

Ana Clara Arguelhes Pedrazzoli

REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS DIMINUEM A TOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA MICROALGA *Chlorella fusca*?

SÃO VICENTE
2024

REVESTIMENTOS POLIMÉRICOS DIMINUEM A TOXICIDADE DE
NANOPARTÍCULAS DE PRATA NA MICROALGA *Chlorella fusca*?

Trabalho de Conclusão de Curso na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Instituto de Biociências, Câmpus do Litoral Paulista. Para obtenção do título de grau de Bacharel em Ciências Biológicas com habilitação em Biologia Marinha.

Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni

P371r Pedrazzoli, Ana Clara Arguelhes
Revestimentos poliméricos diminuem a toxicidade de
Nanopartículas de prata na microalga *Chlorella fusca*? / Ana Clara
Arguelhes Pedrazzoli. -- São Vicente, 2024
30 p. : il., tabs., fotos

Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado - Ciências
Biológicas) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de
Biociências, São Vicente
Orientadora: Cristiane Angélica Ottoni

1. Bioquímica. 2. Biologia molecular. 3. Nanocompósitos
(Materiais). I. Título.

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais Isabel e Marco, e aos meus avós Célia e Licinho, por terem me apoiado e me dado força durante toda a minha graduação e vida. Agradeço também aos meus amigos Carlos, Simone e Dudu, que com o passar do tempo se tornaram também parte da minha família.

Agradeço à minha orientadora Cris, por ter me aceito no laboratório e me orientar, me proporcionando todo o conhecimento e suporte durante todos esses anos. Agradeço aos meus companheiros Charel e Juriti, e ao professor Leandro, que sempre me ajudaram nos momentos em que precisei.

Agradeço a minha companheira Lei, que conheci durante minha graduação, e aos seus pais, Alexsandra e Zinho.

Agradeço aos amigos que me acompanharam e deixaram a graduação mais leve e feliz - Metheus, Carlos, Diana, Quente, Continência, Carminha, Dot, Lin, Mamatinha, Miltchu, Opala, Rock, Sea, Spotify, Murilo, Letrudo, Lucilly, Boom, Lego, Arejado, Murta, Laura e Bettiol.

Agradeço aos servidores Badão e Conceição, que sempre me apoiaram em momentos difíceis.

Agradeço aos meus amigos Lili, Cuddy, Maxi e Danilo, que fizeram minhas madrugadas mais felizes.

Agradeço a AAA CLP por ter feito parte da minha jornada, me proporcionando experiências que eu jamais poderia ter imaginado.

Por fim, gostaria de agradecer a COPE Unesp pelo apoio financeiro e ao Instituto de Biociências do Câmpus Litoral Paulista da UNESP por fornecer toda a estrutura necessária para minha graduação e laboratório.

Resumo

As nanopartículas de prata (AgNPs) afetam diretamente os ambientes aquáticos. Uma maneira de mitigação é a sua síntese verde, realizada através de organismos biológicos, a qual promove a biocompatibilidade com organismos. A biossíntese de AgNPs através do bagaço da cana de açúcar se torna uma produção sustentável, visto que o bagaço é considerado um resíduo agroindustrial e seu uso diminui impactos ambientais. O uso de revestimentos poliméricos para as nanopartículas, como o cloreto de polidialildimetilamônio (Pdadmac), aumenta a estabilidade superficial e diminui a toxicidade para os diferentes gêneros. Diante desse contexto, foi avaliada a toxicidade de AgNPs produzidas através do bagaço da cana e revestidas com Pdadmac na espécie de microalga dulcícola *Chlorella fusca* em concentrações compreendidas entre 0.85–6.8 µL durante 7 dias. O ensaio foi realizado em duplicata em frascos Erlenmeyer a partir da concentração algal de $1,0 \times 10^4$ cel/ml. A determinação do crescimento celular de *C. fusca* foi realizada através da contagem celular com uma câmara de Neubauer. Dos três compostos analisados (AgNP, Pdadmac e AgNP Pdadmac), AgNP apresentou uma menor toxicidade após 168h de ensaio, apresentando ser uma alternativa eficiente à síntese de nanopartículas de prata. Os compostos Pdadmac e AgNP Pdadmac apresentaram uma alta toxicidade. Diante disso, são necessários estudos adicionais em diferentes níveis tróficos de maior complexidade e ambientes a fim de estabelecer uma melhor análise das AgNPs revestidas com Pdadmac.

Palavras-Chave: Bagaço da cana-de-açúcar, nanopartículas de prata biogênicas, cloreto de polidialildimetilamônio, *Chlorella fusca*.

Sumário

1. Introdução.....	7
2. Revisão Bibliográfica	7
3. Objetivo	14
4. Materiais e Métodos	14
5. Resultados.....	16
6. Discussão	20
7. Conclusão	22
8. Referências bibliográficas	23

1. Introdução

Nanopartículas de prata (AgNPs) são partículas de tamanho menor que 100 nm, possuindo propriedades físicas e químicas únicas (Wang, 2016). Possuem aplicações em diversos setores, como têxtil, tecnológico e farmacêutico (Sendra *et al.*, 2017; Abou El-Nour *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016). Por conta de sua vasta utilização, é impossível evitar com que adentrem o ambiente aquático, sendo transformadas e transportadas, causando efeitos adversos na biota destes ambientes (Mahana *et al.*, 2021; Islam *et al.*, 2021). A sua síntese pode ser feita por vias químicas, físicas e biológicas. Porém, a biológica destaca-se em comparação a química e física por conta da utilização de produtos químicos relativamente atóxicos, sendo ecologicamente amigável (síntese verde) e uma alternativa a utilização na indústria, visto que apresenta menor toxicidade às espécies pela sua alta biocompatibilidade (Silva *et al.*, 2017; Palithya *et al.*, 2021; Iwuozor *et al.*, 2022). O bagaço da cana-de-açúcar pode ser utilizado para a biossíntese de AgNPs, principalmente por ser considerado um resíduo agroindustrial e auxiliar no desenvolvimento sustentável, reduzindo impactos ambientais (Pinto, 2019; Rai *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2017; Cordeiro *et al.*, 2020). Além disso, uma maneira de mitigar mais ainda o impacto das AgNPs é o uso de revestimentos da superfície das nanopartículas. Muitas substâncias orgânicas, como polímeros, podem ser utilizadas, sendo selecionadas de acordo com as suas propriedades individuais (Yang *et al.*, 2012; Najahi-Missaoui *et al.*, 2020; Restrepo & Villa, 2021). O cloreto de polidialildimetilamônio (Pdadmac), por ser um polímero, é um agente estabilizador em potencial, podendo realizar a estabilização e aumentar a biocompatibilidade das AgNPs. A fim de testar a toxicidade destes compostos, é interessante utilizar gêneros modelo que sofrem diretamente com a ação das nanopartículas, principalmente por seus produtores estarem localizados em áreas de descarga marinha ou estuarina. As microalgas dulcícolas como a *Chlorella fusca* representam a base da teia trófica dos ambientes aquáticos de água doce, sendo os primeiros alvos dos poluentes presentes no meio (Moreno-Garrido *et al.*, 2015). As AgNPs podem ocasionar a inibição do crescimento celular, afetando o restante da teia trófica e os ambientes aquáticos (Bettio, 2020; Romero *et al.*, 2020).

1. Revisão Bibliográfica

Bionanotecnologia

O prefixo “nano” tem origem etimológica grega e significa anão. Esse termo indica dimensões físicas que estão na ordem de um bilionésimo de qualquer unidade de medida (Hupffer & Lazzaretti, 2019). A nanotecnologia emergiu como uma área de alto destaque por conta da sua vasta dimensão de aplicações industriais, sendo acompanhada de um rápido

crescimento na pesquisa científica. Ela promove transformações e melhorias significativas em diversas áreas, contribuindo para o bem-estar da sociedade nos termos como segurança alimentar e medicina, alterando significativamente a dinâmica social, condições econômicas e a vida humana (Haleem *et al.*, 2023; Kargozar & Mozafari, 2018).

A bionanotecnologia é uma das aplicações da nanotecnologia, a qual integra várias ciências, como a física, química, biologia e dos materiais. É utilizada para criar materiais, dispositivos e sistemas utilizados para estudar sistemas biológicos e desenvolver tecnologias, a fim de utilizá-las no campo biológico. Existem diversos produtos provindos da bionanotecnologia que são utilizados, como os sistemas de materiais em nanoescala com nanopartículas (AgNPs, AuNPs, entre outros) e moléculas biológicas, possuindo várias aplicações em todos os setores industriais (Nagamune, 2017; Silva *et al.*, 2017).

Nanopartículas de prata (AgNPs)

Nanomateriais manufaturados assim como as nanopartículas (NPs) são definidos como materiais em que pelo menos uma dimensão possui um tamanho menor do que 100 nm. Nesta nanoescala, os nanomateriais apresentam propriedades físicas e químicas únicas, tais como uma elevada área superficial e efeitos de tamanho em nanoescala, sendo amplamente utilizados em produtos comerciais (Wang, 2016).

As nanopartículas de prata (AgNPs) são uma forma especial de prata metálica. Sua capacidade de liberação de íons Ag^+ pela superfície da partícula faz com que ela seja tão produzida e utilizada em diversos setores (têxtil, tecnológico, alimentar, produtos de consumo, sensores, entre outros), e principalmente em aplicações contra agentes microbianos (Sendra *et al.*, 2017; Abou El-Nour *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016). Em 2016, a estimativa de sua produção mundial foi de 420 toneladas por ano. É essencial garantir que a sua produção, realizada em larga escala, seja feita de forma que não comprometa os recursos naturais vitais e que aproveite plenamente o seu potencial (Husain *et al.*, 2023).

Cerca de 2500 toneladas métricas de prata são descartadas no meio ambiente todos os anos como resultado de resíduos e emissões industriais, com 150 toneladas métricas adicionais terminando em lodo de esgoto e 80 toneladas métricas indo para cursos de água superficiais (Ramzan *et al.*, 2022). É impossível evitar que as AgNPs saiam do ambiente controlado e adentrem o meio ambiente para os ambientes aquático, aéreo e aos solos por conta de sua ampla utilização (Figura 1). Após adentrar o ambiente aquático, as nanopartículas são transformadas, transportadas ou migradas para outros ambientes, como por exemplo os sedimentos e a biota (Mahana *et al.*, 2021; Islam *et al.*, 2021).

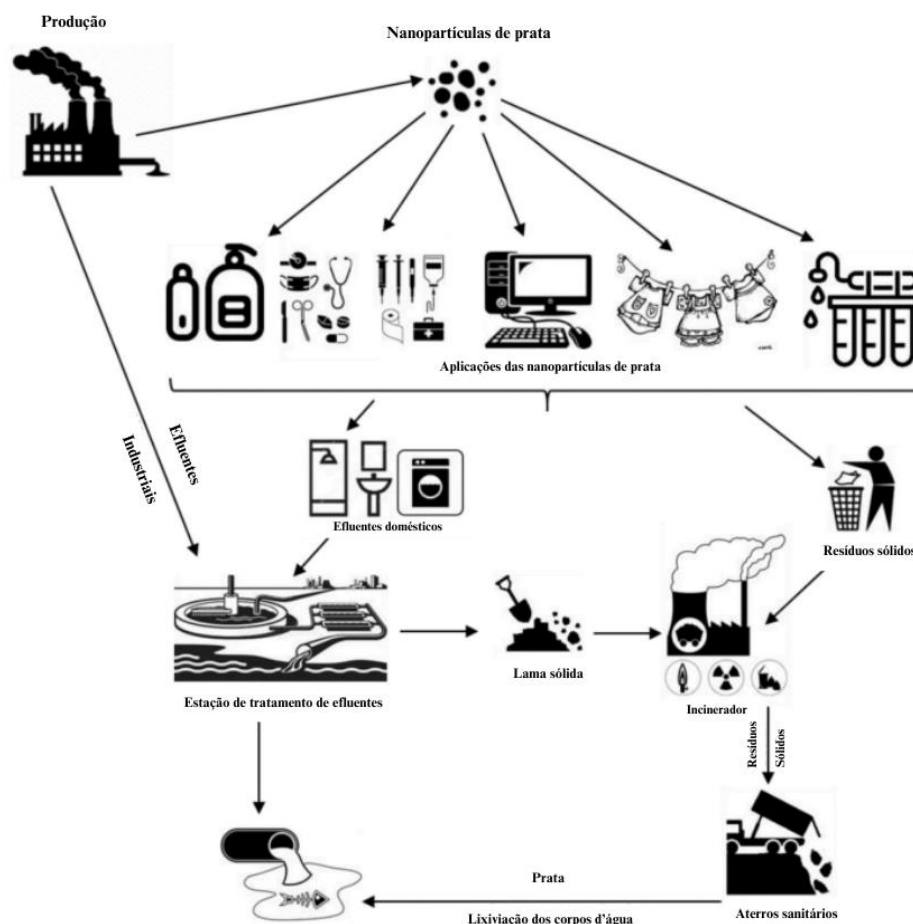


Figura 1 - O “ciclo de vida” das nanopartículas. Adaptado de Islam *et al.*, 2021.

Síntese de AgNPs

A síntese de AgNPs pode ocorrer via processos físicos, químicos e biológicos. A adequação do seu uso depende de quais propriedades das nanopartículas serão utilizadas, visto que seu tamanho, formato e distribuição modificam-se de acordo com o método utilizado para a síntese. As abordagens físicas são dependentes de alta temperatura, pressão e alto consumo de energia, sendo um meio de elevado custo financeiro. Além disso, as abordagens químicas utilizam solventes tóxicos e geram resíduos nocivos para a saúde e meio ambiente (Shaik *et al.*, 2018; Husain *et al.*, 2023; Khodashenas & Ghorbani, 2019). Com isso, a síntese biológica, ou síntese verde, destaca-se por ser ecologicamente amigável por utilizar produtos químicos relativamente atóxicos, biocompatível, impacto ambiental reduzido e de baixo custo para a síntese de nanomateriais. Sua fonte primária ou iniciadora da rota é um organismo biológico como plantas, fungos, entre outros (Silva *et al.*, 2017; Palithya *et al.*, 2021; Iwuozor *et al.*, 2022).

Bagaço de cana-de-açúcar

Recentemente, a síntese de nanomateriais realizada através de organismos como fungos, bactérias, microalgas e plantas ganhou uma maior atenção. Contudo, quando comparado à síntese através de microorganismos, a utilização de extratos vegetais é potencialmente mais vantajosa, visto a facilidade de melhoramento e manutenção do organismo. Além disso, é um processo rápido, não patogênico e econômico (Ahmed *et al.*, 2016; Iwuozor *et al.*, 2022). A habilidade de síntese de nanopartículas das plantas ocorre por conta da diversidade de metabólitos presentes, como cetonas, aldeídos, fenois, aminas, ácidos carboxílicos e proteínas presentes em seus extratos. Quase todos os componentes das partes das plantas (sementes, raízes, folhas e flores) têm sido utilizadas para a extração de ingredientes ativos e empregadas na biossíntese de AgNPs (Moradi *et al.*, 2021; Khoshnamvand *et al.*, 2020).

De acordo com o 2º levantamento da safra brasileira de 2023/24 da Companhia Nacional de Abastecimento (Conab), o Brasil possui como produção da cana-de-açúcar aproximadamente 653 mil hectares (Conab, 2023), sendo o maior produtor do mundo (Iwuozor *et al.*, 2022). A cana-de-açúcar possui uma grande importância para a produção de açúcar e álcool, tendo como sua substância residual do caule o bagaço de cana-de-açúcar, o que sobra após retirar o seu líquido. Aproximadamente 270-280 kg de bagaço são produzidos a partir de cada tonelada de cana-de-açúcar processada (Mustafa *et al.*, 2020), sendo composto majoritariamente por celulose, hemicelulose, lignina e cinzas. A fração de celulose isolada dessas biomassas tem sido explorada na fabricação de polímeros e nanomateriais (Pinto, 2019). O bagaço da cana-de-açúcar é considerado um subproduto agroindustrial, e a sua utilização principalmente para a síntese verde acaba sendo uma via sustentável, visto que não possui valor econômico e causa impactos ambientais, podendo, de forma negativa, alterar a biota e interferir em todo o ecossistema, devido à alta quantidade, lenta degradação e a geração de subprodutos tóxicos. A síntese biológica possui suas bases no desenvolvimento sustentável, e a crescente preocupação em relação ao meio ambiente tem aumentado o interesse científico e tecnológico por matérias-primas renováveis na produção de energia, produtos químicos e materiais poliméricos (Pinto, 2019; Rai *et al.*, 2021; Silva *et al.*, 2017; Cordeiro *et al.*, 2020).

A síntese de nanopartículas de prata envolve a redução dos íons de prata e sua estabilização por uma fusão de biomoléculas como polissacarídeos, vitaminas, aminoácidos, proteínas, saponinas, alcaloides, terpenos e ácidos fenólicos. A redução e alteração de íons de prata em partículas de prata nanométricas deve-se principalmente aos produtos orgânicos solúveis em água presentes em tais materiais vegetais. Alguns outros fatores também

desempenham um papel único na biossíntese de nanopartículas de prata, por exemplo, o pH do meio, pois controla o tamanho da nanopartícula (Iwuzor *et al.*, 2022).

As AgNPs biogênicas possuem uma área de superfície ativa, tamanho pequeno, formatos diversos, biocompatibilidade, estabilidade, alta solubilidade e menor capacidade de aglomeração. A sua biocompatibilidade e estabilidade estão relacionadas a seu revestimento superficial natural, o qual acrescenta outras funcionalidades às nanopartículas (Rai *et al.*, 2021). Suas aplicações atualmente ocorrem em diversas áreas dentro da biomedicina, agricultura e indústria (Figura 2).

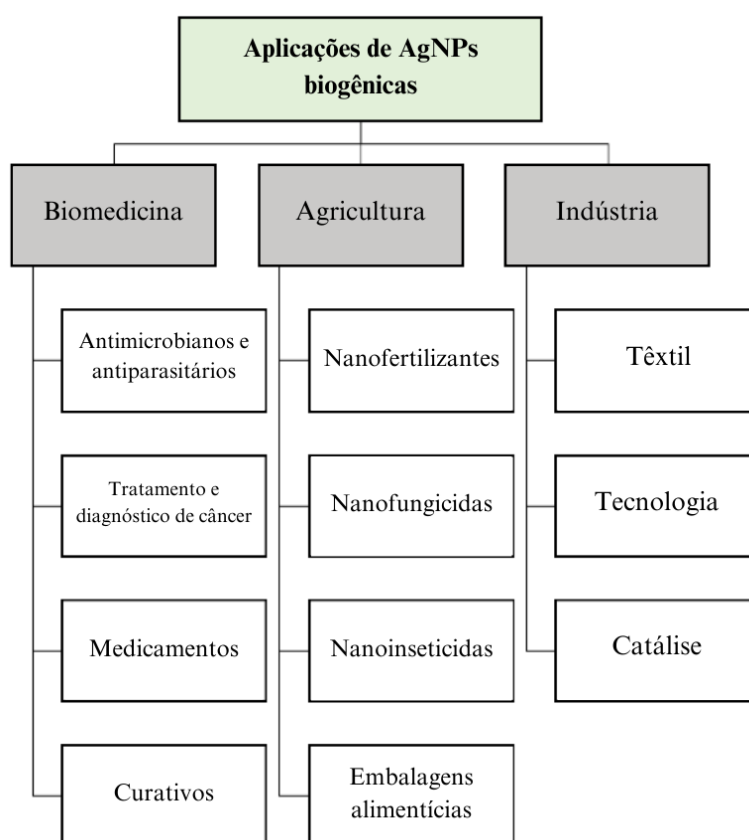


Figura 2 - Múltiplas aplicações de AgNPs biogênicas (Adaptado de Rai *et al.*, 2021).

Microalgas

As microalgas são microrganismos eucariontes ou procariontes autotróficos fotossintetizantes, que vivem em forma unicelular ou colonial, responsáveis por 40% à 50% da produção primária líquida global. Além disso, também são de fundamental importância ao equilíbrio ecológico, a circulação de materiais, o fluxo de energia, a fixação de nitrogênio e a degradação da poluição. São divididas em dois grandes grupos: as bentônicas e as pelágicas, as quais podem reagir com todos os tipos de materiais particulados, quaisquer que sejam as suas densidades. Podem habitar todos os ambientes aquáticos (marinhos, salobros e dulcícolas) e até ambientes extremos, como os permafrosts e solos desérticos. Essa habilidade de crescer em uma multiplicidade de nichos ecológicos não só oferece uma utilização eficaz dos recursos, mas também indica um estilo de vida adaptativo com uma diversidade de capacidades metabólicas que podem ser aproveitadas (Butler *et al.*, 2020; Vishnivetskaya, 2009; Perera *et al.*, 2018; Lu *et al.*, 2021).

Esses seres microscópicos representam a base da teia trófica dos ambientes aquáticos, implicando que quaisquer poluentes, como as nanopartículas, podem afetar diretamente ou indiretamente seus consumidores, pela possível mortalidade das microalgas ocasionadas pelas AgNP's e pela biomagnificação (Mariano, *et al.*, 2020; Dolganyuk *et al.*, 2020; Elisabeth *et al.*, 2021; Déniel *et al.*, 2019). A grande parte dos fabricantes de produtos químicos em grande escala que produzem NPs estão localizados em áreas de descarga marinha ou estuarina. Assim, os produtores primários são os primeiros alvos dos poluentes presentes no meio, afetando o restante da teia trófica (Moreno-Garrido *et al.*, 2015).

Possuem um curto ciclo de vida, rápida capacidade de multiplicação celular e uma estrutura celular simples, sendo muito sensíveis a poluentes, os quais podem alterar o funcionamento de sua fisiologia e ecologia e nos fornecer o primeiro sinal de impactos ao ecossistema aquático. Essas características possibilitam às microalgas a serem utilizadas em ensaios ecotoxicológicos e de áreas biotecnológicas de curta duração (Adelere & Lateef, 2021; Tato & Beiras, 2019; Lu *et al.*, 2021; Sun *et al.*, 2020).

Revestimentos de nanopartículas para as microalgas

O efeito das nanopartículas nas microalgas é dependente de seu tamanho, impacto físico, estado de agregação e dispersão, concentração, características químicas da superfície e de outros fatores intrínsecos (Nguyen *et al.*, 2020). Revestimentos, por definição, são quaisquer modificações, funcionalizações ou estabilizações aplicadas às nanopartículas para alterar seletivamente suas propriedades. Se escolhido corretamente, o revestimento proporciona

biocompatibilidade e afeta o comportamento (por exemplo, estabilidade coloidal) e o destino das NPs após o seu uso nas células. Com isso, são acoplados a sua superfície e podem ser utilizados para reduzir a energia de superfície, prevenir o aumento das partículas, sua aglomeração e sua dispersão, sendo considerados agentes estabilizantes e podendo reduzir a toxicidade das nanopartículas às microalgas (Yang *et al.*, 2012; Najahi-Missaoui *et al.*, 2020; Restrepo & Villa, 2021).

Para a escolha de qual revestimento utilizar para diminuir a toxicidade de nanopartículas, os materiais devem manter uma elevada estabilidade coloidal desde a etapa de produção das NPs em seus meios utilizados para a produção (contendo sais, proteínas, soluções tampão) e aos seus testes em células biológicas. Muitas substâncias orgânicas, como polímeros, polissacarídeos e proteínas, ou inorgânicas como cloretos e sulfetos podem ser utilizadas, sendo selecionadas de acordo com as suas propriedades individuais. Por exemplo, o polímero Polivinilpirrolidona (PVP) vem sendo utilizado para proteção ambiental, diagnósticos médicos e controle alimentício (Fahmy *et al.*, 2019; Najahi-Missaoui *et al.*, 2020).

Chlorella fusca

A microalga dulcícola *Chlorella fusca* Shihira & R.W. Krauss, pertencente ao filo Chlorophyta, das chamadas algas verdes, possui clorofilas a e b, e armazena amido no cloroplasto, geralmente em associação com um pirenoide. As Chlorophyta diferem assim do resto das algas eucarióticas no armazenamento do produto da fotossíntese no cloroplasto em vez de no citoplasma (Lee, 2018). O gênero *Chlorella* apresenta células microscópicas com 2–10 µm de diâmetro, podendo ser células esféricas, sub esféricas ou elipsoidais, solitárias ou formando colônias com até 64 células. São pelágicas e encontradas na coluna d'água, interagindo com todos os materiais particulados. Possuem uma parede celular rígida, que preserva a integridade da célula contra ambientes hostis e invasores. Sua reprodução ocorre através de autósporos (Safi *et al.*, 2014).

Muitos estudos de toxicidade são realizados com microalgas do gênero *Chlorella*. As diferentes nanopartículas podem causar muitos efeitos negativos. Nanopartículas de prata modificam morfológicamente e fisiologicamente as células, inibem a síntese de clorofila, causam estresse oxidativo, danos nas membranas celulares e mutações, ocasionando a inibição do crescimento (Bettio, 2020; Romero *et al.*, 2020).

2. Objetivo

Avaliar a toxicidade de AgNPs biogênicas produzidas através do bagaço de cana-de-açúcar sobre a microalga dulcícola *Chlorella fusca*.

Objetivos específicos

- Avaliar o crescimento algal de *C. fusca* após exposição a AgNPs biogênicas, AgNPs biogênicas revestidas com Pdadmac e o composto Pdadmac;
- Avaliar a toxicidade de todos os compostos nas concentrações 0.85, 1.7, 3.4 e 6.8 µL nos tempos 24h, 48h, 72h e 168h na microalga *C. fusca*.

3. Materiais e Métodos

Nanopartículas de prata biossintetizadas em extrato vegetal (AgNPs)

As nanopartículas de prata (AgNP) foram sintetizadas utilizando extrato aquoso do bagaço de cana-de-açúcar (BCA) obtido da Usina Iracema pertencente ao grupo São Martinho localizada em Iracemápolis, São Paulo, Brasil. De maneira simplificada, o BCA foi incorporado a um volume de água ultrapura na razão de 1:20. A mistura foi aquecida a 121 °C por 15 minutos. Posteriormente, com o auxílio de um sistema de filtração, o extrato foi filtrado em papel filtro Whatman (80g/m²-4µm). A síntese ocorreu em frascos Erlenmeyer de 250 ml que continham 50 ml de extrato ajustado a pH 11 e 50µL de solução de nitrato de prata (AgNO₃) na concentração de 1,0 mM (107 mg/L de Ag). A mistura foi incubada em plataforma orbital com agitação de 180 rpm, temperatura de 30 °C por 24 horas.

Estabilização

As AgNP de bagaço de cana de açúcar (AgNP_{BCA}) foram modificadas quanto a sua carga de superfície utilizando o polieletrólito catiônico cloreto de polidialildimetilamônio (Pdadmac) de carga positiva. A reação ocorreu em frasco Erlenmeyer de 250 ml que continha 50 ml de solução coloidal de AgNPs (107 mg/l de Ag) ajustada a pH 9 e 95 µl de solução de Pdadmac, equivalente a 190 mg/l no volume final. A mistura permaneceu incubada a 30°C, sob agitação de 180 rpm, por 24 h. As AgNP_{BCA} revestidas de Pdadmac foram codificadas de AgNP_{BCA}-Pdadmac.

Cultivo e manutenção de *Chlorella fusca*

As microalgas *Chlorella fusca* foram cedidas pelo Banco de Microrganismos Aidar & Kutner (BMAK) do Instituto Oceanográfico da Universidade de São Paulo (IO-USP).

Todas as microalgas foram cultivadas no meio de cultura Bold Basal Medium (BBM), e mantidas em frascos erlenmeyer na temperatura 24 ± 1 °C na Estufa B.O.D. da marca Novatecnica, modelo NT 703, em um ciclo claro:escuro 12:12 controlado por temporizador com uma luz LED branca fria 5740 lux ou $77.45 \mu\text{mol/s/m}^2$. Foram realizados repiques semanais da *C. fusca*, com uma proporção de 1:1 de microalga e meio.

Ensaio de ecotoxicidade de microalgas em frascos Erlenmeyer

O ensaio de ecotoxicidade dos compostos biogênicos em microalgas foi realizado com o objetivo de mensurar o crescimento celular após exposição às soluções de AgNP, AgNP Pdadm e Pdadm. Utilizando frascos Erlenmeyer, foram colocados 50 mL do meio de cultura BBM e o inóculo da alga na fase exponencial de crescimento na concentração de $1,0\times 10^4$ cel/mL. Foram realizados os testes nas concentrações 0.85, 1.7, 3.4, 6.8 μL e o controle em duplicata. A cada 24h nos primeiros 3 dias e posteriormente no 7º dia, foi coletado 1 mL de cada réplica a fim de realizar a contagem celular na câmara de Neubauer.



Figura 3 - Microalgas na câmara de incubação após a exposição às soluções no dia 0 do experimento.

Análise de Dados

Para a análise estatística, todos os testes foram realizados no programa Paleontological Statistical 4.03 (Past4) (Gonçalves, 2023). A fim de testar a normalidade dos ensaios realizados em cada composto em todos os tempos e concentrações, foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk. Os ensaios que apresentaram resultados com maioria em distribuição não normal, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis com o objetivo de avaliar se há diferenças significativas entre as concentrações. Em ambos os testes foram utilizados a significância estatística de $p \leq 0.05$. Todos os gráficos foram elaborados no software Microsoft Excel 2016.

4. Resultados

Toxicidade de AgNP

A Figura 4 apresenta a variação celular ($\mu\text{g/ml}$) de *C. fusca* em função da concentração do composto AgNP. Aplicando-se o teste de Shapiro-Wilk, apresentou distribuição não normal para todos os grupos (Tabela 1). Por conta deste padrão de distribuição em todas as

concentrações testadas, Kruskal-Wallis foi utilizado e apresentou um valor de p igual a 0.00823, demonstrando diferenças significativas na distribuição de todas as concentrações.

Tabela 1 - Análise estatística de Shapiro-Wilk para o ensaio de toxicidade de AgNP.

	Valores de p (significância $p \leq 0.05$)				
	Controle	AgNP 0.85 µg/ml	AgNP 1.7 µg/ml	AgNP 3.4 µg/ml	AgNP 6.8 µg/ml
Shapiro-Wilk	0.003124	0.04084	0.001068	0.000131	0.03269

O composto apresentou um crescimento celular após 24h na concentração 0.85 e após 168h nas concentrações 1.7 e 6.8 µL. Não houve crescimento em 3.4 µL (Tabela 2).

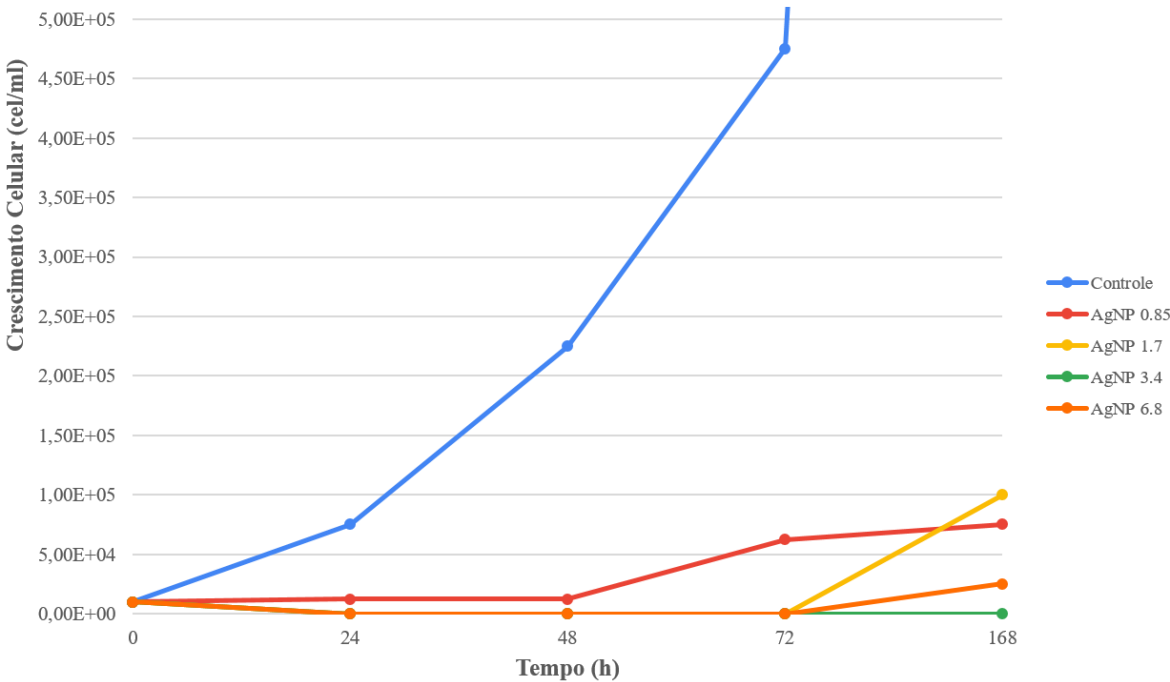


Figura 4 - Crescimento celular de *C. fusca* após exposição a AgNP.

Tabela 2 - Concentração celular de *C. fusca* realizada no ensaio após exposição a AgNP.

Tempo (h)	Controle	Concentração celular de <i>C. fusca</i> (células/ml)			
		AgNP 0.85 µg/ml	AgNP 1.7 µg/ml	AgNP 3.4 µg/ml	AgNP 6.8 µg/ml
0	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04
24	7,50E+04	1,25E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
48	2,25E+05	1,25E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
72	4,75E+05	6,25E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
168	3,60E+06	7,50E+04	1,00E+05	0,00E+00	2,50E+04

Toxicidade de Pdadmac

A Figura 5 ilustra a variação celular ($\mu\text{g/ml}$) de *C. fusca em* após exposição a diferentes concentrações do composto Pdadmac. Shapiro-Wilk apresentou não normalidade para a maioria das concentrações (0.85, 1.7 e 3.4 $\mu\text{g/ml}$). Com isso, aplicando-se Kruskal-Wallis, o valor para p foi 0.0108, indicando que há uma diferença significativa entre as medianas dos grupos.

Tabela 3 - Análise estatística de Shapiro-Wilk para o ensaio de toxicidade de Pdadmact.

Valores de p (significância $p \leq 0.05$)					
	Controle	Pdadmact 0.85 µg/ml	Pdadmact 1.7 µg/ml	Pdadmact 3.4 µg/ml	Pdadmact 6.8 µg/ml
Shapiro-Wilk	0.003124	0.02485	0.000131	0.000131	0.3442

O presente estudo demonstrou que Pdadmact apresenta alta toxicidade às células de *C. fusca*, inibindo o crescimento em todos os dias e concentrações, exceto em 6.8 µL 168h, a qual apresentou crescimento quando comparado ao controle (Tabela 4).

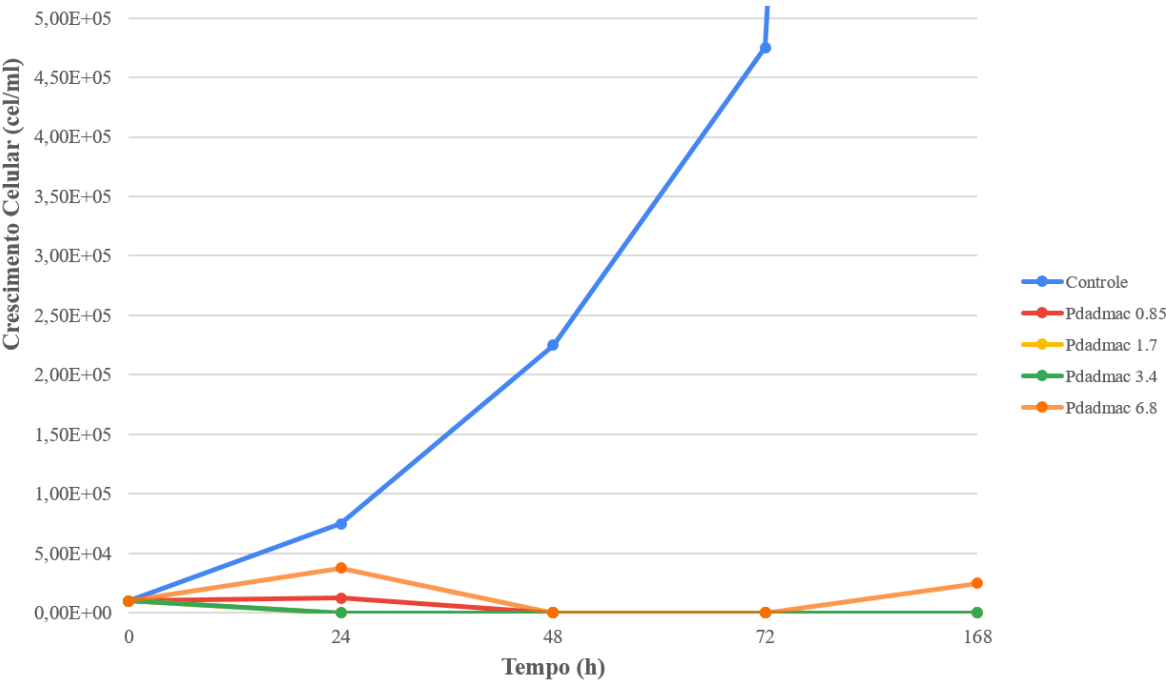


Figura 5 - Crescimento celular de *C. fusca* após exposição a Pdadmact.

Tabela 4 - Concentração celular de *C. fusca* realizada no ensaio após exposição a Pdadmact.

Tempo (h)	Controle	Concentração celular de <i>C. fusca</i> (células/ml)			
		Pdadmact 0.85 µg/ml	Pdadmact 1.7 µg/ml	Pdadmact 3.4 µg/ml	Pdadmact 6.8 µg/ml
0	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04
24	7,50E+04	1,25E+04	0,00E+00	0,00E+00	3,75E+04
48	2,25E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
72	4,75E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
168	3,60E+06	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	2,50E+04

A fim de avaliar a variação celular em $\mu\text{g/ml}$ de *C. fusca* em função do composto AgNP Pdadmac (Figura 6), foi aplicado o teste de Shapiro-Wilk para todas as concentrações e tempos (Tabela 5), demonstrando que todas as concentrações apresentam uma distribuição não normal. Com isso, os resultados de Kruskal-Wallis ($p = 0.01276$) mostram que há uma diferença significativa entre as medianas dos grupos estudados.

Tabela 5 - Análise estatística de Shapiro-Wilk para o ensaio de toxicidade de AgNP Pdadmac.

	Controle	Valores de p (significância $p \leq 0.05$)			
		AgNP Pdadmac 0.85 $\mu\text{g/ml}$	AgNP Pdadmac 1.7 $\mu\text{g/ml}$	AgNP Pdadmac 3.4 $\mu\text{g/ml}$	AgNP Pdadmac 6.8 $\mu\text{g/ml}$
Shapiro-Wilk	0.003124	0.02485	0.000131	0.005262	0.000131

O composto demonstrou alta toxicidade às microalgas. Após 48h, não houve crescimento celular em nenhuma das concentrações, exceto em 3.4 μL 168h (Tabela 6).

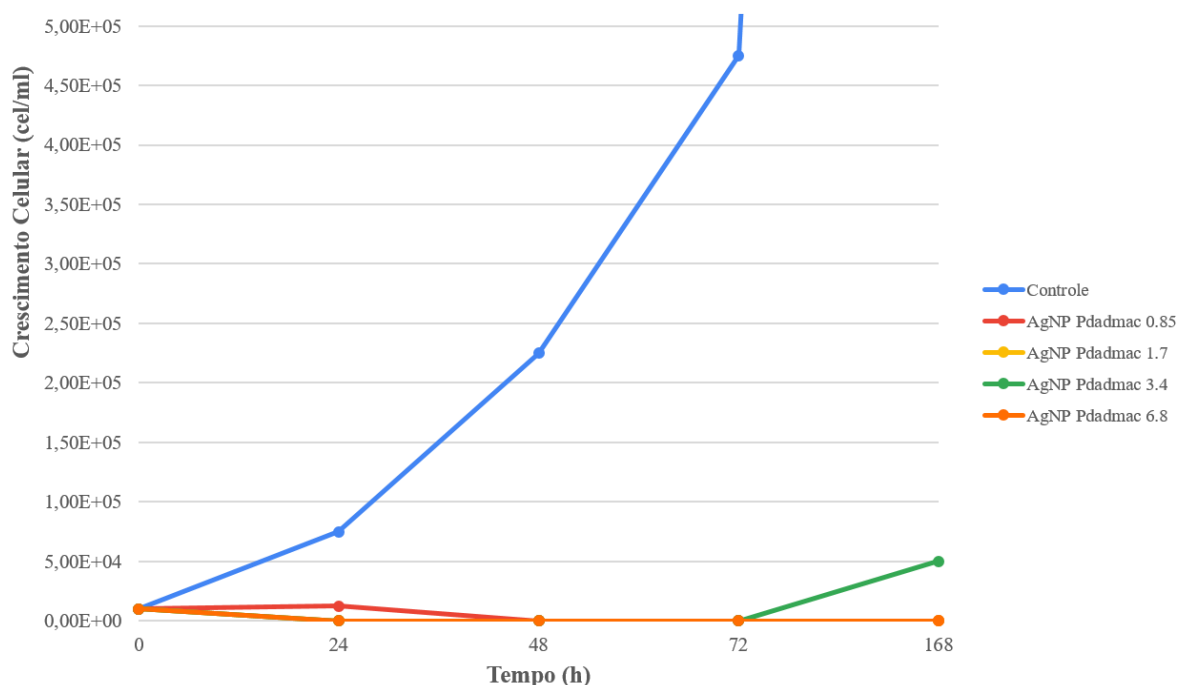


Figura 6 - Crescimento celular de *C. fusca* após exposição a AgNP Pdadmac.

Tabela 6 - Concentração celular de *C. fusca* realizada no ensaio após exposição a AgNP Pdadmac.

Tempo (h)	Controle	Concentração celular de <i>C. fusca</i> (células/ml)			
		AgNP Pdadmac 0.85 $\mu\text{g/ml}$	AgNP Pdadmac 1.7 $\mu\text{g/ml}$	AgNP Pdadmac 3.4 $\mu\text{g/ml}$	AgNP Pdadmac 6.8 $\mu\text{g/ml}$
0	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04	1,00E+04

24	7,50E+04	1,25E+04	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
48	2,25E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
72	4,75E+05	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00	0,00E+00
168	3,60E+06	0,00E+00	0,00E+00	5,00E+04	0,00E+00

5. Discussão

Nanopartículas metálicas são integradas em culturas de microalgas para testar os efeitos no crescimento, produção de biomassa e acumulação intracelular. Organismos aquáticos são vulneráveis às nanopartículas por conta da sua absorção ser facilitada nestes ambientes através da exposição direta aos tecidos ou pela alimentação, causando danos fisiológicos e celulares (Pham, 2019; Vargas-Estrada *et al.*, 2020). Em ambientes aquáticos, as AgNPs tendem a dissolver íons Ag^+ pela presença do oxigênio (Pham, 2019).

Há inúmeras aplicações para materiais biossintetizados através de resíduos (como a cana-de-açúcar) - área médica, alimentícia, de tratamento de água, energética, farmacêutica e entre outros. Os materiais produzidos geralmente são mais duráveis, estáveis, fortes e leves, otimizando assim a sua produção (Aswathi *et al.*, 2023; Ying *et al.*, 2022). De acordo com San *et al.* (2014), nanopartículas de sílica (SiNPs) produzidas através do bagaço da cana apresentaram uma menor toxicidade quanto à produção via de síntese química, não demonstrando possíveis danos ao meio ambiente. da Silva *et al.* (2022) validou que a exposição a AgNPs biossintetizadas através de fungos, quando comparadas ao controle AgNO_3 , apresenta uma menor inibição do crescimento algal. Por outro lado, vários trabalhos demonstram a diminuição do crescimento pelas AgNPs produzidas de maneiras físicas e químicas (Fazelian *et al.*, 2020; Pham, 2019; Sendra *et al.*, 2017), sendo a toxicidade dose-dependente, ocasionando efeitos na produção de clorofila, indução do estresse oxidativo e danos às membranas celulares após exposição.

Neste estudo, podemos observar as modificações comportamentais ocasionadas pelas AgNPs. O crescimento algal após exposição a AgNPs sintetizadas através do bagaço da cana-de-açúcar apresentou uma toxicidade quando comparado ao controle na amostra. Os danos que as AgNPs causam estão totalmente associados ao tempo de exposição, concentração e ao seu tamanho (da Silva *et al.*, 2022). No geral, as amostras apresentaram apenas fragmentos celulares nos tempos 24-72h nas concentrações 1.7 e 6.8 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 7), demonstrando um crescimento exponencial efetivo após 168h de exposição. Em 0.85 $\mu\text{g/ml}$, o crescimento foi efetivo a partir das 24h de exposição, porém, ao comparar com o controle, houve também uma diminuição do número celular. Esses resultados nos mostram que o crescimento exponencial apresentou um atraso, porém, houve uma baixa toxicidade às células, assim como demonstrado em Johari *et*

al. (2018), no qual conforme a exposição da AgNPs, o crescimento algal fica mais lento em comparação a microalgas sem exposição a contaminantes.

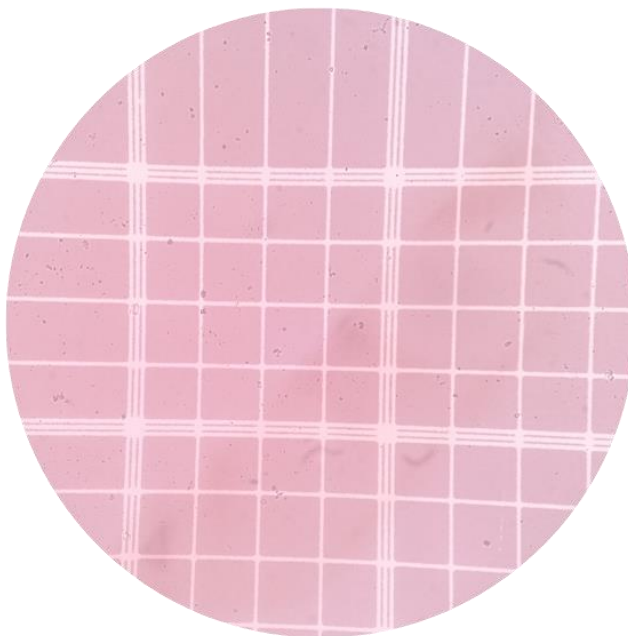


Figura 7 - Contagem de células na Câmara de Neubauer em 24h após exposição à AgNP. Podemos observar que não possuem células saudáveis, apenas fragmentos celulares.

Os polímeros são considerados produtos economicamente amigáveis, porém, na realidade, causam redução no crescimento, estresse oxidativo e danos ao DNA (Schiavo *et al.*, 2021). Os revestimentos para as AgNPs devem ser atóxicos, biodegradáveis, bio solúveis e biocompatíveis, a fim de reduzir as taxas de agregamento e a toxicidade da nanopartícula, estabilizando-as (Chugh *et al.*, 2021). Pdadmac foi selecionado por conta de sua ampla familiaridade e disponibilidade no mercado. Além disso, é um polímero catiônico com uma carga de superfície positiva, interagindo com a superfície negativa da AgNP (Michna *et al.*, 2019). Os resultados, assim como demonstrado anteriormente (Tabela 4), apresentaram alta toxicidade para as concentrações 0.85 - 3.4 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 8). Em contraste, a maior concentração (6.8 $\mu\text{g/ml}$) apresentou crescimento celular após 168h de exposição, podendo ser interpretado como um possível efeito de adaptação ou resistência da *C. fusca* a concentrações mais altas do composto, onde as células conseguiram superar o estresse inicial e começar atingiram um crescimento significativo (Qiao *et al.*, 2023). Isso sugere que o Pdadmac tem um impacto dependendo da concentração, com concentrações mais baixas e intermediárias

mostrando potencial toxicidade aguda, enquanto concentrações mais altas podem induzir respostas adaptativas nas microalgas.



Figura 8 - Ensaio de toxicidade em 168h de exposição nas concentrações 0.85 - 6.8 $\mu\text{g/ml}$ em Pdadm.

Schiavo *et al.* (2017) realizou experimentos com AgNPs revestidas do polímero PVP/PEI, as quais demonstram que são mais tóxicas para as células do que AgNPs sem revestimentos, e que estes agentes estabilizantes possivelmente são os principais causadores a mortalidade das células. Suresh *et al.* (2012) testou a toxicidade de AgNPs revestidas com Pdadm em células animais, corroborando ambos com os resultados apresentados neste estudo utilizando microalgas. AgNP Pdadm mostrou ser tóxico para as microalgas, uma vez que não houve crescimento celular efetivo após 168h de exposição em todas as concentrações testadas, exceto em 3.4 $\mu\text{g/ml}$. Esse crescimento em 3.4 $\mu\text{g/ml}$ pode ser explicado pela toxicidade dos íons Ag^+ liberado pelas NPs depender da acumulação intracelular dos mesmos, e sua toxicidade não poder ser explicada apenas pelas concentrações destes íons nas soluções, mas também pela maneira como as nanopartículas interagem com as microalgas, podendo indicar mecanismos adaptativos em *C. fusca* (Navarro *et al.*, 2008; Qiao *et al.*, 2023).

A variação de resultados demonstra a necessidade de estudos adicionais em um maior tempo de exposição e concentrações, a fim de concluir se é viável a utilização de Pdadm para diminuir os impactos ambientais ocasionados pelas nanopartículas de prata.

6. Conclusão

A toxicidade das AgNPs biogênicas, Pdadm e AgNP Pdadm foi avaliada na microalga *Chlorella fusca*. De acordo com os resultados obtidos, AgNP apresentou baixa toxicidade às microalgas após 168h de exposição nas concentrações 0.85, 1.7 e 6.8 $\mu\text{g/ml}$. Os compostos Pdadm e AgNP Pdadm apresentaram uma alta toxicidade, sendo necessários

estudos adicionais sobre a síntese e revestimentos em AgNPs na toxicidade de organismos, utilizando diferentes níveis tróficos (com um maior nível de complexidade) e ambientes (solo, água e ar) a fim de estabelecer uma melhor análise de parâmetros no efeito dessas AgNPs nas microalgas.

7. Referências bibliográficas

1. Abou El-Nour, K. M., Eftaiha, A. A., Al-Warthan, A., & Ammar, R. A. (2010). Synthesis and applications of silver nanoparticles. *Arabian journal of chemistry*, 3(3), 135-140.
2. Adelere, I. A., & Lateef, A. (2021). Microalgal nanobiotechnology and its applications—a brief overview. *Microbial Nanobiotechnology: Principles and Applications*, 233-255.
3. Ahmed, S., Ahmad, M., Swami, B. L., & Ikram, S. (2016). A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. *Journal of advanced research*, 7(1), 17-28.
4. Aswathi, V. P., Meera, S., Maria, C. A., & Nidhin, M. (2023). Green synthesis of nanoparticles from biodegradable waste extracts and their applications: a critical review. *Nanotechnology for Environmental Engineering*, 8(2), 377-397.
5. Bettio, C. D. (2020). Efeitos de toxicidade de nanopartículas metálicas para espécies de microalgas marinhas e dulcícolas: uma revisão.
6. Butler, T., Kapoore, R. V., & Vaidyanathan, S. (2020). *Phaeodactylum tricornutum*: a diatom cell factory. *Trends in biotechnology*, 38(6), 606-622.
7. Conab - Boletim da Safra de Cana-de-açúcar. (2023). Conab.gov.br. <https://www.conab.gov.br/info-agro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>
8. Cordeiro, N. K., Cardoso, K. P. S., da Mata, T. C., de Araújo Barbosa, J., & Gonçalves Jr, A. C. (2020). Gestão de resíduos agrícolas como forma de redução dos impactos ambientais. *Revista de Ciências Ambientais*, 14(2), 23-34.
9. Chugh, D., Viswamalya, V. S., & Das, B. (2021). Green synthesis of silver nanoparticles with algae and the importance of capping agents in the process. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 19(1), 126.
10. da Silva, C. A., Ribeiro, B. M., do Valle Trotta, C., Perina, F. C., Martins, R., de Souza Abessa, D. M., ... & Ottoni, C. A. (2022). Effects of mycogenic silver nanoparticles on organisms of different trophic levels. *Chemosphere*, 308, 136540.

11. Déniel, M., Errien, N., Daniel, P., Caruso, A., & Lagarde, F. (2019). Current methods to monitor microalgae-nanoparticle interaction and associated effects. *Aquatic Toxicology*, 217, 105311.
12. Dolganyuk, V., Belova, D., Babich, O., Prosekov, A., Ivanova, S., Katserov, D., ... & Sukhikh, S. (2020). Microalgae: A promising source of valuable bioproducts. *Biomolecules*, 10(8), 1153.
13. Elisabeth, B., Rayen, F., & Behnam, T. (2021). Microalgae culture quality indicators: a review. *Critical reviews in biotechnology*, 41(4), 457-473.
14. Fahmy, H. M., Mosleh, A. M., Abd Elghany, A., Shams-Eldin, E., Serea, E. S. A., Ali, S. A., & Shalan, A. E. (2019). Coated silver nanoparticles: Synthesis, cytotoxicity, and optical properties. *RSC advances*, 9(35), 20118-20136.
15. Fazelian, N., Movafeghi, A., Yousefzadi, M., Rahimzadeh, M., & Zarei, M. (2020). Impact of silver nanoparticles on the growth, fatty acid profile, and antioxidative response of *Nannochloropsis oculata*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 42, 1-14.
16. Gonçalves, D. G. (2023). Avaliação da toxicidade de inibidores de corrosão marinha de base nanotecnológica sustentável sobre *Chlorella minutissima*.
17. Haleem A., Javaid M., Singh RP., Rab S, Suman R. (2023). Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Global Health Journal*. 7:70-77.
18. Hupffer HM., Lazzaretti L.L. (2019). Nanotecnologia e sua regulamentação no Brasil. *Revista Gestão e Desenvolvimento*: 16: 153-177.
19. Husain, S., Nandi, A., Simnani, F. Z., Saha, U., Ghosh, A., Sinha, A., ... & Verma, S. K. (2023). Emerging trends in advanced translational applications of silver nanoparticles: a progressing dawn of nanotechnology. *Journal of Functional Biomaterials*, 14(1), 47.
20. Islam, M. A., Jacob, M. V., & Antunes, E. (2021). A critical review on silver nanoparticles: From synthesis and applications to its mitigation through low-cost adsorption by biochar. *Journal of Environmental Management*, 281, 111918.
21. Iwuozor, K. O., Ogunfowora, L. A., & Oyekunle, I. P. (2022). Review on sugarcane-mediated nanoparticle synthesis: a green approach. *Sugar Tech*, 24(4), 1186-1197.
22. Johari, S. A., Sarkheil, M., Tayemeh, M. B., & Veisi, S. (2018). Influence of salinity on the toxicity of silver nanoparticles (AgNPs) and silver nitrate (AgNO₃) in halophilic microalgae, *Dunaliella salina*. *Chemosphere*, 209, 156-162.
23. Kargozar, S., & Mozafari, M. (2018). Nanotechnology and Nanomedicine: Start small, think big. *Materials Today: Proceedings*, 5(7), 15492-15500.

24. Khodashenas, B., & Ghorbani, H. R. (2019). Synthesis of silver nanoparticles with different shapes. *Arabian Journal of Chemistry*, 12(8), 1823-1838.
25. Khoshnamvand, M., Hao, Z., Fadare, O. O., Hanachi, P., Chen, Y., & Liu, J. (2020). Toxicity of biosynthesized silver nanoparticles to aquatic organisms of different trophic levels. *Chemosphere*, 258, 127346.
26. Lee, R. E. (2018). *Phycology*. Cambridge university press.
27. Lu, T., Zhang, Q., Zhang, Z., Hu, B., Chen, J., Chen, J., & Qian, H. (2021). Pollutant toxicology with respect to microalgae and cyanobacteria. *Journal of Environmental Sciences*, 99, 175-186.
28. Mahana, A., Guliy, O. I., & Mehta, S. K. (2021). Accumulation and cellular toxicity of engineered metallic nanoparticle in freshwater microalgae: Current status and future challenges. *Ecotoxicology and environmental safety*, 208, 111662.
29. Mariano, S., Panzarini, E., Inverno, M. D., Voulvoulis, N., & Dini, L. (2020). Toxicity, bioaccumulation and biotransformation of glucose-capped silver nanoparticles in green microalgae *Chlorella vulgaris*. *Nanomaterials*, 10(7), 1377.
30. Michna, A., Morga, M., Adamczyk, Z., & Kubiak, K. (2019). Monolayers of silver nanoparticles obtained by green synthesis on macrocation modified substrates. *Materials Chemistry and Physics*, 227, 224-235.
31. Moradi, F., Sedaghat, S., Moradi, O., & Arab Salmanabadi, S. (2021). Review on green nano-biosynthesis of silver nanoparticles and their biological activities: With an emphasis on medicinal plants. *Inorganic and nano-metal chemistry*, 51(1), 133-142.
32. Moreno-Garrido, I., Pérez, S., & Blasco, J. (2015). Toxicity of silver and gold nanoparticles on marine microalgae. *Marine environmental research*, 111, 60-73.
33. Mustafa, G., Arshad, M., Bano, I., & Abbas, M. (2020). Biotechnological applications of sugarcane bagasse and sugar beet molasses. *Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-13.
34. Nagamune, T. Biomolecular engineering for nanobio/bionanotechnology. (2017). *Nano Convergence* 4, 9.
35. Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D., & Cummings, B. S. (2020). Safe nanoparticles: are we there yet?. *International journal of molecular sciences*, 22(1), 385.
36. Navarro, E., Piccapietra, F., Wagner, B., Marconi, F., Kaegi, R., Odzak, N., Sigg, L., & Behra, R. (2008). Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*, 42(23), 8959-8964.

37. Nguyen, M. K., Moon, J. Y., & Lee, Y. C. (2020). Microalgal ecotoxicity of nanoparticles: An updated review. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 201, 110781.
38. Palithya, S., Gaddam, S. A., Kotakadi, V. S., Penchalaneni, J., & Challagundla, V. N. (2021). Biosynthesis of silver nanoparticles using leaf extract of *Decaschistia crotonifolia* and its antibacterial, antioxidant, and catalytic applications. *Green Chemistry Letters and Reviews*, 14(1), 137-152.
39. Perera, I., Subashchandrabose, S. R., Venkateswarlu, K., Naidu, R., & Megharaj, M. (2018). Consortia of cyanobacteria/microalgae and bacteria in desert soils: an underexplored microbiota. *Applied microbiology and biotechnology*, 102, 7351-7363.
40. Pham, T. L. (2019). Effect of silver nanoparticles on tropical freshwater and marine microalgae. *Journal of Chemistry*, 2019(1), 9658386.
41. Rai, M., Ingle, A. P., Trzcińska-Wencel, J., Wypij, M., Bonde, S., Yadav, A., ... & Golińska, P. (2021). Biogenic silver nanoparticles: what we know and what do we need to know?. *Nanomaterials*, 11(11), 2901.
42. Ramzan, U., Majeed, W., Hussain, A. A., Qurashi, F., Qamar, S. U. R., Naeem, M., ... & Lee, T. Y. (2022). New insights for exploring the risks of bioaccumulation, molecular mechanisms, and cellular toxicities of AgNPs in aquatic ecosystem. *Water*, 14(14), 2192.
43. Restrepo, C. V., & Villa, C. C. (2021). Synthesis of silver nanoparticles, influence of capping agents, and dependence on size and shape: A review. *Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management*, 15, 100428.
44. Romero, N., Visentini, F. F., Márquez, V. E., Santiago, L. G., Castro, G. R., & Gagneten, A. M. (2020). Physiological and morphological responses of green microalgae *Chlorella vulgaris* to silver nanoparticles. *Environmental Research*, 189, 109857.
45. Safi, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Morphology, composition, production, processing and applications of *Chlorella vulgaris*: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 35, 265-278.
46. San, N. O., Kurşungöz, C., Tümtaş, Y., Yaşa, Ö., Ortac, B., & Tekinay, T. (2014). Novel one-step synthesis of silica nanoparticles from sugarbeet bagasse by laser ablation and their effects on the growth of freshwater algae culture. *Particuology*, 17, 29-35.
47. Schiavo, S., Duroudier, N., Bilbao, E., Mikolaczyk, M., Schäfer, J., Cajaraville, M. P., & Manzo, S. (2017). Effects of PVP/PEI coated and uncoated silver NPs and PVP/PEI

- coating agent on three species of marine microalgae. *Science of the Total Environment*, 577, 45-53.
48. Schiavo, S., Oliviero, M., Chiavarini, S., Dumontet, S., & Manzo, S. (2021). Polyethylene, Polystyrene, and Polypropylene leachate impact upon marine microalgae *Dunaliella tertiolecta*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 84(6), 249-260.
 49. Sendra, M., Yeste, M. P., Gatica, J. M., Moreno-Garrido, I., & Blasco, J. (2017). Direct and indirect effects of silver nanoparticles on freshwater and marine microalgae (*Chlamydomonas reinhardtii* and *Phaeodactylum tricornutum*). *Chemosphere*, 179, 279-289.
 50. Shaik, M. R., Khan, M., Kuniyil, M., Al-Warthan, A., Alkathlan, H. Z., Siddiqui, M. R. H., ... & Adil, S. F. (2018). Plant-extract-assisted green synthesis of silver nanoparticles using *Origanum vulgare* L. extract and their microbicidal activities. *Sustainability*, 10(4), 913.
 51. Silva, L. P., Bonatto, C. C., Pereira, F. D. E. S., Silva, L. D., Albernaz, V. L., & Polez, V. L. P. (2017). Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. In *Biotechnologia Aplicada à Agro&Indústria-Vol. 4* (Vol. 1, No. 1, pp. 967-1012). Blucher Open Access.
 52. Sun, C., Xu, Y., Hu, N., Ma, J., Sun, S., Cao, W., ... & Zhao, Y. (2020). To evaluate the toxicity of atrazine on the freshwater microalgae *Chlorella* sp. using sensitive indices indicated by photosynthetic parameters. *Chemosphere*, 244, 125514.
 53. Suresh, A. K., Pelletier, D. A., Wang, W., Morrell-Falvey, J. L., Gu, B., & Doktycz, M. J. (2012). Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types. *Langmuir*, 28(5), 2727-2735.
 54. Tato, T., & Beiras, R. (2019). The use of the marine microalga *Tisochrysis lutea* (T-iso) in standard toxicity tests; comparative sensitivity with other test species. *Frontiers in marine science*, 6, 488.
 55. Vargas-Estrada, L., Torres-Arellano, S., Longoria, A., Arias, D. M., Okoye, P. U., & Sebastian, P. J. (2020). Role of nanoparticles on microalgal cultivation: A review. *Fuel*, 280, 118598.
 56. Vishnivetskaya, T. A. (2009). Viable cyanobacteria and green algae from the permafrost darkness. In *Permafrost soils* (pp. 73-84). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

57. Wang, Y., Zhu, X., Lao, Y., Lv, X., Tao, Y., Huang, B., ... & Cai, Z. (2016). TiO₂ nanoparticles in the marine environment: physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricornutum*. *Science of the Total Environment*, 565, 818-826.
58. Qiao, Z., Guo, P., Yang, D., Pei, Z., Wang, M., Liu, J., & Wang, Q. (2023). Evaluation of acute toxicity response to the algae *Chlorella pyrenoidosa* of biosynthetic silver nanoparticles catalysts. *Environmental Science and Pollution Research*, 30(4), 10955-10968.
59. Yang, X., Gondikas, A. P., Marinakos, S. M., Auffan, M., Liu, J., Hsu-Kim, H., & Meyer, J. N. (2012). Mechanism of silver nanoparticle toxicity is dependent on dissolved silver and surface coating in *Caenorhabditis elegans*. *Environmental science & technology*, 46(2), 1119-1127.
60. Ying, S., Guan, Z., Ofoegbu, P. C., Clubb, P., Rico, C., He, F., & Hong, J. (2022). Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. *Environmental Technology & Innovation*, 26, 102336.
61. Zhang, X. F., Liu, Z. G., Shen, W., & Gurunathan, S. (2016). Silver nanoparticles: synthesis, characterization, properties, applications, and therapeutic approaches. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1534.

PARECER FINAL DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Discente: ANA CLARA ARGUELHES PEDRAZZOLI

Título: "Revestimentos poliméricos diminuem a toxicidade de nanopartículas de prata na microalga *Chlorella fusca*?"

Orientador: Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

Curso/Habilitação: Bacharelado em Ciências Biológicas/Biologia Marinha

COMISSÃO EXAMINADORA	CONCEITO
Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni	<i>Aprovado</i>
Prof. Dr. Yoannis Domínguez Rodríguez	<i>Aprovado</i>

PARECER:

A autora deverá finalizar correções no documento antes de depositar a versão final. Existem questões de referências e as discussões devem ser melhoradas.

CONCEITO FINAL:

A Comissão Examinadora abaixo assinada conclui que a discente Ana Clara Arguelhes Pedrazzoli obteve o seguinte conceito:

☒ APROVADO

☐ REPROVADO

São Vicente, 21 de junho de 2024.

Cristiane Angélica Ottoni
Profa. Dra. Cristiane Angélica Ottoni

Yoannis Domínguez Rodríguez
Prof. Dr. Yoannis Domínguez Rodríguez