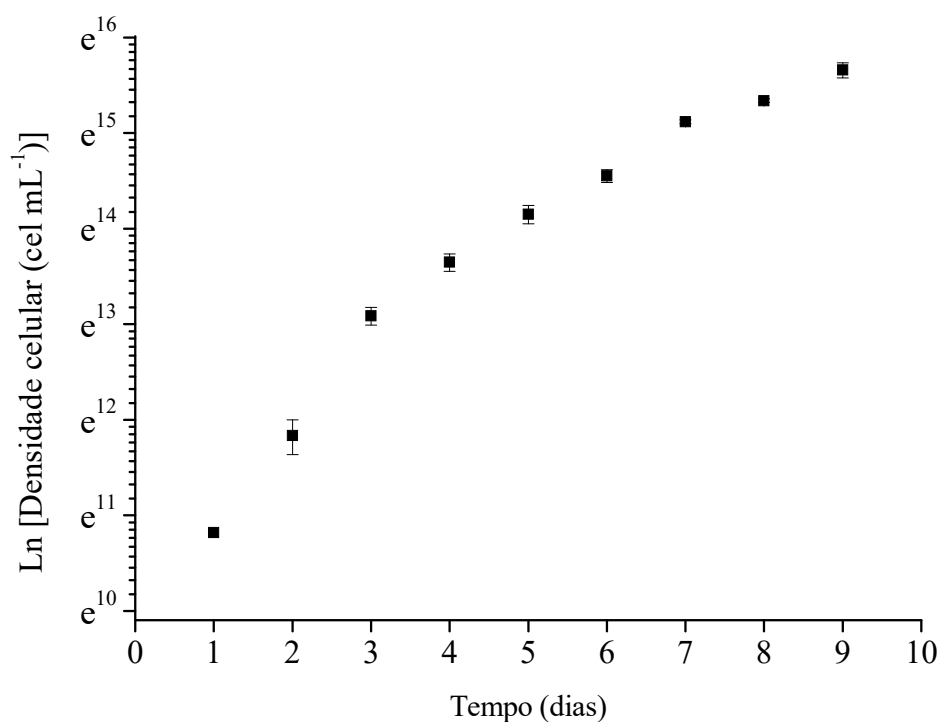


Figura 2. Curva de crescimento de *Raphidocelis subcapitata* em meio LC Oligo. A densidade celular é expressa pelo logaritmo natural (Ln) das concentrações (células mL<sup>-1</sup>) a cada 24 horas durante 9 dias. Médias ± Desvio Padrão de n=4.

Nos testes de sensibilidade da microalga *R.subcapitata* ao NaCl (substância de referência) obteve-se valor médio de  $IC_{50-96\text{ h}} = 3,79\text{ g L}^{-1}$ . Esse resultado é próximo ao encontrado por Casali-Perreira (2013) com valor médio de  $IC_{50-96\text{ h}} = 3,5\text{ g L}^{-1}$  e encontra-se dentro da faixa estabelecida para essa espécie.

## 4.2 Caracterização das nanopartículas

As imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para a nanopartícula de magnetita (NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) registradas em diferentes aumentos (Figura 3) mostram a homogeneidade da amostra e o caráter facetado das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  com diâmetro médio ao redor de 20 nm.

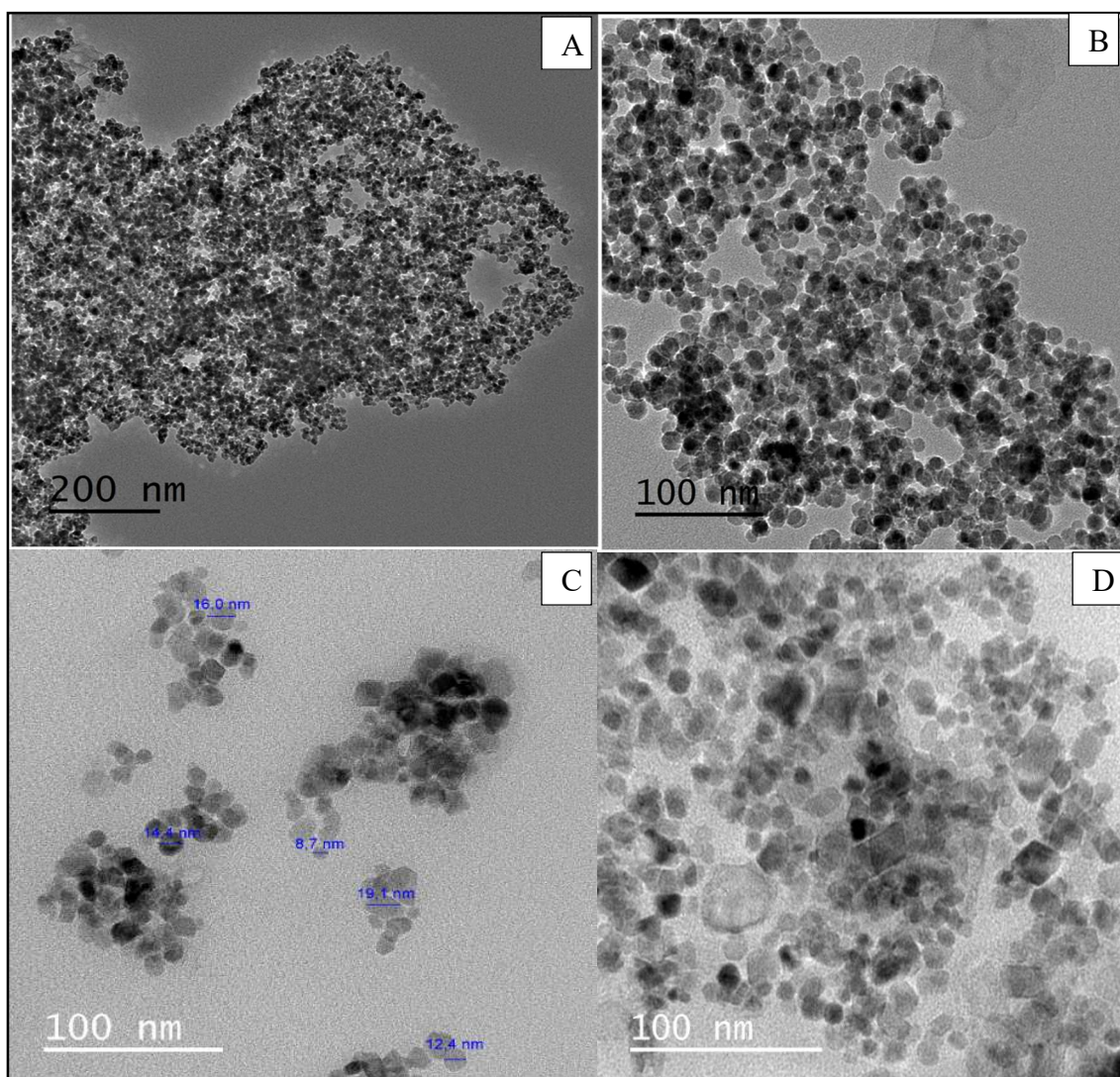


Figura 3. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de magnetita (NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) (A, B, C e D) com diâmetro médio ao redor de 20 nm.

Fase cristalográfica das amostras das NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  analisadas por difratometria de raios X (DRX) (Figura 4). De acordo com o padrão de difração (JCP DS), as reflexões (picos) da fase magnética de óxido de ferro encontram-se dispostas nas mesmas posições, e o alargamento dessas reflexões são característicos das NPs de magnetita. Além disso, o posicionamento de reflexões em  $2\theta$  indica que somente  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  está presente na amostra.

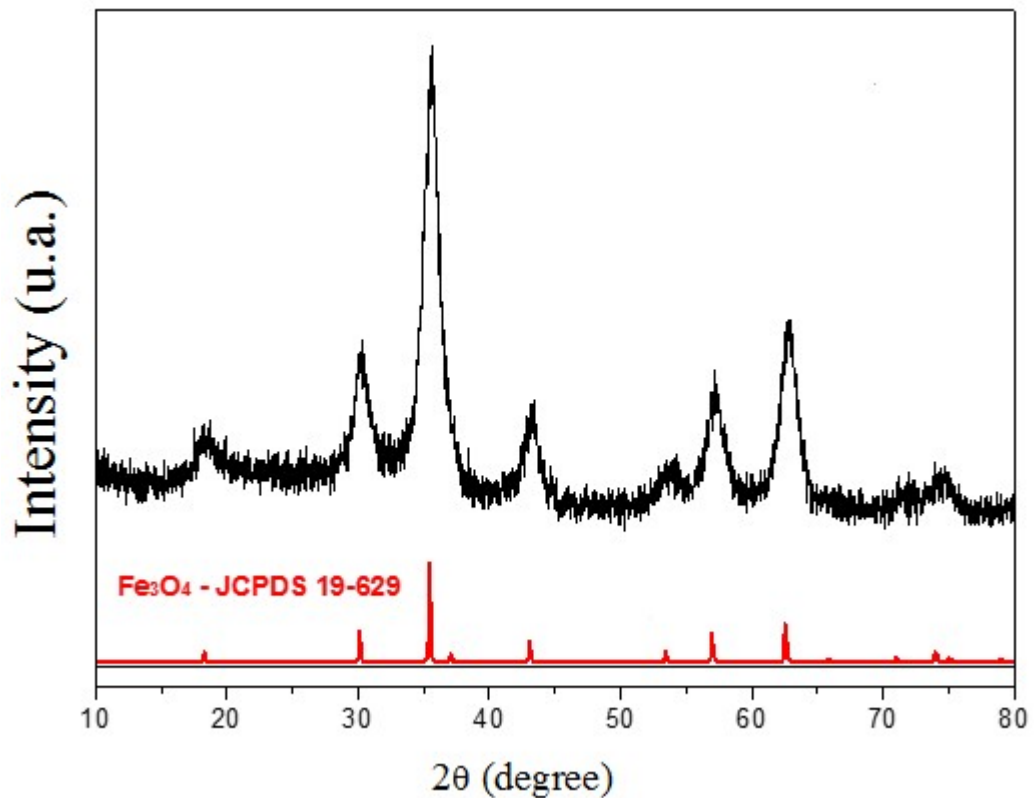


Figura 4. Difratometria de raios X da nanopartícula de magnetita (NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ). Abaixo, encontram-se os padrões de difração (JCPDS).



Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para a nanopartícula de hematita com íons cobre adsorvidos (NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) (Figura 5) fotografadas em diferentes aumentos. As imagens mostram a homogeneidade da amostra e o caráter facetado dessas NPs com diâmetro médio ao redor de 80 nm.

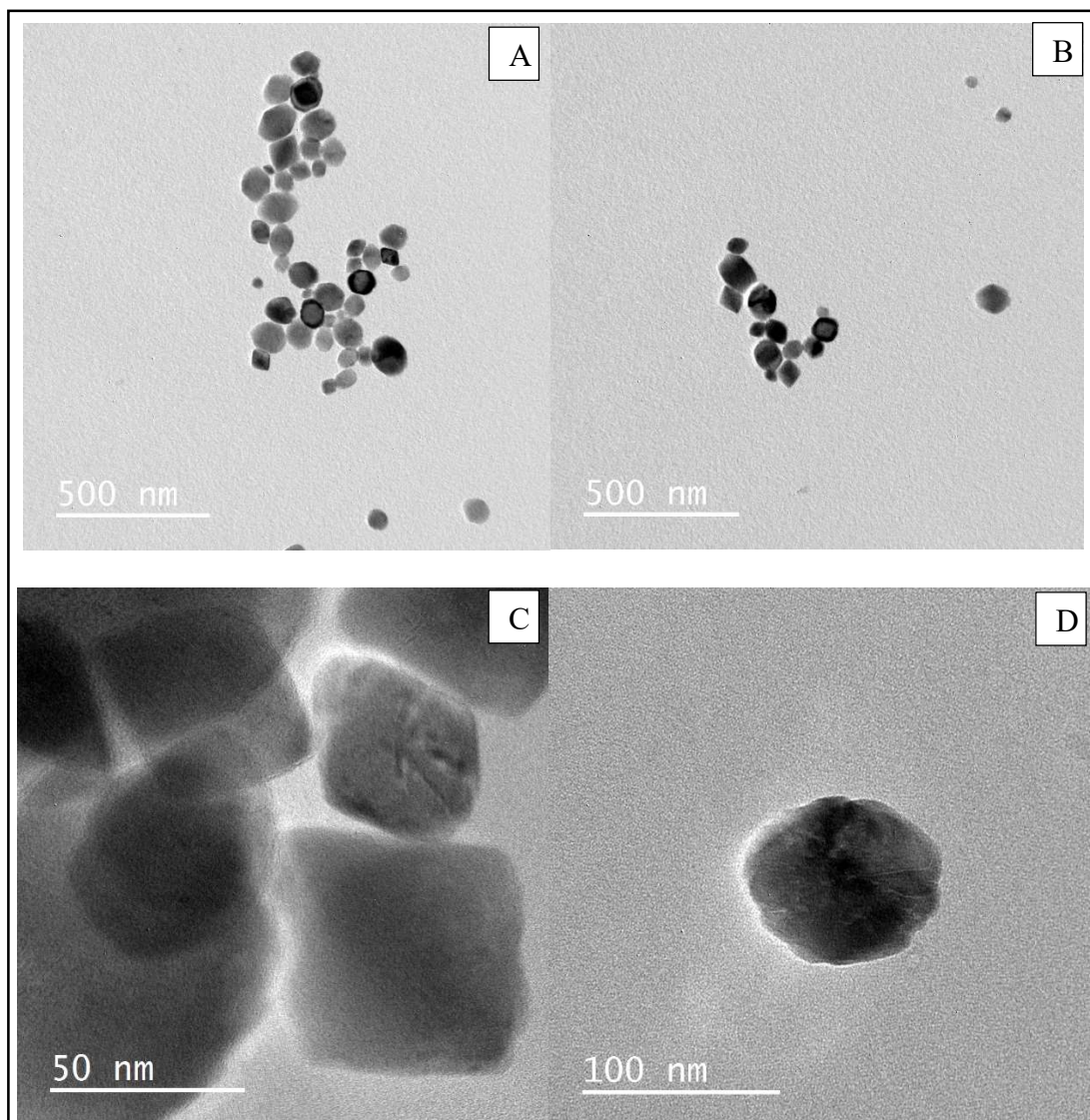


Figura 5. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) das nanopartículas de hematita com íons cobre adsorvidos (NP Cu- Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) (A, B, C e D) com diâmetro médio ao redor de 80 nm.

Fase cristalográfica das amostras das NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> analisadas por difratometria de raios X (DRX) (Figura 6). De acordo com o padrão de difração (JCP DS) essa amostra não apresentou a fase espinélio inverso da ferrita de cobre (CuFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), mas a fase de

hematita de óxido de ferro ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). As análises de Espectrometria de Absorção Atômica (AAS) mostraram uma pequena quantidade de íons cobre nas amostras, 0,064Cu:2,94Fe molar ( $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ ), o esperado era uma proporção 1Cu:2Fe molar ( $\text{CuFe}_2\text{O}_4$ ). Assim, a NP  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  é uma hematita com íons cobre adsorvidos em sua superfície. Os íons cobre adsorvidos não podem ser identificados como fase cristalina e, portanto, o DRX apresenta apenas a fase de hematita.

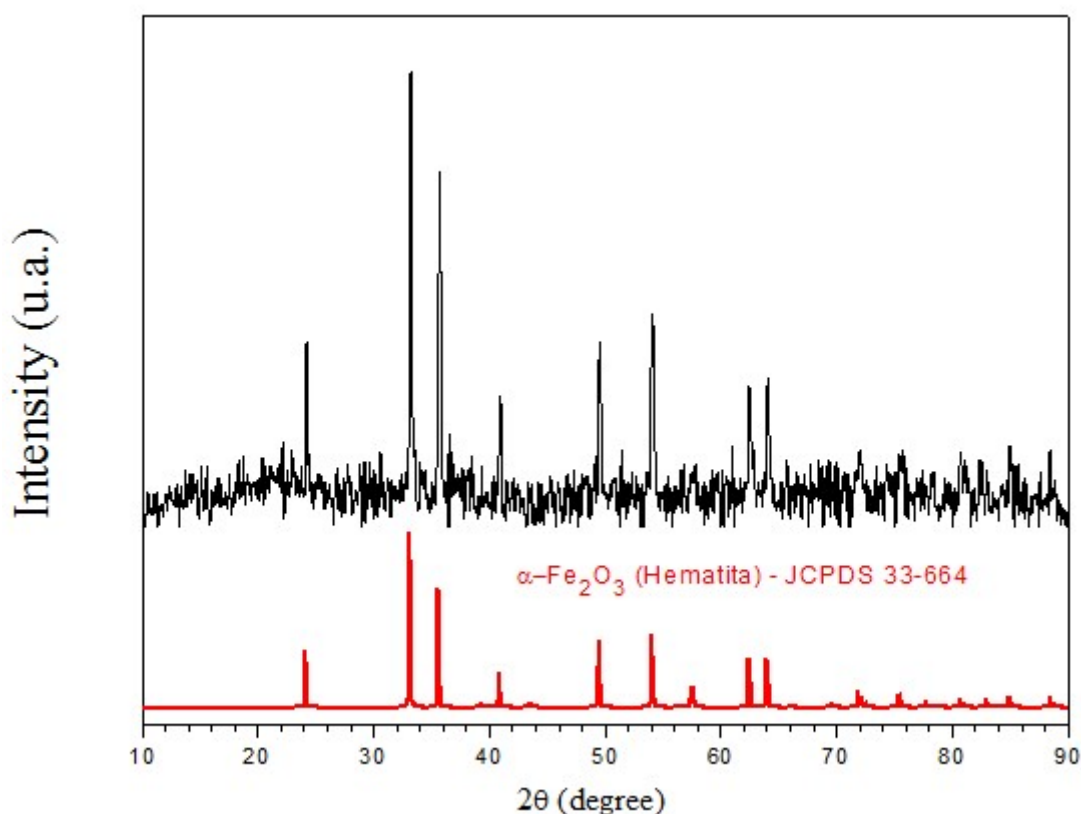


Figura 6. Difratometria de raios X da nanopartícula de hematita (NP  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ). Abaixo, encontram-se os padrões de difração (JCPDS).

A determinação de cobre nas NPs  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  por energia dispersiva de raios X (Energy Dispersive Spectroscopy, EDS) é evidenciada na Figura 7. Observa-se dois espectros: o primeiro (Figura 7b) é constituído de uma área de carbono amorfo sem nanopartículas (apenas com o filme de carbono e Formvar, polímero usado na MET) nessa área pôde-se obter uma contagem de 185 para a energia do cobre 8,048 KeV (o porta amostra contém cobre) e, o segundo (Figura 7c) espectro refere-se a área com as

NPs, com contagem de energia de 872 para o cobre 8,048 KeV. Os valores teóricos para identificar os valores de emissão (em KeV), característicos de cada elemento, foram obtidos em Grieken e Markowicz (2001).

Como a área do feixe de elétrons foi a mesma, o tempo de coleta dos dados também foi constante para ambas as áreas da amostra (30 s), e todos os outros dados para coleta dos espectro foram mantidos constantes, pode-se afirmar que há cobre nas NPs observadas na amostra. Na área amorfa da grade de microscopia pôde-se observar também a ausência, como esperado, do sinal do ferro (6,404 KeV). A presença de silício está relacionada ao detector do EDS, que é de constituído de silício.

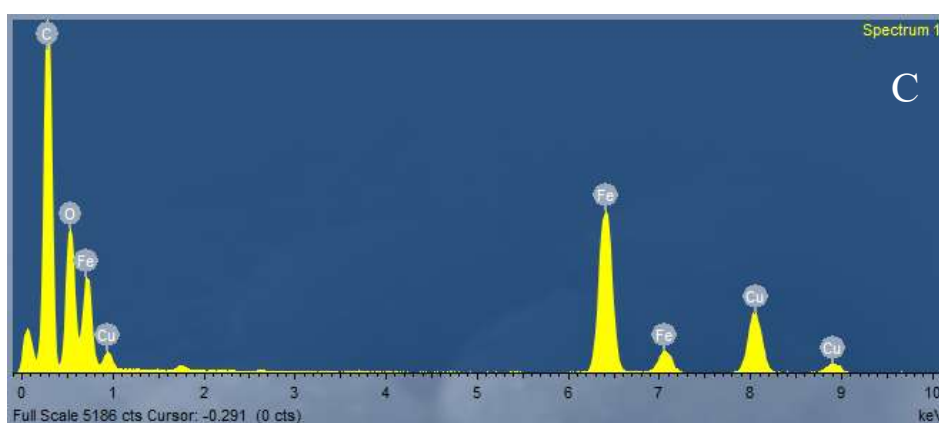
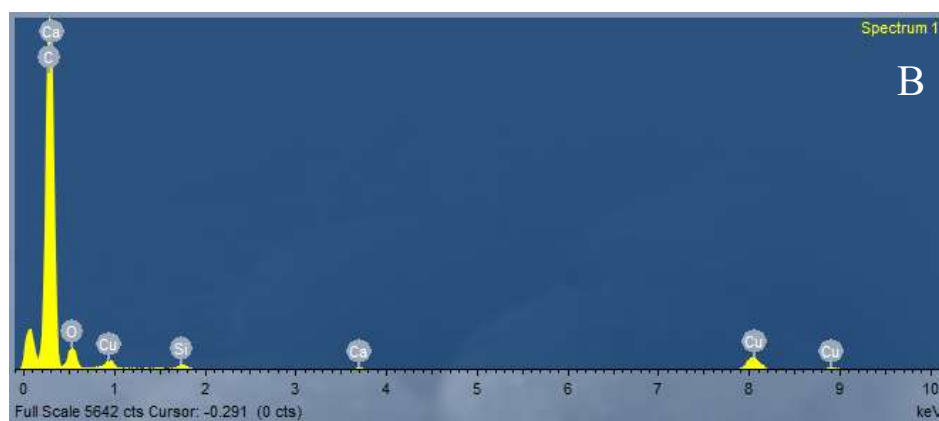
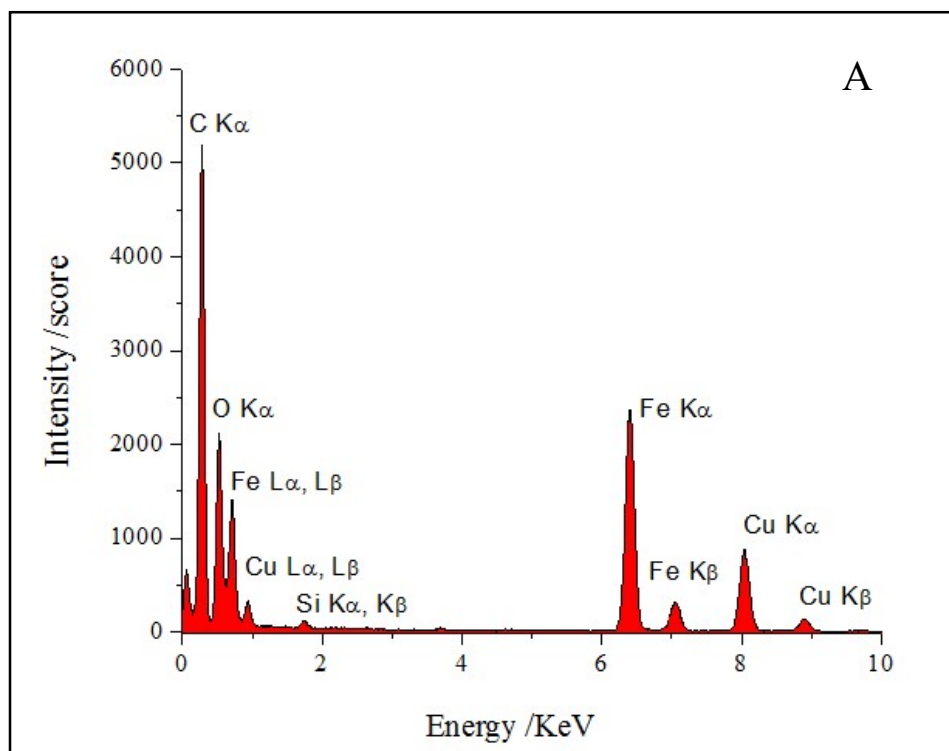


Figura 7. Energia dispersiva de raios X (Energy Dispersive Spectroscopy, EDS) para as NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. A. NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e padrão amorfo. B. padrão amorfo. C. NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) para a nanopartícula de ferrita de cobalto (NP  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) (Figura 8) registradas em diferentes aumentos. As imagens mostram a homogeneidade da amostra com diâmetro médio ao redor 20 nm.

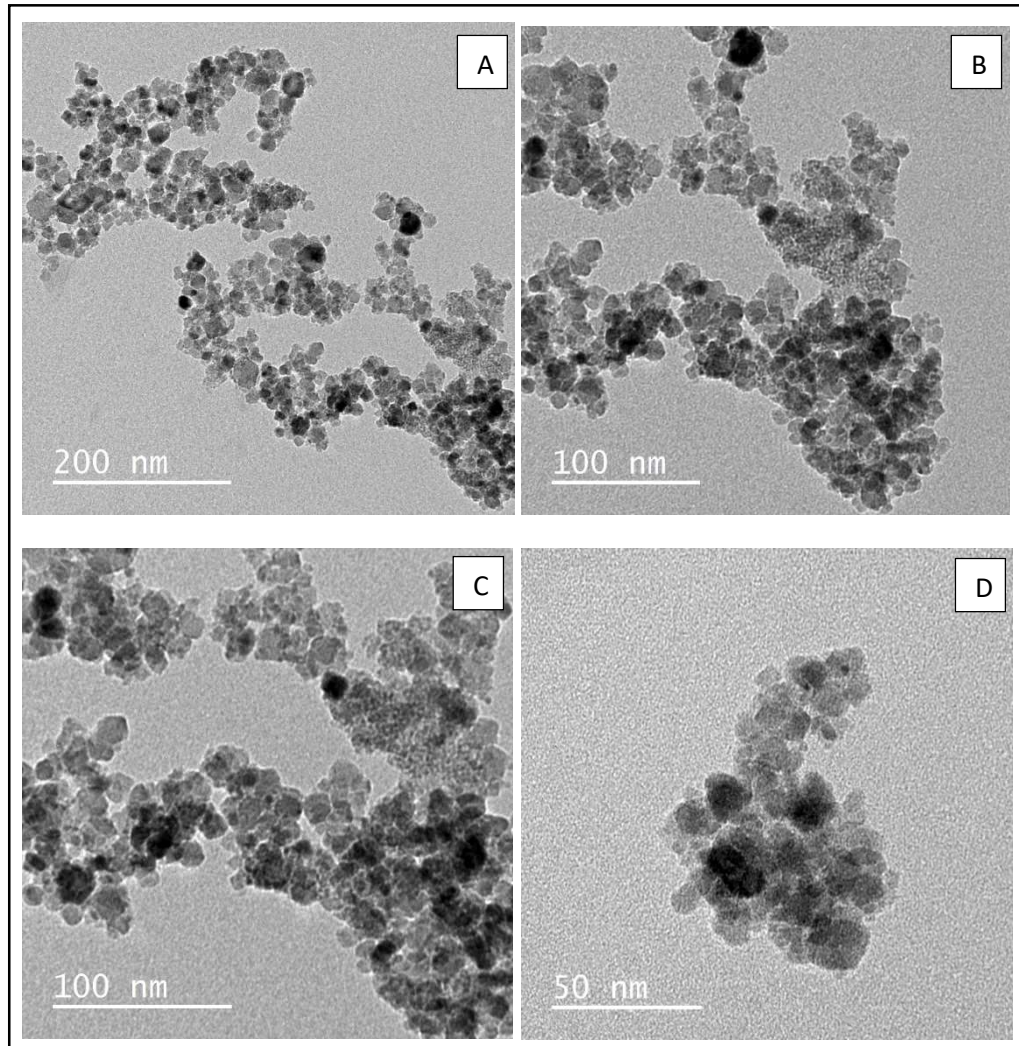


Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão das nanopartículas de ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) (A, B, C, D) com diâmetro médio ao redor de 20 nm.

A fase cristalográfica das amostras das nanopartículas de ferrita de cobalto analisadas por difratometria de raios X (DRX) está representada na figura 9. De acordo com o padrão de difração (JCP DS), as reflexões da fase magnética da ferrita de cobalto encontram-se dispostas nas mesmas posições, e o alargamento está dentro do padrão para as NPs de ferrita de cobalto. O posicionamento de reflexões em  $2\theta$  indica que somente essa NP está presente na amostra.

A proporção ferro:cobalto presente na nanopartícula de ferrita de cobalto analisada por Espectrometria de absorção atômica (AAS) foi de 1,13Co:1,87Fe molar ( $\text{Co}_{1,13}\text{Fe}_{1,87}\text{O}_4$ ). Assim a quantidade de cobalto e de ferro foram adequadas, uma vez que a proporção é próxima a 1Co:2Fe molar ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ).

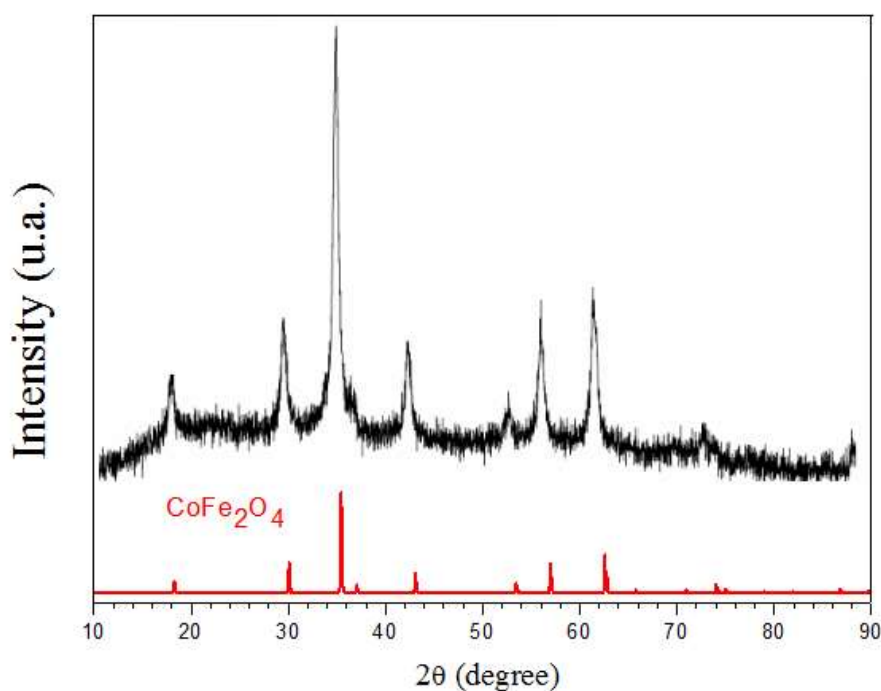


Figura 9. Difratometria de raios X da nanopartícula de ferrita de cobalto (NP  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ). Abaixo, encontram-se os padrões de difração (JCPDS).

A caracterização das nanopartículas magnéticas obtidas nos meios de exposição das microalgas estão apresentadas na Tabela 1. O tamanho médio das nanopartículas em 0 h ficou abaixo de 600 nm de diâmetro indicando que o procedimento de sonicação adotado foi eficiente para dispersão. O índice de polidispersividade (PDI) em 0 h ficou abaixo de 0.500 para as NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e NPs  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  indicando boa dispersividade (homogeneidade) nas soluções de exposição. Apenas as NPs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  não apresentaram boa dispersão no meio (PDI > 0.500). Valores elevados de PDI sugerem uma ampla distribuição de tamanho (Gaumet et al., 2008). Após 96 h de exposição o tamanho das três nanopartículas estudadas foi maior, indicando que houve agregação/aglomeração nos meios durante a exposição. Os valores de PDI também aumentaram após 96 h confirmando a agregação/aglomeração das nanopartículas.

A Tabela 1 mostra que para a NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  os valores do Potencial Zeta ( $\zeta$ ) em 0 hora são todos negativos ( $\geq -25\text{mV}$ ) e indicam a alta estabilidade dessas partículas no início do experimento. Em 96 horas os valores do  $\zeta$  são inferiores a  $-30\text{ mV}$  (apenas em  $100\text{ mg/L}$   $\zeta$  foi  $-27,2\text{ mV}$ ). Esses valores mostram que essas NPs tornaram-se fortemente aniônicas ao longo do período experimental

Na NP  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  os valores do  $\zeta$  em 0 hora foram próximos a  $-25\text{ mV}$  apenas para a maior concentração analisada, sendo que nos demais os valores ficaram próximos a  $-27\text{mV}$ . Em 96 horas os valores do  $\zeta$  ficaram entre  $-27$  a  $-25,8\text{ mV}$ . Esses resultados indicam que essas NPs ficaram estáveis ao longo de todo teste (Tab. 1).

Para a NP  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  os valores do  $\zeta$  em 0 hora foram próximos a  $-25\text{ mV}$  e em 96 horas os valores foram inferiores a  $-29,5\text{ mV}$ . Esses resultados indicam maior estabilidade das NPs em 0 hora, sendo que essas partículas mostraram-se fortemente aniônicas ao longo do testes (Tab. 1).

Tabela 1. Tamanho hidrodinâmico médio (THM = d.nm), Índice de Polidispersividade (PDI) e Potencial Zeta( $\zeta$ ) (mV) das nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (CN = concentração nominal em mg L<sup>-1</sup>) em 0 e 96 horas de exposição da microalga *Raphidocelis subcapitata*.

CN	0 hora			96 horas		
	THM	PDI	$\zeta$	THM	PDI	$\zeta$
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>						
1,0	257,3±4,6	0,32±0,01	-25,3	542,55±87,4	0,580±0,1	-34,6
5,0	304,6±21,7	0,338±0,09	-21,7	649,7±28,0	0,499±0,05	-30,5
50,0	301,7±17,8	0,237±0,01	-25,0	550,4±0,64	0,253±0,06	-32,6
100,0	316,3±20,9	0,284±0,02	-24,0	478,2±115,0	0,293±0,08	-27,2
<b>Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>						
0,001	990,3±303,5	0,98±0,03	-27,0	448,8±87,2	0,700±0,11	-27,0
5,0	203,2±5,6	0,241±0,02	-27,2	766,7±111,0	0,880±0,12	-25,8
50,0	191,03±4,1	0,196±0,02	-25,7	315,9±14,0	0,380±0,015	-26,0
<b>CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>						
0,65	524,3±89,0	0,707±0,05	-24,7	3716±162,63	0,912±0,15	-32,4
10,0	575,1±69,4	0,803±0,04	-26,3	1588,5±140,0	1,000 ±0,00	-32,3
100,0	366,43±6,72	0,405±0,07	-25	1032,7±173,0	0,970±0,03	-29,5

#### 4.3 Análise dos metais

A tabela 2 apresenta fração de metais particulados obtidos no início (0 hora) e final (96 horas) do período experimental. Para todas as nanopartículas a quantidade de íons livres diminuiu consideravelmente após 96 horas.



Tabela 2. Fração particulada de íons ferro, cobre e cobalto das NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> em *Raphidocelis subcapitata*.

Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> NP	0 h		96 h	
CN (mg L <sup>-1</sup> )	Fe (mg cel <sup>-1</sup> )		Fe (mg cel <sup>-1</sup> )	
0	< DL		< DL	
1,0	1,17 x 10 <sup>-8</sup>		< DL	
5,0	7,36 x 10 <sup>-8</sup>		2,14 x 10 <sup>-9</sup>	
100,0	2,44 x 10 <sup>-7</sup>		2,81 x 10 <sup>-8</sup>	

Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0 h		96 h	
NC (mg L <sup>-1</sup> )	Fe (mg cel <sup>-1</sup> )	Cu (mg cel <sup>-1</sup> )	Fe (mg cell <sup>-1</sup> )	Cu (mg cel <sup>-1</sup> )
0	< DL	< DL	< DL	< DL
0,1	< DL	< DL	< DL	< DL
1,0	1,39 x 10 <sup>-8</sup>	8,90 x 10 <sup>-10</sup>	4,54 x 10 <sup>-9</sup>	2,90 x 10 <sup>-10</sup>
50,0	2,14 x 10 <sup>-7</sup>	1,36 x 10 <sup>-8</sup>	5,35 x 10 <sup>-8</sup>	3,41 x 10 <sup>-9</sup>

CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>	0 h		96 h	
NC (mg L <sup>-1</sup> )	Fe (mg cel <sup>-1</sup> )	Co (mg cel <sup>-1</sup> )	Fe (mg cell <sup>-1</sup> )	Co (mg cel <sup>-1</sup> )
0	< DL	< DL	< DL	< DL
0,65	2,53 x 10 <sup>-9</sup>	9,49 x 10 <sup>-10</sup>	< DL	< DL
5,0	4,89 x 10 <sup>-8</sup>	1,84 x 10 <sup>-8</sup>	6,65 x 10 <sup>-9</sup>	2,50 x 10 <sup>-9</sup>
10,0	8,90 x 10 <sup>-8</sup>	3,35 x 10 <sup>-8</sup>	1,88 x 10 <sup>-8</sup>	7,04 x 10 <sup>-8</sup>
100,0	2,23 x 10 <sup>-7</sup>	8,37 x 10 <sup>-8</sup>	1,10 x 10 <sup>-7</sup>	4,43 x 10 <sup>-7</sup>

Onde: < LD indica abaixo do limite de detecção. LD = 0,005 mg L<sup>-1</sup> Fe; LD = 0,0015 mg L<sup>-1</sup> Cu; DL = 0,009 mg L<sup>-1</sup> Co

Em relação às análises dos metais dissolvidos todos os dados obtidos ficaram abaixo do limite de detecção do AAS utilizado. Assim, a quantidade de íons ferro livre é inferior a 0,005 mg L<sup>-1</sup>, de íons cobre livre é inferior a 0,0015 mg L<sup>-1</sup> de íons de cobalto livre é inferior a 0,009 mg L<sup>-1</sup> em todas as amostras filtradas (dissolvidas).

#### 4.4 Exposição da microalga *Raphidocelis subcapitata* às nanopartículas magnéticas

A Figura 10 mostra imagens em microscopia óptica de *Raphidocelis subcapitata* expostas às nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , sendo possível observar a formação de aglomerados de NPs.

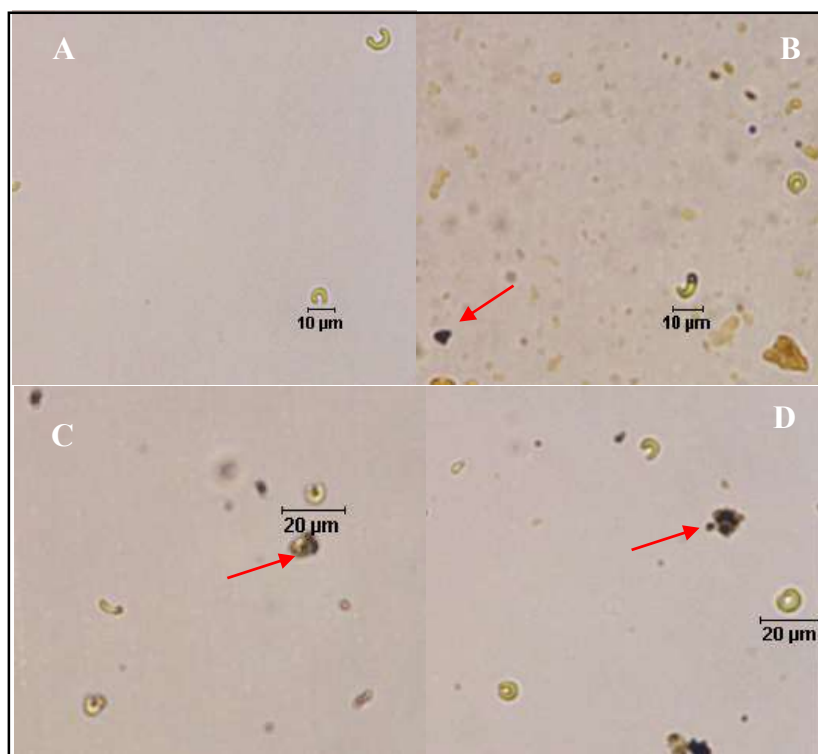


Fig 10. Fotomicrografias de *Raphidocelis subcapitata* (aumento 400x) com 96 horas de exposição às nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ . (A) controle; (B) alga com NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ); (C) alga com NP  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ). (D) alga com NP  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  ( $100 \text{ mg L}^{-1}$ ). As setas vermelhas evidenciam os aglomerados.

#### 4.5 Biomassa (clorofila *a*) e Taxa de Crescimento

A determinação do conteúdo de clorofila *a* partir da biomassa está apresentado na Tabela 3. Após a exposição de 96 horas às NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  houve redução significativa na

concentração de clorofila *a* em  $\text{pg cel}^{-1}$  apenas no tratamento de  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Em relação à taxa de crescimento, novamente, apenas a concentração mais elevada de NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) apresentou diminuição significativa.

Em relação às NPs  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , o conteúdo de clorofila *a* nas células não apresentou diferença significativa em relação ao controle e entre os tratamentos. A taxa de crescimento foi significativamente menor nas concentrações mais altas dessas nanopartículas ( $20,0$  e  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) em relação ao controle. E, ainda, para as algas expostas a  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  da NP  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ , também houve diminuição significativa da taxa de crescimento em relação ao controle.

Tabela 3. Média  $\pm$  Desvio Padrão da concentração de clorofila *a* (pg cel<sup>-1</sup>) e taxa de crescimento (d<sup>-1</sup>) da microalga *Raphidocelis subcapitata* em diferentes concentrações nominais de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (mg L<sup>-1</sup>) após 96 horas de exposição. Letras distintas em cada coluna indicam diferença estatisticamente significativa (p<0.05).

Concentração nominal (mg L <sup>-1</sup> )	Chl <i>a</i> (pg cel <sup>-1</sup> )	Taxa de crescimento (d <sup>-1</sup> )
NP Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>		
0	0,12 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,82 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
1,0	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,83 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>
5,0	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,79 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
10,0	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,84 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
20,0	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,82 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
50,0	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,82 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
100,0	0,07 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>	0,77 $\pm$ 0,01 <sup>b</sup>
NP Cu-Fe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>		
0	0,10 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,84 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
0,1	0,09 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,71 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>
1,0	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,84 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>
5,0	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,84 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
10,0	0,11 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,79 $\pm$ 0,01 <sup>abc</sup>
20,0	0,10 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,78 $\pm$ 0,01 <sup>c</sup>
50,0	0,11 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,65 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>
NP CoFe <sub>2</sub> O <sub>4</sub>		
0	0,06 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	1,00 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>
0,65	0,06 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	1,01 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>
2,0	0,08 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,95 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>
5,0	0,09 $\pm$ 0,03 <sup>a</sup>	0,90 $\pm$ 0,09 <sup>ab</sup>
10,0	0,09 $\pm$ 0,01 <sup>a</sup>	0,89 $\pm$ 0,02 <sup>ab</sup>
20,0	0,06 $\pm$ 0,005 <sup>a</sup>	0,81 $\pm$ 0,03 <sup>b</sup>
50,0	0,07 $\pm$ 0,04 <sup>a</sup>	0,79 $\pm$ 0,02 <sup>b</sup>

#### 4.6 Conteúdo de proteínas, carboidratos, lipídeos totais e classes lipídicas

As concentrações de proteínas totais nas microalgas expostas às nanopartículas estão representadas na Tabela 4. Nas NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, a concentração de proteínas totais por

célula diminuiu significativamente nas concentrações de 10,0, 20,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>. No entanto, na maior concentração (100,0 mg L<sup>-1</sup>), houve um aumento do conteúdo proteico em relação ao controle. Para a NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, houve um aumento significativo na quantidade de proteína por célula na menor concentração (0,10 mg L<sup>-1</sup>) e diminuição nas concentrações intermediárias (1,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>). Já nas últimas concentrações (10,0; 20,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>) não houve diferença significativa na quantidade de proteína em relação ao controle. Para as NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> a quantidade de proteína foi significativamente maior em relação ao controle nas maiores concentrações (10,0; 20,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>). Para as algas expostas às menores concentrações (0,65; 2,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>) a quantidade de proteína foi significativamente igual ao controle.

Em relação ao conteúdo de carboidratos totais por célula (Tabela 4) não houve diferença significativa em relação ao controle para as algas tratadas com NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. No entanto, houve aumento significativo do conteúdo de carboidrato nos tratamentos com 1,0; 5,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup> de NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e, diminuição no tratamento de 10,0 mg L<sup>-1</sup>. Para a NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> houve aumento significativo de carboidrato nas algas submetidas à concentração mais elevada (50,0 mg L<sup>-1</sup>). Nos demais tratamentos, não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle.

A razão entre proteína e carboidrato (P/C) (Tabela 4) para as células expostas às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> diminuiu nas concentrações de 1,0 10,0; 20,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>. No tratamento de 5,0 mg L<sup>-1</sup> a razão diminuiu apenas 1,89% e, no tratamento com maior concentração (100,0 mg L<sup>-1</sup>), a razão foi igual ao controle. Para NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, essa razão diminuiu na maioria das concentrações analisadas quando comparadas ao controle, exceto para a concentração de 10 mg L<sup>-1</sup> (aumento de aproximadamente 16,3% na razão P/C). Para NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> a razão diminuiu cerca de 10,6% na maior concentração utilizada nos testes (50,0 mg L<sup>-1</sup>) e, aproximadamente, 57,5% na concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup>.

A quantidade de lipídeos totais por célula (Tabela 4) para as NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  diminuiu significativamente em relação ao controle nas concentrações de 1,0; 10,0; 20,0 e 50,0  $\text{mg L}^{-1}$ . Na exposição a NP  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  houve diminuição do conteúdo lipídico nas células algais tratadas com 1,0 e 10,0  $\text{mg L}^{-1}$  e, também, um aumento significativo no tratamento na maior concentração (50,0  $\text{mg L}^{-1}$ ). Para NP  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , pode-se observar um aumento significativo de lipídeos totais nas concentrações de 2,0 e 20,0  $\text{mg L}^{-1}$  em relação ao controle e, diminuição significativa nas células tratadas com 10,0  $\text{mg L}^{-1}$ .

Tabela 4. Composição bioquímica (proteínas, carboidratos e lipídeos totais) da microalga *Raphidocelis subcapitata* em meio LC Oligo após 96h de exposição às nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. P/C (razão proteína e carboidrato). Letras distintas em cada coluna indicam diferença estatisticamente significativa entre controles e tratamentos e entre tratamentos (p<0,05). Média ± Desvio de n=4.

Concentração nominal mg L <sup>-1</sup>	Proteína pg cel <sup>-1</sup>	Carboidrato pg cel <sup>-1</sup>	Razão P/C	Lipídeos pg cel <sup>-1</sup>
<b>Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub></b>				
0	3,80 ±0,55 <sup>a</sup>	2,38±0,34 <sup>a</sup>	1,59	0,46±0,05 <sup>ad</sup>
1,0	2,95 ±0,28 <sup>ac</sup>	2,44±0,08 <sup>a</sup>	1,20	0,35±0,00 <sup>bc</sup>
5,0	3,31±0,19 <sup>a</sup>	2,12±0,27 <sup>a</sup>	1,56	0,52±0,01 <sup>d</sup>
10,0	2,18±0,21 <sup>b</sup>	2,09±0,65 <sup>a</sup>	1,04	0,39±0,01 <sup>ac</sup>
20,0	2,30±0,07 <sup>bc</sup>	2,39±0,19 <sup>a</sup>	0,96	0,35±0,04 <sup>c</sup>
50,0	2,39±0,28 <sup>bc</sup>	2,60±0,20 <sup>a</sup>	0,90	0,40±0,01 <sup>ace</sup>
100,0	4,17±0,05 <sup>d</sup>	2,61±1,04 <sup>a</sup>	1.59	0,48±0,02 <sup>de</sup>
<b>Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>				
0	5,55 ±0,25 <sup>a</sup>	1,45±0,32 <sup>ad</sup>	3,80	1,17±0,03 <sup>ace</sup>
0,1	7,06 ±0,55 <sup>b</sup>	2,31±0,38 <sup>ace</sup>	3,05	1,30±0,10 <sup>a</sup>
1,0	3,75±0,22 <sup>c</sup>	2,36±0,20 <sup>bce</sup>	1,58	0,74±0,03 <sup>bde</sup>
5,0	4,27±0,31 <sup>cd</sup>	2,06±0,43 <sup>dce</sup>	2,07	1,05±0,09 <sup>cde</sup>
10,0	5,04±0,33 <sup>ad</sup>	1,14±1,16 <sup>d</sup>	4,42	0,83±0,10 <sup>de</sup>
20,0	5,03±0,21 <sup>ad</sup>	1,59±0,34 <sup>ac</sup>	3,16	0,95±0,13 <sup>e</sup>
50,0	5,92±0,32 <sup>a</sup>	2,45±0,15 <sup>e</sup>	2,41	1,90±0,06 <sup>f</sup>
<b>CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub></b>				
0	1,25±0,08 <sup>a</sup>	0,80±0,15 <sup>a</sup>	1.60	0,33±0,01 <sup>a</sup>
0,65	1,27±0,25 <sup>ac</sup>	0,77±0,15 <sup>a</sup>	1,64	0,45±0,01 <sup>ac</sup>
2,0	0,97±0,20 <sup>a</sup>	1,42±0,15 <sup>a</sup>	0,68	0,54±0,09 <sup>bc</sup>
5,0	1,93±0,46 <sup>abc</sup>	1,20±0,15 <sup>a</sup>	1,60	0,40±0,01 <sup>ac</sup>
10,0	2,19±0,10 <sup>bc</sup>	1,31±0,15 <sup>a</sup>	1,67	0,10±0,02 <sup>d</sup>
20,0	2,27±0,53 <sup>bd</sup>	1,35±0,15 <sup>a</sup>	1,68	0,55±0,09 <sup>c</sup>
50,0	3,28±0,04 <sup>d</sup>	2,28±0,15 <sup>b</sup>	1,43	0,35±0,09 <sup>a</sup>

O conteúdo de hidrocarboneto (HC) detectado no ensaio submetido às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Figura 11a) apresentou aumento significativo nas células algais nas concentrações de 5,0; 10,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup> quando comparado ao controle. A quantidade de HC nessas concentrações acima mencionadas foi, respectivamente, 0,030±0,004; 0,0326±0,001 e 0,046±0,001 pg cel<sup>-1</sup>, enquanto o controle apresentou 0,022±0,003 pg cel<sup>-1</sup> de HC. No controle a quantidade de HC representa cerca de 4,94% da quantidade total de lipídeos,

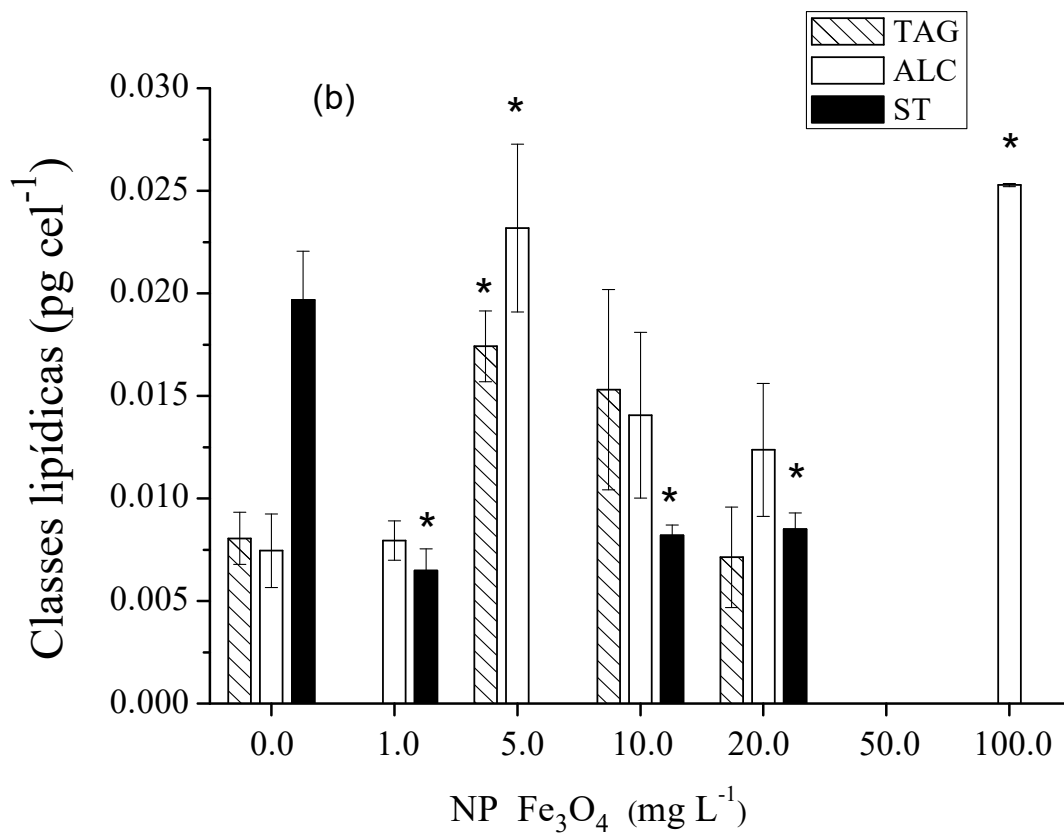
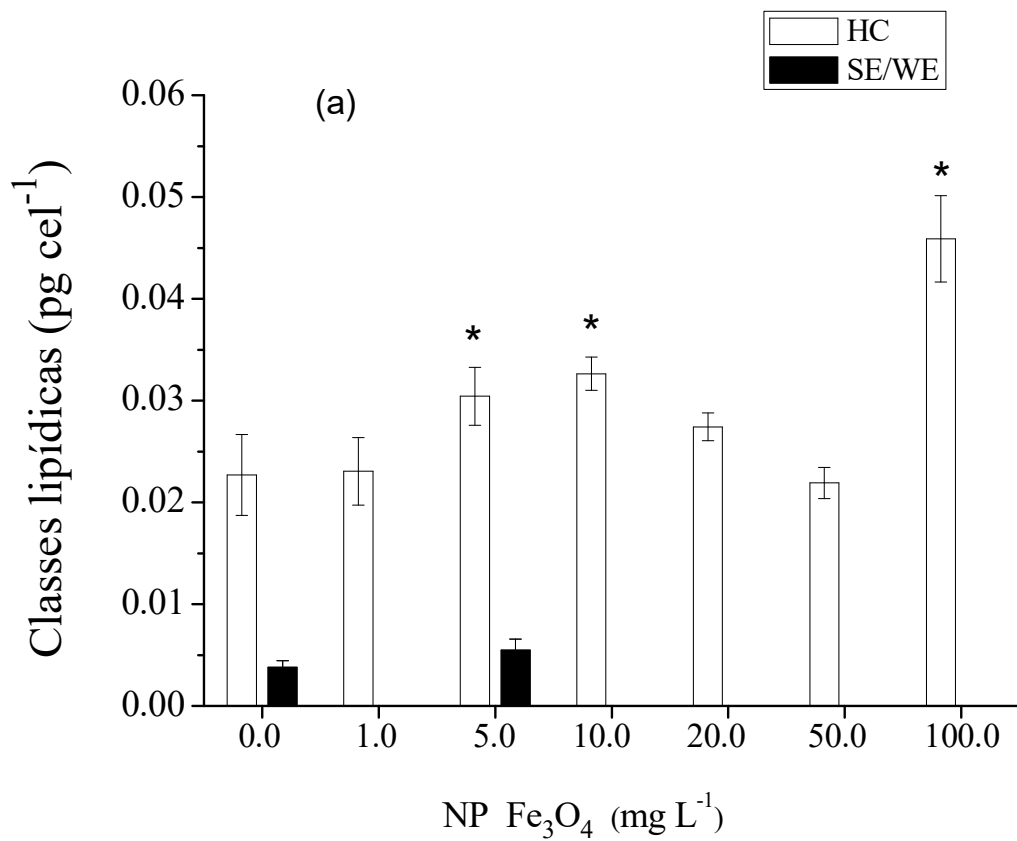
já nos tratamentos submetidos a 5,0; 10,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup> a quantidade de HC representa, respectivamente, 5,88; 8,36 e 9,64%. As classes estéril éster/éster de cera (SE/WE) foram detectadas apenas no controle e no tratamento com 5,0 mg L<sup>-1</sup> de NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, porém em pequena quantidade (0,003±0,0006 e 0,005±0,001 pg cel<sup>-1</sup>, respectivamente).

O álcool alifático livre (ALC) foi detectado em todos os tratamentos (exceto em 50,0 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 11b), com aumento significativo nas concentrações de 5,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>. A quantidade de ALC nessas concentrações foi, respectivamente, 0,023±0,004 e 0,025±0,001 pg cel<sup>-1</sup>. Esses valores representam, respectivamente, 4,48 e 5,31% da quantidade total de lipídeos, enquanto no controle com 0,0074±0,001 pg cel<sup>-1</sup> essa quantidade equivale a 1,62% de ALC. A quantidade de ST (esterol) nos tratamentos (1,0; 10 e 20,0 mg L<sup>-1</sup>) foi cerca de 2,12%, já no controle representou 4,29%, e não foi detectada em 5,0; 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>. O TAG não foi detectado nas concentrações de 1,0; 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>, apresentando aumento significativo apenas em 5 mg L<sup>-1</sup>, com 0,02±0,002 pg cel<sup>-1</sup>, o que representa 3,37% do total de lipídeos. Já o controle apresentou apenas 0,008±0,001 pg cel<sup>-1</sup> de TAG (1.75% da quantidade total de lipídeos).

A classe FFA (ácido graxo livre) (Figura 11c) aumentou significativamente nas concentrações de 5,0; 10,0; 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>, na maior parte dessas classes (exceto 10,0 mg L<sup>-1</sup>), aumento que foi cerca de 10 vezes maior que o controle. A quantidade de lipídeos polares móveis em acetona (AMPL) ficou estável no controle e tratamentos. O fosfolipídeo (PL) foi significativamente menor em 1,0; 10,0; 20,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>. No entanto, nos controles e tratamentos, o PL é a classe que mais contribuiu para o incremento de lipídeos nas células, com 0,34±0,04 pg cel<sup>-1</sup> no grupo controle e cerca de 0,24±0,006 pg cel<sup>-1</sup> nos tratamentos com 1,0; 10,0; 20,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup> de NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. O AMPL é a segunda classe que maior contribuiu na quantidade de lipídeo nas células algais do controle, porém os tratamentos apresentaram variações, com o FFA sendo a segunda



principal classe em 5,0; 50,0; e 100,0 mg L<sup>-1</sup> e, o AMPL a segunda maior classe em 1,0; 10,0 e 20,0 mg L<sup>-1</sup>.



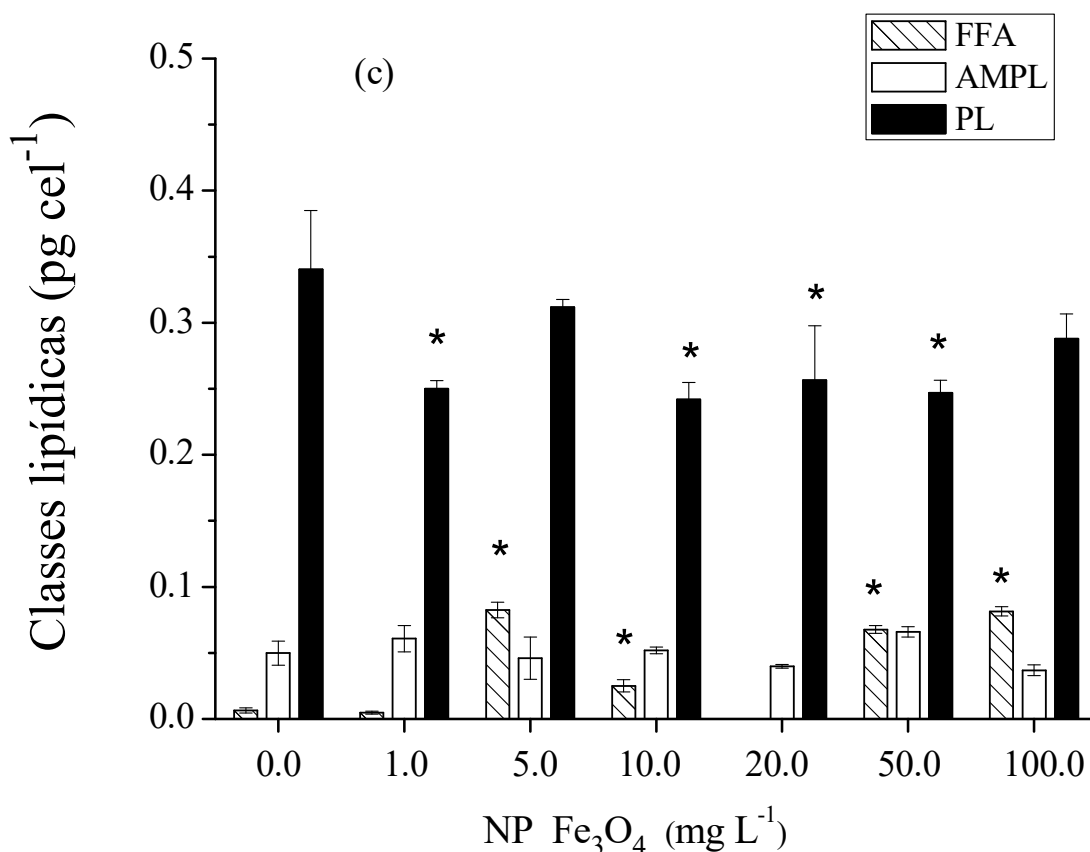


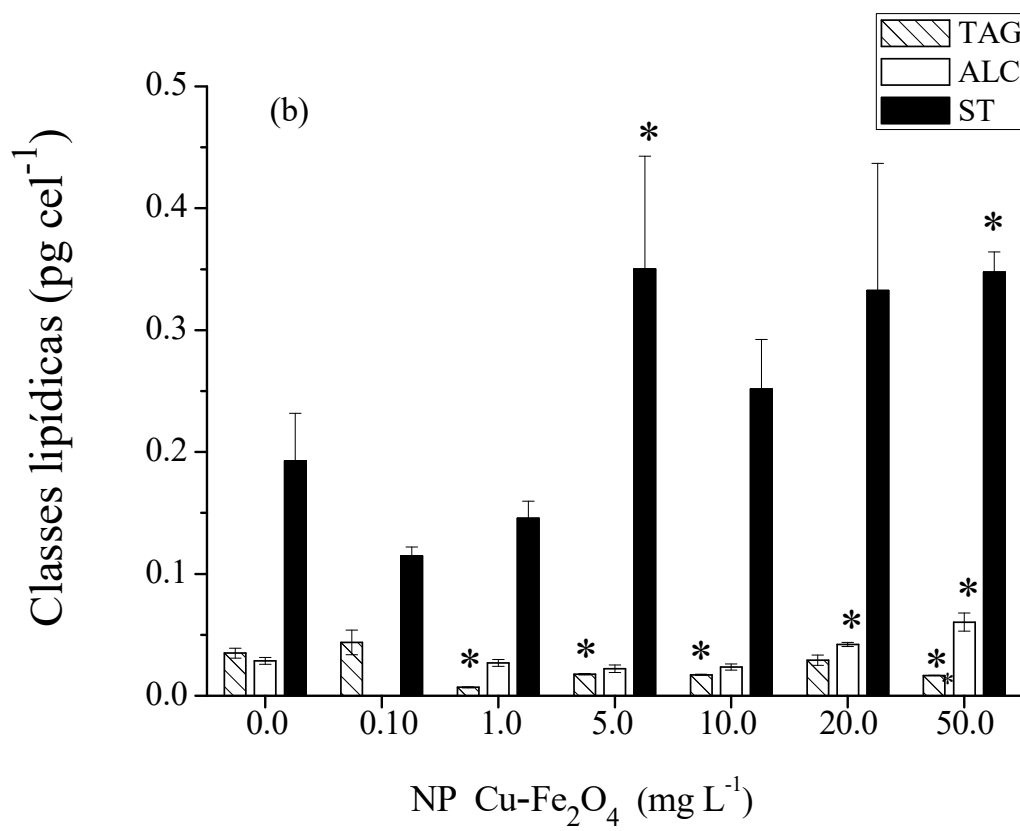
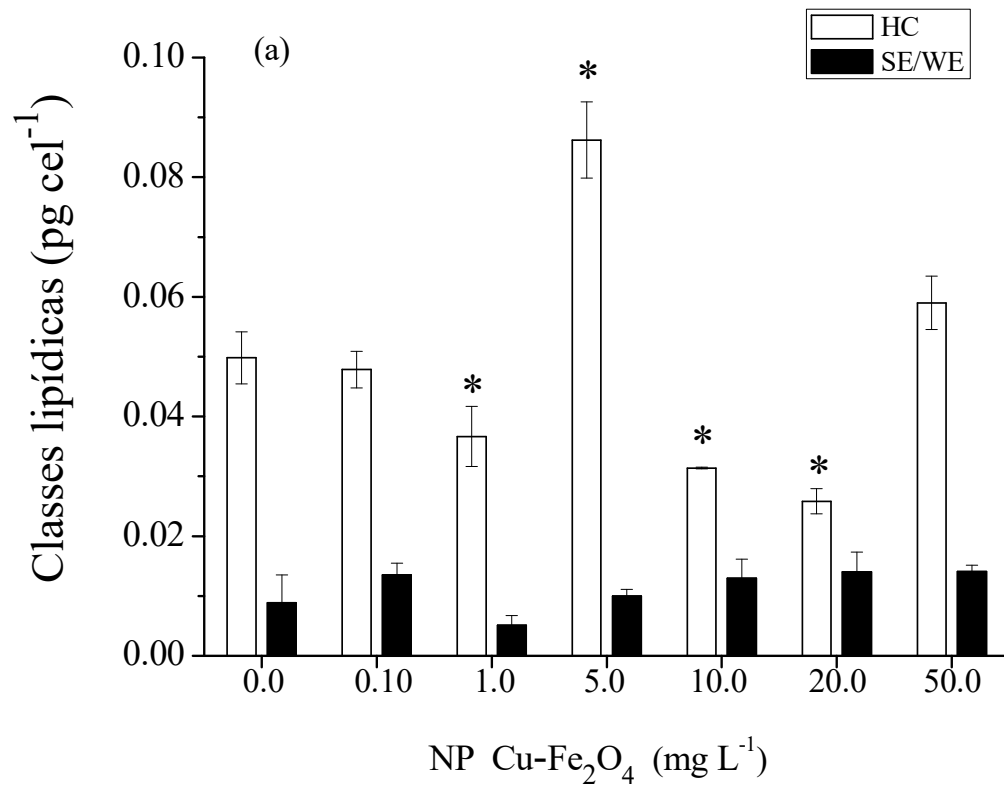
Figura 11. Classes lipídicas nas células da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta à diferentes concentrações de nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. (a) HC hidrocarboneto alifático e SE/WE éster/éster de cera (b) TAG triacilglicerol; ALC álcool alifático livre; ST esterol. (c) FFA ácido graxo livre; AMPL lipídeos polares móveis em acetona e PL fosfolípideo. Em cada classe lipídica, os asteriscos indicam que há diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) de acordo com one-way ANOVA e Teste de Tukey.

Nos ensaios com a NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Figura 12a), o conteúdo de HC no tratamento com 5,0 mg L<sup>-1</sup> (8,24% do total lipídico) foi aproximadamente duas vezes maior que o controle. Nas concentrações de 1,0; 10,0 e 20,0 mg L<sup>-1</sup> a quantidade da classe de HC diminuiu cerca de 0.02 pg cel<sup>-1</sup> em relação ao controle. Já SE/WE não apresentaram mudanças em todos os tratamentos em relação ao controle.

A quantidade de TAG (Figura 12b) diminuiu nas concentrações acima de 1,0 mg L<sup>-1</sup> (exceto em 20 mg L<sup>-1</sup>). Na maior concentração (50,0 mg L<sup>-1</sup>) a quantidade de TAG foi 0,016±0,001 pg cel<sup>-1</sup>. O controle e a menor concentração (0,1 mg L<sup>-1</sup>) apresentaram 0,034±0,006 e 0,04±0,008 pg cel<sup>-1</sup>, respectivamente. Nesse cenário, o TAG no controle,

0,1mg L<sup>-1</sup> e 20 mg L<sup>-1</sup> representa cerca de 3,20 % da quantidade total de lipídeo, e em 50 mg/L<sup>-1</sup> apenas 0,90%. A classe ALC apresentou aumento significativo em relação ao controle nas concentrações de 20,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>, com 0,028±0,002 pg cel<sup>-1</sup> no controle e, 0,042±0,002 e 0,058±0,1 pg cel<sup>-1</sup> em 20,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. A quantidade de ALC nesses tratamentos corresponde a cerca de 3,8% do total de lipídeos. A classe ST esteve presente em maiores quantidades nas células algais expostas à 5,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup> de NP. No controle o valor de ST foi de 0,21±0,006 pg cel<sup>-1</sup> e nos tratamentos com 5,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup> a quantidade foi de aproximadamente 0,35±0,04 pg cel<sup>-1</sup>, o que corresponde a cerca de 18,2% (controle) e 35% (5,0 e 50 mg L<sup>-1</sup>) do total lipídico.

A quantidade de AMPL (Figura 12c) dobrou no tratamento de 0,10 mg/L em relação ao controle (0,06±0,01 pg cel<sup>-1</sup>). A quantidade de FFA diminuiu cerca de duas vezes em relação ao controle (0,12±0,01 pg cel<sup>-1</sup>) em 1 mg L<sup>-1</sup>. Já a quantidade de PL aumentou significativamente em 0,1 mg L<sup>-1</sup> e 50,0 mg L<sup>-1</sup> (0,80±0,07 pg cel<sup>-1</sup> e 1,18±0,09 pg cel<sup>-1</sup>, respectivamente) em relação ao controle (0,64±0,02 pg cel<sup>-1</sup>). Nas demais concentrações a quantidade de PL nas células diminuiu significativamente em relação ao controle, porém essa classe lipídica representa a maior parte dos lipídeos encontrados nas células algais (55,3% no controle e cerca 62,2% nas células tratadas com 0,1 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>).



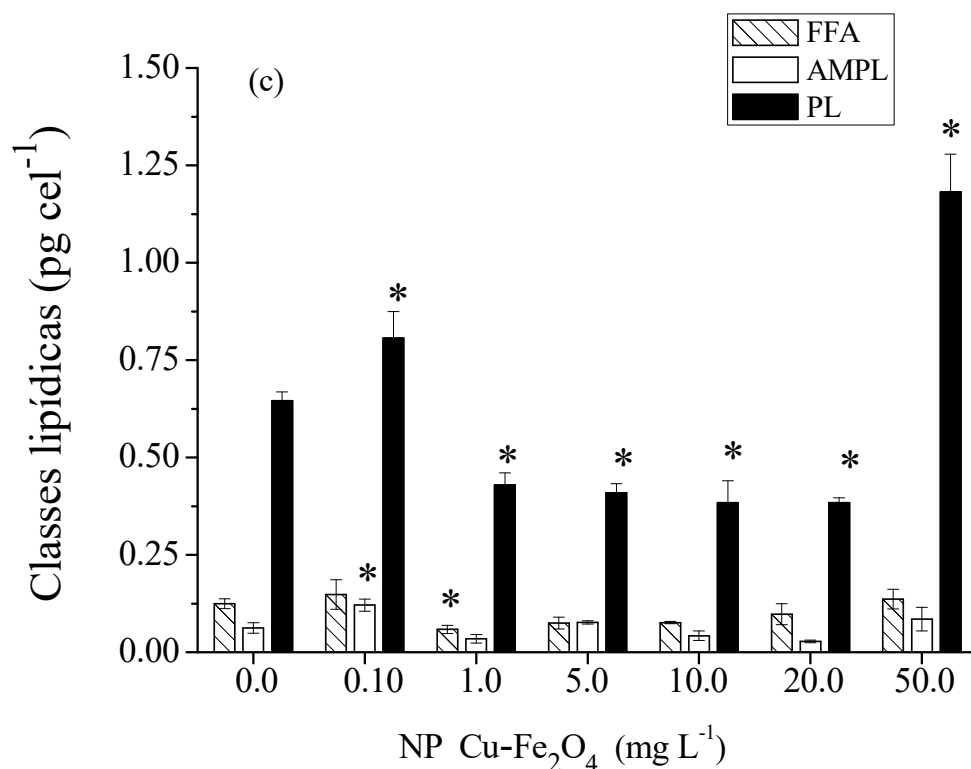


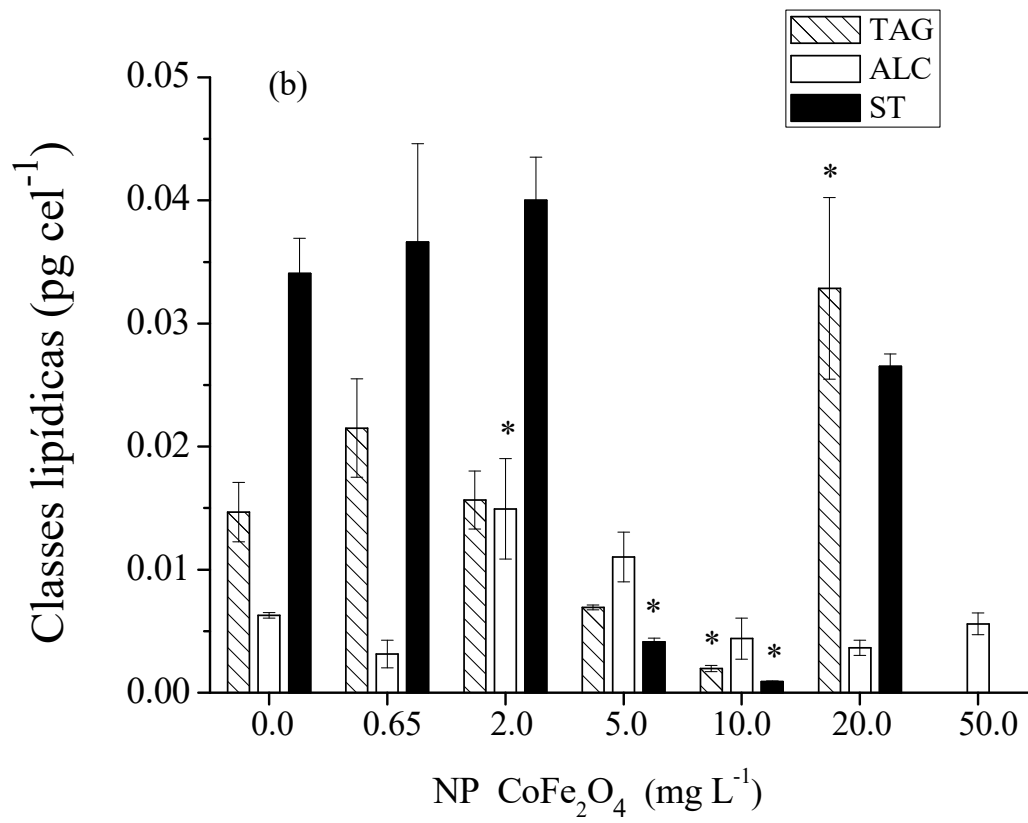
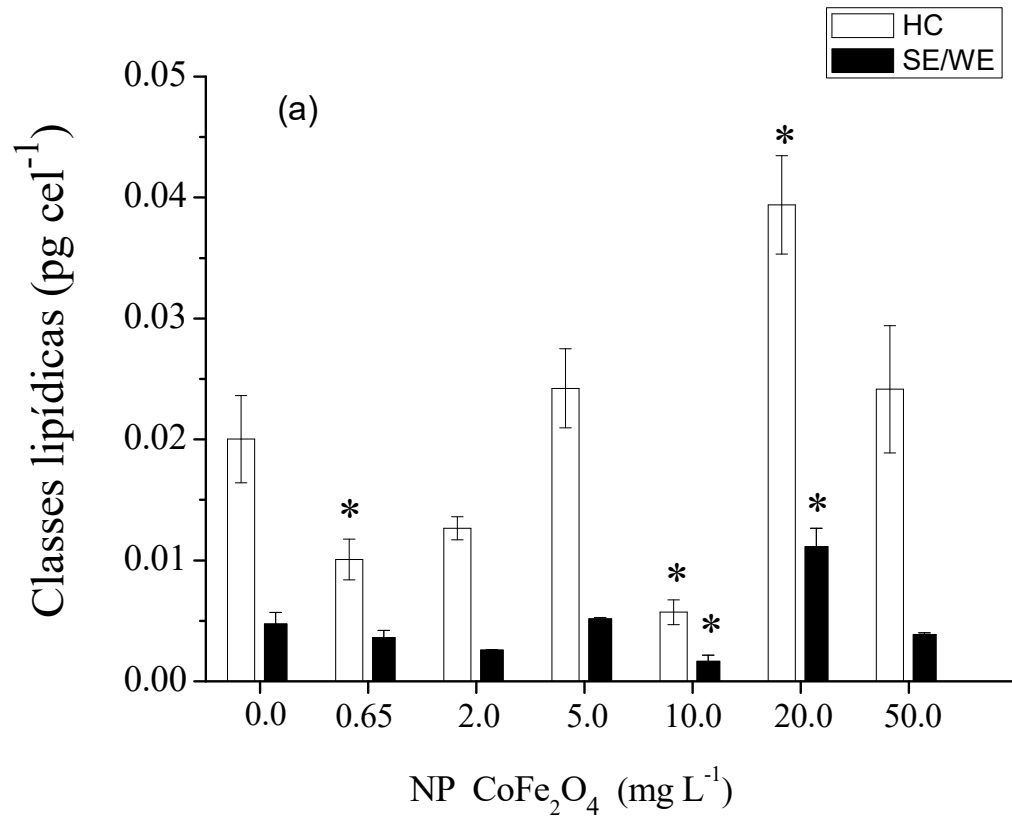
Figura 12. Classes lipídicas nas células da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta à diferentes concentrações de nanopartículas de Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (a) HC hidrocarboneto alifático e SE/WE éster/éster de cera (b) TAG triacilglicerol; ALC álcool alifático livre; ST esterol. (c) FFA ácido graxo livre; AMPL lipídeos polares móveis em acetona e PL fosfolípideo. Em cada classe lipídica, os asteriscos indicam que há diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) de acordo com one-way ANOVA e Teste de Tukey.

Para as microalgas expostas a NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Figura 13a), a quantidade de HC diminuiu nos tratamentos com 0,65 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>, com  $10,07 \pm 0,01$  e  $5,72 \pm 0,005$  pg cel<sup>-1</sup>, respectivamente. O tratamento com 20,0 mg L<sup>-1</sup> apresentou  $0,04 \pm 0,004$  pg cel<sup>-1</sup>, o que corresponde a aproximadamente o dobro de HC presente no controle e 7,1% do total de lipídeo. As classes SE/WE também apresentaram aproximadamente o dobro do conteúdo no tratamento com 20,0 mg L<sup>-1</sup> quando comparadas ao controle ( $0,004 \pm 0,001$  pg cel<sup>-1</sup>).

A quantidade de TAG em relação ao controle ( $0,013 \pm 0,002$  pg/cel<sup>-1</sup>) diminuiu significativamente em 10,0 mg L<sup>-1</sup> ( $0,001 \pm 0,001$  pg/cel<sup>-1</sup>) e aumentou em 20 mg L<sup>-1</sup> ( $0,032 \pm 0,007$  pg cel<sup>-1</sup>). Nota-se também que essa classe não foi detectada na maior concentração (Figura 13b). A quantidade de ALC apresentou aumento significativo em

relação ao controle ( $0,006 \pm 0,0002 \text{ pg cel}^{-1}$ ) somente em  $2,0 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0,015 \pm 0,004 \text{ pg cel}^{-1}$ ). O ST diminuiu em relação ao controle em  $5,0$  e  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , com  $0,004 \pm 0,0003$  e  $0,0009 \pm 0,00004 \text{ pg cel}^{-1}$ , respectivamente. Esses valores representam 1,02 e 0,95% da quantidade lipídica total, enquanto o controle possui 10,28% de ST.

O FFA aumentou significativamente nas células expostas a  $0,65$  e  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  ( $0,02 \pm 0,004$  e  $0,04 \pm 0,002 \text{ pg cel}^{-1}$ , respectivamente) em relação ao controle ( $0,012 \pm 0,003 \text{ pg cel}^{-1}$ ). A classe AMPL diminuiu cerca de 9 vezes em  $10 \text{ mg L}^{-1}$  com relação ao controle e representou 6,04% do total de lipídeos, enquanto que no controle essa classe foi 15,7% do total. O conteúdo de PL dobrou nas concentrações de  $2,0$  e  $20,0 \text{ mg L}^{-1}$  e diminuiu 2,5 vezes em  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  em relação ao controle. No entanto, essa classe foi responsável pela maior parte do conteúdo lipídico das células nesse ensaio (56,7% no controle e 71,8 e 68,0% nas células tratadas com  $2,0$  e  $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ ) (Figura 13c).





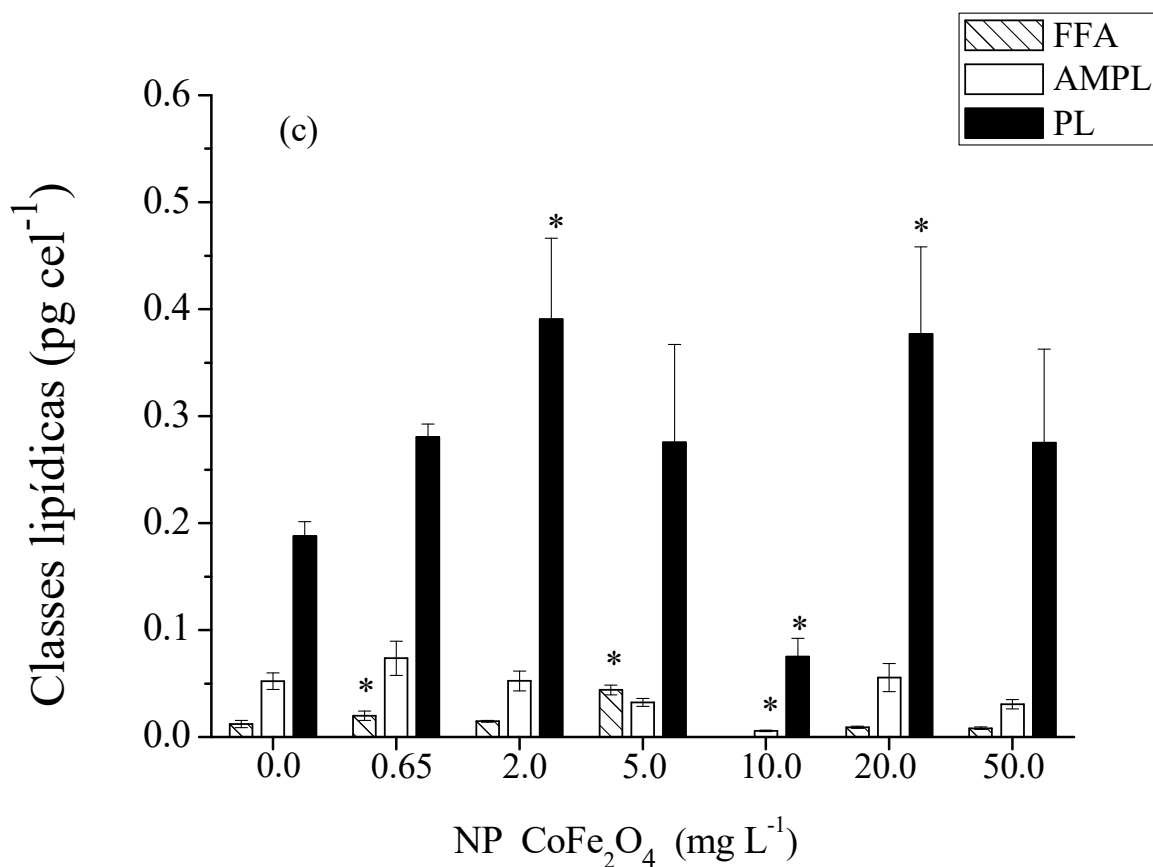


Figura 13. Classes lipídicas nas células algais da microalga *Raphidocelis subcapitata* exposta à diferentes concentrações de nanopartículas de CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. (a) HC hidrocarboneto alifático e SE/WE éster/éster de cera (b) TAG triacilglicerol; ALC álcool alifático livre; ST esterol. (c) FFA ácido graxo livre; AMPL lipídeos polares móveis em acetona e PL fosfolípídeo. Em cada classe lipídica, os asteriscos indicam que há diferença estatisticamente significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) de acordo com one-way ANOVA e Teste de Tukey.

## 5. Discussão

A clorofila *a* constitui um importante indicador de biomassa algal, uma vez que está presente em todas as microalgas planctônicas, sendo um parâmetro relevante de monitoramento biológico de corpos d'água. A mensuração *in vivo* da clorofila *a* é um componente sensível para a detecção rápida de compostos potencialmente nocivos à fotossíntese, uma vez que fornece limites de toxicidade e indica, de certo modo, a ação desses compostos (Fai et al., 2007).

No presente estudo, os resultados da concentração de clorofila *a* de *Raphidocelis subcapitata* confirmam a baixa toxicidade das NPs magnéticas utilizadas, uma vez que apenas para a concentração mais elevada de NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (100,0 mg L<sup>-1</sup>) houve diminuição do conteúdo de clorofila *a* por célula (Tabela 3). Outros estudos têm destacado a baixa toxicidade de NPs magnéticas sobre microalgas (Chen et al., 2012; Hazzem et al., 2015). Na maioria dos estudos encontrados as concentrações que afetam o conteúdo de clorofila *a* são superiores a 50 mg L<sup>-1</sup>. Chen et al. (2012) avaliaram o efeito de NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> em *Chlorella vulgaris* e detectaram que não houve diferença significativa da quantidade de clorofila em relação ao controle em concentrações de 50,0 e 100,0 mg/L. Hazzem et al. (2015) também avaliaram o efeito de NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (20 e 40 nm) na alga *Picochlorum* sp. e demonstraram que apenas na exposição a 200 mg L<sup>-1</sup> de NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (20 nm) houve redução na concentração de clorofila *a*.

Alguns estudos tem relatado também que o crescimento de microalgas poderia ser diretamente afetado por efeitos de sombreamento causado pela presença de NPs. Hund-Rinke e Simon (2006) avaliaram o efeito do sombreamento pela NP TiO<sub>2</sub> na alga *Desmodesmus subspicatus* e relataram que a presença da NP não reduziu o crescimento algal. O mesmo resultado foi observado por Arouja et al (2009) onde o efeito do

sombreamento não foi correlacionado ao efeito tóxico por NPs ZnO e CuO em *R. subcapitata*. Para NP ZnO em *Chlorella* sp Ji et al. (2011) também sugerem que os efeitos de sombreamento não estão associados à toxicidade. No entanto, Gong et al. (2011), em estudos com *Chlorella vulgaris* e NP NiO, e Schawab et al (2011) em estudos com *C. vulgaris*, *R. subcapitata* e nanotubos de carbono, demonstraram que a inibição do crescimento algal foi resultado do efeito de sombreamento e da formação de agregados (NP-alga). E no caso das NP NiO, a liberação de íons níquel também contribuiu para a toxicidade observada. A inibição do crescimento algal devido ao efeito de sombreamento causado pela adsorção de agregados de NP TiO<sub>2</sub> na superfície celular de *Chlorella* sp também foram observados Sadiq et al (2011).

Em nossos resultados, a taxa de crescimento não foi afetada pelo sombreamento das NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ou por agregados de NP-alga pelo menos até 50 mg L<sup>-1</sup>. E para as algas expostas as NPs bimetálicas (NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) esses efeitos também não diminuíram as taxas de crescimento pelo menos até 10 mg L<sup>-1</sup>. É possível que nos tratamentos com 100 mg L<sup>-1</sup> de NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e acima de 20 mg L<sup>-1</sup> de NPs bimetálicas, tenha ocorrido o efeito de sombreamento. Este efeito poderia ser explicado pela adsorção de agregados de NPs na superfície algal e/ou apenas em função das NPs (concentração-dependente). Tal efeito não poderia ser descartado quando os ensaios de cada NP são avaliados isoladamente (Tabela 3).

A toxicidade de NPs de ferro em *Chlorella* sp. tem como componente principal o sombreamento causado pela presença de NPs nos meios de exposição ao invés de danos permanentes na membrana celular e DNA (Toh et al., 2014 e 2016). Os autores relatam que a diminuição da luminosidade devido ao sombreamento acarretou inibição do crescimento algal nas células expostas a aproximadamente 50 mg L<sup>-1</sup> de NPs de ferro, e ressaltam que esse efeito indireto é altamente dependente das concentrações das NPs.

Comparando-se as NPs estudadas, podemos observar que, apesar da baixa toxicidade das três NPs, as bimetálicas apresentaram maior toxicidade para a microalga, pois afetaram a taxa de crescimento em concentrações inferiores às NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Tab. 3). Aglomerados (NP-alga) foram observados por microscopia óptica nas concentrações mais elevadas de todas as NPs (Figura 10). A formação de aglomerados das NPs sobre as células algais poderia inibir o crescimento das algas ou causar entupimento dos poros das paredes celulares e, assim, dificultar a entrada de nutrientes nas células (Navarro et al., 2008; Oukarroum et al., 2012). Essa hipótese é reforçada pela determinação do tamanho hidrodinâmico médio de todas as NPs estudadas, que aumentou após 96 horas confirmando a formação de agregados e/ou aglomerados nos meios de exposição (Tabela 1) (Sadiq et al., 2011). Não apenas a formação dos agregados nas maiores concentrações poderia explicar a diminuição da taxa de crescimento nas algas expostas a 20 e 50  $\text{mg L}^{-1}$  de NPs bimetálicas.

Outro fator que poderia se correlacionar com a maior toxicidade das NPs bimetálicas em relação as NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  seria o efeito da liberação dos íons  $\text{Co}^{2+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  a partir dessas NPs. Estudos com linfócitos humanos os efeitos tóxicos segundo os autores ocorreram devido à entrada de NPs nas células ou pela dissolução das NPs com aumento de íons cobalto no meio de exposição (Chattopadhyay et al., 2015). Da mesma forma Blinova et al. (2010) constataram que os efeitos tóxicos de NP CuO e NP ZnO em crustáceos e protozoários foram ocasionados pela presença de íons metálicos dissolvidos. Em nosso estudo, essa seria uma outra explicação para a maior toxicidade observada pelas NPs bimetálicas, ou seja, íons cobalto (NP  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) e íons cobre (NP  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ ) dissolvidos poderiam estar relacionados à menor taxa de crescimento nos tratamentos com 20 e 50  $\text{mg L}^{-1}$ .

O efeito de oxidação sofrido pelas NPs metálicas também poderia influenciar frequentemente diretamente na sua toxicidade. Lei et al. (2016) avaliaram o efeito da NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (magnetita) e NP  $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$  (hematita) em *Chlorella pyrenoidosa* e concluíram que a toxicidade diminuiu com o aumento da oxidação, com menor toxicidade da hematita em relação à magnetita. Diante da menor toxicidade atribuída à hematita em relação à magnetita, podemos inferir que, no presente estudo, os íons cobre livre podem ter contribuído para o maior efeito tóxico das algas expostas à NP  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  quando comparadas à NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , já que a NP  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  é uma hematita ( $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) com íons cobre adsorvidos.

Em adição, outro efeito relevante foi destacado por Stauber e Florence (1987). Esses autores relatam que íons trivalentes como o  $\text{Fe}^{3+}$  formam uma camada de óxido metálico hidratado sobre a célula algal. Isto facilita a adsorção do cobre sobre a membrana celular antes da penetração na célula o que diminui seu efeito tóxico. Ao analisarmos apenas os efeitos das NP  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ , em comparações com as outras NPs desse estudo, podemos inferir que este efeito também pode ter ocorrido em nosso estudo. Os íons  $\text{Fe}^{3+}$  liberados pela NP  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  podem ter contribuído para a interação do complexo óxido-metal-água com a membrana celular, dificultando a entrada de  $\text{Cu}^{2+}$  nas células algais. Ou seja, os íons trivalentes de  $\text{Fe}^{+3}$  formaram um complexo protetor sobre a membrana e diminuíram a entrada do íon  $\text{Cu}^{+2}$  tóxico. Isto pode ser confirmado pelo fato da manutenção do conteúdo de clorofila *a* e taxa de crescimento nos tratamentos com baixas concentrações (1,0 a 10,0  $\text{mg L}^{-1}$ ), uma vez que a biodisponibilidade de íons cobre é menor (Tab. 2). Mesmo nas concentrações que apresentaram maior efeito, os íons ferro podem ter dificultado a entrada do cobre nas células, o que é evidenciado pela concentração de clorofila *a* que não foi significativamente alterada e também pelo pouco

efeito observado sobre a diminuição da taxa de crescimento, sendo apenas 7% na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup> e 22,6% na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup> (Tab. 3).

A toxicidade de íons Fe<sup>3+</sup> sobre organismos aquáticos pode ser atribuída a efeitos indiretos, tais como interferência na disponibilidade de nutrientes, alterações nos movimentos ou na respiração (Arbildua et al., 2016). Já os íons Fe<sup>2+</sup> encontrados sob condições ácidas ou águas anóxicas são considerados mais tóxicos, sendo responsáveis por efeitos diretos na sobrevivência. Na microalga *R. subcapitata* a toxicidade dos íons Fe<sup>3+</sup> é um efeito secundário devido à menor disponibilidade de fósforo no meio, esse efeito é facilmente revertido pela a adição de fósforo após precipitação do ferro (Arbildua et al. 2016).

Em relação à toxicidade dos íons cobalto e cobre foi observada relataram maior toxicidade do cobre em *Chlamydomonas reinhardtii* (Macfie et al., 1994). Jiang et al. (2016) também demonstraram inibição do crescimento dessa alga pelo cobre. Lustignan et al. (1995) investigaram o efeito do cobalto em *C. reinhardtii* e constataram redução do crescimento em 10 mg L<sup>-1</sup> e interrupção do crescimento acima de 30 mg L<sup>-1</sup>, resultados corroborados por El-Sheekl et al. (2003) com as algas *Monoraphidium minutum* e *Nitzschia perminuta*.

Já em relação à toxicidade de nanomateriais (cobalto, cobre, prata, alumínio e níquel) e seus respectivos sais, Griffitt et al (2008) observaram, em *R. subcapitata* que as formas solúveis desses metais parecem apresentar maior toxicidade do que os nanomateriais. O mesmo resultado foi observado por Arouja (2015) utilizando a microalga *R. subcapitata*, NP CuO e NP Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> foram menos tóxicas que seus respectivos sais. No entanto, para NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e seu sal esse resultado é inverso, com maior toxicidade observada para as NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. No estudo de Arouja (2015) a NP CuO foi mais tóxica para

*R. subcapitata* do que NP Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Em Chen et al. (2011) a toxicidade de íons Fe<sup>2+</sup> foi maior que a apresentada pela NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> para larvas do peixe *Oryzias latipes*.

A liberação e bioacumulação de íons metálicos contribuíram para a toxicidade em *C. vulgaris* submetidas às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e NPs cobalto/zinco/cobre (Barhoumi e Dewez, 2013). No entanto, para esses autores, é difícil determinar se esse mecanismo é a única contribuição para a toxicidade em *C. vulgaris*, visto que NPs ligadas à parede celular podem alterar de forma direta trocas celulares entre as células e o meio. Barhoumi e Dewez (2013) observaram que a taxa de divisão celular foi inibida de forma mais significativa pelas NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> do que pelas NPs cobalto/zinco/ferro concluindo que o ferro causou peroxidação lipídica pela geração de radicais livres nas células. Esse resultado não é corroborado pelos nossos estudos, uma vez que as NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> apresentaram menor toxicidade em relação as NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

A parede celular das algas, constituída de polissacarídeos e glicoproteínas, é uma barreira para a entrada de NPs. A espessura da parede celular, de 5 a 20 nm, e sua permeabilidade parcial, limitam a entrada de moléculas grandes. No entanto, em processos de divisão celular as paredes celulares recém-sintetizadas podem apresentar maior permeabilidade, o que facilitaria a entrada das NPs. O contato das células com as NPs também induz à formação de poros maiores nas paredes celulares, o que pode contribuir de forma significativa para a maior internalização dessas partículas (Navarro et al., 2008). Em nossos estudos, a manutenção do conteúdo de clorofila *a* e taxa de crescimento na maior parte dos tratamentos, após 96 horas de exposição, pode ser correlacionado ao desenvolvimento de mecanismos adaptativos (Hazeem, 2015) ao longo da fase de crescimento e/ou ao fato das NPs não terem afetado a absorção de nutrientes pelas células algais, mesmo com a possível internalização das partículas nas primeiras 48 horas (fase de crescimento exponencial, Figura 2).

O crescimento das algas depende diretamente do suplemento de macro e micronutrientes. Entre estes últimos encontram-se os metais como o ferro, cobalto, cobre, zinco e molibdênio. Em altas concentrações, zinco, cobre e cobalto são tóxicos. Os íons ferro são fundamentais em processos fotossintéticos e respiratórios, porém em excesso podem provocar inibição da clorofila *a* e da biossíntese de proteínas (Huang et al., 2013). Para as NPs utilizadas em nosso estudo, esses efeitos não foram observados (Tabela 4) o que evidencia a baixa toxicidade dessas partículas em comparação com íons ferro, cobalto e cobre, e ainda indica que a absorção de nutrientes pelas células algais não foi comprometida na presença das NPs. Morrissey e Bowler (2011) ressaltam que os organismos podem controlar a homeostase do ferro e apresentar respostas coordenadas à sobrecarga desse nutriente.

No presente estudo, a quantidade de metais da fração particulada diminuiu nos ensaios de todas as NPs após 96 horas (Tabela 2). Esses resultados também foram encontrados por Ahmad et al. (2015). Segundo os autores a lixiviação de íons  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Co}^{2+}$  foi suprimida devido à agregação-aglomeração de NPs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , em concentrações nominais de 2,35 e 117,3  $\text{mg L}^{-1}$ , por exemplo, a concentração de íons livres foi 0,055 e 0,247  $\mu\text{g L}^{-1}$ , respectivamente. Diante desses fatores, pôde-se inferir que a diminuição da biodisponibilidade de íons ferro, cobre e cobalto ( $\text{mg cel}^{-1}$ ), no presente estudo, pode estar relacionada aos seguintes fatores: filtração – nessa etapa a heterogeneidade do meio de cultivo em função de aglomerados (NP-alga ou apenas NP) pode ser relevante, pois as alíquotas analisadas podem ter apresentado maior ou menor quantidade de NP em função de estarem presentes mais ou menos aglomerados; adesão à parede do frasco - as NPs podem ter adsorvido nas paredes do frascos utilizados durante o período experimental; eficiência no processo de digestão das amostras - na concentração mais elevada (100  $\text{mg L}^{-1}$ ) a liberação de íons pode não ter ocorrido com eficiência máxima.



Em nosso estudo, a concentração de íons livres ficou abaixo do limite de detecção do Espectrômetro de Absorção Atômica (AAS). Muitos metabólitos orgânicos excretados por espécies fitoplanctônicas podem atuar como agentes quelantes, e assim diminuir a concentração de metais livres no meio (Lombardi e Maldonado, 2011). Esses fatores também podem ter contribuído para o baixo efeito tóxico apresentado pelas NPs deste estudo.

O Potencial Zeta ( $\zeta$ ) também pode ser um indicativo da baixa toxicidade das NPs desse estudo. O  $\zeta$  mede o potencial eletrostático na dupla camada elétrica em torno de uma NP em solução e, portanto, determina a carga da superfície da partícula. O  $\zeta$  é um indicador da estabilidade em sistemas coloidais, valores de  $\zeta \pm 25$  mV predizem alto grau de estabilidade e ausência de aglomeração (Bogdan et al., 2011). Nanopartículas consideradas aproximadamente neutras apresentam  $\zeta$  entre -10 e +10 mV. Já as NPs com  $\zeta$  superior a +30 mV são fortemente catiônicas e com  $\zeta$  inferior a -30 mV são fortemente aniônicas. A maioria das membranas celulares possui carga negativa; assim NPs catiônicas geralmente exibem maior toxicidade devido a maior interação com as células (permeabilidade) (Clogston e Patri, 2011). No presente estudo, os dados  $\zeta$  mostraram que essas NPs tornaram-se fortemente aniônicas ao longo do período experimental, portanto apresentaram menor biocompatibilidade com a membrana, justificando a menor toxicidade.

A composição bioquímica de microalgas pode sofrer alterações em função da disponibilidade de nutrientes, sendo comum a reserva de carboidratos e lipídeos em condições menos favoráveis e o aumento do conteúdo proteico em condições saudáveis (Chia et al., 2013; Rocha, et al., 2015). Estudos indicam que o decréscimo da razão proteína/carboidrato sugere estresse em função de deficiência nutricional. Essa razão é útil como indicador do estado fisiológico das microalgas (Ganf et al., 1986; Kilham et al.,

1997; Rocha et al., 2015). Assim, pode-se inferir por meio dessa relação que as células expostas às NPs de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  encontravam-se saudáveis na maior concentração utilizada no ensaio, pois essa razão P/C foi igual ao grupo controle. E ainda, as células expostas às NPs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (10 e 20  $\text{mg L}^{-1}$ ) e  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  (10  $\text{mg L}^{-1}$ ) estavam em bom estado fisiológico (Tab. 4). Esses resultados podem indicar que as células expostas às NPs permaneceram saudáveis por 96 horas de exposição e, concomitantemente, também evidenciam que a absorção de nutrientes pelas células algais não foi afetada pelas NPs.

Estudos recentes destacam o potencial da utilização de microalgas para produção de biocombustíveis (Mubarak et al., 2015; Dermirdas e Dermirdas, 2011; Williams e Laurens, 2010). Segundo Zhang et al. (2013) o custo da produção de biodiesel é afetado diretamente pelo teor lipídico das microalgas. No presente estudo a presença de NPs induziu o aumento na concentração de lipídeos totais nas células das algas submetidas à NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (5,0  $\text{mg L}^{-1}$ ), NP  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  (50,0  $\text{mg L}^{-1}$ ) e NP  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (2,0 e 20,0  $\text{mg L}^{-1}$ ) (Tab. 4). Padrova et al. (2014) também observaram o aumento do conteúdo total de lipídeos em seis espécies algais, incluindo *R. subcapitata*, na presença de 5,1  $\text{mg L}^{-1}$  de NP nZVI (NP de ferro com valência zero). O acúmulo de lipídeos em estudos com algas marinhas também foi observado por Kadar et al. (2012) na presença de NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ .

Além do incremento lipídico nas células algais a baixa toxicidade das NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  obtidas neste estudo também favorece o uso dessas NPs magnéticas no melhoramento de técnicas de recuperação de biomassa algal a partir do meio de cultura (colheita das algas) na fase de produção do biodiesel. Essa fase é responsável por 20 a 30% dos custos de produção do biodiesel (Grima et al., 2003; Mata et al., 2010). Tendo em vista, que a diminuição dos custos da produção de biocombustíveis é de suma importância para o aumento de sua aplicação, o uso de substâncias que não causam efeitos tóxicos na alga e,

consequentemente, não afetam sua produtividade é essencial para desenvolvimento desse setor.

Lim et al. (2012) e Lee et al. (2013) destacam o uso de NPs magnéticas na colheita das algas, onde as microalgas são associadas à NPs magnéticas revestidas por substâncias catiônicas através de interações eletrostáticas, e a separação do meio de cultura ocorre a partir da aplicação de um campo magnético externo. Hu et al. (2013) avaliaram que a eficiência da colheita em *Nannochloropsis maritima* na presença de NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> foi de 95%. Lee et al. (2013) observaram que a eficiência da colheita de *Chlorella* sp na presença de NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> revestidas com quitosana foi de 99%. Esses estudos destacam a alta eficiência da utilização de NPs magnéticas para recuperação de biomassa algal sem prejuízos sobre o crescimento, fato este que também foi observado em nosso estudo. Além disso, Hu et al. (2013) e Lee et al. (2013) destacam a possibilidade de reutilização do meio de cultura após a separação magnética.

Nas microalgas, a composição das classes lipídicas pode variar de acordo com as fases de crescimento, nutrientes, temperatura, pH, fotoperíodo e intensidade luminosa (Dunstan et al, 1998). Os esteróis (ST) e fosfolipídeos (PL) constituem componentes estruturais essenciais para as membranas celulares, e os triacilgliceróis (TAG) são essenciais no armazenamento de energia. Os esteróis e os triacilgliceróis estão agrupados como lipídeos neutros, já os fosfolipídeos como lipídeos polares. No entanto, os PL e TAG possuem em comum um esqueleto de glicerol e diacilgliceróis como precursores (Parrish, 1999). A resposta de células algais à limitações de nutrientes também pode aumentar a síntese de lipídeos neutros, principalmente de TAG (Chia et al., 2013a; Chia et al., 2013b; Lombardi e Wangersky, 1991).

No presente estudo os lipídeos neutros da classe ST aumentaram na maior concentração de NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Fig 12c). Nessa situação, também foi observado o

aumento de PL, mostrando que para NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> as células algais investiram em componentes estruturais (PL e ST), mesmo com a diminuição da taxa de crescimento. Para as outras NPs houve diminuição de ST e manutenção de PL na maioria das concentrações (Figura 11 e 13). Segundo Parrish (2000), o PL pode ser utilizado para indicar material biosintetizado. Nossos dados indicam que essa classe é responsável pela maior parte do conteúdo lipídico em *R. subcapitata*. Geng et al (2016) avaliaram o conteúdo de ST nas algas marinhas *Chaetoceros calcitrans*, *Isochrusis galbana*, *Diacronema viridis* e *Nannochloropsis oculata* entre 3,95 e 6,38% do total lipídico. Em nossos estudos, a quantidade de ST foi de 18 a 35% do total de lipídeo nas algas expostas à maiores concentrações de NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

Para outra classe de lipídeos neutros, TAG, houve aumento apenas em células algais submetidas à 5 mg L<sup>-1</sup> de NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e em 20,0 mg L<sup>-1</sup> de NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Figura 13b). As células começam a armazenar TAG em condições não favoráveis, caso não haja exigências para as sínteses de novos compostos de membrana (Gushina e Harwood, 2006), como o PL e ST. O PL aumentou junto com o TAG (20,0 mg L<sup>-1</sup> de NP Fe<sub>2</sub>CoO<sub>4</sub>), resultado que também foi encontrado, por Alonso et al. (2000), com a microalga *Phaeodactylum tricornutum* submetidas à limitação de nitrogênio.

Além de ST e TAG, as classes HC e ALC podem ser classificadas como lipídeos neutros. Chia et al. (2013 a) mostraram que sob efeitos de cádmio e limitação de nitrogênio as classes HC, ALC e ST presentes na alga *Chlorella vulgaris* constituíram menos de 5% da concentração total de lipídeos. Esses resultados são distintos dos encontrados neste estudo para as células submetidas aos três tipos de nanopartículas (somente HC representa cerca de 5% do total lipídios no controle e em alguns tratamentos é superior a 7%, com 9,64% em algas submetidas a 100,0 mg L<sup>-1</sup> de NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) (Fig 11a). Rocha et al. (2015) sugeriram que para a alga *Scenedesmus quadricauda*, sob limitação

de fosfato, a quantidade elevada de HC (cerca de 26% do total de lipídeos) faz parte de seu metabolismo saudável, o que também pode ser atribuído à espécie de microalga utilizada neste estudo.

As classes lipídicas são muitas vezes indicadores do estado fisiológico ou reservas das algas (Emdadi e Berland, 1989). Esses autores encontraram concentração de HC de 48% (*Pavlova lutheri*) e 78% (*Nannochloropsis salina*) em culturas na fase lag (fase latente, sem divisão celular) e evidenciaram, que nesse fase, a alta concentração de HC pode ser resultado de organismos em ambiente favorável, com alta oferta de sais, nutrientes e luminosidade. Na fase exponencial, as exigências energéticas são elevadas e há uma redução de lipídeos totais. Durante a fase estacionária na qual a divisão celular diminui de acordo com a quantidade de nutrientes e sais disponíveis, o metabolismo passa a acumular e sintetizar triglicérides. Assim, mesmo com a diminuição da taxa de crescimento em 96 horas (início da fase estacionária, Figura 2) a presença de NPs parecem ter favorecido a síntese de HC.

O FFA (ácidos graxos livres) estão presentes geralmente em pequenas quantidades nas células, sendo rapidamente incorporados ao TAG e PL (Pernet e Tremblay, 2003) No entanto, o aumento no nível de FFA presentes nas células submetidas às NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  pode estar correlacionado à degradação lipídica de PL e TAG somente em  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ , tratamento em que houve aumento de FFA e diminuição de PL (Figura 11c).

O aumento de ALC também está associado à hidrólise ou degradação de classes lipídicas e, assim como FFA, pode ser correlacionado ao PL, o qual é um componente essencial para as membranas celulares (Parrish, 1995 e 2000). Em nossos resultados, PL aumentou ou manteve-se igual ao controle quando observado o aumento de ALC (exceto em  $20,0 \text{ mg L}^{-1}$  de NP  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ ), sugerindo que as células algais permaneceram

saudáveis na maior parte dos tratamentos com as NPs, sendo PL a classe que mais contribuiu para o conteúdo total de lipídeos.

Os pigmentos das microalgas geralmente são compostos por uma proporção de AMPL (lipídeos polares livres em acetona) (Chia et al., 2013a; Lombardi e Wangersky, 1991). No presente estudo, a quantidade de AMPL pode ser correlacionada com o conteúdo de clorofila *a*. Esses dois parâmetros foram iguais aos controles em todas as NPs (exceto em 100 mg L<sup>-1</sup> de NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) e, portanto, evidenciam a correlação clorofila *a* e AMPL.

As cetonas (KET) são geralmente utilizadas como padrão interno em análises lipídicas, pois raramente são observadas em amostras planctônicas (Parrish, 2000). No presente estudo KET não foi utilizada como padrão interno, porém nos cromatogramas das amostras foram identificados picos correspondentes a KET em *R. subcapitata*. Dunstan et al (1998) identificaram KET (25,6% do total lipídico) em *Isochrysis* sp., alga marinha da classe Prymnesiophyta. Em O'Neil et al (2014) metil e etil cetonas (alquenonas) fazem parte de grupo único de lipídeos sintetizados apenas por Haptophyta (Prymnesiophyta), sendo caracterizadas como bioindicadores algais para estudos de paleotemperatura e de ecossistemas marinhos modernos (Li et al., 2014). Dessa forma, a identificação de KET na Chlorophyta *R. subcapitata* é pouco provável. Os picos de KET identificados nas amostras podem ser da classe metil éster (ME), uma vez que o valor de retenção de KET e ME são próximos (Lombardi e Wangersky, 1995) e essa classe pode ocorrer em Chlorophyceae (Haik, 2011). Em nossas amostras a classe ME não pôde ser quantificada, pois o padrão composto das classes lipídicas utilizado nas curvas de calibração não contém ME e, assim, a quantidade dessa classe em pg cel<sup>-1</sup> não foi determinada.

Tendo-se em vista a produção e comercialização crescentes de NPs magnéticas em função de uma infinidade de aplicações em diversas áreas, a entrada desses compostos em ambientes aquáticos com consequente exposição da biota, é inevitável (Xu et al., 2012) e deve ser avaliada. A baixa toxicidade das NPs do presente estudo pode favorecer o crescimento de aplicações dessas partículas em processos de remediação ambiental e produção de biodiesel.

Sabe-se que as NPs de magnetita já são utilizadas em nanoremediação e seu potencial tem sido explorado em pesquisas que incluem a diminuição de cromo na água (Jabeen et al., 2011; Hao et al., 2010), remoção de pesticidas organofosforados (Daumann et al., 2014), remoção de cobre de rios poluídos (Hu et al., 2005), entre outros. Porém os dados ecológicos sobre a toxicidade dessas NPs e os riscos após sua utilização ainda são escassos (Jang et al., 2014; Peeters et al., 2016). Diante disso, nosso estudo contribui justificar a aplicabilidade dessas partículas, sobretudo a magnetita, em remediação ambiental. Além disso, o uso dessas NPs em função da baixa toxicidade apresentada deve ser encorajado, visto que contribuem para o advento de tecnologias mais eficientes para produção de biocombustíveis, como a técnica de colheitas de células algais por magnetismo e o aumento da produção lipídica, observada nesse estudo.

## 6. Conclusões

Nanopartículas magnéticas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e nanopartículas magnéticas bimetálicas ( $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) apresentaram poucos efeitos tóxicos na concentração de clorofila *a* e na taxa de crescimento da microalga *R. subcapitata*. Portanto, a utilização dessas nanopartículas magnéticas em processos de remediação ambiental pode ser considerada segura para essa espécie de microalga.

A presença das nanopartículas em concentrações elevadas interferiu no conteúdo de proteínas, carboidratos, lipídeos e classe lipídicas nas células algais, mas não ocasionou prejuízos graves à fisiologia das microalgas. A quantidade de proteína e carboidratos presentes nas células indicou boa condição fisiológica das microalgas mesmo em concentrações elevadas das nanopartículas estudadas. O acúmulo de lipídeos totais e algumas classes lipídicas, observado nas microalgas na presença de nanopartículas magnéticas em condições de baixa toxicidade, pode ser um bom indicativo do potencial desses organismos para utilização na produção de biocombustíveis.

Apesar dos efeitos tóxicos sobre as taxas de crescimento, clorofila *a* e composição bioquímica serem baixos, as nanopartículas bimetálicas em função dos íons cobre e cobalto, causaram maiores alterações em *R. subcapitata* em comparação às nanopartículas de magnetita.



## Referências

- ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011 (ABNT NBR 12648). Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 24p.
- AFNOR, 1980. Association Française de Normalisation Afnor. Norme experimental T90-304: Essais dès cause. Détermination de L'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance.
- Ahmad, F., Yao, H., Zhou, Y., & Liu, X., 2015. Toxicity of cobalt ferrite (CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) nanobeads in *Chlorella vulgaris*: Interaction, adaptation and oxidative stress. *Chemosphere*, 139, 479-485. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.008>
- Alonso, D. L., Belarbi, E. H., Fernández-Sevilla, J. M., Rodríguez-Ruiz, J., Grima, E. M. 2000. Acyl lipid composition variation related to culture age and nitrogen concentration in continuous culture of the microalga *Phaeodactylum tricornutum*. *Phytochemistry*, 54(5), 461-471. [http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)00084-4](http://dx.doi.org/10.1016/S0031-9422(00)00084-4)
- Arbilda, J. J., Villavicencio, G., Urrestarazu, P., Opazo, M., Brix, K. V., Adams, W. J., & Rodriguez, P. H., 2016. Effect of Fe (III) on *Pseudokirchneriella subcapitata* at circumneutral pH in standard laboratory tests is explained by nutrient sequestration. *Environ. Toxicol Chem.* <http://dx.doi.org/10.1039/C5EN00057B>
- Aruoja, V., Dubourguier, H. C., Kasemets, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci Total Environ*, 407(4), 1461-1468. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.053>
- Aruoja, V., Pokhrel, S., Sihtmäe, M., Mortimer, M., Mädler, L., & Kahru, A. (2015). Toxicity of 12 metal-based nanoparticles to algae, bacteria and protozoa. *Environ. Sci. Nano*, 2(6), 630-644.
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., Wiesner, M. R., 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol*, 4 (10), 634-641. <http://dx.doi.org/10.1038/nnano.2009.242>
- Blinova, I., Ivask, A., Heinlaan, M., Mortimer, M., & Kahru, A., 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. *Environ Pollut*, 158(1), 41-47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.017>
- Bogdan, N., Vetrone, F., Ozin, G. A., & Capobianco, J. A., 2011. Synthesis of ligand-free colloiddally stable water dispersible brightly luminescent lanthanide-doped upconverting nanoparticles. *Nano letters*, 11(2), 835-840. <http://dx.doi.org/10.1021/nl1041929>
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72(1-2), 248-254. [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)
- Buschmann, H. J., Wolff, T. (1999). Fluorescence of 1-anilino-naphthalene-8-sulfonate in solid macrocyclic environments. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 121(2), 99-103. [http://dx.doi.org/10.1016/S1010-6030\(98\)00459-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1010-6030(98)00459-6)
- Casali-Pereira, M.P., 2013 Efeitos do agrotóxico Vertimec® 18 EC para o zooplâncton e fitoplâncton: análises laboratoriais com o produto comercial e amostras de mesocosmos artificialmente contaminados (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Chen, P. J., Su, C. H., Tseng, C. Y., Tan, S. W., & Cheng, C. H., 2011. Toxicity assessments of nanoscale zerovalent iron and its oxidation products in medaka (*Oryzias latipes*) fish. *Mar Pollut Bull*, 63(5), 339-346. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2011.02.045>
- Chen, X., Zhu, X., Li, R., Yao, H. Lu, Z. e Yang, X. Hanchao, Y., Zhisong, L., Xu, Y., 2012. Photosynthetic toxicity and oxidative damage induced by nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> on *Chlorella vulgaris* in aquatic environment. *Open J Ecol.* <http://dx.doi.org/10.4236/oje.2012.21003>

- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., Parrish, C. C., 2013. Effects of cadmium and nitrogen on lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Eur J Phycol*, 48(1), 1-11. <http://dx.doi.org/10.1080/09670262.2012.750687>
- Chia, M. A., Lombardi, A. T., Melão, M. G. G., Parrish, C. C., 2013. Lipid composition of *Chlorella vulgaris* (Trebouxiophyceae) as a function of different cadmium and phosphate concentrations. *Aquat Toxicol*, 128, 171-182. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.12.004>
- Daumann, L. J., Larrabee, J. A., Ollis, D., Schenk, G., Gahan, L. R., 2014. Immobilization of the enzyme GpdQ on magnetite nanoparticles for organophosphate pesticide bioremediation. *J Inorg Biochem*, 131, 1-7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2013.10.007>
- Demirbas, A., Demirbas, M. F., 2011. Importance of algae oil as a source of biodiesel. *Energy Convers Manage*, 52(1), 163-170. <http://dx.doi.org/10.1016/j.enconman.2010.06.055>
- Dunstan, G. A., Volkman, J. K., Barrett, S. M., Garland, C. D., 1993. Changes in the lipid composition and maximisation of the polyunsaturated fatty acid content of three microalgae grown in mass culture. *J Appl Phycol*, 5(1), <http://dx.doi.org/71-83.10.1007/BF02182424>
- Duraiarasan, S., Razack, S. A., Manickam, A., Munusamy, A., Syed, M. B., Ali, M. Y., Mohiuddin, M. S., 2016. Direct conversion of lipids from marine microalga *C. salina* to biodiesel with immobilised enzymes using magnetic nanoparticle. *J Environ Chem Eng*, 4(1), 1393-1398. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2015.12.030>
- El-Sheekh, M. M., El-Naggar, A. H., Osman, M. E. H., & El-Mazaly, E., 2003. Effect of cobalt on growth, pigments and the photosynthetic electron transport in *Monoraphidium minutum* and *Nitzschia perminuta*. *Brazilian J Plant Physiol*, 15(3), 159-166. <http://dx.doi.org/10.1590/S1677-04202003000300005>
- Emdadi, D., e Berland, B., 1989. Variation in lipid class composition during batch growth of *Nannochloropsis salina* and *Pavlova lutheri*. *Mar Chem*, 26(3), 215-225. [http://dx.doi.org/10.1016/0304-4203\(89\)90004-2](http://dx.doi.org/10.1016/0304-4203(89)90004-2)
- Fai, P. B., Grant, A., Reid, B., 2007. Chlorophyll *a* fluorescence as a biomarker for rapid toxicity assessment. *Environ Toxicol Chem*, 26(7), 1520-1531. <http://dx.doi.org/10.1897/06-394R1.1>
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226(1), 497-509. PMID: 13428781
- Ganf, G. G., Stone, S. J. L., Oliver, R. L., 1986. Use of protein to carbohydrate ratios to analyse for nutrient deficiency in phytoplankton. *Mar Fresh Res*, 37(2), 183-197. <http://dx.doi.org/10.1071/MF9860183>
- Gasol, J. M., Zweifel, U. L., Peters, F., Fuhrman, J. A., & Hagström, Å., 1999. Significance of size and nucleic acid content heterogeneity as measured by flow cytometry in natural planktonic bacteria. *Appl Environ Microb*, 65(10), 4475-4483.
- Gaumet, M., Vargas, A., Gurny, R., & Delie, F., 2008. Nanoparticles for drug delivery: the need for precision in reporting particle size parameters. *Eur J Pharm Biophar*, 69(1), 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2007.08.001>
- Gong, N., Shao, K., Feng, W., Lin, Z., Liang, C., Sun, Y., 2011. Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. *Chemosphere*, 83(4), 510-516. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2010.12.059>
- Gottschalk, F., Sonderer, T., Scholz, R. W., & Nowack, B., 2010. Possibilities and limitations of modeling environmental exposure to engineered nanomaterials by probabilistic material flow analysis. *Environ toxicol Chem*, 29(5). <http://dx.doi.org/1036-1048.10.1002/etc.135>
- Griffitt, R. J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J. C., & Barber, D. S., 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ Toxicol Chem*, 27(9), 1972-1978. <http://dx.doi.org/10.1897/08-002.1>

- Grima, E. M., Belarbi, E. H., Fernández, F. A., Medina, A. R., Chisti, Y., 2003. Recovery of microalgal biomass and metabolites: process options and economics. *Biotechnol Adv*, 20(7), 491-515. [http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750\(02\)00050-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0734-9750(02)00050-2)
- Gupta, A. K., Gupta, M., 2005. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. *Biomaterials*, 26(18), 3995-4021.
- Gushina, I.A., Harwood, J.L., 2006. Lead and copper effects on lipid metabolism in cultured lichen photobionts with different phosphorus status. *Phytochemistry* 67, 1731–1739. PMID: 16524604
- Haik, Y., Selim, M. Y., & Abdulrehman, T., 2011. Combustion of algae oil methyl ester in an indirect injection diesel engine. *Energy*, 36(3), 1827-1835. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2010.11.017>
- Hao, Y. M., Man, C., Hu, Z. B., 2010. Effective removal of Cu (II) ions from aqueous solution by amino-functionalized magnetic nanoparticles. *J Haz Mat*, 184(1), 392-399. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2010.08.048>
- Hazeem, L. J., Waheed, F. A., Rashdan, S., Bououdina, M., Brunet, L., Slomianny, C., Elmeselmani, W. A., 2015. Effect of magnetic iron oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles on the growth and photosynthetic pigment content of *Picochlorum* sp. *Environ Sci Pollut R.*, 22(15), 11728-11739. <http://dx.doi.org/doi:10.1007/s11356-015-4370-5>
- Hu, J., Chen, G., Lo, I. M., 2005. Removal and recovery of Cr (VI) from wastewater by maghemite nanoparticles. *Water Res*, 39(18), 4528-4536. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2005.05.051>
- Hu, Y. R., Wang, F., Wang, S. K., Liu, C. Z., Guo, C., 2013. Efficient harvesting of marine microalgae *Nannochloropsis maritima* using magnetic nanoparticles. *Bioresource Technol*, 138, 387-390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2013.04.016>
- Huang, X., Wei, L., Huang, Z., & Yan, J., 2014. Effect of high ferric ion concentrations on total lipids and lipid characteristics of *Tetraselmis subcordiformis*, *Nannochloropsis oculata* and *Pavlova viridis*. *Journal of applied phycology*, 26(1), 105-114. DOI: 10.1007/s10811-013-0056-x
- Hund-Rinke, K., Simon, M., 2006. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO<sub>2</sub>) on algae and daphnids (8 pp). *Environ Sci Pollut Res*, 13(4), 225-232. PMID: 16910119
- Jabeen, H., Chandra, V., Jung, S., Lee, J. W., Kim, K. S., Kim, S. B., 2011. Enhanced Cr (vi) removal using iron nanoparticle decorated graphene. *Nanoscale*, 3, 3583-3585. <http://dx.doi.org/10.1039/C1NR10549C>
- Jang, M. H., Lim, M., & Hwang, Y. S., 2014. Potential environmental implications of nanoscale zero-valent iron particles for environmental remediation. *Environmental health and toxicology*, 29. <http://dx.doi.org/10.5620/eh.t.e2014022>
- Jang, M. H., Lim, M., Hwang, Y. S., 2014. Potential environmental implications of nanoscale zero-valent iron particles for environmental remediation. *Environ Health Toxicol*, 29. <http://dx.doi.org/doi:10.5620/eh.t.e2014022>
- Ji, J., Long, Z., & Lin, D. (2011). Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. *Chemical Engineering Journal*, 170(2), 525-530. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cej.2010.11.026>
- Jiang, Y., Zhu, Y., Hu, Z., Lei, A., & Wang, J., 2016. Towards elucidation of the toxic mechanism of copper on the model green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Ecotoxicology*, 25(7), 1417-1425. DOI: 10.1007/s10646-016-1692-0
- Kadar, E., Rooks, P., Lakey, C., White, D. A., 2012. The effect of engineered iron nanoparticles on growth and metabolic status of marine microalgae cultures. *Sci Total Environ*, 439, 8-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.09.010>
- Käkinen, A., Ding, F., Chen, P., Mortimer, M., Kahru, A., & Ke, P. C., 2013. Interaction of firefly luciferase and silver nanoparticles and its impact on enzyme activity. *Nanotechnology*, 24(34), 345101.

- Khan, M. I., Mohammad, A., Patil, G., Naqvi, S. A. H., Chauhan, L. K. S., Ahmad, I., 2012. Induction of ROS, mitochondrial damage and autophagy in lung epithelial cancer cells by iron oxide nanoparticles. *Biomaterials*, 33(5), 1477-1488. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.10.080>
- Kilham, S., Kreeger, D., Goulden, C., Lynn, S., 1997. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biol*, 38(3), 591-596. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2427.1997.00231.x>
- Kim, E. J., Le Thanh, T., Chang, Y. S., 2014. Comparative toxicity of bimetallic Fe nanoparticles toward *Escherichia coli*: mechanism and environmental implications. *Environ Sci: Nano*, 1(3), 233-237. <http://dx.doi.org/10.1039/C3EN00057E>
- Kim, J., Yoo, G., Lee, H., Lim, J., Kim, K., Kim, C. W., ... & Yang, J. W., 2013. Methods of downstream processing for the production of biodiesel from microalgae. *Biotechnology advances*, 31(6), 862-876. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.04.006>
- Lee, K., Lee, S. Y., Na, J. G., Jeon, S. G., Praveenkumar, R., Kim, D. M., Oh, Y. K., 2013. Magnetophoretic harvesting of oleaginous *Chlorella* sp. by using biocompatible chitosan/magnetic nanoparticle composites. *Bioresource Technol*, 149, 575-578. <http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.biortech.2013.09.074>
- Lee, Y. C., Lee, K., Oh, Y. K., 2014. Recent nanoparticle engineering advances in microalgal cultivation and harvesting processes of biodiesel production: A review. *Bioresource Technol*, 184, 63-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.10.145>
- Lei, C., Zhang, L., Yang, K., Zhu, L., & Lin, D., 2016. Toxicity of iron-based nanoparticles to green algae: Effects of particle size, crystal phase, oxidation state and environmental aging. *Environmental Pollution*, 218, 505-512. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.030>
- Li, L., Liu, J., He, J., & Wang, H., 2014. Factors affecting the abundance and community structure of the phytoplankton in northern South China Sea in the summer of 2008: a biomarker study. *Chinese Science Bulletin*, 59(10), 981-991. DOI: 10.1007/s11434-013-0106-4
- Lim, J. K., Chieh, D. C. J., Jalak, S. A., Toh, P. Y., Yasin, N. H. M., Ng, B. W., Ahmad, A. L., 2012. Rapid magnetophoretic separation of microalgae. *Small*, 8 (11), 1683-1692. <http://dx.doi.org/doi:10.1002/sml.201102400>
- Liu, D., Wong, P. T. S., Dutka, B. J., 1973. Determination of carbohydrate in lake sediment by a modified phenol-sulfuric acid method. *Water res*, 7(5), 741-746. [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(73\)90090-0](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(73)90090-0)
- Lombardi, A. T., & Maldonado, M. T., 2011. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. *Photosynthesis research*, 108(1), 77-87. <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-011-9655-z>
- Lombardi, A. T., & Wangersky, P. J., 1995. Particulate lipid class composition of three marine phytoplankters *Chaetoceros gracilis*, *Isochrysis galbana* (Tahiti) and *Dunaliella tertiolecta* grown in batch culture. *Hydrobiologia*, 306(1), 1-6. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00007853>
- Lombardi, A. T., Vieira, A. A., Sartori, L. A., 2002. Mucilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kirchneriella aperta* (Chlorococcales). *J Phycol*, 38(2), 332-337. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1529-8817.2002.00126.x>
- Lombardi, A. T., Wangersky, P. J., 1991. Influence of phosphorus and silicon on lipid class production by the marine diatom *Chaetoceros gracilis* grown in turbidostat cage cultures. *Mar ecol-prog ser. Oldendorf*, 77(1), 39-47. <http://dx.doi.org/10.3354/meps077039>
- Lustigman, B., Lee, L. H., & Weiss-Magasic, C., 1995. Effects of cobalt and pH on the growth of *Chlamydomonas reinhardtii*. *B Environmental Contam toxicology*, 55(1), 65-72. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00212390>
- Macfie, S. M., Tarmohamed, Y., & Welbourn, P. M., 1994. Effects of cadmium, cobalt, copper, and nickel on growth of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the influences of the cell wall and pH. *Arch Environ Com Tox*, 27(4), 454-458. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00214835>

- Marciello, M., Connord, V., Veintemillas-Verdaguer, S., Vergés, M. A., Carrey, J., Respaud, M., Morales, M. P., 2013. Large-scale production of biocompatible magnetite nanocrystals with high saturation magnetization values through green aqueous synthesis. *J Mat Chem B*, 1(43), 5995-6004. <http://dx.doi.org/10.1039/C3TB20949K>
- Markou, G., Angelidaki, I., Georgakakis, D., 2012. Microalgal carbohydrates: an overview of the factors influencing carbohydrates production, and of main bioconversion technologies for production of biofuels. *Appl Microbiolol Biot*, 96(3), 631-645, <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-012-4398-0>
- Mata, T. M., Martins, A. A., Caetano, N. S., 2010. Microalgae for biodiesel production and other applications: a review. *Renew Sust Energ Rev*, 14(1), 217-232. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2009.07.020>
- Morrissey, J., Bowler, C., 2011. Iron utilization in marine cyanobacteria and eukaryotic algae. *Front microbiol*, 90.<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2012.00043>
- Mubarak, M., Shaija, A., Suchithra, T. V., 2015. A review on the extraction of lipid from microalgae for biodiesel production. *Algal Research*, 7, 117-123. <http://dx.doi.org/10.1016/j.algal.2014.10.008>
- Navarro, E., Baun, A., Behra, R., Hartmann, N. B., Filser, J., Miao, A. J., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17(5), 372-386. <http://dx.doi.org/10.1007/s10646-008-0214-0>
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761), 622-627. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1114397>.
- Nowack, B., Bucheli, T. D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ Pollut*, 150 (1), 5-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2007.06.006>
- O'Neil, G. W., Knothe, G., Williams, J. R., Burlow, N. P., Culler, A. R., Corliss, J. M., e Reddy, C. M., 2014. Synthesis and analysis of an alkenone-free biodiesel from Isochrysis sp. *Energ Fuel*, 28(4), 2677-2683. <http://dx.doi.org/10.1021/ef500246h>
- Oberdörster, G., Oberdörster, E., & Oberdörster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Persp*, 823-839.
- OECD, *Organization for Economic Co-operations and Development*, 2002. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris.
- Ohse, S., Derner, R. B., Ozório, R. Á., Cunha, P. C. R., Lamarca, C. P., dos Santos, M. E., & Mendes, L. B. B., 2007. Revisão: Sequestro de carbono realizado por microalgas e florestas e a capacidade de produção de lipídios pelas microalgas. *INSULA Revista de Botânica*, 36, 39.
- Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., Popovic, R., 2012. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicol Environl Saf*, 78, 80-85.<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.012>
- Parrish, C. C., 1987. Separation of aquatic lipid classes by Chromarod thin-layer chromatography with measurement by latroscan flame ionization detection. *Can J Fish Aquat Sci*, 44(4), 722-731. <http://dx.doi.org/10.1139/f87-087>
- Parrish, C. C., 1999. Determination of total lipid, lipid classes, and fatty acids in aquatic samples. In *Lipids in freshwater ecosystems* (pp. 4-20). Springer New York. <http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4612-0547-0>
- Parrish, C. C., Abrajano, T. A., Budge, S. M., Helleur, R. J., Hudson, E. D., Pulchan, K., Ramos, C., 2000. Lipid and phenolic biomarkers in marine ecosystems: analysis and applications. In *Mar Chem* (pp. 193-223). Springer Berlin Heidelberg. [http://dx.doi.org/10.1007/10683826\\_8](http://dx.doi.org/10.1007/10683826_8)

- Parrish, C. C., McKenzie, C. H., MacDonald, B. A., Hatfield, E. A., 1995. Seasonal studies of seston lipids in relation to microplankton species composition and scallop growth in South Broad Cove, Newfoundland. *Mar Ecol-Progr Ser*, 129, 151-164. <http://www.int-res.com/abstracts/meps/v129/>
- Peeters, K., Lespes, G., Zuliani, T., Ščančar, J., Milačič, R., 2016. The fate of iron nanoparticles in environmental waters treated with nanoscale zero-valent iron, FeONPs and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs. *Water Res.*, 94, 315-327. <http://dx.doi.org/doi: 10.1016/j.watres.2016.03.004>
- Peniuk, G. T., Schnurr, P. J., & Allen, D. G., 2016. Identification and quantification of suspended algae and bacteria populations using flow cytometry: applications for algae biofuel and biochemical growth systems. *J Appl Phycol*, 28(1), 95-104. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-015-0569-6>
- Pernet, F., Tremblay, R., 2003. Effect of ultrasonication and grinding on the determination of lipid class content of microalgae harvested on filters. *Lipids*, 38(11), 1191-1195. <http://dx.doi.org/10.1007/s11745-003-1178-6>
- Qu, S., Yang, H., Ren, D., Kan, S., Zou, G., Li, D., Li, M., 1999. Magnetite nanoparticles prepared by precipitation from partially reduced ferric chloride aqueous solutions. *J Colloid Interf Sci*, 215(1), 190-192. <http://dx.doi.org/10.1006/jcis.1999.6185>
- Rajiv, S., Jerobin, J., Saranya, V., Nainawat, M., Sharma, A., Makwana, P., Mukherjee, A., 2016. Comparative cytotoxicity and genotoxicity of cobalt (II, III) oxide, iron (III) oxide, silicon dioxide, and aluminum oxide nanoparticles on human lymphocytes in vitro. *Hum Exp Toxicol*, 35(2), 170-183. <http://dx.doi.org/10.1177/0960327115579208>
- Rausch, T., 1981. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. Comparison of methods for extracting protein. *Hydrobiologia*, 78(3), 237-251.
- Rocha, G. S., Pinto, F. H. V., Melão, M. G. G., Lombardi, A. T., 2015. Growing *Scenedesmus quadricauda* in used culture media: is it viable? *J Appl Phycol*, 27(1), 171-178. <http://dx.doi.org/10.1007/s10811-014-0320-8>
- Römer, I., White, T. A., Baalousha, M., Chipman, K., Viant, M. R., Lead, J. R., 2011. Aggregation and dispersion of silver nanoparticles in exposure media for aquatic toxicity tests. *J Chromatogr A*, 1218(27), 4226-4233. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2011.03.034>
- Sadiq, I. M., Dalai, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., 2011. Ecotoxicity study of titania (TiO<sub>2</sub>) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Ecotox Environ Safe*, 74(5), 1180-1187. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.03.006>
- Sarma, S. J., Das, R. K., Brar, S. K., Le Bihan, Y., Buelna, G., Verma, M., Soccol, C. R., 2014. Application of magnesium sulfate and its nanoparticles for enhanced lipid production by mixotrophic cultivation of algae using biodiesel waste. *Energy*, 78, 16-22. <http://dx.doi.org/10.1016/j.energy.2014.04.112>
- Sarmiento, H., Unrein, F., Isumbisho, M., Stenuite, S., Gasol, J. M., & DESCY, J. P., 2008. Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa. *Freshwater Biol*, 53(4), 756-771. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01939.x>
- Schwab, F., Bucheli, T. D., Lukhele, L. P., Magrez, A., Nowack, B., Sigg, L., Knauer, K., 2011. Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration?. *Environ Sci Technol*, 45(14), 6136-6144. <http://dx.doi.org/10.1021/es200506b>
- Servaites, J. C., Faeth, J. L., Sidhu, S. S., 2012. A dye binding method for measurement of total protein in microalgae. *Anal Biochem*, 421(1), 75-80. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2011.10.047>
- Stauber, J. L., & Florence, T. M., 1987. Mechanism of toxicity of ionic copper and copper complexes to algae. *Marine biology*, 94(4), 511-519. DOI: 10.1007/BF00431397 [http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799\(01\)01924-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0167-7799(01)01924-2)

- Stauber, J. L., Franklin, N. M., & Adams, M. S., 2002. Applications of flow cytometry to ecotoxicity testing using microalgae. *TRENDS in Biotechnology*, 20(4), 141-143.
- Tang, S. C., e Lo, I. M., 2013. Magnetic nanoparticles: essential factors for sustainable environmental applications. *Water research*, 47(8), 2613-2632. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2013.02.039>
- Tejamaya, M., Römer, I., Merrifield, R. C., Lead, J. R., 2012. Stability of citrate, PVP, and PEG coated silver nanoparticles in ecotoxicology media. *Environ Sci Technol*, 46(13), 7011-7017. <http://dx.doi.org/10.1021/es2038596>
- Toh, P. Y., Ng, B. W., Ahmad, A. L., Chieh, D. C. J., & Lim, J., 2014. Magnetophoretic separation of *Chlorella* sp.: role of cationic polymer binder. *Process Safety and Environmental Protection*, 92(6), 515-521. <http://dx.doi.org/10.1016/j.psep.2014.03.010>
- Toh, P. Y., Tai, W. Y., Ahmad, A. L., Lim, J. K., & Chan, D. J. C., 2016. Toxicity of bare and surfaced functionalized iron oxide nanoparticles towards microalgae. *International journal of phytoremediation*, 18(6), 643-650. <http://dx.doi.org/10.1080/15226514.2015.1086300>
- Van Grieken, R., & Markowicz, A. (Eds.). (2001). *Handbook of X-ray Spectrometry*. CRC Press
- Vidotti, E. C., Rollemberg, M. D. E., 2004. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Química nova*, 27(1), 139-145.
- Williams, P. J. L. B., Laurens, L. M., 2010. Microalgae as biodiesel, biomass feedstocks: review, analysis of the biochemistry, energetics, economics. *Energ Environ Sci*, 3(5), 554-590. <http://dx.doi.org/10.1039/B924978H>
- Xu, P., Zeng, G. M., Huang, D. L., Feng, C. L., Hu, S., Zhao, M. H., Liu, Z. F., 2012. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: a review. *Sci Total Environ*, 424, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.02.023>
- Yu, L., Liu, J., Wu, K., Klein, T., Jiang, Y., Wang, J. P., 2014. Evaluation of Hyperthermia of Magnetic Nanoparticles by Dehydrating DNA. *Sci Rep*, 4. <http://dx.doi.org/10.1038/srep07216>
- Zhang, X. L., Yan, S., Tyagi, R. D., Surampalli, R. Y., 2013. Biodiesel production from heterotrophic microalgae through transesterification and nanotechnology application in the production. *Renew Sust Energ Rev*, 26, 216-223. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2013.05.061>
- Zheng, J., Clogston, J. D., Patri, A. K., Dobrovolskaia, M. A., e McNeil, S. E., 2011. Sterilization of silver nanoparticles using standard gamma irradiation procedure affects particle integrity and biocompatibility. *J Nanomedic Nanotechnol*, S5:001. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7439.S5-001>

**CAPÍTULO 2. FLUORESCÊNCIA DA CLOROFILA *A* E ESTRESSE OXIDATIVO  
NA MICROALGA *Raphidocelis subcapitata* NA PRESENÇA DE  
NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS**



## RESUMO

O uso de nanopartículas (NPs) magnéticas no cenário atual é crescente em função da ampla aplicabilidade desses materiais em diversas áreas que abrange desde terapias potenciais contra o câncer até a remediação de ambientes aquáticos pela remoção de metais da água. No entanto, dados ecotoxicológicos sobre esses nanomateriais não são concomitantes à sua utilização. *Endpoints* sensíveis, como parâmetros de fluorescência da clorofila e indução de estresse oxidativo pela produção de Espécies Reativas ao Oxigênio (do inglês Reactive Oxygen Species - ROS) são essenciais para a avaliação de potenciais poluentes, como metais e NPs. Assim, o presente trabalho teve como principal objetivo avaliar se o aparato fotossintético da microalga *Raphidocelis subcapitata* foi afetado pela exposição às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (magnetita); NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (hematita com cobre adsorvido) e NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (ferrita de cobalto) através de dados de rendimento quântico máximo ( $\phi_m$ ) e efetivo ( $\phi_m'$ ), dissipação fotoquímica (Qp) e não-fotoquímica (Qn e NPQ) e complexo de evolução do oxigênio (OEC). Nossos resultados evidenciam que para as células submetidas à 100,0 mg L<sup>-1</sup> NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> o valor de OEC aumentou 185,3% em 48 horas. Assim como Qn que após 48 horas de exposição diminuiu significativamente e atingiu valores negativos para às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. O  $\phi_m$  e o OEC foram sensíveis à exposição às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>,  $\phi_m$  diminuiu 19,3% e OEC aumentou 51,0% para a concentração de 50,0 mg L<sup>-1</sup> após 96 horas de exposição. O  $\phi_m'$  foi um parâmetro sensível às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (diminuiu 14,6% em 50,0 mg L<sup>-1</sup>) e NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (diminuiu 29,3% em 100,0 mg L<sup>-1</sup>). O NPQ diminuiu de 32,4 a 81,0% nos tratamentos de 20,0 a 100,0 mg L<sup>-1</sup> de NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e para as NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> diminuiu 44,0% em 50,0 mg L<sup>-1</sup>. A produção de ROS aumentou 30,4% após 96 horas de exposição às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> na concentração de 50 mg L<sup>-1</sup>. Para as NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> a produção de ROS foi 157,6 e 142,3%

maior nos tratamentos com 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente em 0 hora. Para as NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, a produção de ROS aumentou para 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup> em 93,6 e 50,7%, respectivamente, após 96 horas. Assim, o estresse oxidativo induzido por ROS mostrou ser um biomarcador sensível, principalmente para às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Portanto, nossos resultados evidenciam que as células algais de *R. subcapitata* sofreram alterações fisiológicas significantes na presença de nanopartículas magnéticas, sendo afetadas principalmente pelas NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

Palavras-chave: estresse oxidativo; ferrita de cobalto; hematita com cobre adsorvido; magnetita; microalgas; rendimento quântico efetivo; rendimento quântico máximo.

## ABSTRACT

The use of magnetic nanoparticles (NPs) in the current scenario is ascending due to the broad applicability of these materials in several areas, ranging from potential cancer therapies until the remediation of aquatic environments by removing water metals. However, ecotoxicological data on these nanomaterials are not concomitant with their use. sensitive *Endpoints* as parameters of chlorophyll fluorescence and induction of oxidative stress by the production of reactive oxygen species (ROS) are essential for the evaluation of potential pollutants, such as metals and NPs. Thus, this study aimed to evaluate whether the photosynthetic apparatus of microalgae *Raphidocelis subcapitata* was affected by exposure to Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs (magnetite); Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NPs (hematite copper adsorbed) and CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NPs (cobalt ferrite) at maximum quantum yield data ( $\phi_m$ ) and effective quantum yield ( $\phi_m'$ ), photochemical dissipation (Qp) and non-photochemical (Qn and NPQ) and oxygen evolution complex (OEC). Our results show that the  $\phi_m$  and OEC were sensitive to exposure to Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NPs,  $\phi_m$  decreased 19.3% and OEC increased 51.0% for the concentration of 50.0 mg L<sup>-1</sup> after 96 hours of exposure. For the cells subjected to 100.0 mg L<sup>-1</sup> Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs the value of OEC increased 185.3% in 48 hours. Just as Qn that after 48 hours of exposure decreased significantly and reached negative values for the Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs. The  $\phi_m'$  was a sensitive parameter to Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NPS (decreased 14.6% in 50.0 mg L<sup>-1</sup>) and CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NPs (decreased 29.3% in 100.0 mg L<sup>-1</sup>). The NPQ decreased from 32.4 to 81.0% in the treatments from 20.0 to 100.0 mg L<sup>-1</sup> of CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NP and to Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NPs decreased 44.0% in 50.0 mg L<sup>-1</sup>. The ROS production increased by 30.4% after 96 hours of exposure to Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs at concentration of 50.0 mg L<sup>-1</sup>. For Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NPs, ROS production was 157.6 and 142.3% higher than in treatments with 50.0 and 100.0 mg L<sup>-1</sup>, respectively on 0 hour. For CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NPs, ROS production increased in 50.0 and 100.0

mg L<sup>-1</sup> in 93.6 and 50.7% respectively after 96 hours. Thus, oxidative stress induced by ROS proved to be a sensitive biomarker, especially for the Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NPs. Therefore, our results show that the algal cells of *R. subcapitata* suffered significant physiological changes in the presence of magnetic nanoparticles, being mainly affected by Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> NPs.

Keywords: cobalt ferrite; effective quantum yield; hematite with adsorbed copper; oxidative stress; magnetite; maximum quantum yield; microalgae.

## 1. Introdução

As nanopartículas (NPs) magnéticas possuem inúmeras aplicações em biomedicina, biotecnologia, ciência de materiais, engenharia e áreas ambientais. Suas aplicações e toxicidade relacionam-se à natureza de seus constituintes como ferro, cobalto, níquel, ao tamanho das partículas, composição do núcleo e revestimentos. (Akbarzadeh et al., 2012; Salabas).

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e ferrita de cobalto (NPs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) são as mais utilizadas na medicina e constituem uma ferramenta importante para evolução desse setor, sendo empregadas em tratamentos por hipertermia, entrega de drogas, nanosensores, terapia gênica, marcadores celulares, ressonância magnética, entre outros (Liu et al., 2012; Ahmad et al., 2015). Além disso, nanopartículas magnéticas de ferro revestidas com cobre podem ser utilizadas em tratamentos de água subterrâneas e de solos contaminados (Kim et al., 2014), em aditivos a base de óleo para separar superfícies em atrito (Padgurkas et al., 2012) e na síntese de álcoois superiores (HAS) via derivados de gás natural (Xiao et al., 2013). Diante das inúmeras aplicações das nanopartículas magnéticas e crescentes informações sobre suas propriedades, ainda há poucos dados sobre suas interações com o ambiente aquático e seus componentes (Arouja et al., 2009).

A fase clara da fotossíntese é caracterizada quando a absorção de fótons pelo pigmentos, principalmente a clorofila, ocorre associada a dois fotossistemas (PSI – centro de reação do fotossistema I e PSII - centro de reação do fotossistema II). Os pigmentos são incorporados na membrana interna dos tilacóides e absorvem a maior parte da energia da radiação fotossinteticamente ativa, transferindo a energia de excitação para os centros de reação dos fotossistemas. Elétrons derivados da separação da água com simultânea

produção de oxigênio são transferidos ao longo da cadeia de transporte de elétrons na membrana dos tilacóides, sendo que nesse processo são produzidos ATP e NADPH. Estes são utilizados no ciclo de redução do carbono (Ciclo de Calvin), que pode ocorrer na ausência de luz (“reações de escuro” da fotossíntese). No entanto, algumas enzimas envolvidas nessas “reações de escuro” necessitam de luz para a sua ativação (Lambers et al., 2008)

A fluorescência da clorofila *a* é um método rápido e não agressivo para mensurar o desempenho fotossintético de plantas e algas. Atualmente, o uso dessas medições em estudos toxicológicos e ecofisiológicos para avaliar o efeito de estressores (poluentes) e mudanças ambientais é bem difundido (Baker, 2008; kumar et al., 2014). A medição da fluorescência através de fluorimetria de amplitude de pulso modulada (PAM) é um método bem estabelecido e caracteriza o estado do aparato fotossintético, bem como a eficiência dos processos fotoquímicos no fotossistema II (PSII) (Giardia et al., 2001; Lombardi e Maldonado, 2011), fornecendo assim informações em diversos níveis do complexo fotossintético, iniciando com a absorção de luz, transferência e conversão de energia e terminando com a exportação de assimilados do cloroplasto (Schreiber, 1998).

A clorofila está associada à complexos de proteína-pigmento no PSII (fotossistema II), PSI (fotossistema I) e nos complexos de coleta de luz (do inglês *light-harvesting complexes* LHCs). Em temperatura ambiente, assume-se que as variações na fluorescência surgem apenas a partir do PSII, pois abaixo de 700 nm o sinal da fluorescência no PSI não é significativo (Baker, 2008). A energia luminosa absorvida pela clorofila pode ser direcionada aos processos fotossintéticos (fotoquímica), ser reemitida na forma de calor ou ser novamente emitida como luz (fluorescência). Esses processos concorrem entre si e não existem de forma isolada. (Baker, 2008; Murchie e Lawson, 2013).

As espécies reativas ao oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species* - ROS) são produtos do metabolismo do oxigênio relacionados à sinalização celular e homeostase (Ahmad et al., 2015). E incluem, por exemplo, radicais superóxido ( $\bullet\text{O}_2$ ), radicais hidroxila ( $\bullet\text{OH}$ ), peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e oxigênio atômico, sendo produtos do metabolismo oxidativo em condições normais, mas que situações de estresse, como toxicidade por metal ou NPs metálicas, podem elevar a produção de ROS. (Dao e Beardall, 2016).

A tolerância das algas à metais depende fortemente dos mecanismos de defesa que impedem o estresse oxidativo. Os metais estão envolvidos em diferentes mecanismos de geração de ROS, tais como ciclo de Haber-Weiss e mecanismo de reação de Fenton. Metais de transição como  $\text{Fe}^{3+}$  e  $\text{Cu}^{2+}$  participam do ciclo de Haber-Weiss que consiste na produção de  $\bullet\text{OH}$  a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  e  $\text{O}_2^-$ . Já metais como Cr (VI) podem gerar  $\bullet\text{OH}$  a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  pelo mecanismo de reação de Fenton. Nanopartículas de ferro com valência zero produzem  $\bullet\text{OH}$  a partir de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por reação tipo Fenton (Chen et al., 2012), mesmo mecanismo apresentado pelas NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (Xiaoxiao, 2012; Pinto et al., 2013).

Os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e o estresse oxidativo através da formação de ROS avaliados no presente estudo são métodos rápidos e podem mostrar-se mais sensíveis quando comparados aos que são tradicionalmente utilizados em estudos ecotoxicológicos em células algais, tais como avaliação da taxa de crescimento.

## 2. Objetivos

O presente estudo teve como objetivos principais:

- i) Avaliar a toxicidade de NPs de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), NPs de hematita com íons cobre adsorvidos ( $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ ) e NPs de ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) para a microalga *R. subcapitata* através dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a*.
- ii) Avaliar se as NPs de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), NPs de hematita com íons cobre adsorvidos ( $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ ) e NPs de ferrita de cobalto ( $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) podem induzir o estresse oxidativo nas células algais através da formação de Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS).



### 3. Material e métodos

#### 3.1 Exposição da microalga *Raphidocelis subcapitata* às nanopartículas magnéticas

A microalga *Raphidocelis subcapitata* (Chlorophyceae) foi obtida no Laboratório de Biotecnologia de Algas (Departamento de Botânica, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP). Os cultivos estoque foram preparados em meio LC Oligo (AFNOR, 1980) com o uso de água ultra-pura (Barnstead Easypure Rodi, USA) e pH ajustado para 7,0. Os meios de cultivo foram esterilizados em autoclave por 20 min a 121°C, em Erlenmeyers de policarbonato de 500 mL de capacidade contendo 250 mL de meio LC Oligo. Após 24 horas, o meio foi inoculado com  $5 \times 10^4$  cel mL<sup>-1</sup> de *Raphidocelis subcapitata* em fase exponencial de crescimento em cabine de fluxo laminar (Pachane, Brasil). Os cultivos estoque foram submetidos à agitação manual periódica, intensidade luminosa de 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , fotoperíodo de 12:12 h (luz:escuro), temperatura de 24±1°C e pH 7,0.

Microalgas em fase exponencial de crescimento foram expostas durante 96 horas às seguintes concentrações nominais de nanopartículas de magnetita (NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>): 0 (controle); 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup> (0;  $4,32 \times 10^{-6}$ ;  $2,16 \times 10^{-5}$ ;  $4,32 \times 10^{-5}$ ;  $8,60 \times 10^{-5}$ ;  $2,16 \times 10^{-4}$  e  $4,32 \times 10^{-4}$  mol L<sup>-1</sup>, respectivamente). Para as NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - as concentrações utilizadas foram: 0 (controle); 0,1; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup> (0;  $4,18 \times 10^{-7}$ ;  $4,18 \times 10^{-6}$ ;  $2,09 \times 10^{-5}$ ;  $4,18 \times 10^{-5}$ ;  $8,36 \times 10^{-5}$ ;  $2,09 \times 10^{-4}$  e mol L<sup>-1</sup>, respectivamente). Já para as NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> - as concentrações utilizadas foram 0 (controle); 0,65; 2,0; 5,0; 10,0; 20,0; 50,0; 100,0 mg L<sup>-1</sup> (0;  $2,77 \times 10^{-6}$ ;  $8,52 \times 10^{-6}$ ;  $2,13 \times 10^{-5}$ ;  $4,26 \times 10^{-5}$ ;  $8,52 \times 10^{-5}$ ;  $2,13 \times 10^{-4}$  e  $1,0 \times 10^{-4}$ , respectivamente). Tais concentrações foram

estabelecidas a partir de ensaios preliminares que avaliaram a inibição do crescimento celular a partir de concentrações crescentes das nanopartículas.

Os ensaios toxicológicos foram feitos com quatro réplicas e um branco (meio de cultivo adicionado das nanopartículas na ausência de algas) para cada concentração por um período de 96 horas. O controle consistiu em meio de cultivo sem adição de NPs.

Soluções estoque das NP  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e NP  $\text{Cu-F}_2\text{O}_4$  foram dispersas em sonicador de banho por 15 min a 40 KHz para o preparo das soluções de exposição. Estas também foram sonicadas por 15 min antes de serem adicionadas ao meio de cultivo. A solução estoque da NP  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  foi dispersa através de sonicador de ponta UNIQUE (Unique Group, Indaiatuba, Brasil) por 20 min fixado em potência de 20%, pois a mesma não foi fornecida em meio aquoso. Todas as soluções de trabalho foram preparadas em água ultra-pura autoclavada (121°C por 20 min).

### *3.2 Determinação da densidade celular*

A cada 24 horas, alíquotas de 1,8 mL foram retiradas para a determinação da densidade celular através do citômetro de fluxo. As alíquotas das culturas algais foram fixadas em solução de formol 10% (concentração final de 1%) por 10 min no escuro, congeladas em nitrogênio líquido e, armazenadas a -20°C para posterior análise em um citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) equipado com laser de íon-argônio azul de 15 mW com excitação no comprimento de onda de 488 nm. Antes da leitura, foram adicionados à amostra 10  $\mu\text{L}$  de padrão interno constituído de esferas fluorescentes de 6  $\mu\text{m}$  de diâmetro (Fluoresbrite carboxylate microspheres; Polysciences, Warrington, Pensilvânia, EUA). As amostras foram lidas em alta velocidade (aproximadamente 60  $\mu\text{L min}^{-1}$ ) com a contagem de cerca de 10.000 eventos

(número de células algais). Através do parâmetro SSC-H 90° (dispersão lateral, com intensidade de luz de 488 nm dispersa em ângulos retos) versus a intensidade de fluorescência detectada no canal FL3-H (fluorescência vermelha, que detecta a clorofila) foi possível contar as células da microalga *R. subcapitata* (seguindo o mesmo procedimento descrito por Sarmento et al., 2008). Para a aquisição de dados foi utilizado o software CellQuest Pro BD. Para tratamento dos dados foi utilizado o software FlowJo V10.0 (Treestar.com, EUA).

Os valores de IC50 (concentração inibitória média - inibição de 50% do crescimento das células algais em 96 horas de exposição foram determinados através do programa computacional ICp (Linear Interpolation Method for Sublethal Toxicity: The Inhibition Concentration versão 2.0, ano 1993).

### 3.3 Biomassa (clorofila *a*)

Para a determinação da concentração de clorofila *a*, análises da intensidade de fluorescência de *R. subcapitata* foram realizadas através de Fluorimetria com comprimento de onda de excitação de 440 nm (Fluorímetro Turner Designs-Trilogy, EUA). Para isso, foram coletados 3 mL de cada amostra das microalgas expostas às NPs em 0, 24, 48, 72 e 96 horas. O controle apresentava apenas meio LC Oligo. Para os tratamentos, o branco consistiu em meio LC Oligo e NPs nas concentrações correspondentes de exposição. Anteriormente às leituras, as amostras foram mantidas no escuro por 20 min.

As intensidades da fluorescência obtidas por fluorimetria foram utilizadas para o cálculo final da concentração de clorofila *a* (*in vivo*) da alga *R. subcapitata*. Para isso utilizou-se uma curva de calibração que relaciona a intensidade da fluorescência *in vivo*

(variável dependente) e a concentração de clorofila *a* extraída com dimetilsulfóxido (variável independente) para uma espécie de microalga de referência (*Chlorella sorokiniana*).

### 3.4 Eficiência fotossintética de *Raphidocelis subcapitata* na presença de nanopartículas magnéticas

As medições da indução da fluorescência da clorofila foram realizadas por meio do fluorômetro de amplitude modulada (Pulse Amplitude Modulation – PAM). Para tal foi utilizado o aparelho Phyto-PAM® Fluorometer Analyser (Walz, Alemanha) com unidade óptica ED-101US/MP.

Para as determinações do Rendimento Quântico Máximo ( $\Phi_m$ ) a cada 24 horas foram coletados 3 mL de cultura algal por um período de 96 horas. As determinações do Rendimento Quântico Efetivo ( $\Phi'_m$ ) e dos demais parâmetros no estado de luz adaptado (Tabela 1) foram realizadas em 48 e 96 horas.

Anteriormente às medições, as células algais foram adaptadas ao escuro por 20 minutos, para induzir um estado de equilíbrio no transporte de elétrons na fotossíntese. A fluorescência inicial de células adaptadas ao escuro ( $F_o$ ) foi mensurada com luz modulada de baixa intensidade ( $2 \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) para evitar a redução no fotossistema II (PSII) do acceptor de elétron ( $Q_A$ ); o nível de  $F_o$  representa o rendimento da fluorescência quando todos os centros de reação do PSII estão abertos. A fluorescência máxima de células adaptadas ao escuro ( $F_m$ ) foi estabelecida após a aplicação de um curto pulso de luz saturante ( $2000 \text{ } \mu\text{mol f\acute{o}tons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , 700 ms). Através dos valores de  $F_o$  e  $F_m$  pode-se calcular a fluorescência variável ( $F_v$ ), o Rendimento Quântico Máximo ( $\Phi_m$ ) do

fotossistema II (PSII) e a Eficiência do Complexo de Evolução do Oxigênio (OEC) (Tabela 1) (Juneau et al., 2002; Lombardi e Maldonado, 2011)

Em seguida, cada amostra foi submetida à luz actínica contínua com mesma intensidade de irradiância utilizada nos experimentos. Após o nível de fluorescência no estado estável de transporte de elétrons ( $F_s$ ) ser alcançado, foram aplicados pulsos saturantes a cada 20 segundos para a determinação dos parâmetros de fluorescência máxima no estado adaptado a luz ( $F_m'$ ). Depois que a luz actínica foi desligada é aplicada uma luz vermelha-distante para garantir uma oxidação rápida e completa de QA. Sob essas condições, foi obtido o valor da fluorescência mínima adaptada a luz ( $F_o'$ ), que representa a fluorescência quando todos os centros de reação no PSII estão abertos. Os parâmetros de fluorescência do estado adaptado à luz foram calculados de acordo com as equações presentes na tabela 1, sendo caracterizados como Rendimento Quântico Efetivo do PSII ( $\phi_m'$ ), Dissipação fotoquímica ( $Q_p$ ), Dissipação não-fotoquímica ( $Q_n$ ) e Dissipação não-fotoquímica relacionada principalmente à dissipação de calor (NPQ). Para todas as amostras os parâmetros de fluorescência foram corrigidos com o branco (meio LC Oligo com NP na concentração correspondente à amostra analisada). (Juneau et al., 2002; Lombardi e Maldonado, 2011).

Tabela 1. Parâmetros da fluorescência da clorofila

Parâmetros	Definição	Equações	Relevância fisiológica	Referência
F <sub>o</sub> , F <sub>o</sub> '	Fluorescência inicial (mínima) no estado adaptado ao escuro - e no estado adaptado a luz, respectivamente.	$F_o / (F_v / F_m + F_o / F_m')$	Nível de fluorescência quando Q <sub>A</sub> é oxidada ao máximo (centros PSII abertos)	Juneau et. (2002); Oxborough (1997)
F <sub>m</sub> , F <sub>m</sub> '	Fluorescência máxima no estado adaptado ao escuro - e no estado adaptado a luz, respectivamente.	-	Nível de fluorescência quando Q <sub>A</sub> é reduzido ao máximo (centros PSII fechados)	Juneau et. (2002); Baker (2008)
F <sub>v</sub>	Fluorescência variável no estado adaptado a luz	F <sub>m</sub> -F <sub>o</sub>	Demonstra a habilidade fotoquímica do PSII (Q <sub>A</sub> reduzido)	Oxborough (1997)
F <sub>s</sub>	Estado estável de fluorescência da clorofila	-	-	Oxborough (1997)
φ <sub>m</sub>	Rendimento quântico máximo do PSII – células adaptadas ao escuro	$(F_m - F_o) / F_m = F_v / F_m$	Eficiência máxima na qual a luz absorvida pelo PSII é utilizada para redução do Q <sub>A</sub> .	Kitajima e Buller (1975)
φ <sub>m</sub> '	Rendimento quântico efetivo ou operacional do PSII – células adaptadas a luz	$(F_m' - F_s) / F_m'$	Estima a eficiência com qual a luz absorvida pelo PSII é usada para a redução do Q <sub>A</sub> . Esse parâmetro fornece uma estimativa do rendimento quântico de fluxo linear de elétrons no PSII.	Genty et al. (1989); Baker, (2008)
Q <sub>p</sub>	Dissipação fotoquímica	$(F_m' - F_s) / (F_m' - F_o')$	Medida de dissipação da luz via transporte de elétrons	Juneau e Popovic (1999)
Q <sub>n</sub>	Dissipação não-fotoquímica (fluorescência de reflexão)	$1 - [(F_m' - F_o') / (F_m - F_o)]$	Medida de dissipação da energia luminosa através de processos não-fotoquímicos	Schreeiber (1986); Juneau e Popovic (1999)
NPQ	Dissipação não-fotoquímica (Dissipação de calor)	$(F_m - F_m') / F_m'$	Estima o quenching não-fotoquímico de F <sub>m</sub> para F <sub>m</sub> '. Monitora a taxa aparente para perda de calor do PSII.	Lombardi e Maldonado (2011)
OEC	Eficiência do complexo de evolução do oxigênio	$F_o / (F_m - F_o) = F_o / F_v$	-	Kriedemann et al. (1985)

### 3.5 Estresse oxidativo induzido pela produção de Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS)

O nível intracelular de Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) foi avaliado por citometria de fluxo utilizando o corante 2',7' - diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) (2044-85-1, Sigma-Aldrich®). O DCFH-DA é um composto não-fluorescente que é rapidamente oxidado para um o composto 2'7' - diclorofluoresceína (DCFH) altamente fluorescente na presença intracelular de espécies reativas ao oxigênio (Dao e Beardall, 2016). A formação de ROS nas células é induzida especificamente por produtos de oxidação metabólica, como o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Hong et al., 2009). A intensidade da fluorescência emitida pelo DCF foi medida no comprimento de onda de emissão de 530 nm e excitação de 488 nm (Hong et al. 2009).

Uma solução estoque na concentração de  $1 \times 10^4$   $\mu$ M de DCFH-DA foi preparada no escuro e dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO) conforme as especificações do fabricante. As soluções de trabalho foram preparadas em água ultra-pura autoclavada (120°C por 20 min) com concentração de 10  $\mu$ M de DCFH-DA. Alíquotas de células algais (500  $\mu$ L) foram incubadas por 60 min no escuro com DCFH-DA na concentração final de 10  $\mu$ M em temperatura ambiente. O nível de ROS foi determinado após a exposição à NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> durante 0, 24, 48, 72 e 96 horas.

As medições de citometria de fluxo foram realizadas com o aparelho FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, EUA) utilizando-se como o parâmetro a intensidade de fluorescência detectada no canal FL3-H (fluorescência vermelha, que detecta a clorofila *a*) versus canal FL1-H (fluorescência verde, que detecta a fluorescência do DCF) (Hong et al. 2009). Anteriormente à leitura por citometria, foram adicionados às amostras 10  $\mu$ L de padrão interno constituído de esferas (*beads*) fluorescentes de 6  $\mu$ m

de diâmetro (Fluoresbrite carboxylate microspheres; Polysciences, Warrington, Pensilvânia, EUA). Os dados foram coletados com o software CellQuest Pro BD e tratados com o software FlowJo V10.0 (Trestar.com, EUA). (Figura 1).

Após o tratamento dos dados foram calculadas as médias das medidas de fluorescência detectadas no canal FL1-H das amostras algais com *beads* (Figura 1). Em seguida, esses valores foram aplicados na seguinte equação:

$$\text{FL1 (relativo)} = \frac{\log(\text{FL1 algas})}{\log(\text{FL1 beads})}$$

Os valores de FL1 (relativo) para o controle e amostras foram utilizados para o cálculo do nível de ROS relativo (%) (Hong et al., 2009), segundo a seguinte equação:

$$\text{Nível relativo de ROS (\%)} = \frac{\text{FL1 rel. [tratamento]}}{\text{FL1 rel. [controle]}} \times 100$$



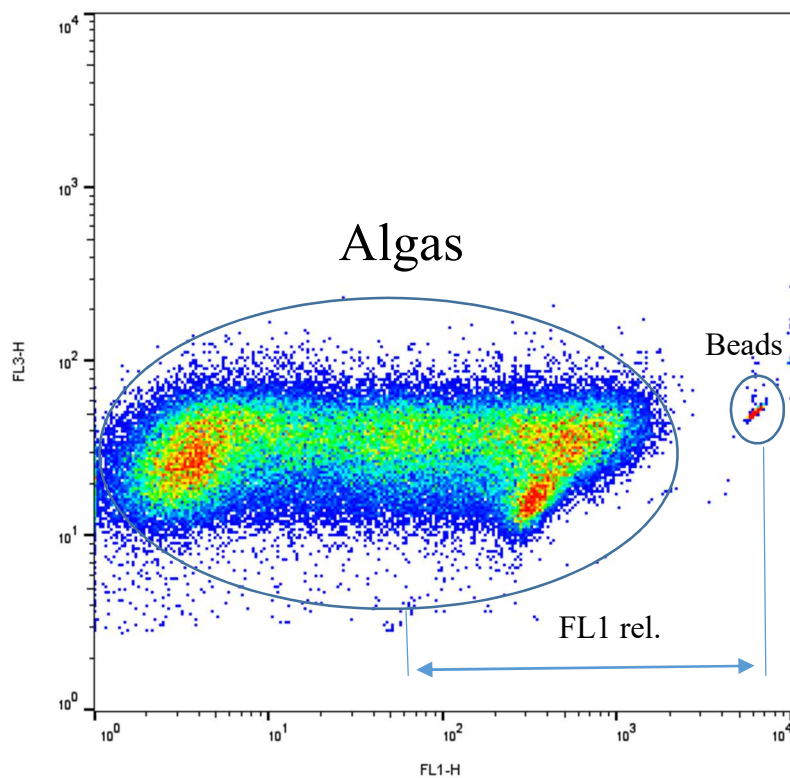
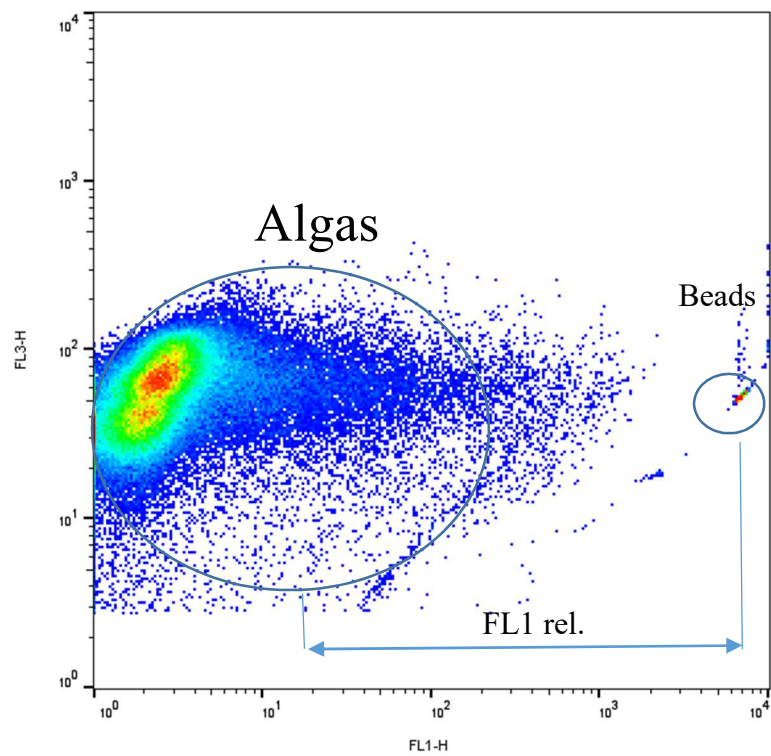


Figura 1. Fluorescência do indicador de produção de ROS - DCF (2', 7' - diclorofluoresceína) nas células algais de *Raphidocelis subcapitata* detectada no canal FL1 (Fluorescência verde). A. controle em 96 horas. B. células algais com 50 mg L<sup>-1</sup> de NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> em 96 horas.

### *3.6 Análises Estatísticas*

Os resultados foram testados para normalidade (Shapiro-Wilk) e homogeneidade da variância (Teste de Levene). Em seguida, os dados foram submetidos à análise de variância one-way ANOVA e Teste de Tukey para comparação entre as médias do controle em relação aos tratamentos, com nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ) em todas as análises.

## 4. Resultados

### 4.1 Densidade celular

A figura 2 (a-c) mostra a densidade celular da alga *Raphidocelis subcapitata* durante 96 horas de exposição às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. Para as algas expostas a NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> a densidade celular diminuiu 4,27% em 50,0 mg L<sup>-1</sup>, e 23,0% no tratamento com 100,0 mg L<sup>-1</sup> após 96 horas. Nesse caso, não foi possível o cálculo da IC<sub>50-96h</sub>, pois não houve 50% de inibição do crescimento celular em nenhum dos tratamentos.

Para as algas expostas às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> a densidade celular em 96 horas para os tratamentos com 20,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup> diminuiu 22,0% e 52,7%, respectivamente. O valor da IC<sub>50-96h</sub> foi igual a 46,8 mg L<sup>-1</sup> (Figura 2 b)

Para as algas expostas às NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> a densidade celular, para os tratamentos com 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>, diminuiu 44,5 e 76,8%, respectivamente. O valor de IC<sub>50-96h</sub> foi igual a 55,3 mg L<sup>-1</sup> (Figura 2 c).

Comparando-se as NPs em relação à inibição média do crescimento algal foi na seguinte ordem: NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> > NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> > NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

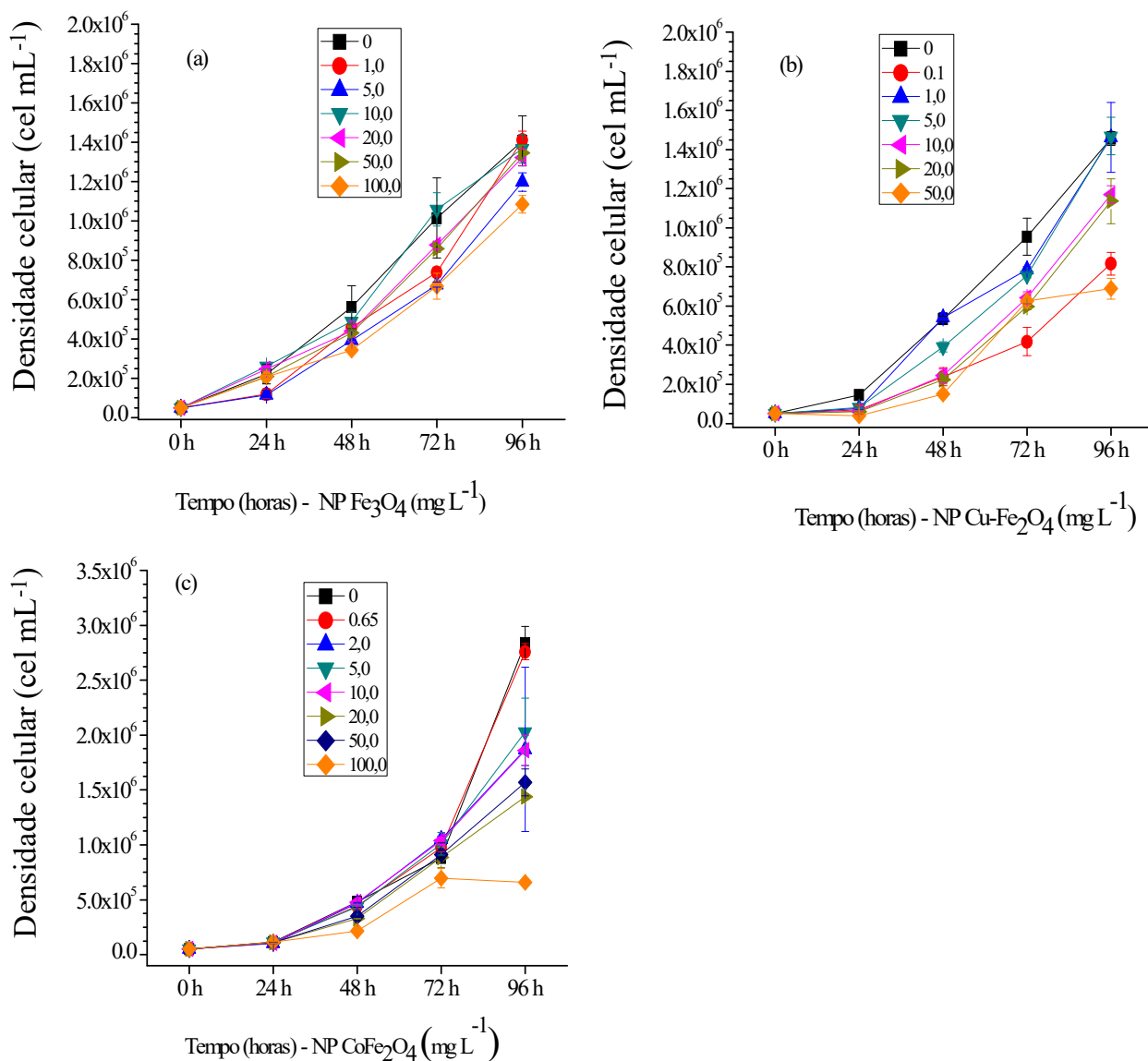


Figura 2. Densidade celular (cel mL<sup>-1</sup>) da microalga *Raphidocelis subcapitata* na presença de nanopartículas magnéticas em relação ao tempo de exposição (horas). (a) NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. (b) NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. (c) NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

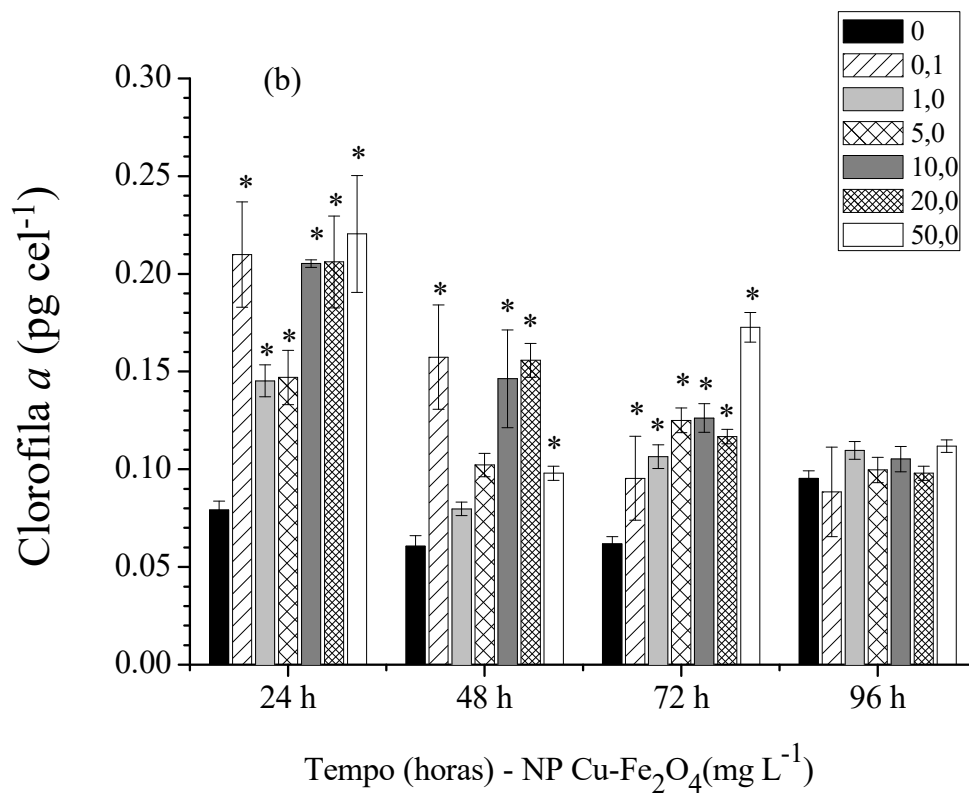
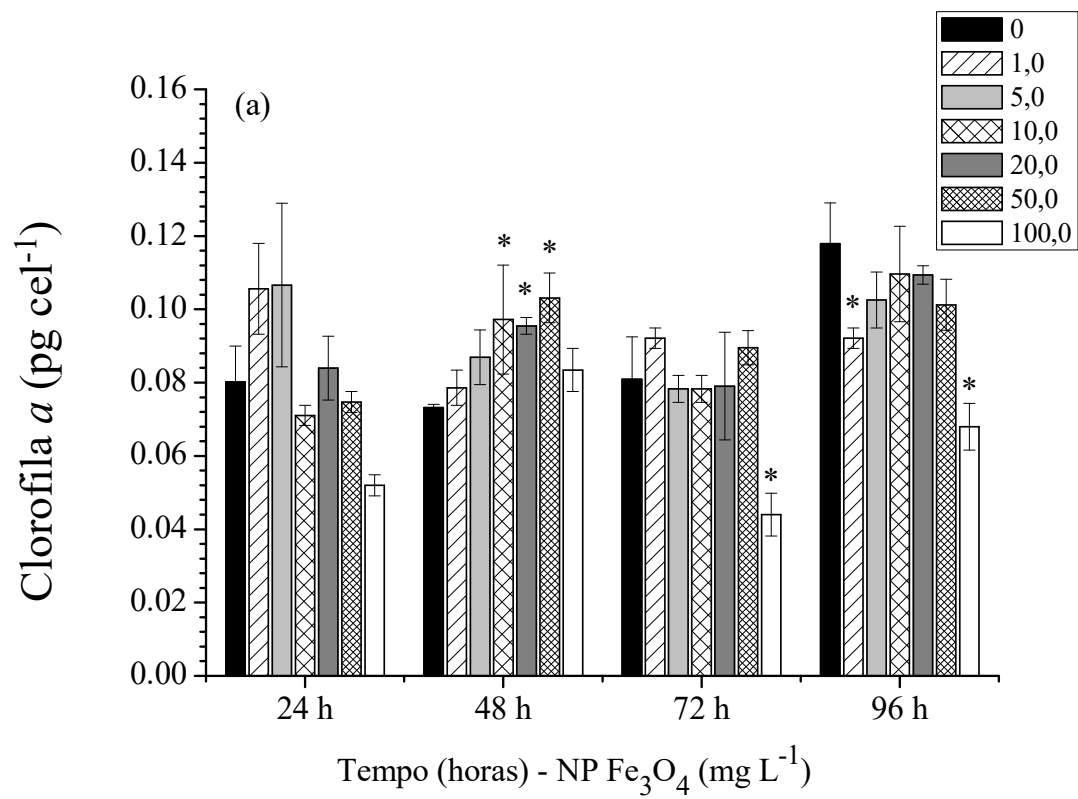
#### 4.2 Biomassa (Clorofila a)

O conteúdo de clorofila *a* (pg cel<sup>-1</sup>) durante 96 horas de exposição às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> é apresentado na figura 3a. Em 48 horas houve um aumento de 31,60% no conteúdo de clorofila *a* em 10,0 e 20,0 mg L<sup>-1</sup>. Em 50,0 mg L<sup>-1</sup> o aumento foi de 40,83%. Em 72 horas

o conteúdo de clorofila diminuiu 45,63% no tratamento com 100,0 mg L<sup>-1</sup>. Em 96 horas a quantidade de clorofila *a* diminuiu 21,91 e 42,40% em 1,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. No entanto, nos demais tratamentos a quantidade de clorofila *a* foi igual ao controle.

O conteúdo de clorofila *a* (pg cel<sup>-1</sup>) durante 96 horas de exposição às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> é apresentado na figura 3b. Em 24 horas o conteúdo de clorofila *a* aumentou acima de 45% em todos os tratamentos. Em 48 horas o conteúdo de clorofila *a* aumentou cerca de 152,5% em 0,1; 10,0 e 20,0 mg L<sup>-1</sup> e 61,37% em 50,0 mg L<sup>-1</sup>. Em 72 horas a quantidade de clorofila *a* aumentou em 54,33 e 72,18% em 0,1 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Já em 96 horas a quantidade de clorofila *a* não foi significativamente diferente em nenhum tratamento.

O conteúdo de clorofila *a* (pg cel<sup>-1</sup>) durante 96 horas de exposição às NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> é apresentado na figura 3c. Em 24 horas a quantidade de clorofila diminuiu 20,63% em 100 mg L<sup>-1</sup>. Em 48 horas houve um aumento de 47,1 e 40,1% no conteúdo de clorofila nas concentrações com 20,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Em 72 horas o conteúdo de clorofila diminuiu de 28,50 a 37,42% em 0,65 a 50,0 mg L<sup>-1</sup> e 55% em 100 mg L<sup>-1</sup>. No entanto em 96 horas, a quantidade de clorofila *a* não apresentou diferenças significativas entre controle e tratamentos.



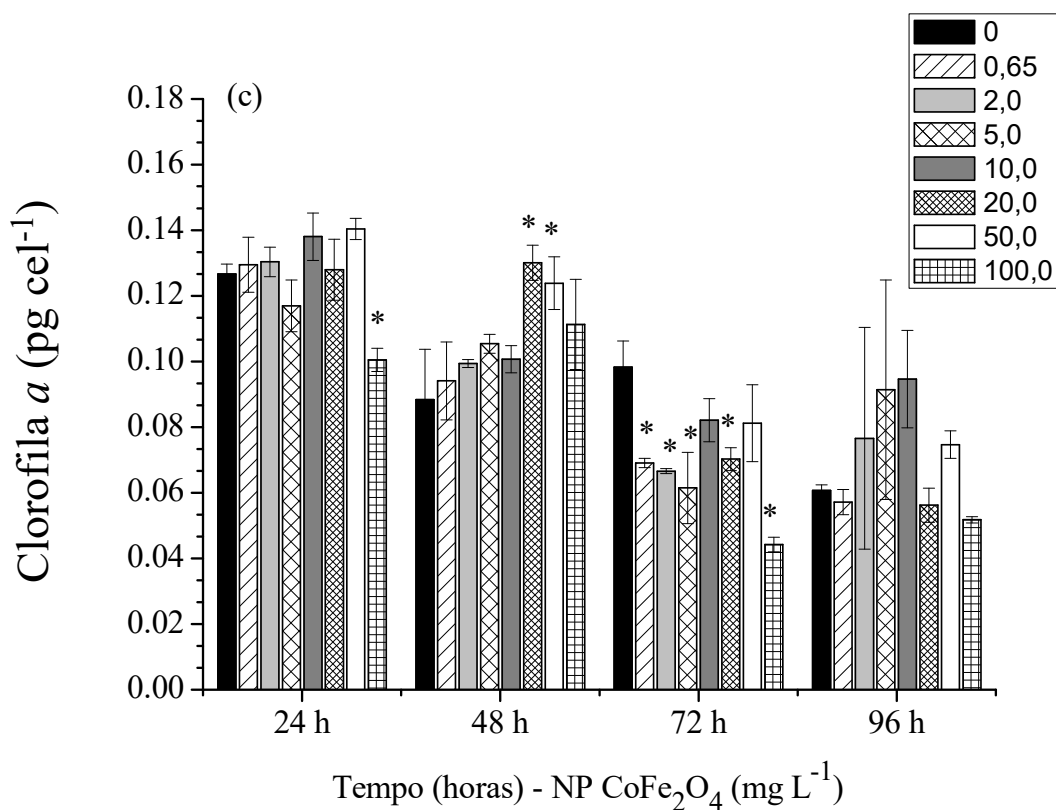


Figura 3. Conteúdo de clorofila *a* (pg cel<sup>-1</sup>) em *Raphidocelis subcapitata* sob diferentes concentrações (mg L<sup>-1</sup>) de nanopartículas magnéticas por 96 horas. (a) NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. (b) NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. (c) NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. (\*) indica diferença significativa entre o controle e tratamentos (p<0,05).

### 4.3 Eficiência fotossintética de *Raphidocelis subcapitata* na presença de nanopartículas magnéticas

#### 4.3.1 Fluorescência mínima (Fo) e Fluorescência máxima (Fm)

A fluorescência mínima (Fo) na microalga *Raphidocelis subcapitata* expostas às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> está representada na figura 4a. O valor de Fo aumentou 35,0; 31,0 e 44,4% em 48 horas nas concentrações de 1,0; 5,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. A fluorescência máxima (Fm) aumentou 19,0% em 5,0 mg L<sup>-1</sup> e diminuiu 20,0% em 100,0 mg L<sup>-1</sup> em 48 horas. Em 96 horas (Figura 4b) o valor de Fo no tratamento com 1,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>

diminuiu 24,0 e 16,0%, respectivamente, e aumentou nos tratamentos com 5,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup> em 30,7 e 17,6%, respectivamente. O valor da Fm em 96 horas aumentou 15,5% em 5,0 mg L<sup>-1</sup> e diminuiu 33% em 1,0 mg L<sup>-1</sup>; 21,4% em 10,0 mg L<sup>-1</sup> e 18,3% em 100,0 mg L<sup>-1</sup> (Figura 4b).

O valor da Fo em *R. subcapitata* expostas às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> está representado na figura 4c. Em 48 horas, Fo aumentou 37,0 e 18,0% em 0,1 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. O valor da Fm em 48 horas aumentou em 24,0; 2,0 e 3,3% em 0,1; 1,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Em 96 horas os valores da Fo diminuíram 55,0; 23,5; 57,2; 59,2 e 35,7% em 0,1; 1,0; 10,0; 20,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os valores da Fm diminuíram 53,0; 43,0; 7,4; 57,7; 61,2 e 50,0% em 0,1; 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup> (Figura 4d).

O valor da Fo em *R. subcapitata* exposta às NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> está representado na figura 4e. Em 48 horas a Fo diminuiu 16,6 e 53,0% em 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. E o valor de Fm diminuiu 4,6 e 55,0% em 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>. Em 96 horas os valores da Fo diminuíram 29,3; 17,3 e 23,6% em 10,0; 20,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup> e aumentou 77,5% em 50,0 mg L<sup>-1</sup>. Os valores da Fm diminuíram 30,0; 18,3 e 16,0% em 10,0; 20,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup> e aumentou 78,0% em 50,0 mg L<sup>-1</sup> em 96 horas (Fig 4f).



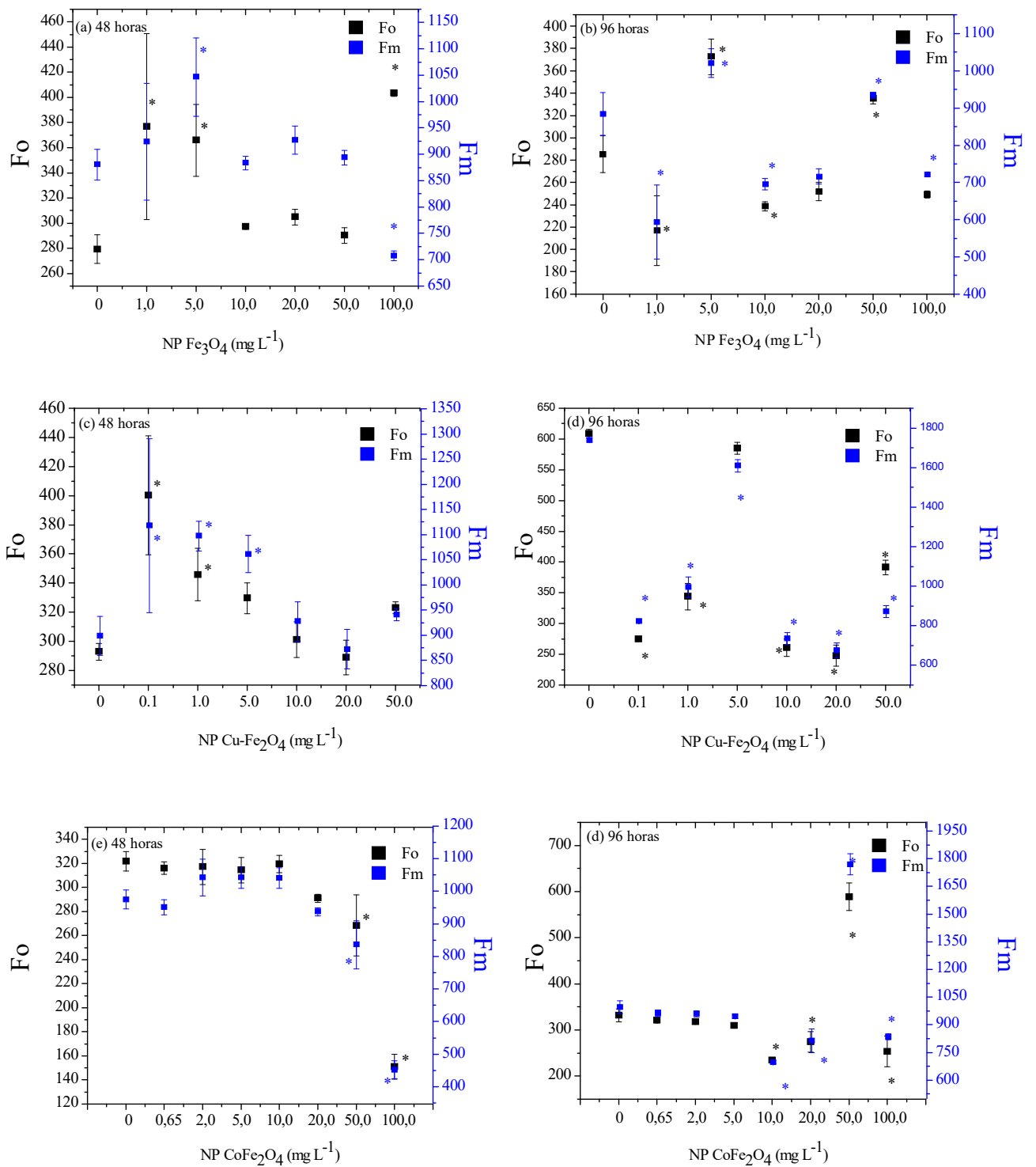


Figura 4. Fluorescência mínima (Fo) e Fluorescência máxima (Fm) em *Raphidocelis subcapitata* em 48 e 96 h. (a) e (b) NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. (c) e (d) NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. (e) e (f) NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. (\*) indica diferenças significativas da fluorescência mínima (Fo) entre controle e tratamento e (\*) indica diferenças significativas da fluorescência máxima (Fm) entre controle e tratamento (p<0,05). Quadrados em preto e azul representam a média ± desvio padrão para n=4. (Fo e Fm em unidades arbitrárias).

#### 4.3.2 Parâmetro de fluorescência: Rendimento Quântico Máximo ( $\phi_m$ )

O Rendimento Quântico Máximo ( $\phi_m = F_v/F_m$ ) na microalga *Raphidocelis subcapitata* expostas às NPs  $Fe_3O_4$  está representado na figura 5a. O  $\phi_m$  em 0 hora foi igual a aproximadamente 0,650 (controle e tratamentos). Em 24 horas,  $\phi_m$  diminuiu 9,3 e 10,8% em 1,0 e 5,0  $mg L^{-1}$ , respectivamente e aumentou 3,7% em 50,0 e 100  $mg L^{-1}$ . Em 48 horas nos tratamentos com 1,0; 5,0 e 10,0  $mg L^{-1}$  o valor do  $\phi_m$  diminuiu cerca de 4,5% e em 100,0  $mg L^{-1}$  a redução foi de 64,2%. Em 72 horas, o valor  $\phi_m$  diminuiu 2,0% em 5,0  $mg L^{-1}$ . Em 96 horas o  $\phi_m$  diminuiu 7,3; 6,6; 4,8 e 5,9% em 1,0; 5,0; 20,0 e 50,0  $mg L^{-1}$ , respectivamente.

Os valores do  $\phi_m$  em *R. subcapitata* na presença de NPs  $Cu-Fe_2O_4$  estão representados na figura 5b. Em 0 hora nos tratamentos com 5,0; 10,0; 20,0 e 50,0  $mg L^{-1}$  o  $\phi_m$  diminuíram cerca de 2,2% em relação ao controle. Em 24 horas, o  $\phi_m$  foi igual a 0,687 no controle, sendo que os tratamentos apresentaram valores significativamente iguais ao controle. Em 48 horas o valor de  $\phi_m$  diminuiu 4,9% em 0,1  $mg L^{-1}$ . Em 72 horas o  $\phi_m$  diminuiu 6,5% em 50,0  $mg L^{-1}$ . Em 96 horas, os valores de  $\phi_m$  diminuíram em 1,0 (4,7%); 5,0 (6,9%); 10,0 (6,6%); 20,0 (6,1%) e 50,0  $mg L^{-1}$  (19,3%).

Os valores de  $\phi_m$  em *R. subcapitata* na presença de NPs  $CoFe_2O_4$  estão representados na figura 5c. Em 0 hora o controle e tratamentos apresentaram  $\phi_m$  igual a 0,640. Em 24 horas para 100,0  $mg L^{-1}$ , o  $\phi_m$  diminuiu 2,6%. Em 48 horas os valores do  $\phi_m$  aumentaram significativamente em 2,0 (3,4%); 5,0 (4,5%); 10,0 (3,4%); 20,0  $mg L^{-1}$  (3,0%). Em 72 horas os valores do  $\phi_m$  aumentaram 1,47; 2,2 e 2,9% em 2,0; 5,0 e 10,0  $mg L^{-1}$  e, diminuíram em 1,47 e 4,4% em 50 e 100,0  $mg L^{-1}$ , respectivamente. Em 96 horas os valores do  $\phi_m$  foram significativamente iguais ao controle ( $\phi_m = 0,670$ ).

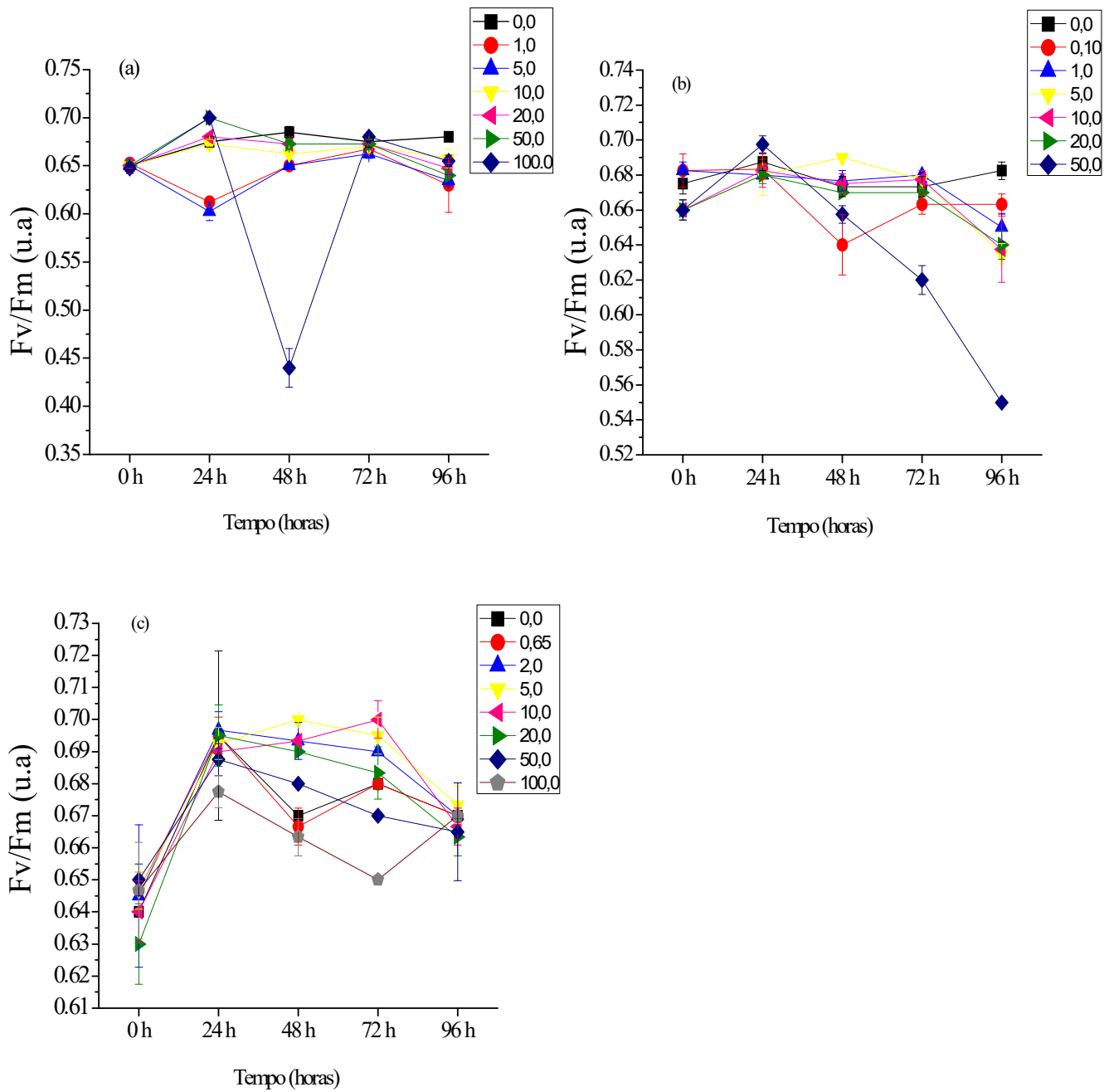


Figura 5. Rendimento Quântico Máximo ( $\phi_m = Fv/Fm$ ) em *Raphidocelis subcapitata* sob diferentes concentrações ( $mg L^{-1}$ ) de nanopartículas magnéticas em 0, 24, 48, 72 e 96 horas. (a) NP  $Fe_3O_4$ . (b) NP Cu- $Fe_2O_4$ . (c) NP Co $Fe_2O_4$ . ( $Fv/Fm$  em unidades arbitrárias - u.a.). Todos os dados do  $\phi_m$  entre controle e tratamento foram submetidos ao Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ; média  $\pm$  desvio padrão para  $n=4$ ).

#### 4.3.3 Parâmetros de fluorescência: Rendimento quântico efetivo ( $\phi_m'$ ), Dissipação fotoquímica ( $Q_p$ ) e não-fotoquímica ( $Q_n$ e $NPQ$ ) e Complexo de evolução do oxigênio (OEC)

O Rendimento quântico efetivo ( $\phi_m' = F'm-Fs/F'm$ ) da microalga *Raphidocelis subcapitata* em 48 e 96 horas de exposição às NPs  $Fe_3O_4$  está representado na figura 6<sup>a</sup>. Em 48 horas o  $\phi_m'$  diminuiu 5,16% em relação ao controle no tratamento com 10 mg L<sup>-1</sup>. Em 96 horas os valores de  $\phi_m'$  nos tratamentos foram significativamente iguais ao controle ( $\phi_m' = 0,590$ ).

Para o Complexo de Evolução do Oxigênio (OEC =  $F_o/F_v$ ) em *R. subcapitata* exposta às NPs  $Fe_3O_4$  (figura 6b), os valores de OEC em 48 horas aumentaram 15,5% nos tratamentos com 1,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>, 9,2% em 10,0 mg L<sup>-1</sup> e 3,5% em 50,0 mg L<sup>-1</sup>. Porém, em 100,0 mg L<sup>-1</sup> o valor do OEC foi 185,3% maior que o controle. Em 96 horas os valores de OEC aumentaram 15,2% em 1,0; 20,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>, 20,7% em 5 mg L<sup>-1</sup> e 9,75% em 10,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>.

Os valores das Dissipações fotoquímicas ( $Q_p$ ) (figura 6c) nos tratamentos de 5,0 a 50,0 mg L<sup>-1</sup> de NP  $Fe_3O_4$  em 48 horas de exposição foram de 4,20 a 6,90% maiores que o controle. Em 100 mg L<sup>-1</sup> o valor de  $Q_p$  aumentou 49,0%. Em 96 horas  $Q_p$  aumentou de 5,7 a 6,7% nos tratamentos de 5,0 a 50,0 mg L<sup>-1</sup> e 4,0% em 100 mg L<sup>-1</sup>.

Os valores das Dissipações não-fotoquímicas ( $Q_n$ ) (figura 6d) em 48 horas foram de 72,0 a 89,4% maiores nos tratamentos de 10,0 a 50,0 mg L<sup>-1</sup> NP  $Fe_3O_4$ . Porém em 100,0 mg L<sup>-1</sup> o valor de  $Q_n$  foi igual a -0,09, enquanto o  $Q_n$  no controle foi de 0,155. Em 96 horas (figura 6d) os valores de  $Q_n$  foram de 15,0 a 22,1% maiores nos tratamentos de 10,0 a 50,0 mg L<sup>-1</sup>.

A Dissipação não-fotoquímica relacionada principalmente a dissipação de calor (NPQ) está representada na figura 6e. Em 48 horas nos tratamentos de 10,0 a 50,0 0 mg L<sup>-1</sup> de NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, os valores de NPQ foram cerca de 2 vezes maiores que o controle. Em 100,0 mg L<sup>-1</sup> o NPQ diminuiu significativamente, com NPQ igual a -0,053 enquanto para o controle o NPQ foi igual a 0,135. Em 96 horas no tratamento com 5,0 mg L<sup>-1</sup> o valor de NPQ foi 8,22% menor que o controle, já em 100,0 mg L<sup>-1</sup> o NPQ foi 12,3% maior que o controle.

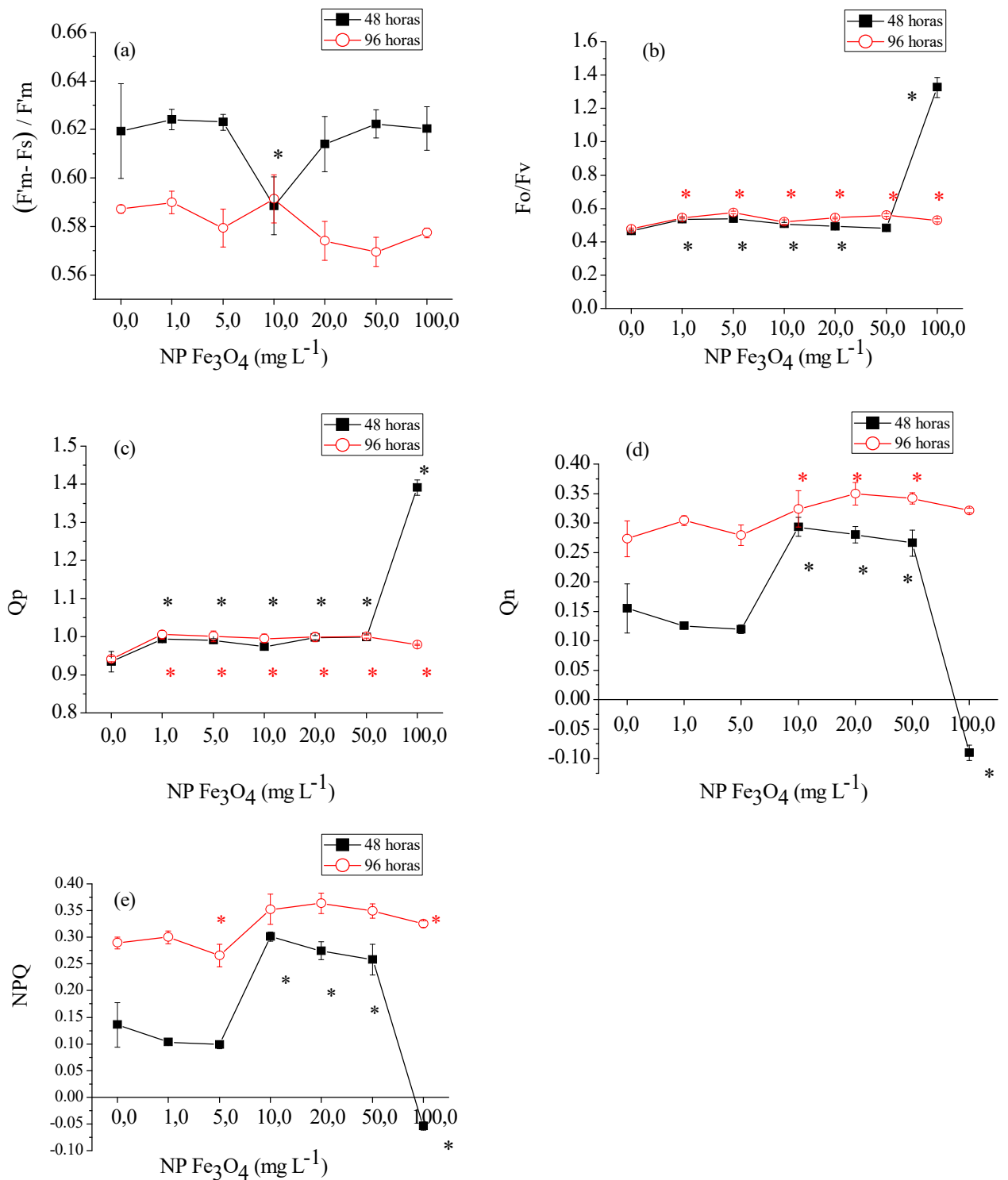


Figura 6. Parâmetros de fluorescência (unidades arbitrárias) da microalga *Raphidocelis subcapitata* submetidas às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> em 48 e 96 horas. (a) Rendimento quântico efetivo ( $\phi_m' = F'm-Fs/F'm$ ). (b) Complexo de evolução do oxigênio (Fo/Fv). (c) Dissipação fotoquímica (Qp). (d) Dissipação não-fotoquímica (Qn). (e) Dissipação não-fotoquímica relacionada principalmente a dissipação de calor (NPQ). (\*) indica diferenças significativas entre controle e tratamento em 48 horas. (\*) indica diferenças significativas entre controle e tratamento em 96 horas ( $p < 0,05$ ). Quadrados em preto e círculos em vermelho representam a média  $\pm$  desvio padrão para  $n=4$ .

O Rendimento quântico efetivo ( $\phi_m' = F'm-Fs/F'm$ ) da microalga *R. subcapitata* em 48 e 96 horas de exposição às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> está representado na figura 7a. O  $\phi_m'$  em 48 horas no tratamento com 0,1 mg L<sup>-1</sup> diminuiu em 22,7% e aumentou em 6,0% em 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Em 96 horas os  $\phi_m'$  diminuiu 14,6% em 50,0 mg L<sup>-1</sup> em relação ao controle.

Para o Complexo de Evolução do Oxigênio (OEC= Fo/Fv) em *R. subcapitata* exposta às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (figura 7b) o valor de OEC em 48 horas aumentou 23,1% em 0,1 mg L<sup>-1</sup>; 4,0% em 20,0 mg L<sup>-1</sup> e 10,0% em 50,0 mg L<sup>-1</sup>. O valor de OEC diminuiu 5,62% apenas em 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Em 96 horas OEC diminuiu 5,8% em 0,1 mg L<sup>-1</sup>, aumentando em 6,0% em 5,0 mg L<sup>-1</sup> e 51,0% em 50,0 mg L<sup>-1</sup>.

A Dissipação fotoquímica (Qp) da microalga *R.subcapitata* em 48 e 96 horas de exposição às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (figura 7c) em 48 horas no tratamento com 0,1 mg L<sup>-1</sup> diminuiu em 5,75% e aumentou em 9,7%; 0,6%; 1,3%; 0,25% e 1,42% em 1,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 50,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Em 96 horas o Qp no tratamento com 10,0 mg L<sup>-1</sup> aumentou 6,12%.

Os valores de Dissipação não-fotoquímica (Qn) da microalga *R.subcapitata* em 48 e 96 horas de exposição às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> estão evidenciados na figura 7d. Em 48 horas os tratamentos com 0,1 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> aumentaram em 2,2 vezes o valor de Qn. No tratamento com 10,0 mg L<sup>-1</sup>, Qn aumentou 41,2%, em 20,0 mg L<sup>-1</sup> o aumento foi de 34,5% e, em 50,0 mg L<sup>-1</sup>, foi de 22,5%. Em 96 horas, Qn aumentou apenas nos tratamentos com 0,1 e 1,0 mg L<sup>-1</sup> em 41,7 e 36,0%, respectivamente. Em 50,0 mg L<sup>-1</sup>, Qn diminuiu 32,4% em relação ao controle.

A Dissipação não-fotoquímica relacionada principalmente à dissipação de calor (NPQ) está representada na figura 7e. Em 48 horas no tratamento de 0,1 mg L<sup>-1</sup> de NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> o valor de NPQ aumentou 3,27 vezes; já em 1,0 mg L<sup>-1</sup> o aumento foi 227% em relação ao controle. Em 10,0 mg L<sup>-1</sup>, NPQ aumentou 53,0% e em 20,0 mg L<sup>-1</sup>, o aumento

foi de 43,0%. Em 96 horas NPQ aumentou em 67,2% e 38,3% em 0,1 e 1,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente, e diminuiu 44,0% em 50,0 mg L<sup>-1</sup>.



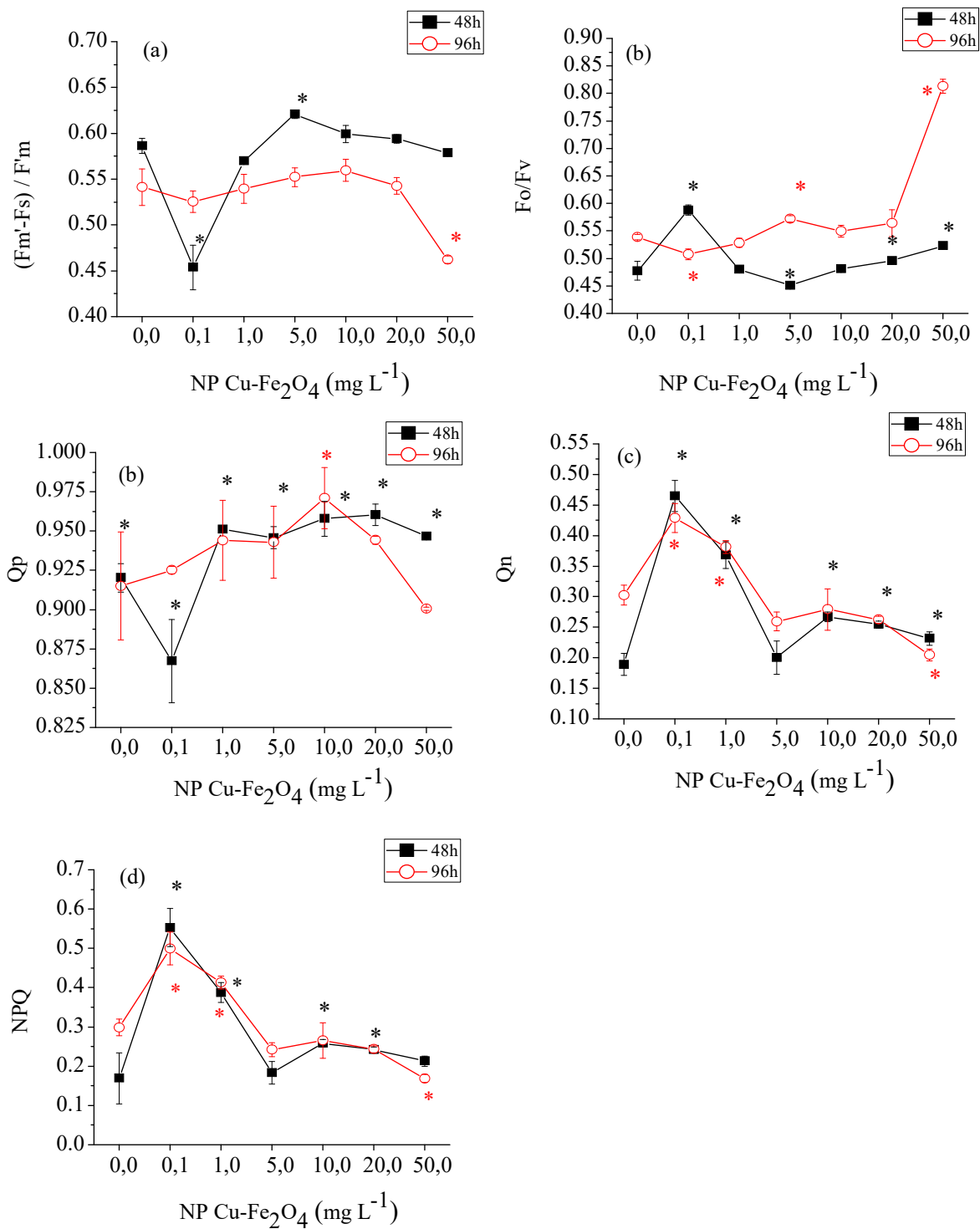


Figura 7. Parâmetros de fluorescência (unidades arbitrárias) da microalga *Raphidocelis subcapitata* submetidas às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> em 48 e 96 horas. (a) Rendimento quântico efetivo ( $\phi_m' = F'm - F_s / F'm$ ). (b) Complexo de evolução do oxigênio (OEC =  $F_o / F_v$ ). (c) Dissipação fotoquímica ( $Q_p$ ). (d) Dissipação não-fotoquímica ( $Q_n$ ). (e) Dissipação não-fotoquímica relacionada principalmente a dissipação de calor (NPQ). (\*) indica diferenças significativas entre controle e tratamento em 48 horas. (\*) indica diferenças significativas entre controle e tratamento em 96 horas ( $p < 0,05$ ). Quadrados em preto e círculos em vermelho representam a média  $\pm$  desvio padrão para  $n=4$ .

O Rendimento quântico efetivo ( $\phi_m' = F'm-Fs/F'm$ ) da microalga *R. subcapitata* em 48 e 96 horas de exposição às NPs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  está representado na figura 8a. O  $\phi_m'$  em 48 horas no tratamento com  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$  diminuiu em 6,7% e em  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  a redução foi de 9,0%. Em 96 horas o  $\phi_m'$  diminuiu 29,3% em  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ .

Para o Complexo de Evolução do Oxigênio ( $\text{OEC} = F_o/F_v$ ) em *R. subcapitata* expostas às NPs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  (figura 8b) em 48 horas os valores de OEC diminuíram 10,7% nos tratamentos de  $2,0$  a  $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ . Em 96 horas não houve diferenças significativas nos valores de OEC entre os controles e tratamentos.

Os valores de Dissipação fotoquímica ( $Q_p$ ) da microalga *R. subcapitata* em 48 e 96 horas de exposição às NPs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  estão representados na figura 8c. Os valores do  $Q_p$  em 48 horas nos tratamentos com  $50,0$  e  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$ , diminuíram 3,65% e 6,22%, respectivamente. Em 96 horas o  $Q_p$  no tratamento com  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  aumentou 3,0% e nos tratamentos com  $50,0$  e  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  diminuiu 5,2 e 35,0%, respectivamente.

Os valores de Dissipação não-fotoquímica ( $Q_n$ ) da microalga *R. subcapitata* em 48 e 96 horas de exposição às NPs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  estão representados na figura 8d. Em 48 horas os tratamentos com  $0,65$ ;  $5,0$  e  $10,0 \text{ mg L}^{-1}$  aumentaram o valor de  $Q_n$  em 69,0; 77,0 e 100,0%, respectivamente. Em  $20,0$  e  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ , os valores de  $Q_n$  dobraram em relação ao controle. Em 96 horas  $Q_n$  diminuiu nos tratamentos com  $20,0$ ;  $50,0$  e  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  em 26,0; 36,0 e 76,0%, respectivamente.

Os valores de Dissipação não-fotoquímica relacionado principalmente à dissipação de calor (NPQ) estão representados na figura 8e. Em 48 horas nos tratamentos com  $0,65$  e  $5,0 \text{ mg L}^{-1}$  de NP  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ , o valor de NPQ aumentou 88,5%; já em  $10,0$ ;  $20,0$  e  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$ , o aumento foi cerca de 145% em relação ao controle. Em 96 horas os valores de NPQ nos tratamentos com  $20,0$ ;  $50,0$  e  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  diminuíram 32,4; 43,0 e 81,0%, respectivamente.

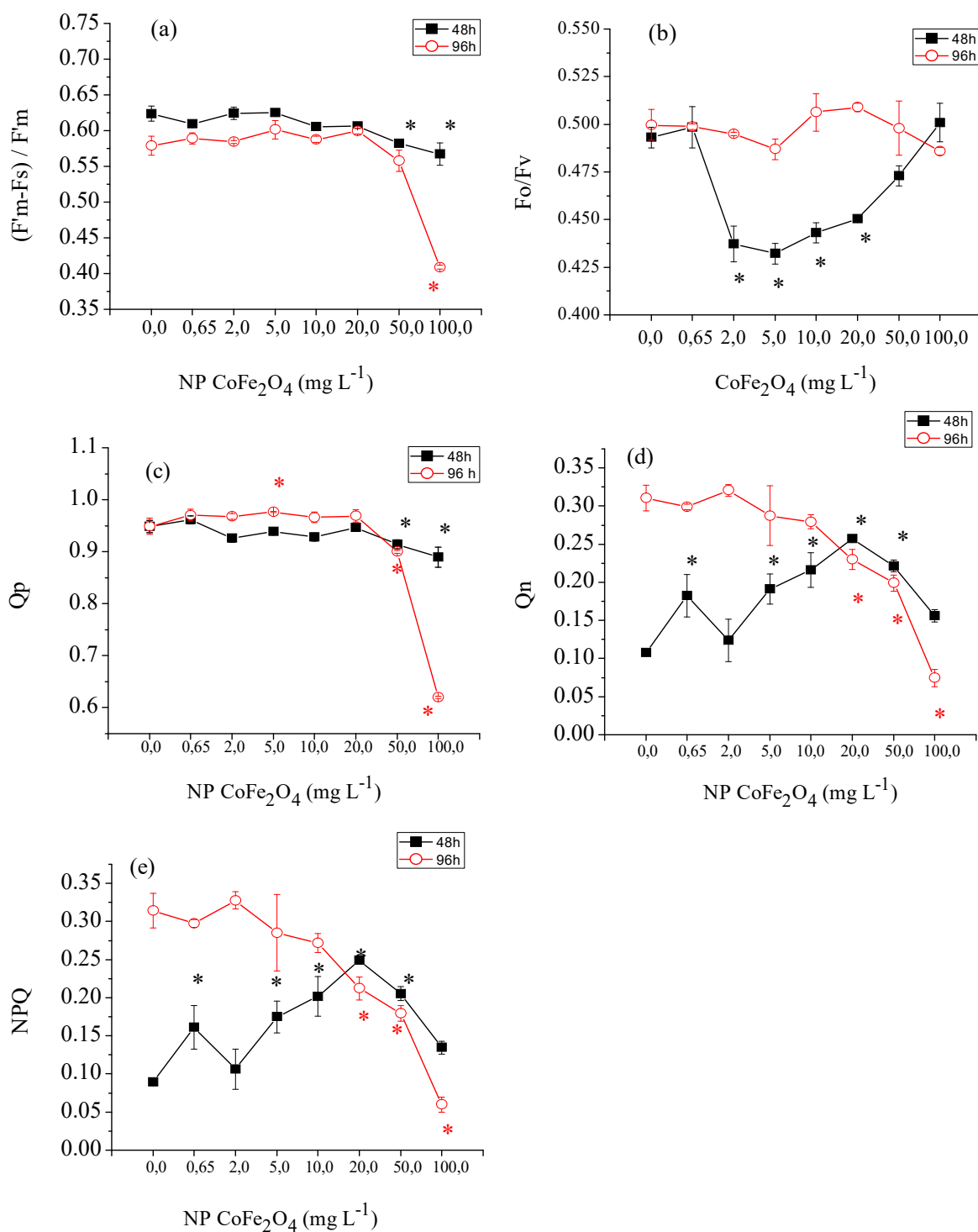


Figura 8. Parâmetros de fluorescência (unidades arbitrárias) da microalga *Raphidocelis subcapitata* submetidas às NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> em 48 e 96 horas. (a) Rendimento quântico efetivo ( $\phi_m' = F'_m - F_s / F'_m$ ). (b) Dissipação fotoquímica (Q<sub>p</sub>). (c) Dissipação não-fotoquímica (Q<sub>n</sub>). (d) Dissipação não-fotoquímica relacionada principalmente a dissipação de calor (NPQ). (e) Complexo de evolução do oxigênio (OEC). (\*) indica diferenças significativas entre controle e tratamento em 48 horas. (\*) indica diferenças significativas entre controle e tratamento em 96 horas (p<0,05). Quadrados em preto e círculos em vermelho representam a média ± desvio padrão para n=3.

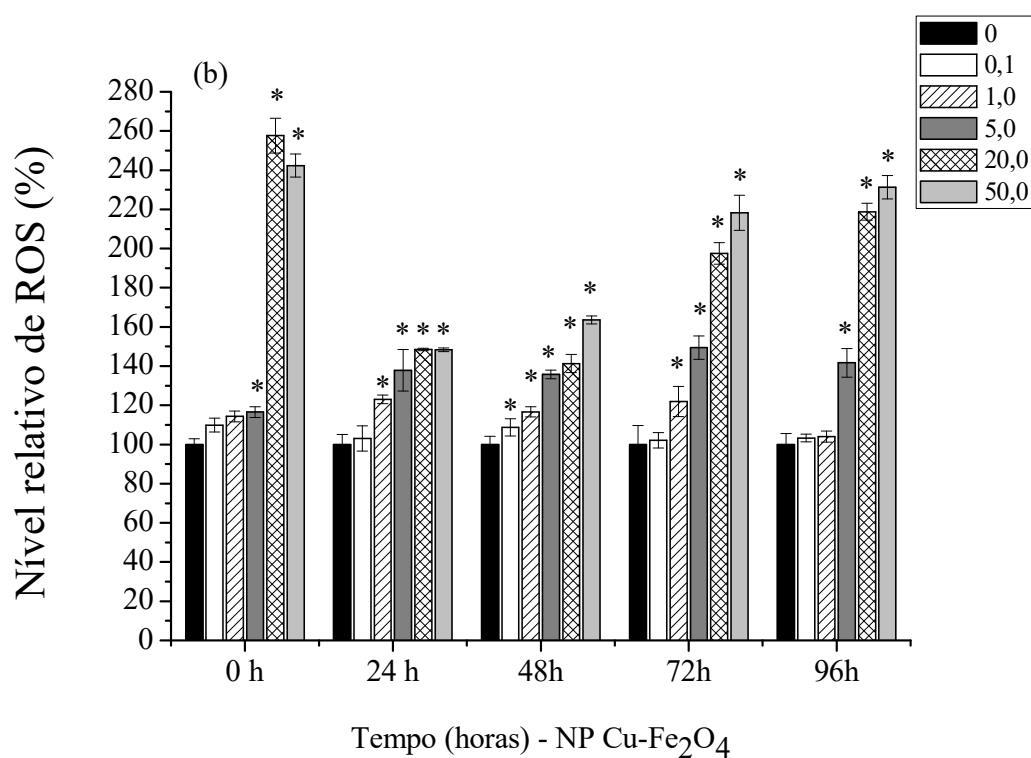
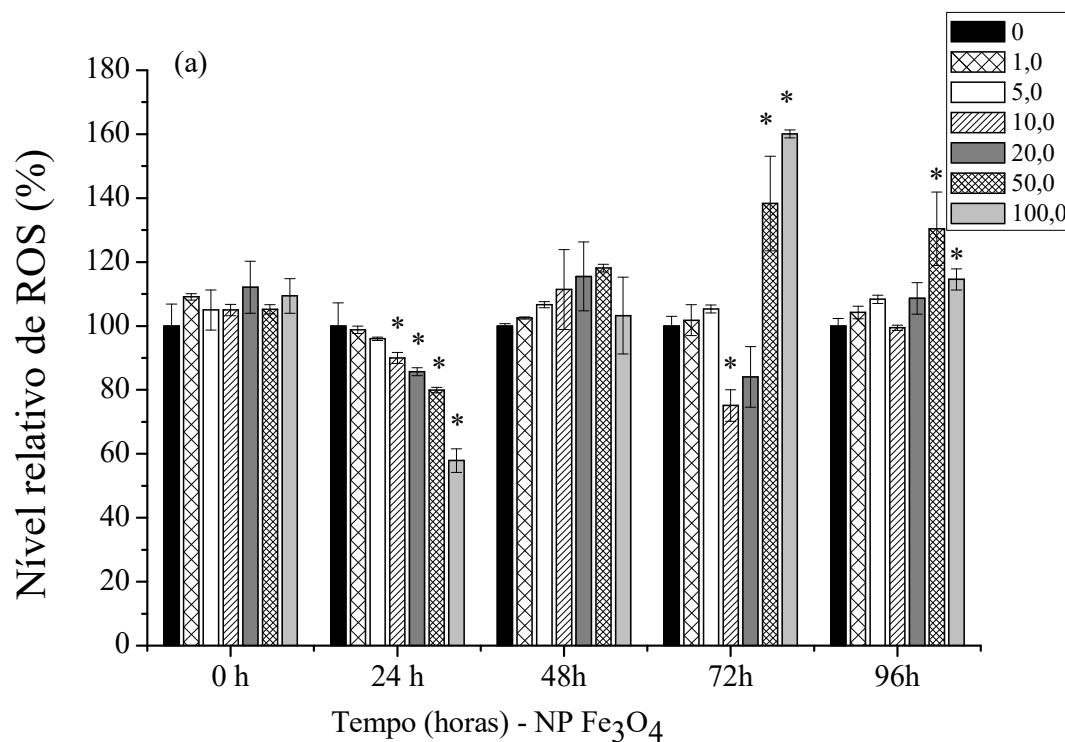
#### 4.4 Estresse oxidativo induzido pela formação de Espécies Reativas ao Oxigênio (Reactive Oxygen Species - ROS)

A produção de espécies reativas ao oxigênio (ROS) em *R. subcapitata* na presença de NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> após 0, 24, 48, 72 e 96 horas está indicada na figura 9a. Em 0 hora não houve indução significativa de ROS em todos os tratamentos em relação ao controle. Em 24 horas houve diminuição significativa na formação de ROS no tratamento de 10,0 mg L<sup>-1</sup>. Em 48 horas, a formação de ROS não foi significativa em relação ao controle. Em 72 horas, a produção de ROS diminuiu significativamente no tratamento de 10,0 mg L<sup>-1</sup>, mas aumentou em significativamente nos tratamentos com 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>. Em 96 horas a formação de ROS aumentou significativamente nos tratamentos com 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *R. subcapitata* na presença de NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> após 0, 24, 48, 72 e 96 horas está indicada na figura 9b. Em 0 horas houve aumento significativo na produção de ROS nos tratamentos acima de 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Em 24 horas houve aumento significativo na produção de ROS a partir do tratamento com 1,0 mg L<sup>-1</sup> e superiores. Em 48 horas a formação de ROS aumentou significativamente em todos os tratamentos em relação ao controle. Em 72 horas produção de ROS aumentou a partir de 1,0 mg L<sup>-1</sup> e para todos os tratamentos superiores. Em 96 horas a produção de ROS aumentou significativamente a partir do tratamento com 5 mg L<sup>-1</sup>.

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em *R. subcapitata* na presença de NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> após 0, 24, 48, 72 e 96 horas está indicada na figura 9c. Em 0 hora houve aumento na produção de ROS nos tratamentos com 10,0; 20,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>. Em 24 horas a produção de ROS diminuiu significativamente a partir do tratamento com 5,0 mg L<sup>-1</sup>. Em 48 horas a produção de ROS diminuiu significativamente no tratamento com 5,0

mg L<sup>-1</sup>, porém aumentou em 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>. Em 72 horas a produção de ROS diminuiu em 2,0 e 5,0 mg L<sup>-1</sup>, mas aumentou em 50,0 mg L<sup>-1</sup> e 100,0 mg L<sup>-1</sup>. Em 96 horas a produção de ROS aumentou em 50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>.



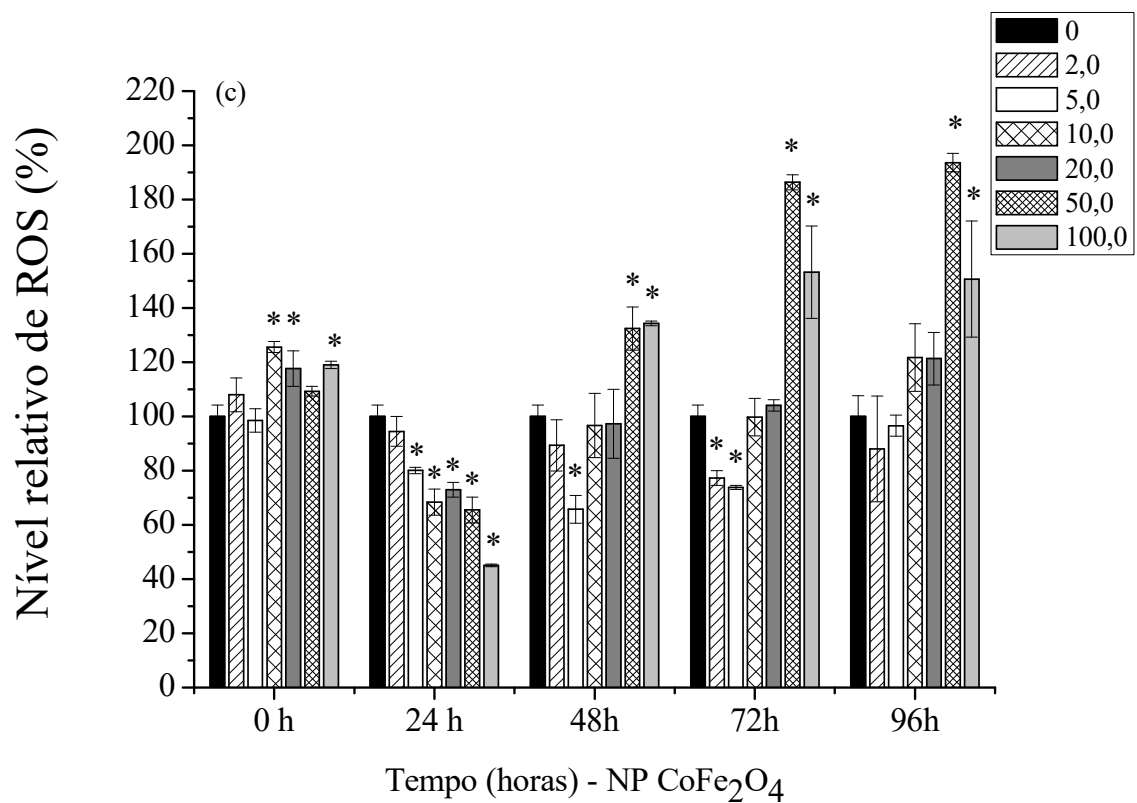


Figura 9. Nível relativo de Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) (%) em *Raphidocelis subcapitata* sob diferentes concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) de nanopartículas magnéticas após 0, 24, 48, 72 e 96 horas. (a) NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. (b) NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. (c) NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>. (\*) indica diferença significativa entre o controle e tratamentos ( $p < 0,05$ ). Barras verticais representam a média  $\pm$  desvio padrão para  $n=3$ .

## 5. Discussão

Diante do crescente cenário de aplicação das nanopartículas (NPs) à base de ferro são cruciais os estudos sobre os efeitos e interações dessas partículas nos compartimentos ambientais. No presente trabalho, os dados de densidade celular da microalga *Raphidocelis subcapitata* durante 96 horas de exposição às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, evidenciaram que essas NPs apresentaram pouco efeito sobre o crescimento da microalga, sendo que para essa NP a IC<sub>50-96h</sub> não pôde ser obtida. Os tratamentos com essa NP não resultaram em inibição do crescimento algal. A inibição do crescimento foi observada para as células submetidas às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e para as NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Figura 2).

Outros estudos relatam a baixa toxicidade de NPs magnéticas. Lei et al. (2016) avaliaram o efeito de NPs a base de ferro na alga *Chlorella pyrenoidosa* (Chlorophyta) e obtiveram valor de IC<sub>50-96h</sub> igual a 30,0 mg L<sup>-1</sup> e 7,1 mg L<sup>-1</sup> para às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e NPs α-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, respectivamente. No entanto, Otero-González et al. (2013) observaram baixa toxicidade para NP zero valente (Fe<sup>0</sup>) e nenhuma toxicidade para NPs Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> em *Saccharomyces cerevisiae* (leveduras) mesmo em concentrações elevadas (1000,0 mg L<sup>-1</sup>). Ivask et al. (2015) avaliaram o efeito de NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, NPs CuO e NPs Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> em células de mamíferos e observaram que abaixo de 100,0 mg L<sup>-1</sup> as NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> não apresentaram efeito sobre as células, enquanto que as NPs CuO e NPs Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> mostraram efeitos tóxicos sobre as células, sendo que a IC<sub>50-24h</sub> igual a 16,4 e 129,0 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente.

Organismos de outros níveis tróficos como os peixes apresentaram toxicidade aguda quando expostos as NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Ahmad et al., 2015). Após 24 horas de exposição os peixes da espécie *Danio rerio* sofreram 23,0% de mortalidade quando foram expostos à 58,65 mg L<sup>-1</sup>. Porém, após 48 horas a mortalidade foi menor que 5% nos tratamentos com 117,3 mg L<sup>-1</sup> de NPs e, em 96 horas não houve letalidade dos peixes

expostos às NPs. É possível que a presença das NPs tenha causado um efeito agudo inicial sobre os peixes, mas os organismos foram capazes de se recuperar desse efeito com o passar do tempo. No nosso trabalho, os efeitos de inibição do crescimento em *R. subcapitata* foram observados após 96 horas da exposição à 100,0 mg L<sup>-1</sup> de NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

Em relação ao conteúdo de clorofila *a* (pg cel<sup>-1</sup>), a exposição às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> na concentração de 100 mg L<sup>-1</sup> houve diminuição no conteúdo ao longo da exposição (Figura 3a). No entanto, a exposição às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> parece ter estimulado o aumento do conteúdo de clorofila *a* nas células no início da exposição (24 e 72 horas) (Figura 3b). Nas células expostas às NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> houve inicialmente uma diminuição no conteúdo de clorofila *a* na maioria dos tratamentos, mas houve uma visível recuperação após 96 horas (Figura 3c).

O efeito de NP Ag sobre o conteúdo de clorofila *a* foi avaliado em *Chlorella vulgaris* e *Dunaliella tertiolecta* (Oukarroum et al. 2012). Os autores observaram diminuição de 34% para a microalga *C. vulgares* expostas a 0,01 mg L<sup>-1</sup> de NP Ag e 51% para a microalga *D. tertiolecta* expostas a 10 mg L<sup>-1</sup> de NP Ag nas primeiras 24 horas de exposição. Metzler et al. (2012) verificaram que o conteúdo de clorofila *a* em *R. subcapitata* aumentou na presença de NP TiO<sub>2</sub> em concentrações acima de 30,0 mg L<sup>-1</sup>. Para NPs SiO<sub>2</sub> e NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> o conteúdo de clorofila *a* diminuiu em concentrações acima de 30,0 mg L<sup>-1</sup>. Dessa forma, podemos inferir que quando o parâmetro utilizado é o conteúdo de clorofila, as NPs Ag, NPs SiO<sub>2</sub> e NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mostraram-se mais tóxicas do que as NPs metálicas do presente estudo. Portanto, neste nosso estudo o conteúdo de clorofila *a* por célula não foi um *endpoint* sensível suficiente para avaliar os efeitos das NPs magnéticas.

O estudo da fluorescência da clorofila *a* é uma ferramenta útil para determinar efeitos tóxicos sobre o aparato fotossintético (Brack e Franck, 1998). Medições



fluorimétricas são um método rápido e sensível para avaliar a presença de poluentes (Juneau et al., 2000). Mallick e Mohn (2003) investigaram o modo de ação de metais (Cu, Cd, Ni, Cr e Zn) sobre a fluorescência da clorofila da alga *Scenedesmus obliquus* (Chlorophyta). O aumento da concentração desses metais (exceto Zn) elevou os valores da fluorescência mínima (Fo) em 12 horas de exposição e diminuiu os valores da fluorescência máxima (Fm) após 1 hora. Para esses autores, a diminuição dos valores de Fo indica que a eficiência na transferência de energia para o centro de reação no PSII foi severamente afetada pelos metais (Cd; Cu; Ni e Cr). Para as NPs utilizadas em nosso estudo, Fo foi mais afetada pela a exposição às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, com efeitos em 48 e 96 horas (Figura 4a e 4b). Já para a exposição às NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, o efeito mais pronunciado sobre a Fo ocorreu somente após 96 horas no tratamento com 50,0 mg L<sup>-1</sup> (Figura 4f). Em relação às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> foi observado um aumento da Fo apenas nas menores concentrações em 48 horas (Figura 4c). O efeito sobre a Fm foi mais evidente em 96 horas para as NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (Fm diminuiu em todos os tratamentos) (Figura 4d).

O Rendimento Quântico Máximo ( $\phi_m$ ) representa a emissão de fluorescência da clorofila *a* originada principalmente no fotossistema II (PSII). Este parâmetro indica o quanto de luz absorvida pelas microalgas foi utilizado na fotossíntese, ou seja, é um indicador sensível da performance fotossintética (Herloy et al., 2013; Kumar et al., 2014). Assim, no presente estudo os valores do  $\phi_m$  da microalga *R. subcapitata* cultivada sob intensidade luminosa de 130  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na ausência de NPs (controle) indicaram que cerca de 66% da luz absorvida por essa espécie foi utilizada nos processos fotossintéticos (Figura 5a, 5b e 5c).

Os valores do  $\phi_m$  em microalgas podem variar em função das condições de cultivo como meio utilizado, intensidade luminosa e fotoperíodo. El-Berdey et al. (2000) avaliaram que o  $\phi_m$  em *R. subcapitata* foi de 72% sob intensidade luminosa de 50  $\mu\text{mol}$

$\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e cultivada em meio Hutner a  $21^{\circ}\text{C}$ . Bährs e Steinberg (2012) também encontraram valores próximos a 72% em *R. subcapitata* sob  $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e meio BG11 (Stainer et al., 1971) com 14:10h (luz:escuro), assim como Choi et al. (2012) sob  $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  e meio Chu-10 (Chu, 1942) com 12:12h (luz:escuro) a  $18^{\circ}\text{C}$ .

Para algumas espécies de algas marinhas e plantas C3 os valores do  $\phi_m$  podem chegar a 83% (Chaloub et al., 2010; Bjorkman e Demming, 1987). No entanto, segundo Kumar et al. (2014) os valores do  $\phi_m$  podem variar em função de diferenças na estrutura celular, na composição do pigmento e, ainda, devido à fatores ambientais como disponibilidade de nutrientes, temperatura e luminosidade. No presente estudo, o  $\phi_m$  do controle pode ter sido afetado pela disponibilidade de nutrientes presentes no meio de cultivo (LC Oligo). Embora, inóculos da mesma cepa algal foram cultivados em meio BG11 e também apresentaram  $\phi_m$  igual a 66% (dados não apresentados).

Nas células submetidas às NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e NPs  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ , em geral, os valores do  $\phi_m$  diminuíram com o tempo na maioria dos tratamentos (Figura 5). Entretanto, o efeito no  $\phi_m$  nas NPs  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  foi mais acentuado em  $50,0 \text{ mg L}^{-1}$  ao final do período experimental (96 horas) (Figura 5b). Os valores de  $\phi_m$  nas microalgas expostas a  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  de NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  tiveram uma redução em 48 horas, porém houve recuperação nesta concentração a partir de 72 horas (Figura 5a). A exposição às NPs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$  causaram um aumento do  $\phi_m$  nos tratamentos de  $2,0$  a  $20 \text{ mg L}^{-1}$  (48 horas) e houve diminuição em  $100,0 \text{ mg L}^{-1}$  (72 horas), mas ao final (96 horas) os valores dos  $\phi_m$  nos tratamentos foram iguais ao controle (Figura 5c). Assim, após 96 horas a toxicidade para o  $\phi_m$  foi na ordem de NPs  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4 > \text{NPs Fe}_3\text{O}_4 > \text{NPs CoFe}_2\text{O}_4$ .

O  $\phi_m$  pode diminuir caso a reoxidação do acceptor primário de elétrons ( $Q_A$ ) (Greene et al., 1992) seja limitada pela diminuição ou bloqueio parcial do transporte de elétrons do PSII para o PSI, uma vez que em condições normais a alga é irradiada e  $Q_A$  é

oxidada pela transferência de elétrons no PSII (Mallick e Mohn, 2003). A redução do  $\phi_m$  seguida da recuperação observada nas células expostas a 100,0 mg L<sup>-1</sup> de NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> também foi observada por Antal et. al (2004) em estudos com *Chlamydomonas reinhardtii* e cloreto de metilmercúrio (MeHg) na concentração de 10<sup>-7</sup> M. Para esses autores, tal resultado mostra uma adaptação da alga ao tóxico. Juneau et. al (2002) inferiu que a alga *Chlorella vulgaris* na presença de cobre desenvolveu mecanismos de resistência ao metal após 48 horas de exposição, já que os efeitos de redução do  $\phi_m$  desapareceram.

Estudos com alga marinha *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyta) sob limitação de Fe demonstraram que o valor do  $\phi_m$  diminui, porém após a adição de Fe em concentrações nanomolares o  $\phi_m$  aumenta 2 a 3 vezes (Greene et al., 1992). Para as NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> utilizadas no presente estudo, o aumento do  $\phi_m$  em *R. subcapitata* ocorreu somente em 24 horas nas maiores concentrações dessas NPs (Figura 5). Para Greene et al. (1992), a limitação de ferro reduziu o  $\phi_m$  devido ao transporte lento de elétrons entre o acceptor primário de elétrons no PSII (Q<sub>A</sub>) e a plastoquinona (PQ) e também em função da redução da eficiência na conversão de energia no PSII, assim como menor eficiência na transferência de energia luminosa nos centros de reação do PSII.

Para outras NPs metálicas, como a NP Ag, o  $\phi_m$  diminuiu em *Chlamydomonas reinhardtii* devido à inibição do transporte de elétrons no PSII e aumento de centros Q<sub>B</sub> não-reduzidos (Matorin et. al., 2013), o parâmetro Q<sub>B</sub> é o acceptor secundário de elétrons no PSII (Greene et al., 1992). Para nanotubos de carbono o  $\phi_m$  diminuiu em 22% em *C. reinhardtii* na concentração de 2,0 mg L<sup>-1</sup>. Segundo Matorin et al. (2010) a diminuição do rendimento afetou a velocidade do transporte de elétrons e as membranas fotossintéticas e, nesse caso, diminuíram o gradiente de prótons na membrana relacionado a processos de síntese de ATP.

Em *Chlorella vulgaris* na presença de NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> e NP de cobre/zinco/ferro (com íons em diferentes proporções) o  $\phi_m$  diminuiu de 12% a 35% no tratamento com 400 mg L<sup>-1</sup> após 72 horas de exposição (Barhoumi e Dewez, 2013). Esses resultados, de acordo com o estudo, estão relacionados ao efeito inibitório das NPs, com maior efeito tóxico causado pela NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, sobre o PSII-*water-splitting* (o PSII está ligado a processos de separação da água e liberação de oxigênio (Matorin et al., 2010) e a fotoativação dos centros de reação do PSII, resultando na deterioração da atividade fotossintética do PSII. O PSII é um complexo pigmento-proteína no cloroplasto que catalisa a transferência de elétrons (induzida pela luz) da água para a plastoquinona (PQ). É composto por um centro de reação, pelo complexo clorofila-proteína coletor de luz (LHCII) e pelo sistema *water-splitting* (complexo de evolução do oxigênio – OEC = Fo/Fv) (Mattoo et al., 1999; Giardi et al., 2001). Para Juneau et al., (2002), o efeito do cobre na diminuição do  $\phi_m$  em *C. reinhardtii*, também é resultado da inibição no sistema *water splitting* no PSII.

No presente estudo os efeitos no sistema *water-splitting* ou OEC aumentaram na maior parte dos tratamentos com as NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, principalmente em 100,0 mg L<sup>-1</sup> após 48 horas e em 5,0 mg L<sup>-1</sup> após 96 horas (Figura 6b). Nas algas expostas às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, esse parâmetro foi mais evidente no tratamento com 50,0 mg L<sup>-1</sup> em 96 horas (Figura 7b). Já as NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> parecem não afetar o sistema *water-splitting* (OEC) (Figura 8b). Desse modo, após 96 horas a toxicidade para o sistema *water-splitting* (OEC) foi na ordem de NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> > Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> > NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

Os metais Cd; Cu; Ni; Cr e Zn têm um severo impacto no sistema *water-splitting*, pois provavelmente esses metais substituem o Mn (manganês) nesse sistema (Mallick e Mohn, 2003). Para esses autores, o aumento dos valores de OEC demonstram que o sistema *water-splitting* no PSII é o primeiro sítio de ação de metais. No entanto, para Lombardi e Maldonado (2011) os efeitos do cobre em concentrações subletais em *Phaeocystis*

*cordata* (Prymnesiophyceae) não têm como principal local de ação o sistema *water-splitting*, uma vez que no estudo de Lombardi e Maldonado (2011) o OEC aumentou apenas na maior concentração de cobre ( $7,9 \times 10^{-11}$  M). Em Mallick e Mohn (2003), as concentrações de cobre utilizadas foram de  $5 \times 10^{-5}$  M a  $2 \times 10^{-3}$  M.

O rendimento quântico efetivo da transformação de energia no PSII ( $\phi_m'$ ) avalia o rendimento real no transporte de elétrons na presença de luz (Matorin et al., 2010). No presente estudo, o  $\phi_m'$  foi inibido de forma mais acentuada nas maiores concentrações de NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (50,0 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 7a) e NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (50,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup>) (Figura 8a) em 96 horas. Para a NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, a inibição ocorreu apenas em 48 horas no tratamento com 10,0 mg L<sup>-1</sup> (Figura 6a). Após 96 horas a toxicidade para o  $\phi_m'$  foi na ordem de NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>  $\approx$  NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> < NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

Em *Chlamydomonas reinhardtii* a inibição do  $\phi_m'$  na presença de NP Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foi observada somente em 10 g L<sup>-1</sup> alterações funcionais no PSII indicam que essa NP afetou a transferência de energia no PSII (Costa et al., 2016). Juneau et al. (2002) também constataram diminuição do  $\phi_m'$  em *C. reinhardtii* e *R. subcapitata* na presença de cobre, porém de forma mais acentuada em *C. reinhardtii*, na qual os efeitos tóxicos do cobre afetaram o transporte de elétrons em concentrações acima de 0,01 mg L<sup>-1</sup>. Em *R. subcapitata*, o transporte de elétrons não foi inibido totalmente mesmo em concentrações elevadas de cobre. Miao et al. (2005) avaliaram os efeitos do zinco e cobre na cianobactéria *Synechococcus* sp. Nesse caso, também houve diminuição do  $\phi_m'$  em relação ao controle. Segundo esses autores, esses metais afetaram o transporte de elétrons, sendo que o zinco diminuiu a atividade do PSII pela inibição de cálcio e manganês.

A dissipação fotoquímica (Q<sub>p</sub>) representa a proporção de energia de excitação da luz convertida no processo fotoquímico pelos centros de reação no PSII ativos (Dewez et al., 2005). No presente estudo os valores de Q<sub>p</sub> aumentaram em 48 e 96 horas na maior

parte dos tratamentos com NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Figura 6c). Para as NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> o Qp em 48 horas também aumentou na maior parte dos tratamentos, mas em 96 horas apenas em 10,0 mg L<sup>-1</sup>(Figura 7c). Para as NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> o valor do Qp aumentou em 96 horas de exposição somente no tratamento com 5,0 mg L<sup>-1</sup> e, diminuiu em 48 e 96 horas nas concentrações mais elevadas (Figura 8c). A diminuição de Qp inidica que o transporte de elétrons foi inibido (Juneau e Popovic, 1999).

A energia absorvida não é totalmente utilizada em reações fotoquímicas, uma parte é emitida como calor e fluorescência (Brank e Franck, 1998). A dissipação não-fotoquímica (Qn) e dissipação não-fotoquímica relacionada a dissipação de calor (NPQ) representam todas as outras formas de dissipação de energia, sendo Qn relacionado à reflexão da fluorescência, ou seja, representa a fluorescência que não está relacionada ao processo fotoquímico no PSII e NPQ está relacionado à dissipação de calor (Dewez et al., 2005). No presente estudo os valores de Qn e NPQ aumentaram após 48 horas nos tratamentos de 10,0 a 50,0 mg L<sup>-1</sup> de NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, porém em 100,0 mg L<sup>-1</sup> os valores foram negativos. Em 96 horas Qn aumentou para os mesmos tratamentos, mas NPQ aumentou apenas em 100,0 mg L<sup>-1</sup> de NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (Figura 6d e 6e). Para as NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, os Qn e NPQ aumentaram após 48 horas na maior parte dos tratamentos e, após 96 horas, apenas nas menores concentrações, com redução em 50,0 mg L<sup>-1</sup>(Figura 7d e 7e). Para as NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, os Qn e NPQ aumentaram após 48 horas na maioria dos tratamentos, porém após 96 horas de exposição os valores de Qn e NPQ diminuíram nos tratamentos acima de 20,0 mg L<sup>-1</sup>(Figura 8d e 8e).

Juneau et al. (2002) avaliaram o efeito do cobre sobre as microalgas *R. subcapitata* e *C. reinhardtii*, registrando efeitos mais pronunciados em *C. reinhardtii*, nas concentrações acima de 0,01 mg L<sup>-1</sup>, houve diminuição do Qp e aumento do Qn. Segundo os autores, Qn diminuiu nas concentrações acima de 0,025 mg L<sup>-1</sup>, pois o transporte de

elétrons no PSII foi completamente inibido e, aumentou nas concentrações mais baixas em função da inibição parcial do processo fotoquímico de energia-consumo, aumentando a dissipação de energia através do processo não-fotoquímico.

O NPQ representa a dissipação térmica através de mecanismos de fotoproteção e, portanto, a diminuição nos valores de NPQ indicam que a proteção desses sistemas foram afetados pelo contaminante (Costa et al., 2016). Assim, no presente estudo os mecanismos de fotoproteção foram afetados de forma significava no tratamento com 100,0 mg L<sup>-1</sup> de NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (valor de NPQ foi negativo) em 48 horas, mas em 96 horas o NPQ aumentou, indicando a capacidade da alga em superar os efeitos nocivos dessas NPs. Para as NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, o sistema NPQ foi afetado mais tardiamente (após 96 horas), porém de forma mais expressiva para as NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.

As espécies reativas ao oxigênio (ROS– *reactive oxygen species*) são produtos normais do metabolismo do oxigênio (Ahmad et al., 2015). No entanto, a produção de ROS pode ser estimulada por estresse ambiental (como alta intensidade luminosa), presença de metais pesados, aleloquímicos, entre outros (Mallick e Mohn, 2000).

O estresse oxidativo induzido pela produção de ROS foi mais evidente nas células algais submetidas às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> apenas nas concentrações mais elevadas e somente após 72 horas (Figura 9a). Para as células expostas às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, a produção de ROS foi crescente durante todos os dias (Figura 9b). Para essa NP (Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), o mecanismo de toxicidade por indução de estresse oxidativo foi mais sensível sendo afetado mesmo em concentrações baixas de exposição. Para as NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, a produção de ROS foi relevante nas maiores concentrações em 0 hora e após 48 horas (Figura 9c).

A produção de ROS sob efeito de chumbo em *Scenedesmus* e *Chlorella* sp aumentou em função do aumento do nível de chumbo, porém diminuiu drasticamente na concentração mais elevada (Dao e Beardall, 2016). Segundo esses autores, genes

envolvidos na biossíntese de antioxidantes são possivelmente expressos nas algas em tratamentos com metais, reduzindo os níveis de ROS com o aumento dos dias de cultivo. Para o metal cobre, a indução de ROS em *R. subcapitata* e *C. vulgaris* (0,02 mg L<sup>-1</sup> de cobre) pode ter sido desencadeado por um sistema de proteção celular através da ativação de enzimas antioxidantes (Knauert e Kanuer, 2008).

Para neutralizar a toxicidade de ROS, as células desenvolveram um sistema de defesa antioxidante enzimático, por exemplo, a superóxido dismutase converte o ânion superóxido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a catalase remove diretamente o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, e ainda mecanismos não-enzimáticos envolvendo ácido ascórbico e glutatona reduzida podem remover radicais hidroxila e oxigênio atômico (Hong et al., 2009). A ativação de alguns antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos em *Microcystis aeruginosa* (cianobactéria) na presença de aleloquímicos (fitotóxicos) foi observada por Hong et al. (2009) devido ao aumento no nível de ROS.

A produção de ROS em *C. vulgaris* aumentou apenas em concentrações de NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> superiores a 400,0 mg L<sup>-1</sup> após 72 horas de exposição, nestas condições houve diminuição do nível de antioxidantes, o que resultou na acumulação de ROS (Chen et al., 2012). Nas concentrações mais baixas houve aumento da superóxido dismutase (SOD) (antioxidante), mostrando que a produção de SOD induziu a remoção de ROS e protegeu as células algais em concentrações inferiores a 400,0 mg L<sup>-1</sup> de NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

As NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> podem liberar ions Co<sup>2+</sup> e Fe<sup>3+</sup> no ambiente e causar estresse oxidativo induzido pela produção de ROS. Os metais pesados podem causar despolarização da membrana e acidificação do citoplasma, o que pode acarretar a ruptura da célula algal. Adaptações das células como exsudação de compostos quelantes e transporte ativo dos íons podem ocasionar um certo grau de tolerância das algas aos metais (Ahmad et al., 2015). Em *Danio rerio* a produção de ROS aumentou de 40 a 70%



em tratamentos de 2,35 a 58,6 mg L<sup>-1</sup> NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> após 96 horas de exposição, induzindo a apoptose celular, mudanças comportamentais e redução da visibilidade (Ahmad et al., 2015). Alarafi et al. (2013) mostraram que em célula hepatocarcinoma as NPs Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> induziram o estresse oxidativo pela formação de ROS, contribuindo para a citotoxicidade e genotoxicidade dessas células cancerígenas.

Nas microalgas *Chlamydomonas reinhardtii* a produção de ROS aumentou na presença de 4,0 mg L<sup>-1</sup> NP CuO após 6 horas de exposição em 392% (Perreault et al., 2012). Em Oukarroum et al. (2012) o tratamento de 1 mg L<sup>-1</sup> NPs Ag induziu o aumento de ROS em 44% em *C. vulgaris* e 123% em *D. tertiolecta*. Em 10 mg L<sup>-1</sup> de NPs Ag a produção de ROS aumentou 7 vezes em *C. vulgaris* e 25 vezes em *D. tertiolecta*. A solubilização das NPs em metais livres é considerada como o mecanismo de toxicidade mais comum. Assim, para Oukarroum et al. (2012), os íons Ag<sup>+</sup> podem ter contribuído para o aumento na produção de ROS, sendo este um endpoint sensível para a toxicidade de NPs Ag. Em relação às NPs utilizadas no presente estudo a produção de ROS também mostrou ser um *endpoint* sensível na ordem NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> > NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> > NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

Nossos resultados indicam que os parâmetros de fluorescência da clorofila *a* e a indução de estresse oxidativo na presença de ROS foram *endpoints* eficientes para avaliar a toxicidade de nanopartículas magnéticas na espécie de microlaga estudada. Assim, o uso desses processos em ensaios ecotoxicológicos deve ser explorado.

## 6. Conclusões

Os parâmetros de densidade celular, clorofila *a* ( $\mu\text{g cel}^{-1}$ ) e inibição média do crescimento (IC50) mostraram-se *endpoints* pouco sensíveis na avaliação da toxicidade de nanopartículas magnéticas sobre a microalga *Raphidocelis subcapitata*.

Em relação aos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* sobre o aparato fotossintético, os resultados apresentados neste estudo demonstraram ser um pouco mais sensíveis para a avaliação da toxicidade de nanopartículas magnéticas. Nossos resultados mostraram que o rendimento quântico máximo ( $\Phi_m$ ) diminuiu significativamente nas células algais expostas às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, o que pode estar associado à inibição do complexo de evolução do oxigênio (OEC). Foi possível observar aumento dos valores de OEC nas células algais submetidas às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e NP Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. O incremento dos valores de OEC demonstra que o sistema *water-splitting* no PSII é um sítio de ação importante dessas NPs.

Aparentemente as NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> afetaram o sistema de transporte de elétrons do PSII, visto que nas concentrações mais elevadas houve diminuição do rendimento quântico efetivo ( $\Phi_m'$ ) após 96 horas. Os parâmetros de dissipação não-fotoquímica diminuíram acentuadamente nas células expostas às NPs Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> (100,0 mg L<sup>-1</sup>) após 48 horas, indicando que o transporte de elétrons foi completamente inibido. No entanto, após 96 horas, o mecanismo de transporte de elétrons parece ter sido retomado. Para as NP Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> e NP CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, as dissipações não-fotoquímicas foram afetadas somente após 96 horas. A diminuição de NPQ revela que mecanismos de fotoproteção foram afetados pela exposição a essas NPs.

O estresse oxidativo induzido pela produção de ROS foi evidente para as algas expostas às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> em todos os dias avaliados; para as NPs CoFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>, os efeitos

foram mais pronunciados após 48 horas. Para as NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , os efeitos foram significativos apenas após 72 horas de exposição. É possível que mecanismos de defesa intracelulares como a atividade de enzimas antioxidantes tenham agido após a exposição prolongada às NPs  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  e NPs  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ . No entanto, para as células expostas às NPs  $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$ , os mecanismos de defesa antioxidantes podem ter aumentado sua atividade após 96 horas, já que a quantidade de ROS produzida diminuiu em 96 horas quando comparada a 0 hora.

## Referências

- Chaloub, R. M., Reinert, F., Nassar, C. A., Fleury, B. G., Mantuano, D. G., e Larkum, A. W., 2010. Photosynthetic properties of three Brazilian seaweeds. *Braz J Botany*, 33(2), 371-374. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-84042010000200017>
- Chen, P. J., Tan, S. W., e Wu, W. L., 2012. Stabilization or oxidation of nanoscale zerovalent iron at environmentally relevant exposure changes bioavailability and toxicity in medaka fish. *Environ Sci Technol*, 46(15), 8431-8439. <http://dx.doi.org/10.1021/es3006783>
- Chen, X., Zhu, X., Li, R., Yao H., Lu, Z., Yang, X., 2012. Photosynthetic toxicity and oxidative damage induced by nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> on *Chlorella vulgaris* in aquatic environment. *Open J Ecol*, 2012. <http://dx.doi.org/10.4236/oje.2012.21003>
- Choi, C. J., Berges, J. A., e Young, E. B., 2012. Rapid effects of diverse toxic water pollutants on chlorophyll a fluorescence: variable responses among freshwater microalgae. *Water Res*, 46(8), 2615-2626. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.02.027>
- Chu, S. P., 1942. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae: part I. Methods and culture media. *The J Ecol*, 284-325. <http://dx.doi.org/10.2307/2256574>
- Costa, C. H., Perreault, F., Oukarroum, A., Melegari, S. P., Popovic, R., e Matias, W. G., 2016. Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci Total Environ*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.01.028>
- Dao, L. H., e Beardall, J., 2016. Effects of lead on growth, photosynthetic characteristics and production of reactive oxygen species of two freshwater green algae. *Chemosphere*, 147, 420-429. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.117>
- Dewez, D., Geoffroy, L., Vernet, G., e Popovic, R., 2005. Determination of photosynthetic and enzymatic biomarkers sensitivity used to evaluate toxic effects of copper and fludioxonil in alga *Scenedesmus obliquus*. *Aquat Toxicol*, 74(2), 150-159. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2005.05.007>
- El Berdey, A., Juneau, P., Pirastru, L., e Popovic, R., 2000. Application of the PAM fluorometric method for determination of copper toxicity to microalgae and duckweed. In *New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring* (pp. 135-140). Springer US. [http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-4289-6\\_11](http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-4289-6_11)
- Genty, B., Briantais, J.M., e Baker, N. R., 1989. The Relationship between Quantum Yield of Photosynthetic Electron Transport and Quenching of Chlorophyll Fluorescence, *Biochim. Biophys. Acta* 990, 87-92 [http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165\(89\)80016-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0304-4165(89)80016-9)
- Giardi, M. T., Koblizek, M., e Masojidek, J., 2001. Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. *Biosens Bioelectron*, 16(9), 1027-1033. [http://dx.doi.org/10.1016/S0956-5663\(01\)00197-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0956-5663(01)00197-X)
- Greene, R. M., Geider, R. J., Kolber, Z., e Falkowski, P. G., 1992. Iron-induced changes in light harvesting and photochemical energy conversion processes in eukaryotic marine algae. *Plant Physiol*, 100(2), 565-575. <http://dx.doi.org/10.1104/pp.100.2.565>
- Herlory, O., Bonzom, J. M., e Gilbin, R., 2013. Sensitivity evaluation of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* to uranium by pulse amplitude modulated (PAM) fluorometry. *Aquatic Toxicol*, 140, 288-294. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.06.007>
- Hong, Y., Hu, H. Y., Xie, X., Sakoda, A., Sagehashi, M., e Li, F. M. 2009. Gramine-induced growth inhibition, oxidative damage and antioxidant responses in freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. *Aquatic Toxicol*, 91(3), 262-269. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.11.014>

- Ivask, A., Titma, T., Visnapuu, M., Vija, H., Kakinen, A., Sihtmae, M., Shimmo, R., 2015. Toxicity of 11 metal oxide nanoparticles to three mammalian cell types in vitro. *Curr Top Med Chem*, 15(18), 1914-1929.
- Juneau, P. e Popovic, R., 1999. Evidence for the rapid phytotoxicity and environmental stress evaluation using the PAM fluorometric method: importance and future application. *Ecotoxicology*, 8(6), 449-455. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1008955819527>
- Juneau, P., El Berdey, A., e Popovic, R., 2002. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Arch Environ Com Tox*, 42(2), 155-164. <http://dx.doi.org/10.1007/s00244-001-0027-0>
- Kim, E. J., Le Thanh, T., e Chang, Y. S., 2014. Comparative toxicity of bimetallic Fe nanoparticles toward *Escherichia coli*: mechanism and environmental implications. *Environ Sci: Nano*, 1(3), 233-237. <http://dx.doi.org/10.1039/C3EN00057E>
- Kitajima, M. e Butler, W. L., 1975. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by dibromothymoquinone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 376(1), 105-115. [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2728\(75\)90209-1](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2728(75)90209-1)
- Knauert, S., e Knauer, K., 2008. The role of reactive oxygen in species in copper toxicity to freshwater green algae. *J Phycol*, 44(2), 311-319. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1529-8817.2008.00471.x>
- Kriedemann, P. E., Graham, R. D., e Wiskich, J. T., 1985. Photosynthetic dysfunction and in vivo changes in chlorophyll a fluorescence from manganese-deficient wheat leaves. *Crop Pasture Sci*, 36(2), 157-169. <http://dx.doi.org/10.1071/AR9850157>
- Kumar, K. S., Dahms, H. U., Lee, J. S., Kim, H. C., Lee, W. C., e Shin, K. H., 2014. Algal photosynthetic responses to toxic metals and herbicides assessed by chlorophyll a fluorescence. *Ecotox Environ Safe*, 104, 51-71. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.01.042>
- Lambers, H., Chapin III, F. S., e Pons, T. L., 2008. Photosynthesis. In *Plant Physiol Ecol* (pp. 11-99). Springer New York. [http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-78341-3\\_2](http://dx.doi.org/10.1007/978-0-387-78341-3_2)
- Lei, C., Zhang, L., Yang, K., Zhu, L., e Lin, D., 2016. Toxicity of iron-based nanoparticles to green algae: Effects of particle size, crystal phase, oxidation state and environmental aging. *Environ Pollut*, 218, 505-512. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.07.030>
- Liu, G., Gao, J., Ai, H., e Chen, X., 2013. Applications and potential toxicity of magnetic iron oxide nanoparticles. *Small*, 9(9-10), 1533-1545. <http://dx.doi.org/10.1002/sml.201201531>
- Lombardi, A. T., e Maldonado, M. T., 2011. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. *Photosynth Res*, 108(1), 77-87. <http://dx.doi.org/10.1007/s11120-011-9655-z>
- Mallick, N., e Mohn, F. H., 2000. Reactive oxygen species: response of algal cells. *J Plant Physiol*, 157(2), 183-193. [http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80189-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80189-3)
- Mallick, N., e Mohn, F. H., 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicol Environ Safe*, 55(1), 64-69. [http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513\(02\)00122-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0147-6513(02)00122-7)
- Matorin, D. N., Karateyeva, A. V., Osipov, V. A., Lukashev, E. P., Seifullina, N. K., Rubin, A. B., 2010. Influence of carbon nanotubes on chlorophyll fluorescence parameters of green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nanotechnologies in Russia*, 5(5-6), 320-327. <http://dx.doi.org/10.1134/S199507801005006X>
- Matorin, D. N., Todorenko, D. A., Seifullina, N. K., Zayadan, B. K., e Rubin, A. B., 2011. Effect of silver nanoparticles on the parameters of chlorophyll fluorescence and P700 reaction in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microbiology*, 82(6), 809-814. <http://dx.doi.org/10.1134/S002626171401010X>

- Mattoo, A. K., Giardi, M. T., Raskind, A., e Edelman, M., 1999. Dynamic metabolism of photosystem II reaction center proteins and pigments. *Physiologia Plantarum*, 107(4), 454-461. <http://dx.doi.org/10.1034/j.1399-3054.1999.100412.x>
- Metzler, D. M., Erdem, A., Tseng, Y. H., & Huang, C. P., 2012. Responses of algal cells to engineered nanoparticles measured as algal cell population, chlorophyll a, and lipid peroxidation: effect of particle size and type. *Journal of Nanotechnology*, 2012. <http://dx.doi.org/10.1155/2012/237284>
- Miao, A. J., Wang, W. X., e Juneau, P., 2005. Comparison of Cd, Cu, and Zn toxic effects on four marine phytoplankton by pulse-amplitude-modulated fluorometry. *Environ Toxicol Chem*, 24(10), 2603-2611. <http://dx.doi.org/10.1897/05-009R.1>
- Murchie, E. H., e Lawson, T., 2013. Chlorophyll fluorescence analysis: a guide to good practice and understanding some new applications. *J Exp Bot*, ert208. <http://dx.doi.org/10.1093/jxb/ert208>
- Otero-González, L., García-Saucedo, C., Field, J. A., e Sierra-Álvarez, R., 2013. Toxicity of TiO<sub>2</sub>, ZrO<sub>2</sub>, Fe<sub>0</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and Mn<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Chemosphere*, 93(6), 1201-1206. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.06.075>
- Oukarroum, A., Bras, S., Perreault, F., e Popovic, R., 2012. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. *Ecotoxicol Environ safe*, 78, 80-85. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.11.012>
- Oxborough, K. e Baker, N. R., 1997. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components—calculation of qP and Fv-/Fm-; without measuring Fo. *Photosynth Res*, 54(2), 135-142. <http://dx.doi.org/10.1023/A:1005936823310>
- Padgurskas, J., Prosycevas, I., Rukuiza, R., Kreivaitis, R., e Kupcinskas, A., 2012. Development and modification of Fe and FeCu nanoparticles and tribological analysis of the lubricants with nano-suspensions. *Ind Lubr Tribol*, 64(5), 253-257. <http://dx.doi.org/10.1108/00368791211249638>
- Perreault, F., Oukarroum, A., Melegari, S. P., Matias, W. G., e Popovic, R., 2012. Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere*, 87(11), 1388-1394. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2012.02.046>
- Pinto, E., Sigaud-kutner, T., Leitao, M. A., Okamoto, O. K., Morse, D., e Colepicolo, P., 2003. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. *J Phycol*, 39(6), 1008-1018. <http://dx.doi.org/10.1111/j.0022-3646.2003.02-193.x>
- Sarmento, H., Unrein, F., Isumbisho, M., Stenuite, S., Gasol, J. M., e DESCY, J. P., 2008. Abundance and distribution of picoplankton in tropical, oligotrophic Lake Kivu, eastern Africa. *Freshwater Biol*, 53(4), 756-771. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2427.2007.01939.x>
- Schreiber, U., 1986. Detection of rapid induction kinetics with a new type of high-frequency modulated chlorophyll fluorometer. *Curr Topics Photosynth* (pp. 259-270). Springer Netherlands. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00029749>
- Schreiber, U., 1998. Chlorophyll fluorescence: new instruments for special applications. *Photosynth: mechanisms effects*, 5, 4253-4258.
- Stanier, R. Y., Kunisawa, R., Mandel, M., e Cohen-Bazire, G., 1971. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 35(2), 171. PMID: PMC378380
- Xiao, K., Bao, Z., Qi, X., Wang, X., Zhong, L., Lin, M., Sun, Y., 2013. Unsupported CuFe bimetallic nanoparticles for higher alcohol synthesis via syngas. *Catalysis Communications*, 40, 154-157. <http://dx.doi.org/10.1016/j.catcom.2013.06.024>

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo contribuiu para a avaliação do comportamento das nanopartículas magnéticas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e nanopartículas magnéticas bimetálicas ( $\text{Cu-Fe}_2\text{O}_4$  e  $\text{CoFe}_2\text{O}_4$ ) em ambientes aquáticos. As respostas fisiológicas das algas foram alteradas por essas partículas apenas nas concentrações mais elevadas, acima de  $50 \text{ mg L}^{-1}$ .

A quantidade de proteína e carboidratos presentes nas células indicou boa condição fisiológica das microalgas mesmo sob concentrações elevadas das nanopartículas estudadas, indicando que as NPs não causaram alterações graves no *uptake* de nutrientes para as células algais.

O acúmulo de lipídeos totais e algumas classes lipídicas pode ser um bom indicativo do potencial de utilização na produção de biocombustíveis. A baixa toxicidade dessas NPs em *Raphidocelis subcapitata* também contribui para utilização dessas nanopartículas na colheita de algas, fase importante na produção de biodiesel, e em processos de remediação ambiental.

A sensibilidade dos parâmetros de fluorescência da clorofila *a* sobre o aparato fotossintético demonstraram ser um pouco mais evidentes para a avaliação da toxicidade de nanopartículas magnéticas, com destaque para a inibição do complexo de evolução do oxigênio que demonstra que o sistema *water-splitting* no PSII é um sítio de ação importante dessas NPs e inibição do transporte de elétrons em concentrações mais elevadas, devido à diminuição do rendimento quântico efetivo e à dissipação não-fotoquímica.

O estresse oxidativo nas algas expostas às NPs Cu-Fe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> foi mais evidente em comparações às demais NPs desse estudo, indicando que possivelmente íons cobre tenham afetado o mecanismo antioxidante nas células algais. Assim, apesar dos efeitos tóxicos sobre as taxas de crescimento, clorofila *a*, composição bioquímica e aparato fotossintético serem baixos, as nanopartículas bimetálicas com íons cobre, causaram maiores alterações em *R. subcapitata*.



## Referências

- ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011 (ABNT NBR 12648). Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 24p.
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J. Y., Lowry, G. V., Jolivet, J. P., Wiesner, M. R., 2009. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nat Nanotechnol*, 4 (10), 634-641. <http://dx.doi.org/10.1038/nano.2009.242>
- Bähns, H., & Steinberg, C. E. (2012). Impact of two different humic substances on selected coccal green algae and cyanobacteria—changes in growth and photosynthetic performance. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(2), 335-346. <http://dx.doi.org/10.1007/s11356-011-0564-7>
- Boudou, A., & Ribeyre, F., 1997. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. *Environ Health Persp*, 105(Suppl 1), 21.
- Bystrzejewska-Piotrowska, G., Golimowski, J., & Urban, P. L., 2009. Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. *Waste Manage*, 29(9), 2587-2595. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2009.04.001>
- Hasany, S. F., Rehman, A., Jose, R., & Ahmed, I., 2012. Iron oxide magnetic nanoparticles: A short review. In *Internacional Conference on nanotechnology-research ans commercialization 2011:(ICONT 2011)* (Vol. 1502, No. 1, pp. 298-321). AIP Publishing. <http://dx.doi.org/10.1063/1.4769153>
- Hindak, F., 1990. Pseudokirchneriella subcapitata Korshikov. *F. Biologicke Prace*, 5, 209.
- Issa, B., Obaidat, I. M., Albiss, B. A., Haik, Y., 2013. Magnetic nanoparticles: surface effects and properties related to biomedicine applications. *Int J Mol Sci*, 14(11), 21266-21305. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms141121266>
- Krug, H. F. e Wick, P., 2011. Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. *Angew Chem Intern Edit*, 50(6), <http://dx.doi.org/1260-1278.10.1002/anie.201001037>
- Lovern, S. B., e Klaper, R., 2006. Daphnia magna mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. *Environ Toxicol Chem*, 25(4), <http://dx.doi.org/1132-1137.10.1897/05-278R.1>
- Moore, M. N., 2006. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environ Int*, 32(8), 967-976. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envint.2006.06.014>
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L., Li, N., 2006. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, 311(5761), 622-627. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1114397>.
- OECD, *Organization for Economic Co-operations and Development*, 2002. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. Organisation for Economic Co-operation and Development, Paris. PMC1470317
- Riehemann, K., Schneider, S. W., Luger, T. A., Godin, B., Ferrari, M., & Fuchs, H., 2009. Nanomedicine—challenge and perspectives. *Angew Chem Int Edit*, 48(5), 872-897. <http://dx.doi.org/10.1002/anie.200802585>
- Sanchez, F. e Sobolev, K., 2010. Nanotechnology in concrete—a review. *Constr Build Mater*, 24(11), 2060-2071. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2010.03.014>