

Ana Letícia de Oliveira Franco Rossetto

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA NANOPARTÍCULA
E MICROPARTÍCULA DE ÓXIDO DE COBRE EM
DIFERENTES ORGANISMOS AQUÁTICOS**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. William Gerson Matias, Dr.
Co-orientadora: Prof^ª. Silvia Pedroso Melegari, Dr^a.

Florianópolis (SC)

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Rossetto, Ana Leticia de Oliveira Franco
AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS DA NANOPARTÍCULA E DA
MICROPARTÍCULA DE ÓXIDO DE COBRE EM DIFERENTES ORGANISMOS
AQUÁTICOS / Ana Leticia de Oliveira Franco Rossetto ;
orientador, William Gerson Matias ; coorientadora, Silvia
Pedroso Melegari. - Florianópolis, SC, 2016.
167 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Ambiental. 2. Nanotoxicologia. 3.
Nanopartículas. 4. Micropartículas. 5. Óxido de Cobre. I.
Matias, William Gerson. II. Melegari, Silvia Pedroso. III.
Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós
Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.



TERMO DE APROVAÇÃO

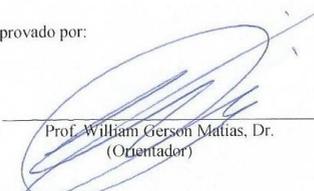
“Avaliação dos Efeitos Tóxicos da Nanopartícula e Micropartícula de Óxido de Cobre em Diferentes Organismos Aquáticos”

Ana Leticia de Oliveira Franco Rossetto

A Tese foi julgada e aprovada pela banca examinadora no Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

DOUTORA EM ENGENHARIA AMBIENTAL

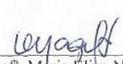
Aprovado por:



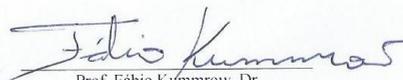
Prof. William Gerson Matias, Dr.
(Orientador)



Prof.ª Rejane Lelena Ribeiro da Costa, Dr.ª



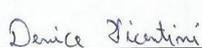
Prof.ª Maria Eliza Nagel Hassemer, Dr.ª



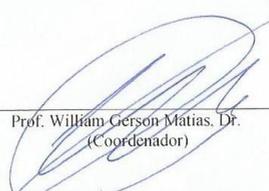
Prof. Fábio Kummrow, Dr.



Prof.ª Cristiane Funghetto Fuzinato, Dr.ª



Denice Schulz Vicentini, Dr.ª



Prof. William Gerson Matias, Dr.
(Coordenador)

Dedico este trabalho a minha
filha Mariana, aos meus pais
Antonio e Dagmar e ao meu
querido esposo Ash.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder discernimento e força para seguir meus caminhos, e por ter me dado o melhor presente que eu poderia receber durante minha vida, minha filha Mariana.

Agradeço, de forma muito especial, aos meus pais, por sempre me incentivarem, pelo apoio emocional e por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos vividos durante a realização desta tese. Agradeço também aos meus irmãos Marcio e Tiago, Giovana pela amizade e amor e a minha sobrinha Gabi, por fazer meus dias mais felizes.

Ao amor da minha vida minha e também meu esposo Ash, por me compreender, incentivar e por sempre estar ao meu lado em todos os momentos. Obrigada. Te amo!

Ao Prof. William Gerson Matias, meu orientador, pela oportunidade e confiança para realizar meu trabalho de tese, pelos seus conhecimentos repassados e orientação para a execução da pesquisa. Em especial agradeço ao senhor por ter sido tão compreensivo comigo no momento mais delicado vivido por mim até hoje. Pelo senhor terei gratidão eterna.

À Silvia Pedroso Melegari, pela amizade, coorientação, sugestões e ajuda durante a execução desta pesquisa.

Aos professores Prof^a Rejane Helena Ribeiro Da Costa, Prof^a Maria Eliza Nagel Hassemer, Prof. Fábio Kummrow, Prof^a Cristiane Funghetto Fuzinato e Dr^a Denice Shulz Vicentine por aceitarem o convite de participar da banca de avaliação e contribuírem para o melhoramento deste trabalho.

Ao Prof. David Dewes da Université du Québec à Montréal (UQÀM), por ter me recebido durante o estágio Doutorado Sanduíche. Aos colegas François Perreault e Abdallah Oukarroum da UQÀM, pelos conhecimentos repassados em laboratório.

A Letícia Folhr, pela amizade e orientação durante a realização do meu estágio de Doutorado Sanduíche no Canadá.

Aos meus colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental (Labtox), Cristiane Fuzzinato, Bianca Oscar, Denice Vicentine, Rodrigo Puerari, José Júlio Barrios, e em especial à Cristina H. Costa pelas sugestões e amizade.

Ao LCME (Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFSC), pela cooperação na realização da caracterização via microscopia. Em especial à Eliana (LCME) pelo auxílio técnico durante as análises das amostras biológicas.

Ao LaMaTe (Laboratório de Materiais Elétricos) pela cooperação para a caracterização da área superficial.

Ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. E ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia Ambiental (PPGEA).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fomento à pesquisa através da bolsa de estudos. Aos amigos que escutaram minhas dúvidas, minhas lamentações e sempre torceram por mim.

“Ninguém caminha sem aprender a
caminhar, sem aprender a fazer o
caminho caminhando, refazendo e
retocando o sonho pelo qual se pôs a
caminhar.”

(Paulo Freire)

RESUMO

O desenvolvimento da nanotecnologia impulsionou o surgimento de diversos produtos, dentre eles as nanopartículas (NP) metálicas. A NP CuO é utilizada em diversos setores industriais destacando-se a aplicabilidade na composição de tintas anti-incrustantes de navios. Devido a maior reatividade, e conseqüentemente a maior concentração de íons de Cu que podem ser liberados em relação a MP CuO, existe o potencial risco de contaminação do meio ambiente aquático. O objetivo da tese foi avaliar os efeitos toxicológicos da nanopartícula e micropartícula (MP) de CuO em organismos aquáticos de água doce, *Daphnia magna* e algas verdes *Scenedesmus subspicatus*, e organismo de água salgada, bactéria marinha bioluminescente *Allivibrio fischeri*, de forma a elucidar qual o principal fator responsável pelos efeitos deletérios sobre estes organismos. Como substancias-testes utilizou-se 2 NP comerciais e 1 sintetizada no LABTOX, 1 NC também sintetizado no LABTOX. Foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica com *D. magna*. Teste de toxicidade com *A. fischeri*. Para os testes com as algas *S. subspicatus* foram avaliadas a formação de ROS, efeito sobre a eficiência do PSII, aumento na concentração intracelular de Cu e interação entre algas, NP e MP. As suspensões-testes foram caracterizadas via microscopia eletrônica de transmissão (MET), difração de raio-x (DRX), área superficial (AS), potencial zeta (Pz) e quantificação iônica via ICP-MS e GFAAS. Foi realizada a especiação química do CuO nos meios de teste através do software Minteq 3.0. Com base nos resultados obtidos, a NP CuO-LABTOX foi mais tóxica do que as demais NP para todos os testes realizados com exceção para o parâmetro reprodução do teste de toxicidade crônica com *D. magna* onde o NC CuO-PANI se mostrou mais tóxico. Todas as NP foram mais tóxicas do que a MP CuO e foram capazes de diminuir a bioluminescência da bactéria *A. fischeri*. A NP e MP foram capazes de gerar ROS, diminuir a eficiência do PSII e bioacumular em algas verdes *S. subspicatus*. Com base nos resultados obtidos no teste de toxicidade e na caracterização das suspensões-testes pode-se concluir que a principal característica intrínseca responsável pela toxicidade nestes organismos foram os íons de Cu que são liberados não apenas devido a maior área superficial das NP e sim devido à combinação entre estado de aglomeração, diâmetro hidrodinâmico, estabilidade das suspensões e pH do meio.

Palavras-Chaves: Nanotoxicologia, NP CuO, MP CuO, PANI, *D. magna*, *A. fischeri*, *S. subspicatus*.

ABSTRACT

The development of nanotechnology spurred the emergence of various products, including metallic nanoparticles (NP). NP CuO is used in diverse industrial sectors with emphasis on the applicability in the composition of anti-fouling paints for ships. Due to a greater reactivity and consequently a greater concentration of Cu ions that can be released by NP CuO in relation to MP CuO, there is a potential risk of contamination of the aquatic environment. The objective of this thesis was to evaluate the toxic effects of nanoparticles and microparticles (MP) of CuO in aquatic organisms of freshwater, *Daphnia magna* and green algae *Scenedesmus subspicatus* and saltwater organisms, marine bacteria bioluminescent *Allivibrio fischeri*, to clarify the main factor responsible for the deleterious effects on these organisms. Acute and chronic toxicity tests were performed with *D. magna*, toxicity testing with *A. fischeri*. For the test with algae *S. subspicatus*, the formation of ROS was evaluated, effect on the PSII efficiency, increase in the intracellular concentration of the Cu and the interaction between algae, NP and MP. The suspension-tests were characterized via transmission of the electron microscopy (TEM), X-ray diffraction (XRD), surface area (SA), zeta potential (Pz) and ion quantification via ICP-MS and GFAAS. Chemical speciation CuO in the test media was carried out through the Minteq 3.0 software. Based on the results obtained, the NP CuO-LABTOX was more toxic than other NPs for all tests carried out with exception of the reproduced parameter of the chronic toxicity test with *D. magna* where the NC CuO-PANI was more toxic. All NPs were more toxic than the MP CuO and were able to decrease the bacterial bioluminescence of *A. fischeri*. The NP and MP were able to generate ROS, decrease the efficiency of PSII and bioaccumulate in green algae *S. subspicatus*. Based on the results obtained from the toxicity testing and in the characterization of the suspensions-tests, we can conclude that the main intrinsic characteristic responsible for toxicity in these organisms were the Cu ions, that are released not only due to the greater surface area of the NPs, and yes, due to the combination between agglomeration state, hydrodynamic diameter, stability of suspensions and pH medium.

Key-Words: Nanotoxicology, CuO NP, CuO MP, PANI, *D. magna*, *A. fischeri*, *S. subspicatus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema ilustrativo das etapas de síntese do NP de CuO/PANI.....	10
Figura 2: Visão esquemática das diferentes vias que induzem toxicidade celular por NP CuO.....	12
Figura 3: Fatores e mecanismos de toxicidade aos organismos expostos a NP de óxido metálico.....	14
Figura 4: Ciclo resumido da fotossíntese entre o FS II e FSI.....	25
Figura 5: Morfologia do microcústáceo <i>D. magna</i>	27
Figura 6: Representação da bactéria <i>A. fischeri</i>	28
Figura 7: Alga verde <i>S. subspicatus</i>	30
Figura 8: Fluxograma da metodologia.....	34
Figura 9: Esquema da montagem do teste de toxicidade aguda com <i>D. magna</i>	45
Figura 10: Ilustração do teste de toxicidade crônica.....	46
Figura 11: <i>D. magna</i> após 21 dias.....	47
Figura 12: Ilustração do teste de toxicidade aguda com <i>A. fischeri</i>	49
Figura 13: Difatogramas: A) NP CuO (Sigma, MIT e LABTOX) e MP CuO Bulk e B) da NP CuO LABTOX, PANI e NC CuO-PANI.....	56
Figura 14: Comparação da área superficial entre NP e MP.....	58
Figura 15: Cinética de liberação de íons de Cu durante 21 dias em meio M4..	61
Figura 16: Micrografias por microscopia de Luz. <i>D. magna</i> exposta a NP e MP CuO a CE _{50,48 horas}	74
Figura 17: Micrografias de <i>D. magna</i> exposta a NP e MP CuO por microscopia de transmissão eletrônica.....	75
Figura 18: Níveis de pigmentos Chl <i>a</i> em algas verdes <i>S. subspicatus</i> após 6 horas de exposição às NP e MP CuO.....	83
Figura 19: Níveis de pigmentos Chl <i>b</i> em algas verdes <i>S. subspicatus</i> após 6 horas de exposição às NP e MP CuO.....	84
Figura 20: Níveis de pigmentos Chl <i>total</i> em algas verdes <i>S. subspicatus</i> após 6 horas de exposição às NP e MP CuO.....	85
Figura 21: Níveis de pigmentos Carot. em algas verdes <i>S. subspicatus</i> após 6 horas de exposição às NP e MP CuO.....	86
Figura 22: Níveis de formação de ROS em algas verdes <i>S. subspicatus</i> após 6 horas de exposição às NP e MP CuO.....	87
Figura 23: Porcentagem da redução da eficiência do PSII em algas verdes <i>S. subspicatus</i> após 6 horas de exposição a NP e MP CuO.....	89
Figura 24: Concentração de Cu intracelular em algas verdes <i>S. subspicatus</i> após 6 horas de exposição às NP e MP CuO.....	91

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Características das NP.....	8
Quadro 2: Microscopia eletrônica de transmissão das NP em diferentes meios diluentes.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diâmetro dos cristalitos	57
Tabela 2: Quantificação de íons de Cu total	59
Tabela 3: pH em diferentes meios diluentes	59
Tabela 4: Cinética de liberação de íons de Cu em meio CHU no tempo de 0 e 6 horas	63
Tabela 5: Comportamento dos valores de Pz dos materiais testados nos diferentes meios de cultivo e tempos de exposição).....	67
Tabela 6: Comportamento do Dh dos materiais testados nos diferentes meios de cultivo e tempos de exposição	67
Tabela 7: pH das suspensões em diferentes meios diluentes	68
Tabela 8: Especificação química do CuO nos meios de teste de toxicidade	70
Tabela 9: Comparação da $CE_{50, 48 \text{ horas}}$ da NP e MP em <i>D. magna</i>	71
Tabela 10: Comparação da $CE_{50, 15 \text{ min.}}$ da NP e MP em <i>A. fischeri</i>	77
Tabela 11: Resultados das avaliações de toxicidade crônica dos organismos <i>D. magna</i> expostas à NP e MP CuO e aos controles do teste. Resultados expressos em termos de CEO e CENO (mg/L) para os parâmetros reprodução e crescimento (n=10).	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas
BET – Teoria de Brunauer, Emmett e Teller
CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CE₅₀ – Concentração Efetiva que causa efeito em 50% dos organismos expostos.
CE_{50-15min} - Concentração efetiva que causa efeito em 50% dos organismos em 15 minutos de exposição
CE_{50-30min} - Concentração efetiva que causa efeito em 50% dos organismos em 30 minutos de exposição
CENO – Concentração de Efeito Não Observado
CEO – Concentração de Efeito Observado
CETESB – Companhia Ambiental do estado de São Paulo
CE_{zero} – Concentração efetiva que não causa efeito sobre os organismos expostos
CIMAR – Centre of Marine and Environmental Research (Centro de Pesquisa Marinha e Ambiental)
CL₅₀- Concentração que causa morte de 50% dos organismos expostos
CuO- Óxido de Cobre
DIN – Deutsches Institut Für Normung (Instituto alemão de Normatização)
DNA – Ácido desoxirribonucleico
FAAS - Flame atomic absorption spectroscopy (Espectrometria de Absorção Atômica de Chama)
LABTOX – Laboratório de Toxicologia Ambiental
LAMAR – Laboratório de Algas Marinhas
LAMATE – Laboratório de Materiais Elétricos
LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MP – Micropartícula
MP CuO – Micropartícula de Óxido de Cobre
NM – Nanomaterial
NP – Nanopartícula
NP CuO – Nanopartícula de Óxido de Cobre
NT- Nanotecnologia
Pz - Potencial Zeta
ROS – Espécie Reativa de Oxigênio
RNS – Espécie Reativa de Nitrogênio
SCENIHR – Scientific Committee on Emerging and Newly Identified health Risk
UP – ultrapura

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVA	3
1.2 HIPÓTESES DA PESQUISA	5
1.3 OBJETIVOS	5
1.3.1 Objetivo Geral	5
1.3.2 Objetivos Específicos	6
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 NANOTECNOLOGIA e NANOPARTÍCULA	7
2.2 NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE COBRE	9
2.2.1 Toxicidade da NP CuO	10
2.3 CARACTERIZAÇÕES DAS SUSPENSÕES PARA ESTUDOS TOXICOLÓGICOS	14
2.3.1 Potencial zeta (Pz)	15
2.3.2 Microscopia eletrônica	15
2.3.3 Difração de Raio-X	16
2.3.4 Área superficial	17
2.3.5 Características intrínsecas das NP	18
2.5 NANOTOXICOLOGIA	19
2.5.1 Testes de Toxicidade	22
2.5.2 Organismos-testes.....	26
CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS	33
3.1 SUBSTÂNCIA-TESTE	35
3.2 NP e NC de CuO - LABTOX	35
3.2.1 Síntese das NP CuO.....	35
3.2.2 Síntese da PANI	36
3.2.3 NC de CuO/PANI.....	36
3.3 PREPARO DAS SUSPENSÕES-TESTES	36
3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES-TESTES	37
3.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão	38
3.4.2 Difração de raios-X (DRX)	38
3.4.3 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS).....	38
3.4.4 Espectrometria de absorção atômica - Forno de Grafite (GFAAS) .	39
3.4.5 Determinação da Área Superficial	40
3.4.6 Determinação do Potencial Zeta	40
3.4.7 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico	40
3.4.8 Especiação metálica.....	41
3.5 PROCEDIMENTOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ	41

3.6 PROCEDIMENTOS PARA MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO	41
3.7 AVALIAÇÃO DA BIOACUMULAÇÃO	43
3.8 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS	43
3.8.1 Metodologia do cultivo para <i>D. magna</i>	43
3.8.2 Controle da sensibilidade dos organismos	44
3.8.3 Metodologia de teste agudo com <i>D. magna</i>	44
3.8.4 Metodologia do teste de toxicidade crônica com <i>D. magna</i>	45
3.8.5 Metodologia de teste agudo com a bactéria bioluminescente <i>A. fischeri</i> - Sistema Microtox	48
3.9 METODOLOGIA DO CULTIVO PARA ALGA <i>S. subspicatus</i>	49
3.10 ENSAIOS DE TOXICIDADE COM ALGAS <i>S. subspicatus</i>	49
3.10.1 Determinação de ROS como indicador de estresse oxidativo	49
3.10.2 Viabilidade Celular	50
3.10.3 Dosagem dos pigmentos clorofilianos	50
3.10.4 Avaliação do nível de Fluorescência Clorofiliana – Eficiência do PII (P.I. PSII)	51
CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	53
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NP, NC E MP CuO	53
4.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão	53
4.1.2 Difração de Raio-X	56
4.1.4 Quantificação iônica	58
4.1.6 Especificação metálica	68
4.2 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA	71
4.2.1 Toxicidade Aguda com <i>D. magna</i>	71
4.2.2 Toxicidade Aguda com <i>A. fischeri</i>	76
4.2.3 Toxicidade Crônica	79
4.3 BIOENSAIO COM ALGA VERDE <i>S. subspicatus</i>	82
4.3.1 Dosagem dos Pigmentos Fotossintéticos	82
4.3.2 Formação intracelular de ROS	86
4.3.3 Eficiência do fotossistema II - Índice de Performance (P.I. PSII)	88
4.3.4 Acumulação de Cu intracelular	90
4.3.5 Interação entre NP e MP com algas <i>S. subspicatus</i>	92
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES	96
CAPÍTULO VII – RECOMENDAÇÕES	100
CAPÍTULO VIII - REFERÊNCIAS	102
CAPÍTULO IX – APÊNDICES	124
A1. Artigo Rossetto et al.(2014^a)	124
A2. Artigo Rossetto et al.(2014^b)	132
A3. Comportamento dos parâmetros reprodução e crescimento	140

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

A Revolução Industrial permitiu grandes avanços produtivos devido à rapidez na produção, otimização dos processos produtivos e padronização dos produtos, fatores esses que favoreceram o impulso da inovação tecnológica. No entanto, estes mesmos processos que potencializaram a produção, trouxeram impactos em relação à degradação do meio ambiente, devido à carência de legislação específica de controle ambiental e o desconhecimento do potencial poluidor, dentre eles o toxicológico, dos produtos gerados.

Como resultado da Revolução Industrial, em conjunto com a ciência, surge nos dias de hoje a nanotecnologia (NT). A NT abre muitas e variadas perspectivas para a indústria e segundo Paschoalino et al. (2010), atualmente, é um dos ramos da ciência que mais se desenvolve, abrangendo praticamente todos os setores da indústria e serviço, despertando interesse crescente devido a sua aplicabilidade e multidisciplinaridade. Exemplos de alguns setores que utilizam a NT em seus produtos é a biotecnologia, indústria farmacêutica e cosmética, eletrônica, alimentícia, medicina, agrícola, entre outros (NGÔ e VAN DE VOORDE, 2014).

Na escala nanométrica, onde os produtos nanotecnológicos são projetados, diversas aplicações são possíveis devido às novas propriedades adquiridas. Estas novas propriedades tais como, tamanho nanométrico, grande área superficial e estabilidade, oferece a possibilidade de compreender novos fenômenos que podem ser utilizados à escala microscópica e macroscópica. No entanto, as mesmas propriedades que prometem a sua utilização em diversas aplicações, são também aquelas que apresentam motivos de preocupação no contexto da saúde e do meio ambiente, pois os riscos sobre a saúde humana e ao meio ambiente causados pela exposição aos nanomateriais aumentam (CURTIS et al. 2006).

A atenção se dá devido à grande reatividade química, a persistência no meio ambiente e biocompatibilidade que o tamanho reduzido da nanopartícula (NP) gera. Com o aumento da produção industrial, aplicações de nanomateriais (NM) e de subprodutos gerados durante o processo de fabricação, a preocupação em relação aos riscos ao

meio ambiente e a saúde torna-se cada vez mais frequente e importante. Devido ao rápido crescimento do domínio da nanotecnologia, os ecossistemas aquáticos podem ser contaminados por poluentes nanométricos, dentre eles as NP metálicas que são largamente sintetizadas e utilizadas para aplicações industriais (BRAR et al., 2009). Os nanopoluentes podem ainda se acumular na cadeia alimentar como muitos contaminantes conhecidos (FURLANETO, 2011).

Apesar dos grandes esforços de diferentes países na criação de uma regulamentação no uso da NT, como por exemplo, as normas ISO (ISO/TR 16197:2014; ISO/TR 13014:2014, ISO/TS 12901-2:2014), não existe uma política pública específica para controlar os efeitos dos NM sobre o meio ambiente e a saúde humana. Devido a isso, um esforço proativo de entender, identificar e minimizar o potencial risco se torna cada vez mais necessário, principalmente no estágio inicial do processo de inovação e durante todo o ciclo de vida do produto.

A história mostra que existe um grande risco para a saúde e ao meio ambiente devido à produção e comercialização de produtos sem um estudo prévio dos efeitos tóxicos, dentre eles destacam-se a utilização na década de 70 de agrotóxicos clorados, sendo que os resíduos clorados persistiam em toda a cadeia trófica. O risco do uso pode ser agravado pelo fato de que os NM têm características intrínsecas, diferenciadas dos compostos convencionais. Esses efeitos tóxicos são difíceis de prever a partir das propriedades conhecidas da mesma matéria na escala macroscópica ou de extrapolações teóricas, com base em propriedades atômicas ou moleculares.

A nanotoxicologia é uma subárea da toxicologia, que segundo Stone et al. (2006) estuda os efeitos deletérios que NM exercem sobre os seres humanos e o meio ambiente. O uso de NM pode representar importantes riscos toxicológicos, sendo necessário avaliar os seus possíveis efeitos toxicológicos. O mecanismo de interação entre NM e sistemas biológicos está diretamente relacionado com suas novas características específicas.

Avaliar as características específicas das NP é fundamental para compreender as respostas toxicológicas das mesmas. Segundo Chang et al. (2012) fatores-chave, tais como tamanho, características de superfície, dissolução, e as vias de exposição, ajudam a medir os efeitos tóxicos e descrever os mecanismos correspondentes à toxicidade.

A micropartícula de óxido de cobre (MP CuO) também chamada de *bulk* (em inglês) é a forma do CuO mais conhecida e aplicada. Assim

como a NP CuO, a MP CuO possui diversas aplicações devido as suas propriedades e funcionalidades, destacando-se as aplicações como semicondutor e baterias.

O CuO, tanto na forma nanométrica, como micrométrica, devido as suas características biocidas, é utilizado como princípio ativo em tintas antincrustantes, que são aplicadas como sistemas de proteção, com a finalidade de combater a formação e o estabelecimento de comunidades bioincrustantes sobre a superfície exposta à água (SAISON et al. 2010).

Portanto, o objetivo desta tese de doutorado foi avaliar a toxicidade da nanopartícula e micropartícula de CuO sobre o meio ambiente aquático, devido a sua ampla utilização como composição de tintas antincrustantes de embarcações e plataformas *offshore*. Os organismos utilizados nos testes de toxicidade foram o microcrustáceo de água doce *Daphnia magna*, algas verdes *Scenedesmus subspicatus* e bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*, atingindo 3 níveis da cadeia trófica, com a inovação de elucidar qual o fator-chave das características intrínsecas das NP é responsável pela toxicidade.

1.1 JUSTIFICATIVA

Avaliar, elucidar e comparar os efeitos toxicológicos, em diferentes organismos teste aquáticos, entre nanopartícula e micropartícula de CuO é de fundamental importância considerando que o meio ambiente aquático é um dos principais receptáculos finais das mesmas e a quantidade de produtos que possuem NP em sua composição está aumentando. Estima-se que até 2020, 20% dos produtos utilizarão em suas estruturas, componentes nanotecnológicos.

Segundo a Comissão das Comunidades Europeias (2009), as NP existem na natureza ou podem ser produzidas por atividades humanas, intencional ou involuntariamente. A Fundação Nacional de Ciências (NSF) dos Estados Unidos estima que na economia global, a aplicação da nanotecnologia pode ser avaliada em mais de 1 trilhão de dólares em 2015 (Luo, 2007). Observam-se esforços de governantes de alguns países em catalogar os produtos nanotecnológicos, devido à quantidade de produtos de consumo que possuem compostos com NP na sua estrutura. Por exemplo, com a NANoREG, que trata da regulação internacional em nanotecnologia, a comunidade europeia está somando esforços para unir dados existentes acerca da segurança no uso de NM a fim de responder as perguntas que ainda continuam abertas, pois os dados existentes não são suficientes para fins de regulamentações (NANoREG 2015). Com isso,

este estudo fornecerá informações que poderão ajudar na elaboração destas regulamentações.

No âmbito social, os resultados e informações aqui expostos poderão ser utilizados pela população em geral na ajuda de tomada de decisão em relação ao uso de produtos, pois se sabe que as partículas de menores dimensões têm uma superfície reativa superior por unidade de massa à das partículas de maiores dimensões, com isso a toxicidade e os potenciais efeitos à saúde podem igualmente aumentar.

No âmbito científico, esta tese de doutorado se justifica, pois, mediante as características intrínsecas e a facilidade que as NP possuem em penetrar em organismos vivos, devido ao pequeno tamanho, potencializando os efeitos toxicológicos em relação a MP, os efeitos toxicológicos precisam ser averiguados e os principais responsáveis pela toxicidade precisam ser elucidados, uma vez que os dados de pesquisas científicas apresentados na bibliografia ainda encontram-se contraditórios em relação a isso (OBERDÖRSTER, G. et. al. 2005; OBERDÖRSTER, OBERDÖRSTER e OBERDÖRSTER, 2005; KOLESNICHENKO, TIMOFEEV e PROTOPOPOVA, 2008, NANoREG, 2015).

Além disso, este trabalho contribuirá para a sociedade científica, pois além de fazer a comparação entre a toxicidade em 3 diferentes organismos-teses, os resultados ajudarão elucidar a principal característica intrínseca da NP responsável pela toxicidade nestes organismos-testes. O Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC iniciou suas atividades com nantoxicologia em 2009, com o projeto de cooperação internacional aprovada pela CAPES, intitulado "Nanotoxicologia: Métodos toxicológicos, genéticos e epigenéticos como uma estratégia para avaliar o risco da exposição humana e ambiental aos nanomateriais" (PGCI/CAPES nº 017/2010), projeto este que consolidou a cooperação internacional entre Brasil e Canadá (UQAM) na área de Nanotoxicologia. Esse projeto possibilitou ainda a aprovação do projeto para a formação de uma rede de pesquisas em Nanotoxicologia, aprovado pelo CNPq e intitulado "Rede cooperativa de pesquisas em nanotoxicologia aplicada a nanopartículas de interesse da indústria petrolífera e de tintas" (Processo CNPq nº. 552112/2011-9) envolvendo as instituições UFSC (Florianópolis, Brasil), UQAM (Montreal, Canadá), Bordeaux 2 (Bordeaux, França), UNIFESP (São Paulo, Brasil), UNIVILLE (Joinville, Brasil) e Polinova (Biguaçu, Brasil). O mais recente projeto aprovado pelo LABTOX foi a Chamada Universal -

MCTI/CNPq Nº 14/2013 intitulado como “Nanocompósitos para aplicação em nanofiltração de sais e íons de metais pesados de águas para abastecimento e efluentes”.

Portanto, esta tese se justifica no âmbito científico, legal e social, pois para garantir um desenvolvimento seguro da nanotecnologia, baseada no CuO ou outros óxidos metálicos, uma boa compreensão dos riscos ambientais desses NM se torna necessária, além disso, esta tese se destaca com a inovação no âmbito científico por avaliar a toxicidade em diferentes cenários (água doce e água salgada) correlacionando diferentes características específicas dos nanomateriais com a sua toxicidade.

1.2 HIPÓTESES DA PESQUISA

Considerando a problemática exposta sobre o uso da NP e MP CuO, principalmente devido à falta de dados que possa definir qual a principal característica específica responsável pela toxicidade do CuO, as hipóteses a seguir foram formuladas com o objetivo de serem orientadoras para o desenvolvimento da tese.

- Hipótese 1

Se as características específicas, tais como o tamanho e área superficial, são responsáveis pela maior toxicidade da NP CuO, então devido a isso, o principal indutor da toxicidade da NP são os íons liberados de Cu devido a estas características.

-Hipótese 2

Se a toxicidade da NP CuO está relacionada com o seu tamanho e forma devido a sua maior reatividade, então quanto menor o estado de aglomeração, maior será a toxicidade da NP.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar os efeitos tóxicos das nanopartículas de CuO, nanocompósito (NC) e micropartícula de CuO em diferentes organismos aquáticos, de forma a elucidar qual o principal fator responsável pelos efeitos deletérios sobre estes organismos

1.3.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as suspensões de NP, NC e MP de CuO em água ultrapura, e nos meios de teste ISO, M4, NaCl 2% e CHU.
- Realizar ensaios de toxicidade aguda utilizando *D. magna* para suspensões de NP, NC e MP de CuO.
- Avaliar os efeitos da NP, NC e MP de CuO causados sobre a *D. magna* quanto à longevidade, fecundidade e crescimento, empregando ensaios de toxicidade crônica.
- Realizar ensaios de toxicidade aguda utilizando a bactéria *A. fischeri* para suspensões de NP, NC e MP de CuO.
- Realizar ensaios de toxicidade aguda utilizando a alga verde *Scenedesmus subspicatus* para suspensões de NP, NC e MP de CuO avaliando o efeito em relação à eficiência da emissão de fluorescência.
- Avaliar a bioacumulação do CuO na forma de NP, NC e MP sobre a alga verde *S. subspicatus*.
- Avaliar o estresse oxidativo do CuO na forma de NP, NC e MP sobre a alga verde *S. subspicatus*.
- Avaliar a cinética de liberação de íons de Cu da fração solúvel em meios de teste das algas verdes *S. subspicatus*.
- Avaliar a especiação metálica da NP, NC e MP CuO nos meios de teste através de software.
- Avaliar a diferença de efeitos toxicológicos do CuO em escala nanométrica e micrométrica em relação à liberação de íons de Cu.
- Avaliar a diferença de efeitos toxicológicos do CuO em escala nanométrica e micrométrica em relação ao tamanho das partículas.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo foi apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre estudos desenvolvidos sobre nanotoxicologia, com o objetivo de destacar as principais linhas seguidas para a elaboração desta tese e selecionar as metodologias mais adequadas para a execução deste trabalho. Esta revisão é composta inicialmente pela definição sobre nanotecnologia e NP. No âmbito específico do tema, foi apresentada uma descrição sobre as NP CuO, MP CuO, toxicidade, usos e tipos de caracterização. Por fim, é apresentada uma breve revisão sobre a nanotoxicologia, teste de toxicidade aquática e organismos teste utilizados neste estudo.

2.1 NANOTECNOLOGIA e NANOPARTÍCULA

A nanotecnologia é uma ciência verdadeiramente multidisciplinar, e segundo Biju et al. (2008) com potenciais aplicações em quase todos os ramos da ciência e da tecnologia atual. A nanotecnologia se refere à preparação de materiais, dispositivos ou processos que envolvam o controle da matéria na escala do bilionésimo do metro, que é expressa pelo prefixo nano, que em grego significa “anão”.

A origem da nanotecnologia, segundo Segala (2009), remonta a meados do século XX, onde em seu discurso durante a reunião anual da Sociedade Americana de Física, Richard Feynman, referiu-se sobre a primeira visão da nanotecnologia. Segundo ele, as dimensões a serem tratadas estariam próximas ao nível atômico, chamando a atenção o fato que em dimensão atômica, trabalha-se com leis diferentes, gerando com isso novos efeitos e novas possibilidades de uso, nascendo assim à nanotecnologia moderna.

Avanços na área da nanotecnologia mostraram-se mais significativos a partir de 1980, com o aprimoramento das instrumentações para a visualização e manipulação do que havia sido proposto por Richard Feynman. A primeira definição sobre nanotecnologia foi reportada por Mario Taniguchi em 1974. Segundo Taniguchi (1974) a nanotecnologia consiste principalmente, no processo de separação, consolidação e deformação dos materiais atômicos, por átomo ou molécula.

Os NM são uma grande classe de materiais produzidos pela nanotecnologia, fazendo parte os compostos orgânicos e inorgânicos que possuem pelo menos uma dimensão na nanoescala (10^{-9} m). Segundo

Christian et al. (2008) pode-se citar como exemplo, para NP inorgânicas, as de nano-ouro, nano-cobre, nano-prata; os óxidos metálicos, tais como, óxido de cobre, dióxido de titânio e óxido de zinco e ligas metálicas quantun dots. Já as NP orgânicas, são exemplos clássicos, os nanotubos de carbono e o fulereno (C_{50} e C_{70}).

Para Falaguasta (2005) e Steffens (2007), as NP podem ser divididas em pelo menos duas categorias: NP naturais e NP engenheiradas (aquelas produzidas pelo homem). As principais fontes de NP no meio ambiente são as queimas de florestas, vulcões, automóveis e fábricas (NOWACK e BUCHELI, 2007; LANONE e BOCZKOWSKI, 2010; MYUNG e PARK, 2012).

Segundo Nagarajan (2008), o grande interesse se dá nas NP engenheiradas que são desenvolvidas em laboratórios com propriedades muito específicas, geralmente projetadas e sintetizadas com modificações superficiais específicas para atender as necessidades de aplicações. As NP podem ser produzidas por síntese química ("bottom-up") ou quebra mecânica das partículas maiores ("top-bottom") (OBERDÖRSTER et al. 2005).

Já as NP naturais diferem-se pelas suas características, tais como sua distribuição de tamanho, aglomeração, quando gerada e composição química. No Quadro 1 é possível fazer uma comparação entre NP naturais e as NP engenheiradas, através do tamanho, do estado de aglomeração, composição química e significância tóxica.

Quadro 1: Características das NP.

Característica de partículas primárias	NP Naturais (ultrafinas)	NP Engenheiradas
Tamanho	< 100nm	< 100nm
Distribuição de tamanho	Poli dispersa	Mono dispersa
Aglomeração quando gerada	Sim	Não
Composição química	Variável até bem definida	Bem definida
Significância tóxica	Pequeno tamanho, área superficial, composição química	Pequeno tamanho, área superficial, composição química

Fonte: Adaptado de Oberdörster et al. (2005)

2.2 NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE COBRE

As NP podem ser desenvolvidas segundo Drobne (2007), a partir de uma grande quantidade de elementos químicos, sendo que os mais comuns são os metais, óxidos metálicos, silicatos, óxidos não cerâmicos, polímeros, compostos orgânicos, carbono e biomoléculas.

Por possuírem uma grande área superficial em relação às partículas micrométricas, as NPs são mais reativas devido ao carregamento de cargas. Estas propriedades as fazem altamente desejáveis para diversas aplicações comerciais, médicas, setores militares e ambientais, como é o caso dos óxidos metálicos.

Segundo Popov et al. (2005), as NP de óxido metálicos são fabricadas em grande escala para uso industrial e doméstico (materiais esportivos e eletrônicos, têxteis, cosméticos) com a estimativa do aumento de aplicações.

Os óxidos de metais de transição são uma importante classe de semicondutores, que têm aplicações magnéticas, de transformação de energia solar, eletrônica e quando presente na camada superficial pode ter uma profunda influência sobre propriedades como a atividade catalítica, pois esta atividade está relacionada com estado de oxidação (AHAMED et al. 2010). Para Wang et al. (2011) entre os óxidos metálicos de transição, o óxido de cobre (CuO) tem atraído muita atenção, pois pode ser utilizado como supercondutores em aplicações como fotocondutores e fototérmicas. Devido a isso, as NP CuO possuem um significativo interesse tecnológico e são cada vez mais utilizadas em várias aplicações (ZHOU et al. 2006).

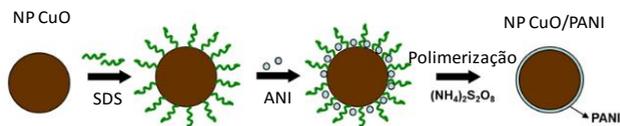
CuO é o membro mais simples da família de compostos de cobre e apresenta uma gama potencial de propriedades físicas, como a supercondutividade em alta temperatura e efeitos de correlação eletrônica (CAVA, 1990; TRANQUADA et al. 1995). CuO nanoparticulado é aplicado em diferentes áreas, incluindo sensores de gás (CHOWDHURI et al. 2004) catálise (JAMMI et al. 2009), baterias (ZHANG et al. 2005), supercondutores de alta temperatura (DAR et al. 2008), conversão de energia solar (YIN et al. 2005). Além disso, as NP CuO podem ser utilizadas na composição de tintas anticrustantes (ALMEIDA, DIAMANTINO e SOUSA, 2007) devido as suas características biocidas.

As NP podem ser sintetizadas e funcionalizadas segundo a aplicação que se deseja. Existem hoje os nanocompósitos (NC) de CuO,

como por exemplo, o NC CuO/PANI, que são NP de CuO revestidas com polianilina (PANI). Estas NP, se destacam devido às suas potenciais aplicações em áreas multidisciplinares, tais como eletrônicos, termelétrica, eletromagnética, química, membranas e sensores (BHADRA et al. 2009) devido ao polímero que as revestem.

A Figura 1 representa a síntese de uma NP CuO revestida com PANI. A NP CuO após passar por uma reação com dodecilsulfato de sódio (SDS) e anilina (ANI) e por fim uma polimerização com agente oxidante forma a NP CuO revestida com PANI.

Figura 1: Esquema ilustrativo das etapas de síntese do NP de CuO/PANI.



Devido a crescente aplicação das NP de óxido metálicos, entre eles a NP CuO, cresce também a preocupação acerca de seu comportamento em sistemas aquáticos e de sua biodisponibilidade em relação a partículas maiores, fazendo-se então necessária a correta caracterização e efeitos em todo o seu ciclo de vida.

2.2.1 Toxicidade da NP CuO

Estudos de avaliação de toxicidade têm focado principalmente em investigar os efeitos em diferentes vias de exposição, tais como as vias respiratórias e gastrointestinais (PASCHOALINO et al. 2010).

Em organismos, Cu é um dos elementos indispensáveis para a manutenção da homeostase (GALHARDI et al. 2005). Homeostase é uma propriedade em seres vivos que tem função reguladora do ambiente interno a fim de manter uma condição estável, mediante os múltiplos ajustes de equilíbrio dinâmico. Íons Cu podem causar toxicidade, uma vez que exceda a faixa de tolerância fisiológica *in vivo* (ZIETZ et al. 2003); GALHARDI et al. 2004).

Em relação à saúde humana, Yokohira et al. (2009) realizaram biosensaio *in vivo* com NP de CuO em ratos. Avaliação histopatológica mostrou que a NP CuO induziu graves alterações inflamatórias agudas

em pulmão de rato em doses elevadas e cronicamente em doses baixas ou com injeções frequentes.

Karlsson et al. (2008) relataram que a NP CuO poderia causar citotoxicidade e danos ao DNA na linhagem celular humana A549 do epitélio pulmonar. Lesões oxidativas foram verificadas através da medição da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) através de sonda fluorescente sensível à oxidação do 2', 7'- diacetatodifluorescina (DCFH-DA).

Em relação a geração de ROS e danos ao DNA, XING et al. (2012) demonstraram que o estresse oxidativo seria o efeito tóxico primário. Em comparação com as células cultivadas em meio, as células expostas a NP CuO apresentaram diminuição da catalase e glutatona redutase (GR) e mostrou aumento de atividade da glutatona peroxidase (GPx). O aumento observado de oxidação total de glutatona sugeriu que a NP CuO não só gera ROS, como também bloqueia defesas antioxidantes celulares (FAHMY e CORMIER, 2009).

A investigação ambiental em relação à toxicidade NP CuO tem focado principalmente nos organismos aquáticos. Os modelos experimentais mais comuns são algas, peixes e crustáceos, cujo crescimento e toxicidade são tratados como indicadores de relevância ambiental.

Aruoja et al. (2009) estudaram a toxicidade da NP CuO utilizando com bioindicador as algas *Pseudokirchneriella subcapitata*. Em baixas concentrações, NP CuO ($CE_{50} = 0,71$ mg de Cu L⁻¹) foi mais solúvel e mais tóxica quando comparado com a bulk ($CE_{50} = 11,55$ mg de Cu L⁻¹). Grosell et al. (2007) e Griffitt et al. (2007) reportam que a NP CuO também foi tóxica para peixes. Os resultados mostraram que a toxicidade CuO foi largamente influenciada pela liberação íons Cu solúvel.

Griffitt et al. (2007) relatam ainda que em peixes da espécie *Danio rerio*, as suspensões de NP CuO podem danificar lamelas branquiais e inibir a reprodução de células epiteliais devido a alteração dos níveis do metal no plasma. Gomes et al. (2012) consideraram que a glândula digestiva do mexilhão da espécie *Mytilus galloprovincialis* pode agregar a NP CuO e resultar em toxicidade.

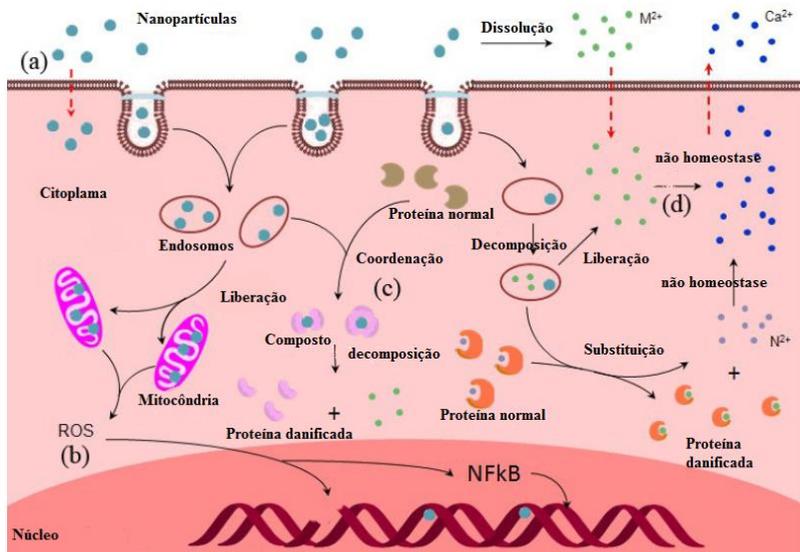
Segundo Rossetto (2011), a NP CuO se mostrou mais tóxica tanto em teste de toxicidade aguda, assim como crônica, com microcrustáceo *D. magna* e *A. fischeri* do que a MP CuO.

Os resultados de Shi et al. (2011) indicaram que a NP CuO diminui os níveis de clorofila da *Landoltia punctata* e que a toxicidade NP CuO é de três a quatro vezes maiores do que a do Cu iônica, devido a maior absorção de NP.

NP CuO também teve efeitos adversos sobre bactérias *Escherichia coli* induzidos à produção de ROS e danos ao DNA (BONDARENKO et al. 2012).

A toxicidade das NP está relacionada a diversos fatores ligados às suas características. Alguns dos mecanismos que podem induzir a toxicidade são apresentados na Figura 2. Entre esses mecanismos podem-se citar como principais, a dissolução e a internalização da NP.

Figura 2: Visão esquemática das diferentes vias que induzem toxicidade celular por NP CuO. (a) Potenciais mecanismos de entrada da NP CuO em células, (b) Efeito intracelular de ROS devido a NP CuO, (c) Efeito da coordenação de Cu^{2+} liberado pela NP CuO na célula, (d) Efeito não homeostase interrompido pela presença de Cu^{2+} .



Fonte: Adaptado de Chang et al. 2012.

Quando o tamanho das NP é pequeno suficiente, diâmetro entre 50 e 150 nm, segundo Krug e Wick (2011), elas podem sofrer endocitose através da membrana e entrarem nas células, desencadeando diversas

reações. Além disso, segundo Verna et al. (2008), as mesmas também podem adentrar a compartimentos celulares através de difusão devido à presença de íons positivos na superfície (Cu^{+2}) que podem competir com outros cátions durante os processos biológicos. Enquanto isso, as proteínas transportadoras permitem que as NP atravessem a membrana plasmática.

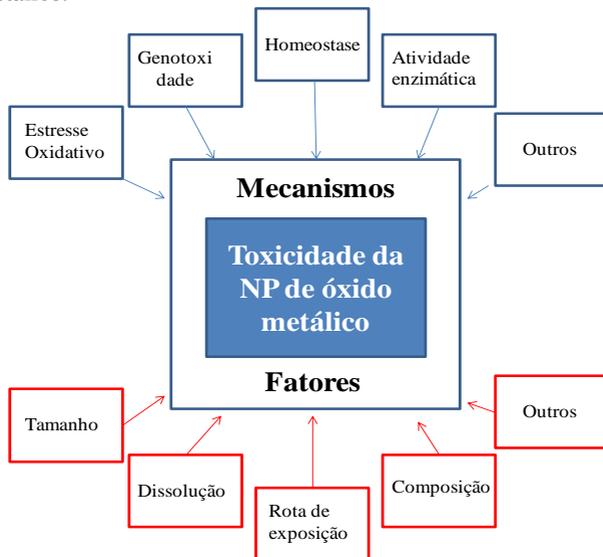
Efeito intracelular de ROS induzidos pela CuO é mostrado na Figura 2b. NP podem interagir diretamente com organelas oxidativas, tais como mitocôndrias, redox das proteínas ativas e estimular a produção de ROS nas células. Os íons (Cu^{2+}) produzidos pelas NP podem induzir ROS por diversas reações químicas. As ROS podem induzir quebras no DNA, e afetar a expressão de genes.

Os íons de Cu^{2+} têm a capacidade de formar quelatos com biomoléculas ou desalojar os íons metálicos em metaloproteínas específicas, que podem resultar na inativação da proteína funcional (Figura 2c). Cu^{2+} liberado pela NP pode aumentar a sua concentração local e perturbar a homeostase celular, resultando em toxicidade celular (Figura 2d).

Existem diversas rotas de exposição e mecanismos de toxicidade da NP CuO. Normalmente, para materiais micrométricos, a avaliação do perigo de exposição se dá através da composição química, dose e via de exposição. No entanto, para avaliação de NM, fatores adicionais são incluídos tais como, o tamanho nanométrico, nanosuperfície, dissolução, efeitos quânticos, nanoestruturas, concentração e agregação (YAN et al. 2011).

Na Figura 3 são representados os possíveis fatores e mecanismos de toxicidade em um organismo exposto à NP de óxidos metálicos, incluindo a NP CuO.

Figura 3: Fatores e mecanismos de toxicidade aos organismos expostos a NP de óxido metálico.



Fonte: Adaptado de Chang et al. (2012).

2.3 CARACTERIZAÇÕES DAS SUSPENSÕES PARA ESTUDOS TOXICOLÓGICOS

Ao iniciar um estudo de toxicidade de NP em organismos vivos e meio ambiente, é necessário caracterizar as suspensões-testes para compreender os possíveis causadores de efeitos deletérios. Existem diferentes tipos de caracterização que podem ser realizadas para uma NP/NM. Uma completa caracterização de NM requer diversas abordagens metodológicas (da SILVA et al. 2011; SUAREZ et al. 2011).

Para Powers et al. (2007), a caracterização completa de uma NP inclui medidas como o tamanho, distribuição e forma, além de outras características morfológicas (por exemplo, cristalinidade, porosidade, superfície e rugosidade), a química do material, a sua solubilidade, área de superficial, estado físico da dispersão, química de superfície, entre outras propriedades.

2.3.1 Potencial zeta (Pz)

A estabilidade da dispersão de NP pode estar relacionada às interações eletrostáticas entre as partes, ou, caso não haja surgimento destas, a viscosidade do meio pode proporcionar uma estabilidade física da dispersão. A estabilidade de uma suspensão pode ser medida através do seu Pz. Segundo Schaffazick et al. (2003), a medida é realizada através da técnica de Mobilidade Electroforética, ou seja, através da medida das cargas superficiais da amostra.

O Pz é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento. Depende não somente da superfície da partícula, mas do dispersante. O Pz pode ser afetado pelo pH ou força iônica do meio. Dessa forma, pode-se prever estabilidade de suspensões coloidais. Esta técnica, contudo, não considera a heterogeneidade das cargas de cada molécula, fornecendo sempre um valor médio.

Quanto maior for o seu valor em módulo, maior será a carga superficial da partícula, conferindo uma maior estabilidade da suspensão, ou seja, maior resistência à agregação. Quando o potencial é baixo, a atração supera a repulsão e as partículas tendem a aproximar-se mais, aumentando a probabilidade de uma colisão, ocorrendo à aglomeração e floculação (METCALF e EDDY, 2003; GOUVÊA e MURAD, 2001).

2.3.2 Microscopia eletrônica

A microscopia é uma importante técnica de caracterização de NP, pois fornece como principais informações o tamanho e a morfologia superficial. Esta técnica é utilizada a fim de caracterização das NP em solução. No caso da microscopia eletrônica, a área ou o microvolume a ser analisado é irradiado por um fino feixe de elétrons ao invés da radiação da luz.

Segundo Maliska (2011) a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) é um instrumento versátil e usado rotineiramente para a análise microestrutural de materiais sólidos. Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de fácil interpretação. Ainda segundo a autora, dependendo do material, pode atingir aumento de até 900.000 vezes, mas para a análise de materiais normalmente o aumento é da ordem de 10.000 vezes. O princípio físico de funcionamento do MEV consiste na emissão de um de feixes de elétrons (eletrodo negativo) por um filamento capilar de tungstênio mediante a aplicação de uma diferença de potencial que pode variar de 0,5 a 30 kV. Como resultado a radiação irá fornecer informações

características sobre a amostra (topografia da superfície, composição, cristalografia, etc.).

Já a Microscopia de Transmissão Eletrônica (MET), segundo Padilha (2011), consiste de um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas, que controlam o feixe, encerrados em uma coluna evacuada com uma pressão cerca de 10^{-5} mmHg e com faixa de magnificação entre 50 a 600.000 vezes. Uma caracterização microestrutural desejável envolve a determinação da estrutura cristalina, composição química, quantidade, tamanho, forma e distribuição das fases. O MET é uma técnica análoga à microscopia óptica de transmissão, no sentido de que a iluminação em um MET é obtida por um canhão de elétrons, que está no topo da coluna do microscópio, enquanto que o sistema de gravação está no fundo (uma tela fluorescente ou um filme fotográfico).

2.3.3 Difração de Raio-X

A Difração de Raio-X (DRX) é uma técnica não destrutiva, sendo um dos métodos mais utilizados e simples para estudar a estrutura interna de materiais cristalinos e consequentemente identificá-los (SCAPIN, 2003; MEDEIROS, 2007, COSTA et al., 2009).

A DRX transformou-se em um método indispensável para a investigação, caracterização e controle de qualidade dos materiais. As áreas de aplicação incluem a análise da fase qualitativa e quantitativa, a cristalografia, a determinação da estrutura e do abrandamento, entre outros.

A DRX possibilita a obtenção de informações importantes como grupos espaciais, parâmetros de rede, posição dos átomos na célula unitária, microdeformações, quantidade relativa de fases e distância entre os primeiros vizinhos (Gomes, 2009). E com ela é possível obter o tamanho do cristalito do material que se está analisando.

Para a determinação do tamanho médio dos cristalitos, é necessário conhecer o valor de espaçamento interlamelar, que é obtido através do tratamento matemático e aplicação da Lei de Bragg (Equação 1).

$$2d \sin\theta = n\lambda$$

$$\text{Eq. (1)}$$

Onde: n = número inteiro
 d = distância entre planos atômicos
 θ = ângulo de incidência em relação ao plano considerado

O tamanho médio do cristalito é dado pela equação de Debye-Sherrer (Equação 2).

$$D (\text{Å}) = k \lambda / \beta (\text{size}) \cos\theta \quad \text{Eq. (2)}$$

Onde: K = fator de forma (constante usualmente 0,9)
 λ = é o comprimento de onda da radiação incidente
 B = largura observada da linha difratada a meia altura do pico.

2.3.4 Área superficial

Segundo Powers et al. (2007), as interações entre os NM e organismos ocorrem geralmente na superfície da partícula, portanto, área superficial é de fundamental importância na determinação de possíveis efeitos tóxicos.

Segundo Webb et al. (1997), a determinação da área superficial das NP normalmente é baseada no método de Brunauer, Emmett e Teller que ficou conhecido como a metodologia de BET, que é baseada na teoria de que utiliza a adsorção de gás pela superfície da partícula, o gás nitrogênio é o adsorbato mais comum, a baixas temperaturas, onde esses dados são aplicados em uma sequência de fórmulas do próprio procedimento BET. Assim, a área superficial específica é obtida através da isoterma de adsorção, que relaciona o volume de gás adsorvido em função da pressão relativa. A isoterma de BET utiliza as seguintes equações 3 e 4 para representar os dados experimentais (FIGUEIREDO & RIBEIRO, 1989):

$$P. V / (P_0 - P) = 1 / C.V_m + ((C-1) P) / C.V_m. P_0 \quad \text{Eq. (3)}$$

Onde:

P e P_0 são a pressão medida no estado de equilíbrio e a pressão de saturação inicial do sistema.

V é a quantidade de gás adsorvido e V_m corresponde a monocamada de gás adsorvida quando o sólido está completamente recoberto.

C é a constante de BET

$$S = ((V_m \cdot L_{av} \cdot A_{ad}) / M_v) \quad \text{Eq. (4)}$$

Onde: S é a área de superfície específica.

V_m é o volume de gás adsorvido.

L_{av} é o número de Avogadro ($6,02214179 \times 10^{23}$).

A_{ad} é área de seção transversal da uma molécula de adsorbato.

M_v é o volume ocupado por 1 mol da molécula de adsorbato.

2.3.5 Características intrínsecas das NP

O comportamento das NP em meio líquido é muito importante para compreender a sua reatividade no mesmo. As alterações das características das NP no estado seco (em pó) e aquoso são ilustradas na Figura 4, onde Jiang, Oberdörster e Biswas (2008) observam que as NP no estado seco ou em pó, podem apresentar-se de duas formas: aglomerados (devido à fraca força de van der Waals) e na forma de agregados (interações químicas fortes entre as partículas) que podem ser controlados durante a síntese. Após a dispersão em solução, as NP podem permanecer em aglomerados ou na forma de agregados, cobertas por dupla camada elétrica. Normalmente, quando se encontram em forma de aglomerados, as NP podem ser separadas (devido a forças mais fracas) por diversas metodologias, enquanto que os agregados NP não podem ser separados.

Segundo Jiang, Oberdörster e Biswas (2008), as aglomerações acontecem devido à presença das forças e energia de superfície. Logo, é necessário romper estas forças existentes no aglomerado através de processos físicos, como o cisalhamento (forças ultrassônicas), ou químicos, que envolvem adição de surfactantes ou funcionalização da superfície.

O tamanho das NP está diretamente correlacionado com muitas propriedades essenciais, tais como a superfície, solubilidade e reatividade química, e alguns deles têm efeitos sobre as interações entre nanomateriais e biomoléculas que afetam posteriormente o comportamento nanotoxicológico das NP in vivo (Zhao et al., 2007). Por exemplo, diminuindo o tamanho da partícula, resulta-se no aumento da área superficial específica que poderá promover a acumulação das NP, mas também um aumento de reatividade e aumento das interações entre

NP e biomoléculas (CHANG et al., 2012). A solubilidade é outra propriedade importante que ajuda a explicar os efeitos tóxicos em vários organismos, conforme apresentado na Sessão 2.2.1.

Existem diferentes metodologias e técnicas para quantificar os íons de cobre total e fração solúvel, dentre elas a espectrometria de absorção atômica.

Brunner et al. (2006) verificou que em seis dias, o efeito tóxico de NP de óxido de metal foi mais elevado para os metais solúveis do que os insolúveis aplicando a mesma concentração.

Bactérias com sensor-Cu demonstraram que as NP CuO foram muito mais solúveis do que a MP CuO (MORTIMER et al. 2010). Isso acontece, pois, as partículas nanométricas terem maiores áreas de superfície para interagir com moléculas do solvente, do que as MP e também, as NP mostraram que possuem dissolução mais rápida.

Portanto, quando a caracterização das suspensões é bem conduzida, torna-se aparente como os fenômenos biológicos observados estão relacionados às características específicas de cada NP. Segundo Singh et al. (2009) muitos problemas relacionados aos estudos nanotoxicológicos está no fato da não caracterização das suspensões em questão.

2.5 NANOTOXICOLOGIA

A toxicologia tem por finalidade conhecer os efeitos das substâncias químicas, de formas isoladas ou misturadas, e como, onde e em que escala eles se manifestam (MATIAS, 1996). Um tipo de estudo muito utilizado é de toxicidade em organismos aquáticos, pois os ecossistemas aquáticos representam os receptáculos finais de qualquer poluição, sendo ela aquática, atmosférica ou depositada no solo (MATIAS, 2009). Segundo Rand, Wills e Mccarty (1995), a toxicologia aquática tem como objetivo avaliar o efeito de xenobióticos sobre organismos aquáticos representativos.

A crescente produção e aplicação de NM têm provocado uma ampla discussão sobre os potenciais riscos associados a sua exposição. (SEATON e DONALDSON, 2005). Com a crescente necessidade do conhecimento dos riscos potenciais destes materiais e compostos nanoestruturados diretamente relacionados à saúde humana e ao meio ambiente surgiu o termo nanotoxicologia, que tem por objetivo estudar a toxicidade dos NM em relação ao homem e ao meio ambiente.

Segundo Marquis et al. (2009) e Choi, Oh e Choy (2008), nanotoxicologia é uma área emergente que tem como objetivo caracterizar e categorizar os efeitos na saúde causados por NM para determinar relações de estrutura/função entre NP e toxicidade. Holsapple et al. (2005) afirmam que estudos sobre nanotoxicologia estão voltados para caracterizar a segurança dos NM, com foco especial em definir seus mecanismos de ação bem como seus perfis toxicológicos, verificando desde os efeitos agudos, subcrônicos e crônicos de extrema importância para estudos dos NM.

Os primeiros estudos sobre a toxicidade de NM foram realizados na última década do século XX, investigando-se materiais que em escala micrométrica não apresentavam toxicidade, e que em escala nanométrica, como nanoparticulados, apresentavam algum efeito tóxico (PASCHOALINO et al., 2010). Um dos primeiros trabalhos sobre esta temática foi realizado (SEATON et al. 1995) que, em um ensaio *in vivo* com ratos, observou a inflamação de tecidos intersticiais somente dos indivíduos que foram expostos a partículas nanométricas de 20 nm, enquanto que os demais, expostos a partículas de 250 nm, mantiveram-se saudáveis.

Em organismos, segundo Heinlaan et al. (2008), o principal mecanismo de toxicidade de NP pode ser através do estresse oxidativo que danifica os lipídios, carboidratos, proteínas e DNA. Nel et al. (2006) e Xia et al. (2006) afirmam também que existe uma rede de mecanismos por trás dos efeitos induzidos à saúde por estas NP, e a capacidade de causar estresse oxidativo é um deles. NP pode cruzar as mais fortes barreiras biológicas como, por exemplo, a hematoencefálica que protege o Sistema Nervoso Central (LOCKMAN et al. 2006).

Segundo Nel et al. (2006) o estresse oxidativo ocorre quando ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS) perturbam o equilíbrio entre a pressão oxidativa e a defesa antioxidante. ROS podem, por exemplo, ser formada através de um radical de metal de transição, ou outro produto químico na superfície da partícula, ou como consequência da interação entre partículas e componentes celulares. A peroxidação lipídica é considerada um dos mais importantes efeitos associados à exposição à NP, pois proporciona alterações nas propriedades da membrana celular que por sua vez pode perturbar as funções celulares vitais (RIKANS E HORN BROOK, 1997). Além disso, a oxidação das proteínas desempenha um papel chave no desenvolvimento de arterioesclerose, câncer e artrite (VALKO et al. 2004).

Segundo Drobne (2007), a membrana celular, mitocôndrias e núcleo da célula são considerados como alvos mais relevantes de indução da toxicidade gerada pelas NP TiO_2 . As mitocôndrias são alvo de partículas que foram fagocitadas pelas células, bem como uma fonte para a produção de ROS (XIA et al. 2006) e os danos gerados a elas podem levar ao aumento da produção de ROS, diminuição do potencial de membrana mitocondrial e apoptose. Segundo Upadhyay et al. (2003), foi demonstrando uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial em células alveolos pulmonares (da linhagem A549) quando expostas a partículas de amianto. Este fato também foi observado após a exposição a vários outros tipos de partículas incluindo partículas metálicas por Karlsson, Holgersson e Möller (2008b).

Para Oberdörster (2008), a aplicação de partículas com diâmetros menores que 100 nm incitam várias discussões em relação à avaliação toxicológica, em especial, o fato de que características inerentes às partículas com diâmetros diferentes, porém com mesma composição, podem também interferir na biocompatibilidade desses materiais.

Segundo Karlsson et al. (2008a), estudos mostram que em geral as NP possuem maiores toxicidade quando comparada com suas formas micrométricas, levantando a hipótese amplamente assumida de que as NP são mais potentes em causar danos. Renwick et al. (2004) descreveram um estudo em dois diferentes tamanhos do TiO_2 que foram administradas diretamente no pulmão de ratos e as respostas inflamatórias foram observadas. Os resultados mostram que, enquanto as partículas micrométricas foram tidas como "não tóxica", a partícula na escala nanométrica foi classificada como "tóxica".

Esta hipótese não pode ser totalmente aceita uma vez que alguns estudos demonstram a existência de NP que não se mostraram mais tóxica do que a sua formulação bulk. O exemplo de Warheit et al. (2006) representa bem essa situação: a toxicidade das partículas de quartzo não foi dependente do tamanho da partícula pela área superficial, mas sim a reatividade da superfície. Embora já existam alguns estudos sobre o potencial perigo de NP engenheiradas, a sua liberação para o ambiente aquático os seus efeitos nocivos permanecem amplamente desconhecidos (CHANG et al. 2012).

Como a água é um dos bens essenciais para os ecossistemas, os dados sobre o destino e comportamento das NP sintéticas em diferentes tipos de águas naturais, bem como os seus potenciais efeitos ecotoxicológicos, são essenciais para a avaliação dos riscos ambientais

para as nanotecnologias (NOWACK e BUCHELI 2007). Segundo Quina (2004), a reflexão a respeito desta questão é bastante pertinente, uma vez que, além das inúmeras perspectivas oriundas do desenvolvimento de uma gama de novos materiais, há o potencial risco de contaminação ambiental, dadas as características intrínsecas das NP, as quais podem facilitar a translocação destas pelos compartimentos ambientais e ocasionar danos à cadeia alimentar. Todos os aspectos levantados até o momento sobre o tema justificam a importância da investigação sobre a disponibilidade, degradabilidade e toxicidade dos NM (QUINA, 2004).

2.5.1 Testes de Toxicidade

Os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais que têm como objetivo avaliar os efeitos nocivos das substâncias a serem analisadas, bem como o seu grau de toxicidade. Os organismos vivos são expostos a diferentes concentrações das substâncias de interesse e analisam-se os efeitos adversos causados sobre estes organismos, como por exemplo, imobilidade, morte, alterações físicas, morfológicas e funcionais, entre outros (MATIAS, 2009).

De acordo com Rand, Wells e Mccarty (1995), os efeitos toxicológicos dependem da concentração e das propriedades da substância química à qual o organismo é exposto, bem como do tempo de exposição. Os testes de toxicidade podem ser realizados *in situ* ou em laboratório, causando efeitos agudos ou crônicos.

Toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda visam demonstrar a ocorrência de efeitos adversos em um curto espaço de tempo em relação ao ciclo de vida do organismo-teste, após a exposição, em diferentes diluições. A duração deste teste é variável, sendo normalmente de 24 a 96 horas para organismos aquáticos (MATIAS, 2009).

Os efeitos observados neste tipo de teste em organismos aquáticos são a letalidade ou a inibição do movimento. De acordo com a ABNT NBR 12713/2009, a imobilidade do organismo-teste é determinada através da incapacidade do mesmo em nadar na coluna d'água durante um período de até 15 segundos, após uma leve agitação do recipiente (ABNT NBR 12713, 2009).

O resultado dos testes de toxicidade aguda normalmente é expresso através da concentração letal média (CL₅₀) ou da concentração efetiva

mediana (CE_{50}) (COSTA et al. 2008; MATIAS, 2009). A CL_{50} refere-se à concentração real da amostra que causa a morte de 50% dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio; enquanto a CE_{50} refere-se à concentração real da amostra que causa efeito agudo a 50% dos organismos no tempo de exposição, nas condições de ensaio, sendo estes normalmente caracterizados pela imobilidade ou mortalidade (MATIAS, 2009).

Toxicidade crônica

Os testes de toxicidade crônica são testes de longa duração, onde a exposição é contínua por um período longo de tempo, abrangendo todo ou parte do ciclo de vida do organismo-teste. Os principais parâmetros observados neste tipo de teste são os efeitos crônicos subletais, como alterações nas atividades respiratórias, cardíacas, bioquímicas, no desenvolvimento morfológico, nas funções biológicas, na reprodução e no crescimento, que não causam necessariamente a morte do organismo (AZEVEDO e CHASIN, 2003). Geralmente, a avaliação dos testes de toxicidade crônica é feita através da concentração de efeito observado (CEO) que é a menor concentração que causa efeito sobre os organismos, e a concentração de efeito tóxico não observado (CENO) que é a maior concentração do produto que não causa efeito sobre os organismos (MATIAS, 2009; COSTA et al. 2008).

Para a realização destes testes devem ser utilizados, no mínimo, dois níveis de doses ou concentração, e a via de administração destas deve estar de acordo com a via de exposição mais provável (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

No Brasil, os testes crônicos são contemplados na Resolução CONAMA nº357 (BRASIL, 2005) e exigidos para realização do enquadramento dos corpos hídricos. Segundo esta resolução, efeito toxicológico crônico é definido como os efeitos deletérios aos organismos vivos causados por agentes físicos ou químicos que afetam uma ou várias funções biológicas dos organismos, como a reprodução, o crescimento e o comportamento, em um período de exposição que pode abranger parte ou a totalidade de seu ciclo de vida.

Bioindicadores fotossintéticos em algas verdes

A fotossíntese é fundamental para o metabolismo dos organismos fotossintéticos acontecendo dentro dos cloroplastos onde

ocorre a conversão da energia luminosa em energia química. Segundo Avenson et al. (2005) e Merchant e Sawaya (2005), a luz branca é absorvida pelos pigmentos das antenas clorofilianas do fotossistema II (FS II) e I (FS I) a fim de garantir o transporte de elétrons a partir da água, doador de elétrons primário, até a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), acceptor final de elétrons, através do FS II, citocromo *b6/f* e FS I.

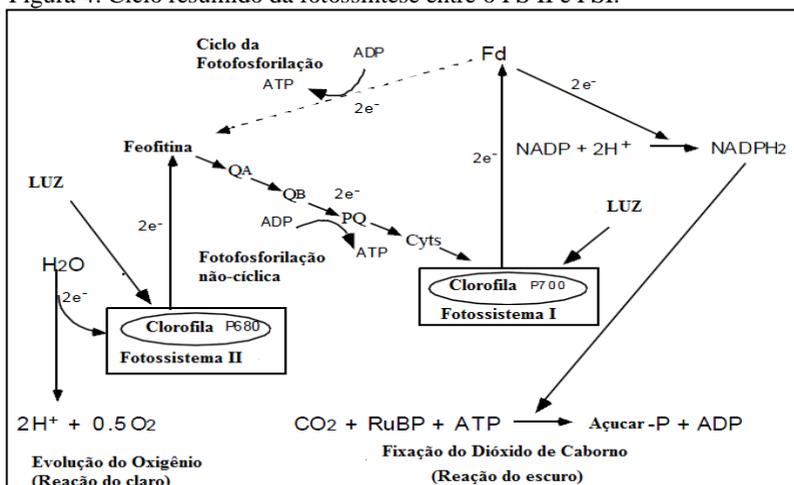
Os pigmentos, as proteínas e outras substâncias químicas envolvidas na reação da fotossíntese estão localizados nos cloroplastos. Em condições normais durante a fase fotoquímica, sem a interferência de inibidores fotossintéticos, a energia luminosa capturada pelos pigmentos (clorofila e carotenoides) é transferida para um “centro de reação” especial (P680), gerando um elétron excitado (AVENSON et al. 2005). Segundo Sing et al. (2008), o elétron do FS II é transferido para uma molécula de quinona localizada na membrana tilacoide do cloroplasto. A quinona A (QA) transfere o elétron para outra molécula de plastoquinona (PQ), que se reduz a plastoquinol, chegando no citocromo *b6 f*, em seguida, até a plastocianina (PC), localizadas na mesma proteína.

A captura de dois prótons a partir do estroma é também requerida para a formação do plastoquinol. A difusão do plastoquinol ocorre através da camada lipídica da membrana tilacoideal ao complexo citocromo *b6 f*, onde dois elétrons são transferidos ao complexo proteico do FS I e dois prótons são liberados ao espaço intratilacoide (SAMPAIO et al. 2012). Consequentemente, a transferência de elétrons da molécula de água ao *b6 f* está associada com a geração de um gradiente de prótons através da membrana, devido a uma diferença de potencial eletroquímico, resultante da oxidação da água pelo FS II no lado do lúmen da membrana tilacoide e a ciclo redução-oxidação da plastoquinona (ANDREIADIS et al. 2011).

A captura de prótons envolvida na redução de NADP⁺ no estroma também contribui para a criação de uma diferença de potencial transmembrana que pode ser usada para guiar a síntese de ATP, através do fator acoplamento. A ferredoxina transfere elétrons para o NADP⁺ e a reação é catalisada pela redutase de ferredoxina-NADP⁺, uma flavoproteína solúvel, com um grupo de flavina adenina dinucleotídeo protético (FAD). O FAD oxidado aceita dois elétrons e dois prótons a partir de duas moléculas de ferredoxina reduzida para formar FADH₂, e essa coenzima transfere um hidreto para NADP⁺ para reduzi-lo a NADPH (ANDREIADIS et al. 2011).

A Figura 4 mostra de forma resumida os processos citados acima sobre o funcionamento do FS II e FS I durante o processo de fotossíntese.

Figura 4: Ciclo resumido da fotossíntese entre o FS II e FS I.



Fonte: Adaptado de Manual de instruções. Qubit System (Canadá).

Existem diferentes metodologias para quantificação do processo de fotossíntese, mas vem se destacando entre elas um grupo de metodologias que permite estudar detalhes da fotossíntese sem destruir nenhum tecido fotossintético, baseado na quantificação da emissão da fluorescência da clorofila *a* (Chl *a*) (HOLUB et al. 2007).

A fluorescência da Chl *a* pode ser considerada como uma investigação intrínseca do sistema de fotossíntese e da intensidade da fluorescência, como medida direta das atividades do FS II.

Existem diferentes metodologias para a avaliação da cinética da fluorescência. Os fluorímetros são baseados em abordagens diferentes para medir a variação da fluorescência da Chl *a* (ROTTGERS 2007). Destaca-se o uso da fluorimetria direta, como é o caso do analisador de eficiência da planta (PEA), na qual a fotoquímica da alga ou planta é saturada através de incidência de luz direta.

A avaliação da eficiência da emissão de fluorescência da Chl *a*, vem sendo utilizada em diferentes estudos que analisaram os efeitos da NP CuO em algas (PERREAULT et al. 2012) e tem se mostrado uma importante ferramenta de avaliação devido à importância das algas na cadeia trófica e no processo de captura de CO_2 .

Avaliação do Estresse Oxidativo

ROS são um processo natural que ocorre durante o metabolismo celular, que quando em concentrações normais, são responsáveis, por exemplo, pela defesa e desinibição celular. No entanto, sob uma condição desfavorável, onde há um aumento de ROS, o sistema de defesa amplia seu arsenal enzimático e não enzimático para controlar os níveis intracelulares destas moléculas (VALKO et al. 2006).

A formação de ROS pode ser relacionada com agentes internos (endógena) ou externos (exógenas), estando às fontes endógenas relacionadas com o processo de respiração celular. Mecanismos fisiológicos, como fagocitose de corpos estranhos (infecção microbiana), metabolismo de xenobióticos, hidroxilação de prolina elisina e oxidação de xantina também estão relacionados à geração endógena de ROS (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; MARIANI, 2008).

Em situações em que a quantidade destas espécies reativas ultrapassa a capacidade de defesa antioxidante das células, ocorre o que se chama de estresse oxidativo (MATIAS, 1999). Esta condição de estresse pode ser resultado também de uma diminuição da capacidade de defesa celular antioxidante (COSTA e MORADAS-FERREIRA, 2001).

2.5.2 Organismos-testes

Existem inúmeros organismos aquáticos que podem ser utilizados como organismo-teste para avaliação da toxicidade. Com relação ao organismo escolhido, Rand, Wells e Mccarty (1995) destacam: a seletividade constante e elevada aos contaminantes, a disponibilidade e abundância do organismo desejado, a uniformidade e estabilidade genética nas populações, a representatividade de seu nível trófico, a ampla distribuição e importância comercial e a facilidade de cultivo e de adaptação às condições de laboratório. A fim de facilitar a interpretação dos resultados, Costa et al. (2008) salientam que devem ser utilizadas espécies cuja fisiologia, genética e comportamento sejam bem conhecidos.

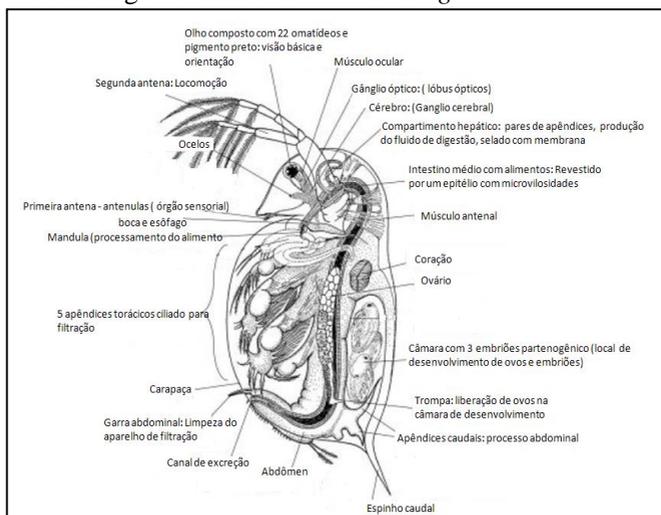
Recomenda-se que sejam utilizadas mais de uma espécie representativa do ecossistema aquático e de níveis tróficos diferentes para testes com a mesma substância, objetivando representar de forma mais clara e realista a toxicidade do xenobiótico testado (RAND, WELLS e MCCARTY, 1995; ARAGÃO e ARAÚJO, 2006).

Daphnia magna

A *D. magna* é um microcrustáceo de água doce, originária do hemisfério norte, com tamanho médio entre 5 a 6 mm (ALVES e SILVANO, 2006). Segundo Costa et al. (2008) estes microcrustáceos são bastante utilizados em testes de toxicidade pois existe um grande número de informação sobre as técnicas de cultivo, os requisitos de temperatura, luz e nutrientes e sobre sua resposta a muitas substâncias tóxicas e importância na cadeia trófica.

Segundo American Public Health Association (1998), a *D. magna* possui ciclo de vida relativamente curto, são facilmente cultivados em laboratório, são sensíveis a vários contaminantes do ambiente aquático e devido ao seu pequeno tamanho, necessitam de menores volumes de amostras e água de diluição do que os testes realizados com algas e peixes. A Figura 5 ilustra a morfologia da *D. magna*. A cabeça possui dois pares de antenas, sendo que seu segundo par de antenas serve para a locomoção. O primeiro par, de tamanho inferior, funciona como órgão sensorial. Essa espécie suporta águas com pH entre 6,5 e 9,5, sendo pH ótimo entre 7,2 e 8,5 (CLARE, 2011).

Figura 5: Morfologia do microcrustáceo *D. magna*.



Fonte: traduzido de Rosenkranz (2010)

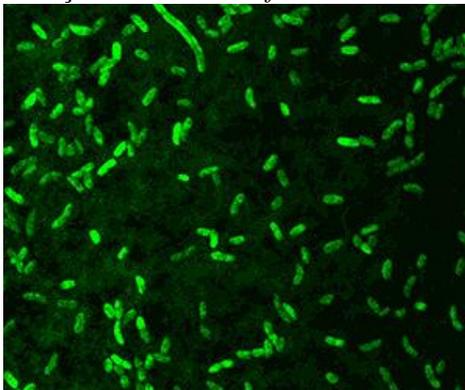
A principal fonte de alimentação é através da filtração de algas unicelulares do meio ambiente (KNIE e LOPES, 2004). Em condições

ambientais favoráveis esses microcrustáceos reproduzem-se por partenogênese, originando apenas fêmeas (ALVES e SILVANO, 2006), ou seja, são gerados filhotes idênticos aos originais (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006). Quando ocorrem condições ambientais desfavoráveis, como baixas temperaturas ou grande densidade e subsequente acumulação de produtos excretados, estas induzem o aparecimento de ovos sexuados, ou efípios (CIMAR, 2011). O seu ciclo de vida médio é de aproximadamente 40 dias à 25 °C e 56 dias a 20°C. Quando mantida em laboratório, esta espécie normalmente dá origem à primeira ninhada entre 6 e 10 dias, e produz ninhada de juvenis a cada 2 dias (CIMAR, 2011).

Aliivibrio fischeri

A bactéria bioluminescente *A. fischeri* (anteriormente denominada *Vibrio fischeri*) é uma proteobactéria, da ordem Vibrionales, da família Vibrionaceae e é gram-negativa, heterótrofa, podendo ser encontrada como simbiote de várias espécies (HARME Larmel, 2004), como patógenos de invertebrados e como saprófito de vida livre. São bactérias anaeróbias facultativas que emitem luz em condições ambientais favoráveis e necessitam de condições de oxigênio acima de 0,5 mg/L (KNIE e LOPES, 2004). A Figura 6 representa a bactéria luminescente *A. Fischeri*.

Figura 6: Representação da bactéria *A. fischeri*.



Fonte: <http://www.ou.edu/cas/botany-micro/faculty/dunn.html>

Segundo Mortimer et al. (2008) testes toxicológicos usando a bactéria *A. fischeri* são uma poderosa ferramenta para testes de toxicidades de NP. Atualmente, há várias normas padronizando os testes que utilizam a bactéria *A. fischeri* como organismo-teste. Dentre estas destacam-se as metodologias americanas: a ISO 11348-1 que se refere a testes de toxicidade utilizando bactérias recém cultivadas (ISO, 1998^a), a ISO 11348-2 que se refere a testes de toxicidade utilizando bactérias desidratadas (ISO, 1998^b), a ISO 11348-3 que se refere a testes de toxicidade utilizando bactérias liofilizadas (ISO, 1998^c); a norma alemã: DIN 38412-37 (DIN, 1999) sobre a determinação do efeito inibitório em bactérias, e a norma brasileira sobre a determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *vibrio fischeri*, ABNT 15411-1 (ABNT, 2006^a) ABNT 15411-2 (ABNT, 2006^b) e ABNT 15411-3 (ABNT, 2006^c).

Segundo Mortimer et al. (2008), a bioluminescência da *A. fischeri* é resultado de uma complexa cadeia de reações bioquímicas onde o mononucleótido de flavina é reduzido a um aldeído de cadeia longa de ácidos graxos e luciferase são as responsáveis pelas reações. A variação desta bioluminescência emitida foi descrita por Boettcher e Ruby (1990). Segundo os autores, a emissão ou diminuição de luminescência ocorre devido à ação de um grupo de genes denominado como *lux operon* e os testes de toxicidade com este organismo-teste baseiam-se na diminuição da bioluminescência causada pelo contato da substância teste com as bactérias. A diminuição da luminosidade emitida pelas bactérias ocorre devido à interferência das substâncias tóxicas sobre a respiração celular desses microorganismos (HOLLEBONE, FIELDHOUSE, LANDRIAULT, 2008).

Normalmente, a inibição de quaisquer das inúmeras enzimas envolvidas no processo causará a diminuição da luminescência. Do ponto de vista bioquímico, os sistemas bioluminescentes são considerados uma parte do sistema transportador de elétrons, onde a enzima luciferase catalisa a oxidação do FMNH₂ (mononucleotídeo flavina reduzido) e um aldeído, resultando na produção do mononucleótido de flavina (FMN), ácido e luz (BITTON; DUTKA, 1989). A inibição da bioluminescência é o resultado do processo total da célula, ou seja, é a expressão da resultante de uma série complexa de reações químicas produtoras de energia.

Ensaios laboratoriais utilizando a bactéria *A. fischeri* como organismo-teste apresentam algumas vantagens, já que podem ser realizados com pequeno volume de amostras e são relativamente fáceis

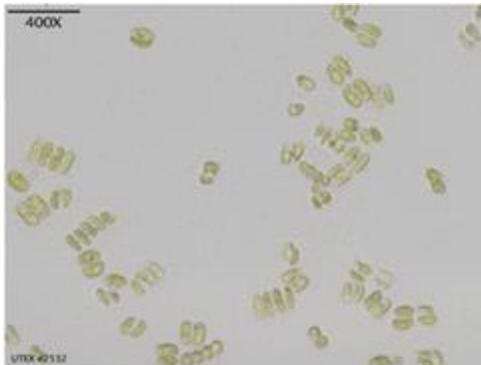
de executar. Além disso, a rapidez na obtenção dos resultados, após 30 minutos de exposição, permite uma resposta rápida em casos de acidentes ambientais.

Scenedesmus. subspicatus

S. subspicatus são algas verdes unicelulares de água doce, sendo classificadas como microalgas, que também podem formar colônias. As microalgas são muito utilizadas em testes de toxicidade devido a sua importância ambiental, sua posição na cadeia trófica e devido ao seu rápido crescimento em laboratório. Como produtores primários, as microalgas se situam na base da cadeia alimentar e as alterações ocorridas na dinâmica da comunidade poderão afetar os níveis superiores do ecossistema (LEWIS, 1995).

As culturas algáceas em laboratório são axênicas, mantidas em condições controladas de temperatura e luminosidade. Na Figura 7 é representado uma cultura celular de *S. subspicatus*.

Figura 7: Alga verde *S. subspicatus*.



Fonte: <http://web.biosci.utexas.edu/utex/algaeDetail.aspx?algaeID=5012>

Alguns indicadores são importantes para o teste de toxicidade com microalgas verdes. A morte celular é a última consequência de um efeito de contaminantes tóxicos. A integridade da membrana é um bom indicador da viabilidade celular e pode ser facilmente determinada pela penetração na célula de composto normalmente incapazes de atravessar a membrana, que cora apenas as células não viáveis, por exemplo.

As atividades de certas enzimas desempenham um papel importante no metabolismo da célula, também é utilizada como um indicador de viabilidade celular, como, por exemplo, a hidrólise de diacetato de fluoresceína (FDA) por esterases celulares. Esses indicadores mostraram boa sensibilidade aos efeitos dos NM (PETIT et al. 2012; HAN et al. 2011).

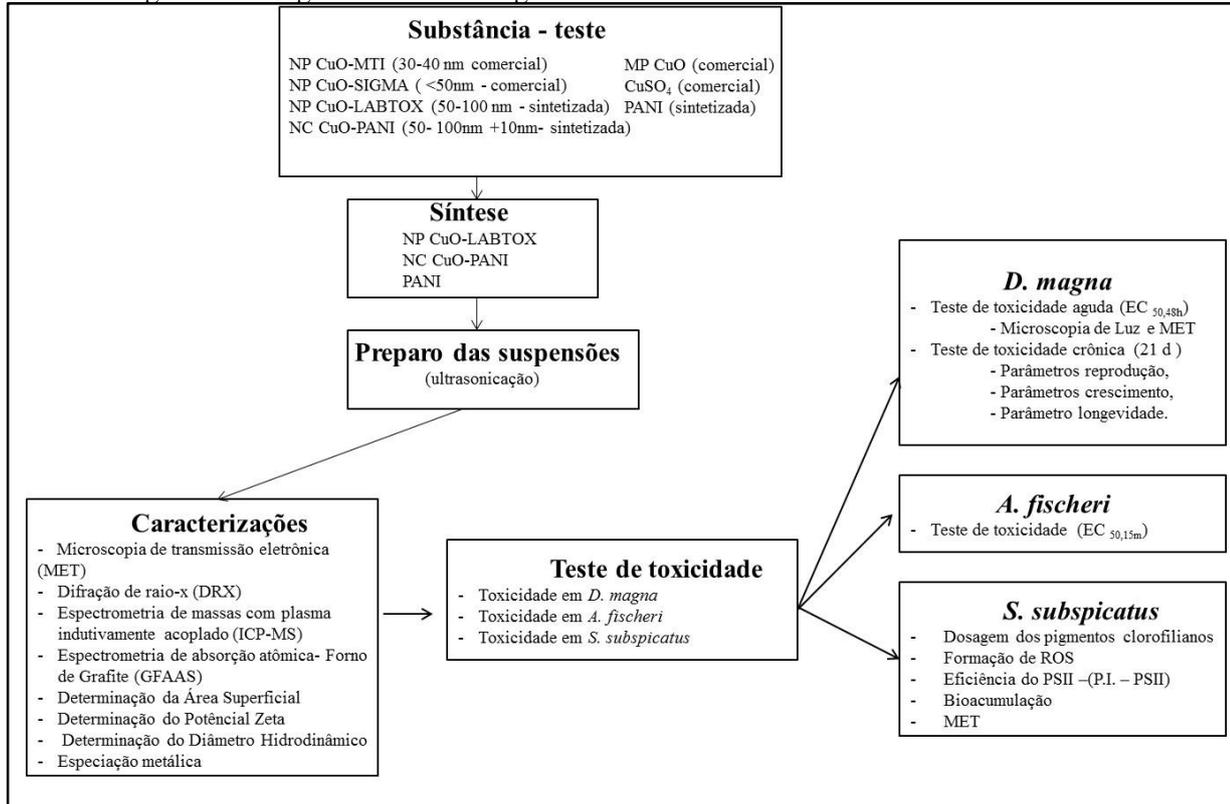
Outro indicador são as ROS que têm uma vida muito curta devido à sua elevada reatividade. ROS podem levar ao estresse oxidativo quando exceder as capacidades de defesa da célula. Eles podem reagir com vários componentes celulares (lipídios, proteínas, pigmentos, DNA) e induzir importantes danos a nível celulares (D'AUTRÉAUX e TOLEDANO, 2007).

Portanto, uma avaliação toxicológica em diferentes bioindicadores aquáticos é importante na compreensão do potencial toxicológico dos NM no meio ambiente, ajudando assim a tomada de decisão em relação a qual produto usará, a fim de garantir um meio ambiente mais sustentável.

CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS

A tese de doutorado aqui apresentada foi dividida em dois momentos: o primeiro desenvolvido no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) da Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC onde foram realizados dos testes de toxicidade aguda e crônica com *D. magna* e *A. fischeri* além das caracterizações nas suspensões de testes, e um segundo momento, realizados na Université du Québec à Montréal – UQAM, durante o estágio doutoral com bolsa de doutorado sanduíche, onde foram realizados os testes de toxicidade com as algas verdes *S. subspicatus* e a caracterização neste meio de teste. Para todos os testes, foram utilizadas 4 diferentes NP e 1 MP, sendo estas descritas no item 3.1. Na fig. 8 é apresentado o fluxograma da metodologia utilizada para a realização desta tese.

Figura 8: Fluxograma da metodologia



3.1 SUBSTÂNCIA-TESTE

A substância-teste avaliada e adquirida neste estudo foi o CuO, na forma de NP, NC e MP, que são compostos inorgânicos e insolúveis em água.

Foram analisados um total de quatro (4) NP CuO, sendo elas, duas (2) comerciais (NP CuO – MTI e NP CuO – Sigma) e duas (2) sintetizadas no LABTOX (NP CuO – LABTOX e NC CuO/PANI). Foram analisados também a MP CuO comercial (MP CuO – Bulk) e o polímero PANI utilizado como revestimento da NP CuO. Como controle positivo, a fim de obter a contribuição da toxicidade dos íons de cobre, foi utilizado o sulfato de cobre (CuSO₄).

Das NP comerciais, a NP CuO – MTI foi adquirida pela MTI Corporation (Richmond, CA, USA) e fornecidas pelo Département de Chimie - “Laboratoire de Toxicologie de l’Environnement” da Université du Québec à Montréal (UQAM) através do projeto de cooperação internacional aprovado pela CAPES, com pureza de 99,9 % e diâmetro entre 30 - 40 nm. A NP CuO – Sigma foi adquirida da Sigma Aldrich (Brasil) com pureza de 99,9 % e diâmetro inferior a 50 nm.

Das NP sintetizadas no LABTOX, a NP CuO – LABTOX tem diâmetro entre 50 - 100 nm. O NC CuO/PANI tem diâmetro entre 50-100nm + 10 nm de recobrimento com a PANI.

A MP utilizada neste estudo foi o Óxido de Cobre (II) P.A.ACS (Vetec-Química) com pureza de 99 %.

A PANI foi sintetizada no LABTOX e o CuSO₄ foi obtido da Synth (Brasil).

3.2 NP e NC de CuO - LABTOX

As NP de CuO (LABTOX) e NC CuO-PANI foram sintetizados na sala de manipulação do laboratório LABTOX pela professora visitante Prof^a Denice Schulz Vicentini. Para a síntese das NP de CuO foi utilizada a metodologia da decomposição térmica (Rossetto et al. 2014).

3.2.1 Síntese das NP CuO

As NP de CuO foram sintetizadas pelo método de decomposição térmica com algumas modificações (DAS et al. 2013). O precursor foi sintetizado com adição de uma solução 0,6 M de Na₂CO₃ em 100 mL de uma solução de 0,5 M de CuSO₄ e ultrassonicado por 1 h a 60 °C. O produto precipitado foi então centrifugado e lavado várias vezes com água

quente para remoção do material das impurezas. Depois, o precipitado foi seco na estufa a 70 °C por 12 h. Por fim, o produto seco foi calcinado a 600 °C por 2 h.

3.2.2 Síntese da PANI

A PANI foi utilizada como revestimento da NP CuO, formando o NC CuO/PANI. A PANI foi obtida a partir da reação de 100 mL de uma solução de HCl (15 mmol) com anilina (26,7 mmol). Em seguida, foi adicionada lentamente uma solução aquosa de persulfato de amônio ((NH₄)₂S₂O₈, 6,7 mmol). Após este procedimento, a reação foi agitada e mantida a temperatura controlada entre 0 e 3 °C, por 3 h. O sólido formado (sal de PANI) foi então filtrado e lavado com água e etanol, e seco em estufa a 50 °C por 48 h. O sal de PANI foi então desprotonado com a adição de uma solução 0,1 M NH₄OH e agitado por 24 h. Por fim, o produto foi lavado com água em excesso e seco a 60 °C por 24 h.

3.2.3 NC de CuO/PANI

O NC de CuO/PANI foi sintetizado *in situ* na presença do monômero da anilina a partir da dispersão 1,0 g de NP de CuO em 50 mL de água destilada contendo 40 mg de dodecilsulfato de sódio (SDS) e ultrasonicado por 20 min. Esta suspensão foi mantida sob agitação por 72 h à temperatura ambiente. Depois, o meio reacional foi mantido em um banho de gelo com temperatura entre 0 e 5 °C para então adicionar 0,5 mL de anilina e 0,5 mL de solução de HCl 1 M. A razão entre as NP de CuO e anilina foi de 1,0:0,3 (m/m). Em seguida, foi adicionado o agente oxidante (NH₄)₂S₂O₈ (0,114 g em 5 mL de H₂O) para iniciar a polimerização. O meio reacional foi mantido sob agitação e banho de gelo por 2 h. Depois, o produto foi lavado por filtração com água e etanol para obter o NC CuO/PANI *core-shell*. O NC foi seco em estufa 60 °C por 24 h (Yin et al. 2012). Na última etapa o CuO/PANI foi desprotonado com adição de 50 mL de uma solução 0,1 M NH₄OH e agitado por 24 h. Finalmente, o NC CuO/PANI foi seco em estufa 60 °C por 24 h.

3.3 PREPARO DAS SUSPENSÕES-TESTES

Para o início dos estudos fez-se necessário o preparo das suspensões com cada uma das substâncias-testes a fim de avaliar os possíveis efeitos deletérios sobre organismos aquáticos testados. Trabalhou-se com suspensões uma vez que o CuO é um composto insolúvel no forma de nanopartícula e micropartícula.

O método de preparo para a obtenção das suspensões de NP tem sido objeto de estudo, porém não há um procedimento padrão para o seu preparo. A principal metodologia utilizada é com o processo de ultrassonicação, realizado através de uma sonda ultrassônica (ultrassonicador), que tem como objetivo romper os possíveis aglomerados de NP formados quando as mesmas são adicionadas ao diluente e manter as partículas em suspensão. O preparo das suspensões-testes seguiu, em linhas gerais, a metodologia utilizada por Heinlaan et al., (2008) e com algumas adaptações.

O preparo da suspensão foi realizado na unidade de preparação e manipulação de amostra do LABTOX e do “Laboratoire de Toxicologie Environnementale” da Université du Québec à Montréal (UQAM). A suspensão foi preparada a uma concentração de 1 g/L, pesando 1 g da amostra e diluindo em 10 mL de água ultrapura (UP) ($\sigma = 18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). A suspensão foi colocada em erlenmeyer de 50 mL em banho de gelo e colocada sobre um agitador magnético e sonicada por 30 minutos com uma sonda ultrassônica do ultrassonicador. O ultrassonicador (Unique – 100W) foi utilizado na potência máxima de 99%. Após este processo, o volume da suspensão final foi aferido até completar 1L com UP. Antes e durante as realizações das avaliações toxicológicas e caracterizações tomou-se o cuidado de homogeneizar a suspensão-teste.

Para MP CuO, as suspensões foram realizadas através do mesmo processo que as NP. Porém, não se utilizou o processo de ultrassonicação, pois o objetivo é avaliar a escala micrométrica desta formulação. As suspensões foram preparadas em temperatura ambiente.

Os parâmetros pH e salinidade foram acompanhados durante a realização desses procedimentos, a fim de observar se as características da suspensão-teste afetam os resultados dos testes de toxicidade.

3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES-TESTES

Existe um consenso crescente de que a caracterização das NP é parte essencial na avaliação da toxicidade. A adequada caracterização das suspensões de teste é importante para garantir que os resultados sejam reproduzíveis, e também fornecer a base para a compreensão de como as propriedades das NP poderão influenciar na determinação dos efeitos toxicológicos. As NP e MP de CuO foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Difração de raios-X (XRD), Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), Espectrometria de absorção atômica- Forno de Grafite (AAS-

GF), Área superficial (AS), Potencial zeta (Pz), Diâmetro hidrodinâmico (Dh) e especiação química.

3.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A caracterização das suspensões na escala nanométrica e micrométrica foi realizada através do MET (JEM-1011 MET – 100KV), do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC com o objetivo de verificar o tamanho dos aglomerados e forma após a adição do meio diluente.

Para a análise através do MET, as suspensões-testes (1 g L^{-1}) foram gotejadas sobre uma grade de carbono-Cu (300 meshes) e armazenadas em um dessecador à vácuo por 24 h para a secagem (metodologia padrão do LCME).

3.4.2 Difração de raios-X (DRX)

As análises de difração de raio-X (DRX) foram realizadas no Laboratório de Caracterização Microestrutural – Difractometria de Raios-X no Departamento de Engenharia de Materiais – UFSC. A análise foi realizada nos compostos em pó. Os difratogramas de raios-X foram medidos na escala angular $2\theta = 20^\circ - 70^\circ$, utilizando um difratômetro Philips, modelo X'Pert, equipado com um tubo de cobre ($\text{CuK } \alpha$, $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$). O tamanho de cristalito foi calculado com base nos alargamentos dos picos. O objetivo desta análise foi analisar a estrutura cristalina das amostras, através dos difratogramas – DRX fim de obter o tamanho dos cristalitos do CuO .

3.4.3 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A análise de ICP-MS (Perkin-Elmer, modelo Nexlon 300 D) foi utilizada a fim de quantificar os íons Cu total. As análises foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massa e Atômica do Departamento de Química – UFSC. As amostras foram preparadas de duas formas. Na primeira, as soluções com concentração de 125 mg L^{-1} foram acidificadas com HNO_3 e diluídas numa razão 1/200. As medidas de Cu total foram feitas em dois tempos, 0 h e 48 h, em água UP, meio ISO e M4 (*D. magna*) e NaCl 20% (*A. fischeri*). A segunda análise consiste em fazer a digestão da amostra com tratamento em HNO_3 , H_2O_2 e micro-ondas. Após diluição numa razão 1/200, o Cu total foi quantificado.

3.4.4 Espectrometria de absorção atômica - Forno de Grafite (GFAAS)

As análises por GFAAS foram realizadas no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental UFSC, com equipamento Varian SpectrAA 640Z e através do GFAAS (Varian SpectrAA 220Z) no “Laboratoire de Toxicologie Environnementale” da Université du Québec à Montréal (UQAM). Esta análise tem como objetivo quantificar a cinética de liberação de íons do CuO na forma de NP e MP durante um tempo de 21 dias do teste crônico com *D. magna* e 0 e 6 h de exposição para o teste de toxicidade aguda com a alga *S. subspicatus*. Foram analisadas as concentrações utilizadas para o teste de toxicidade crônica e concentrações do teste de toxicidade aguda com algas. A preparação das amostras foram realizada de duas formas: quantificação total de íons de cobre e quantificação dos íons de cobre disponíveis.

- *Quantificação dos íons de cobre totais*

A metodologia foi baseada no método EPA n° 3010A (USEPA, 2007) com algumas modificações: 150 mL das suspensões-testes de NP, NC e MP CuO (previamente agitada e acidificada pH < 2) foram transferidas para um béquer de teflon de 50 mL (triplicata). Após esta etapa, foram acrescentados 1,5 mL de HNO₃ concentrado em cada béquer. Os mesmos foram cobertos com um vidro de relógio e transferidos para uma chapa aquecedora entre 90 – 95° C, até evaporação (volume final de aproximadamente 5 mL da amostra). Após o resfriamento, foram adicionados 1,5 mL de HNO₃ concentrado e mais 1,0 mL de HCl (10mL/100mL da solução final) e o volume foi aferido ao volume inicial (50 mL em cada béquer da triplicata) com água UP deixando que o mesmo evapore até um volume de 25 mL.

Por fim, após o resfriamento, a amostra (extrato digerido) foi filtrada em papel filtro de 28 µm de porosidade e com o auxílio de um balão volumétrico, aferindo o volume para 50 mL com água UP. As amostras foram diluídas conforme a necessidade do equipamento durante a leitura.

- *Quantificação dos íons de cobre disponíveis*

A metodologia para a quantificação dos íons de cobre disponíveis foi baseada em Perreault et al. (2012), onde 150 mL das amostras de NP e MP foram centrifugadas (3000 rpm, 10min). O sobrenadante foi retirado cuidadosamente, filtrado em membrana de 20 µm de porosidade e

acidificado com HNO_3 concentrado antes da leitura. As amostras foram diluídas conforme a necessidade do equipamento durante a leitura.

3.4.5 Determinação da Área Superficial

A determinação da área superficial para as duas formas estudadas foi realizada no Laboratório de Materiais Elétricos (LaMatE) da UFSC com o auxílio do equipamento NOVA[®] Surface Area Analyzer (Quantachrome Instruments), e baseada na metodologia BET conforme proposto por Webb e Orr (1997).

As amostras em pó foram preparadas a 150°C , sob vácuo, durante 1 hora no próprio equipamento e submetidas a um ciclo contendo um total de 14 pontos (p/p^0), 7 de adsorção e 7 de dessorção através da injeção de nitrogênio líquido. A área superficial específica foi calculada pelo software do equipamento através da equação BET (Brunauer, Emmett e Teller).

3.4.6 Determinação do Potencial Zeta

A medida do Pz das suspensões foi realizada no Laboratório de Catálise Biomimétrica (LaCBio), no Departamento de Química – UFSC e “Laboratoire de Toxicologie Environnementale” da Université du Québec à Montréal (UQAM). A análise de Pz foi realizada com o equipamento Malvern Zetasizer (Nano ZS; ZEN 3600 model) para os meios diluentes ISO e M4 (*D. magna*) NaCl 2% (*A. fischeri*) e água UP e no equipamento Zeta Plus da BTC (BrookHaven Instruments Corporation) para os meio diluentes CHU (*S. subspicatus*), através do método de mobilidade eletroforética a fim de obter a estabilidade das suspensões nos tempos de teste nas concentração de 125 mg L^{-1} .

3.4.7 Determinação do Diâmetro Hidrodinâmico

O diâmetro hidrodinâmico foi determinado utilizando uma concentração de 125 mg L^{-1} em água UP, meio diluente ISO e M4 (*D. magna*) NaCl 20% (*A. fischeri*) e CHU (*S. subspicatus*). O método através da dispersão de luz dinâmica, com um calibrador de partículas Zetaplus (Brookhaven Instruments Corporation, EUA) e Malvern Zetasizer (Nano ZS; ZEN 3600 model) da Laboratoire de Toxicologie Environnementale da Université du Québec à Montréal (UQAM) e Laboratório de Catálise Biomimétrica (LaCBio), no Departamento de Química – UFSC respectivamente. O objetivo desta análise foi obter o diâmetro hidrodinâmico das suspensões nos tempos de teste.

3.4.8 Especiação metálica

A especiação metálica da NP, NC e MP CuO foi realizada em todos os meios diluente dos testes através de modelagem matemática. O software utilizado foi o Minteq 3.0.

3.5 PROCEDIMENTOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Os procedimentos necessários para os emblocamentos do microcrustáceo *D. magna* foram realizados no Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR) da UFSC. Os organismos utilizados para a observação foram aqueles expostos a CE₅₀ e ao controle para ambas as formulações de estudo. As *D. magnas* foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5%, em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,2 por 4 horas, à 4 °C. A fixação foi seguida por 2 lavagens em tampão fosfato, por 10 minutos em cada troca (OURIQUES et al. 2011).

Posteriormente, as amostras fixadas foram desidratadas em uma série de soluções aquosas de etanol em concentrações crescentes de 30% a 100%, com uma troca de 15 minutos em cada concentração, exceto o etanol 100%, que foi trocado 2 vezes. Em seguida, o material foi pré-infiltrado com uma mistura 1:1 de etanol 100% e historesina (Leica Historesin, Heidelberg, Alemanha), por 24 horas; logo após, as amostras foram infiltradas em historesina pura também por 24 horas.

A inclusão foi feita em histo-moldes, adicionando-se polimizador na mesma historesina, à temperatura ambiente, por 2-3 horas (ARNOLD et al. 1975). As amostras foram cortadas em um micrótomo manual de parafina modelo LEICA RM 2135, com navalha de tungstênio. Os cortes com espessuras de 5µm foram coletados com pinça e distendidos nas lâminas de vidro com gotas de água destilada e secos a 37 °C, em placa quente, por 30 minutos.

Os cortes foram corados com solução aquosa de Azul de toluidina (AT-O) 0,5 %, durante 30 segundos; em seguida, o material foi lavado em água destilada, seco ao ar e montado com bálsamo do Canadá (Gordon e McCandless 1973; McCully 1968). Os cortes foram observados e fotografados em microscópio de luz Olympus com sistema de captura de imagem, câmara digital (Olympus Q-Color-3C América ind.).

3.6 PROCEDIMENTOS PARA MICROSCOPIA DE TRANSMISSÃO

Os procedimentos necessários para os emblocamentos do microcrustáceo *D. magna* foram realizados no Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR), na UFSC e para o emblocamento das algas *S.*

subspicatus foram realizados no “Laboratoire de Toxicologie Environnementale” da Université du Québec à Montréal (UQAM). *D. magna* foram emblocadas após 48 horas de exposição à concentração CE₅₀ e as algas *S. subspicatus* foram emblocadas após 6 horas de exposição de 100 mg L⁻¹ e os organismos controle.

- *Avaliação da interação entre a NP, NC e MP CuO e microcrustáceo:*

Para a análise por MET, as amostras dos controles e tratamentos das *D. magna*, foram fixadas em uma solução de glutaraldeído 2,5%, sacarose 2,0 %, tamponadas com cacodilato 0.1 M (pH 7.2), pós fixadas em 1% tetróxido de ósmio por 4 horas e desidratadas em uma série de concentrações crescentes de acetona.

Posterior à desidratação, o material foi infiltrado em resina Spurr Em seguida as secções ultrafinas foram constratadas com acetato de uranila e citrato de chumbo.

As amostras foram analisadas e registradas através de fotos em um microscópio eletrônico de transmissão MET (JEM-1011 MET – 100KV), do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) - UFSC.

- *Avaliação da interação entre a NP, NC e MP CuO e a alga:*

As algas *S. subspicatus* expostas ao CuO, foram fixadas no “Laboratoire de Toxicologie Environnementale” da Université du Québec à Montréal (UQAM), a fim de avaliar as modificações morfológicas, devido a penetração da NP e MP de óxido de cobre pela parede celular. Para isso, foi feita a fixação e corte das algas. Assim, foi necessário fazer a recuperação das algas dos tratamentos e do controle, através de centrifugação. Após, estas foram fixadas com uma solução de glutaraldeído 2,5 % e em seguida lavadas com solução tampão cacodilato pH 7,2. Após a lavagem, as células foram coradas com tetróxido de ósmio 2% e deixadas sobre agitação por rotação por 2 horas. Em seguida, as células foram novamente lavadas com solução tampão fosfato pH 7,2 e desidratadas com um gradiente de solução de acetona. Após isso, inicia-se a infiltração da resina Epon que foi preparada com solvente orgânico acetona nas seguintes proporções: 1:1; 2:1; 3:1 (Epon: Acetona). As amostras foram secas à vácuo, por uma noite e cortadas em lâminas microscópicas. As imagens estão sendo capturadas em um microscópio eletrônico de transmissão MET (JEM-1011 MET – 100KV), do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) – UFSC.

3.7 AVALIAÇÃO DA BIOACUMULAÇÃO

A acumulação de NP, NC e MP CuO em *S. subspicatus* foi avaliada por espectrometria de absorção atômica com forno de grafite (GFAAS). A quantidade acumulada foi analisada após períodos de exposição de 6 horas, nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 mg/L de NP, NC e MP e organismo controle. Inicialmente, foi preparado um gradiente de sucrose (100, 80, 60,40 e 20%) a fim de remover após a centrifugação (1000rpm, 15 min) com auxílio de uma centrífuga 5810R (Eppendorf, Canada).

A cultura algacea exposta a NP CuO e MP CuO foi então filtrada à vácuo em filtros de celulose, previamente secos e pesados. Após o processo de filtração, os filtros permaneceram durante toda a noite em forno à 105 °C e o peso seco será obtido. Em seguida, inicia-se o processo de digestão da amostra, realizado em duas etapas: Na primeira etapa, são acrescentados 2 mL de ácido nítrico e 500 µL de peróxido de hidrogênio a cada uma das amostras. A digestão ocorre durante 8 h, em temperatura constante de 120 °C. Na segunda etapa, retira-se 1 mL de cada amostra e a fim de ocorrer a digestão a seco, onde evapora-se toda a amostra (1 mL). Ao final, 1 mL de ácido nítrico 1 % é adicionado e recupera-se a amostra. Em seguida, as amostras foram diluídas com água UP para 0,1 % de ácido nítrico e analisadas no GFAAS. As quantidades de Cu solúvel foram normalizadas em função do peso seco das algas.

3.8 TESTES ECOTOXICOLÓGICOS

As análises toxicológicas foram realizadas através de testes agudos e crônicos utilizando como organismo-teste o microcrustáceo de água doce *D. magna*, e testes de toxicidade aguda, utilizando a bactéria marinha luminescente *A. fischeri* e testes de toxicidade com algas verdes *S. subspicatus*. Os testes de toxicidade com *D. magna* e *A. fischeri* foram realizados na sala de manipulação do LABTOX. Os testes de toxicidade com a microalga *S. subspicatus* foram realizados durante o doutorado sanduíche na Universidade du Quebec à Montreal- Canadá.

3.8.1 Metodologia do cultivo para *D. magna*

A metodologia do cultivo do organismo-teste *D. magna* Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea) foi baseada na NBR 12.713 (ABNT, 2009), ISO 6341 (ISO, 1996) e DIN 38412-11 (DIN, 1989). A *D. magna* foi cultivada em béqueres de 2L no meio M4. Durante a preparação do M4, parâmetros tais, como pH e dureza, foram analisados. Tanto o meio M4 como o ISO permaneceram em aeração por no mínimo 12 horas antes da

sua utilização, a fim da estabilizações dos sais, saturação do oxigênio dissolvido e estabilização do pH.

Os organismos-testes foram cultivados em lotes de fêmeas, onde cada lote possui de 20 a 30 organismos, mantidos a temperatura controlada 20 ± 2 °C e com fotoperíodo de 16 horas de luminosidade. Foi realizada a manutenção dos lotes com troca do meio M4, retirada de filhotes e alimentação com a alga *S. subspicatus* (ISO 1989) 3 vezes por semana.

O alimento também foi cultivado no laboratório, onde a alga *S. subspicatus* foi inoculada em ambiente estéril CHU (CHU, 1942). A cultura, com densidade de aproximadamente 10^7 células/mL, foi então centrifugada (2000 g) e o precipitado de algas foi ressuspensão em M4 e mantido em estoque com temperatura controlada entre 4 até 10 °C por até 3 meses.

3.8.2 Controle da sensibilidade dos organismos

Os organismos foram testados semanalmente em relação a sua sensibilidade, a fim de assegurar que a qualidade dos mesmos esteja dentro dos padrões internacionais e garantir com isso a validação dos testes realizados, conforme a ISO 6341 (ISO, 1996). Para isso, foram realizados testes de toxicidade aguda com a substância de referência dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), sendo considerados lotes com neonatos aptos para testes de toxicidade aqueles que apresentem $CE_{50, 24h}$ entre 0,6 e 1,7 mg/L de $K_2Cr_2O_7$ (ISO, 1996).

3.8.3 Metodologia de teste agudo com *D. magna*

A metodologia do teste de toxicidade aguda utilizando *D. magna* como organismo-teste foi realizada de acordo com a NBR 12.713 (ABNT, 2009) e consiste na exposição de neonatos (2 até 26 horas de vida) da substância a ser testada, por um curto intervalo de tempo (48 horas), tendo como resultado a CE_{50} , observada em relação a capacidade natatória ou imobilização do organismo-teste.

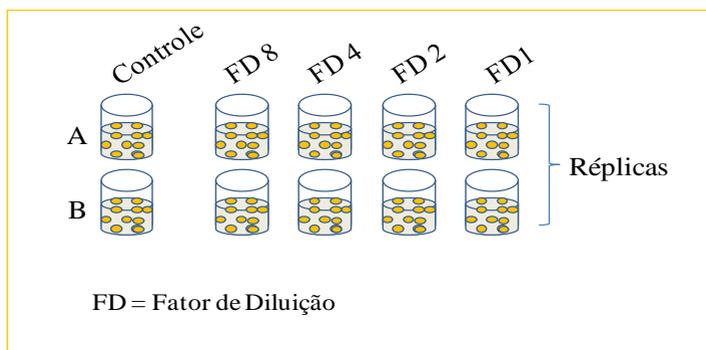
As amostras foram testadas com base na exposição de neonatos, no controle e em diferentes diluições das suspensões, por um período de 48 horas. Os testes foram realizados em duplicata, expondo um total de 20 organismos-testes por diluição (duas réplicas de 10 organismos), mantidos à temperatura a 20 a 22° °C, sem alimentação ou iluminação.

A primeira observação de imobilidade/mortalidade foi realizada após 24 horas do início do teste. Após o tempo de prova (48 horas) foi

então observado o número de indivíduos imóveis por suspensão (concentração) testada.

A partir destes dados, foi calculada a porcentagem de imobilidade por concentração das suspensões, definindo assim a CE_{50} e observado o fator de diluição (FD). O fator de diluição é representado pela diluição do teste que não causa imobilidade dos organismos. A Figura 9 apresenta um esquema do teste de toxicidade aguda com *D. magna*.

Figura 9: Esquema da montagem do teste de toxicidade aguda com *D. magna*.



Para todas as amostras, a concentração inicial foi de 1g L, ou seja, 100% da amostra. Foram testadas as diluições de 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 %, 3,12 %, 1,56 %, 0,78 % e 0,39 % e 0,19 % para NP e MP, 100 %, 50 %, 25 %, 12,5 %, 6,25 % para PANI, 6,25 %, 3,12 %, 1,56 %, 0,78 %, 0,39 %, 0,19 % e 0,09 % para $CuSO_4$. A suspensão-teste foi cuidadosamente homogeneizada e transferida para os béqueres de teste com auxílio de uma pipeta.

A CE_{50} foi calculada através de métodos estatísticos Probit Method (Weber, 1993) para dados paramétricos e Trimmed Sperman-Kaber Method (Hamilton, Russo e Thurston, 1977) para dados não paramétricos.

3.8.4 Metodologia do teste de toxicidade crônica com *D. magna*

O teste de toxicidade crônica foi baseado na ISO 10706 (ISO, 2000) e no protocolo da Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), o Guideline 211 (OECD, 2012).

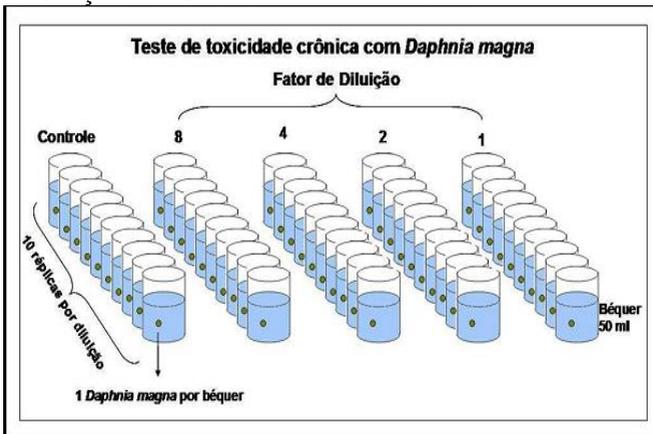
Para realização dos testes foram utilizados organismos neonatos com 2 a 26 horas de idade. Estes organismos foram expostos ao controle e as diluições-testes de 0,39 %, 0,195 %, 0,0975 % e 0,048 % para as NP,

e as diluições de 3,125 %, 1,562 %, 0,78 % e 0,39 % para a MP. A concentração inicial para as duas formulações foi de 1g L. As diluições testadas foram definidas a partir da concentração que não causou efeito no teste toxicidade agudo para ambas as formulações e seguindo uma razão de 2, objetivando a determinação da CEO e CENO.

Cada teste teve a duração de 21 dias e o meio diluente foi o M4 (meio de cultura do cultivo de *D. magna*). Para cada diluição foi composta por 10 réplicas, dispondo individualmente 10 organismos neonatos de *D. magna* em béqueres de 50 mL.

Os testes foram mantidos nas mesmas condições ambientais que os lotes de cultivo, ou seja, temperatura ambiente controlada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade difusa, com fotoperíodo de 16 horas, alimentado com a cultura alga *S. Subspicatus*, acompanhando diariamente. Durante o teste foi acompanhado e registrado a sobrevivência e o número de jovens gerados por fêmea. A manutenção dos testes foi realizada três vezes por semana, substituindo a solução-teste antiga por uma nova, a retirada dos possíveis filhotes e a manutenção da *D. magna* adulta. Este procedimento caracteriza o teste crônico como sendo um teste semi-estático. A Figura 10 apresenta um esquema do teste de toxicidade crônica utilizando *D. magna* como organismo-teste.

Figura 10: Ilustração do teste de toxicidade crônica.



Fonte: Fuzinatto, 2009.

Os parâmetros analisados no teste foram a longevidade, reprodução e crescimento. Para a determinação da longevidade foi observada a sobrevivência dos organismos-teste, ou seja, este parâmetro

foi expresso pelo número de organismos adultos sobreviventes nos 21 dias.

A reprodução foi avaliada através da contagem dos filhotes gerados por réplica no período de duração do teste. Para a avaliação da reprodução foi utilizada as seguintes equações:

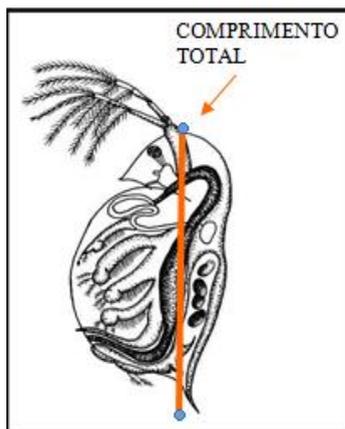
$$\text{Média de filhotes por réplica} = \frac{\text{número total de filhotes}}{\text{n}^{\circ} \text{ posturas}}$$

$$\text{Média de filhotes por diluição} = \frac{\text{somatório das médias por réplica}}{\text{n}^{\circ} \text{ réplicas}}$$

A *D. magna* foi avaliada através da variação do seu comprimento após 21 dias de teste, sendo considerado comprimento total do organismo a distância entre a cabeça até o final da carapaça da *D. Magna*, considerando o espinho apical.

A medição foi realizada no final do teste, com o auxílio de uma lupa de aumento de 40 vezes e uma lâmina com escala milimetrada de 1 cm. A Figura 11 apresenta a medição do crescimento total da *D. magna* após 21 dias.

Figura 11: *D.magna* após 21 dias.



Fonte: COSTA, 2010.

Para a interpretação dos dados obtidos com o controle foi utilizada a análise estatística recomendada pela EPA, EPA 821-R-02-013 (EPA, 2002). Para estes, foi utilizado o programa estatístico Statistic 7.0 através

da análise de ANOVA que define a diferença significativa entre grupos através da variabilidade entre eles. Este software basea-se no princípio da comparação entre os resultados obtidos e controle do teste ($p = 0,05$). A menor concentração em que a diferença significativa exceda este valor é considerada como CEO. Determinada a CEO, foi originada a CENO como sendo a concentração inferior a CEO.

3.8.5 Metodologia de teste agudo com a bactéria bioluminescente *A. fischeri* - Sistema Microtox

O teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha luminescente *A. fischeri* foi realizado a partir da metodologia desenvolvida para o equipamento denominado Microtox® 500, um luminômetro que baseia-se na medição da luminescência das bactérias. Este equipamento é capaz de medir e registrar a quantidade de luz emitida pelas bactérias através da metodologia proposta pela ISO 11348-3 (1998^c).

As bactérias foram expostas a uma gama de concentrações das suspensões testadas. A concentração para NP foi de 2g L e para a MP foi de 4g L. A redução na intensidade da luz emitida a partir de bactérias foram medida juntamente com as soluções padrão e amostras de controle. A mudança na saída de luz e a concentração da substância tóxica produzem uma relação dose/resposta e os resultados foram obtidos através da $CE_{50, 15min}$.

Os testes de toxicidade foram realizados em temperatura controlada pelo equipamento Microtox, que mantém a série de diluições do teste em 15 ± 1 °C e o reagente bacteriano a 3 °C. A medição da intensidade luminosa emitida pelas bactérias foi realizada em 2 momentos: antes de a bactéria entrar em contato com a suspensão a ser testada e 15 min após o contato da bactéria. As diluições utilizadas foram 80 %, 50 %, 33,33 %, e 25 %, 16,67 %, 12,50 %, 8,33 % e 6,25 %.

Antes do início dos testes alguns cuidados estão sendo tomados em relação aos possíveis interferentes, tais como: pH, salinidade e turbidez. Inicia-se o teste de sensibilidade com a finalidade de validar o lote de bactérias utilizado. A substância de referência usada para este teste foi o sulfato de zinco heptahidratado, na concentração de 100 mg L, esperando que o valor da $CE_{50, 15min}$ para esta substância seja entre 3-10 mg L.

Com os resultados do teste foram determinados através da $CE_{50, 15min}$, que corresponde à concentração efetiva que causa a inibição de 50 % da luminescência em 15 minutos. Os cálculos foram realizados pelo software do equipamento Microtox.

Devido à necessidade de adição de soluções para a realização do teste é impossível a verificação da toxicidade da amostra bruta, sendo que a maior concentração da amostra testada foi de 80 %. A Figura 12 ilustra a realização do teste de toxicidade aguda com a *A. fischeri* com o equipamento Microtox®.

Figura 12: Ilustração do teste de toxicidade aguda com *A. fischeri*.



3.9 METODOLOGIA DO CULTIVO PARA ALGA *S. subspicatus*

A microalga *S. subspicatus* foi obtida do UTEX The Culture Collection Center (Texas University, USA) foi cultivada em béqueres de 1 L em meio CHU, com temperatura controlada de 24 °C. O meio de cultura foi renovado 3 vezes por semana.

A cultura algacea foi utilizada para testes quando a mesma encontrava-se em fase de crescimento exponencial com densidade celular de 10^6 cell mL⁻¹. A densidade da cultura foi determinada através do multisizer Z3 (Beckman Coulter Inc., USA) no “Laboratoire de Toxicologie Environnementale” da Université du Québec à Montréal (UQAM).

3.10 ENSAIOS DE TOXICIDADE COM ALGAS *S. subspicatus*

Os ensaios de toxicidade com as algas foram realizados com tempo de exposição de 6 horas, nas concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 mg L⁻¹, nas mesmas condições do cultivo. Todos os ensaios foram realizados durante o estágio sanduíche na Université du Québec à Montréal (UQAM).

3.10.1 Determinação de ROS como indicador de estresse oxidativo

Para a determinação de ROS, foi utilizado o corante fluorescente diacetato de 2,7 - diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA) como

marcador, de acordo com Knauert e Knauer (2006). Esse marcador é um composto não-polar que ao entrar nas células das algas é transformado em sua forma não-fluorescente 2,7 diclorodihidrofluoresceína (H_2DCF). Quando a formação de ROS for induzida dentro da célula, pela NP e MP estudada, o H_2DCF é convertido em 2,7- diclorofluoresceína (DCF) com uma alta intensidade de fluorescência.

A leitura do teste foi feita após 6 horas de exposição a NP, NC e MP CuO adicionando o reagente marcador do parâmetro a ser analisado. Para uma alíquota de 2 mL de volume do tratamento, incluindo o controle, foram adicionados 5 μ L da solução estoque do marcador H_2DCFDA na concentração 10 mM, preparada em etanol e armazenada à $-20\text{ }^\circ\text{C}$ sobre proteção da luminosidade.

Após 30 minutos de adaptação no escuro, as algas foram expostas a uma luz azul de excitação a 485 nm, que foi utilizado para medir a emissão de fluorescência a 530 nm (SpectraMax M2). Os resultados foram normalizados em relação ao FDA.

3.10.2 Viabilidade Celular

Para a determinação da viabilidade celular foi analisado como parâmetro a atividade enzimática das esterases. As avaliações foram feitas após 6 horas de exposição das algas nas concentrações de 0,1, 1, 10 e 100 mg L^{-1} de NP, NC e MP CuO. Como controle foi utilizado apenas algas e o meio de cultura.

Tratamentos e controle foram avaliados em triplicatas. As células viáveis foram determinadas de acordo com Mayer et al. (1997), onde foram tratadas com 5 μ L de uma solução de 10 mM de diacetato de fluoresceína (FDA) em 2 mL de meios de solução.

Depois de 30 minutos de adaptação no escuro, as algas foram expostas luz à azul de excitação no comprimento de 485 nm que foi usada para medir a emissão de fluorescência a 530 nm (SpectraMax M2).

3.10.3 Dosagem dos pigmentos clorofilianos

A quantificação dos pigmentos clorofilianos, clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total (clorofila *a* + clorofila *b*) e carotenoides, foi realizada após 6 horas de exposição. Para cada réplica do teste, foi utilizado 1 mL da amostra, que foi transferida para tubos eppendorfs e centrifugada a 10000 rpm, por 10 minutos. Após a centrifugação, foi descartado o sobrenadante e adicionado 1 mL de metanol para a extração dos pigmentos.

As absorvâncias foram medidas nos comprimentos de onda de 470; 652,4; 665,2 e 750 nm, de acordo com Lichtenthaler (1987). As equações (5-8) foram utilizadas para calcular a clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenoides.

Clorofila Total ($\mu\text{g/mL}$):

$$[24,93 \times (A_{652,4} - A_{750}) + 1,44 \times (A_{665,2} - A_{750})] \times V_{\text{metanol}} / V_{\text{cultura}} \quad \text{Eq. (5)}$$

Clorofila *a* ($\mu\text{g/mL}$):

$$[16,72 \times (A_{665,2} - A_{750}) - 9,16 \times (A_{652,4} - A_{750})] \times V_{\text{metanol}} / V_{\text{cultura}} \quad \text{Eq. (6)}$$

Clorofila *b* ($\mu\text{g/mL}$):

$$[34,09 \times (A_{652,4} - A_{750}) - 15,28 \times (A_{665,2} - A_{750})] \times V_{\text{metanol}} / V_{\text{cultura}} \quad \text{Eq. (7)}$$

Carotenoides ($\mu\text{g/mL}$):

$$[1000 \times (A_{470} - A_{750}) - (1,63 \times \text{Clh } a - 104,96 \times \text{Clh } b) / 221] \times V_{\text{metanol}} / V_{\text{cultura}} \quad \text{Eq. (8)}$$

3.10.4 Avaliação do nível de Fluorescência Clorofiliana – Eficiência do PII (P.I. PSII)

A avaliação da fluorescência clorofiliana *a* foi mensurada no final do tempo de exposição (6 horas). Para essa avaliação, as algas do tratamento e do controle foram adaptadas à escuridão por 30 minutos antes da medida, para obter o equilíbrio das reações de óxido-redução do transporte de elétrons dos fotossistemas PS II e PS I.

Após a adaptação ao escuro, uma alíquota de $5\mu\text{g}$ de clorofila total de cada réplica foi filtrada em filtro de fibra de vidro 13mm (Millipore). As algas depositadas nesse filtro foram inseridas no aparelho para leitura.

Foram analisadas as concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 mg L^{-1} . Para o controle foi utilizado apenas o meio de cultura com as algas. Os aparelhos utilizados para a leitura foram um fluorômetro portátil (Plant Efficiency Analyzer, PEA, Hansatech® Ltda, UK) um fluorômetro de clorofila (MAXI- Imaging PAM, Walz, Germany).

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico são apresentados os resultados obtidos durante a tese de doutorado. Os resultados de caracterização e toxicidade aguda e crônica com *D.magna* e *A. fischeri* constam nos artigos Rossetto et al.(2014^a) – Apêndice 1 e Rossetto et al.(2014^b) –Apêndice 2.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NP, NC E MP CuO

4.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Os resultados aqui apresentados referem-se as NP e MP utilizando como diluente a água ultra pura e os meios de testes utilizados no teste de toxicidade (ISO, M4, CHU e NaCl 2%). Através da microscopia eletrônica de transmissão – MET (Quadro 2) pode-se observar que as NP e MP apresentam morfologia irregular e com formação de aglomerados.

Com auxílio das micrografias obtidas pelo MET (Quadro 2) foi possível observar a morfologia da NP, NC e MP em meio aquoso e sua tendência à aglomeração devido as forças iônicas originadas das cargas positivas e negativas dos compostos constituintes do meios diluentes. Com auxílio destas imagens foi possível observar e prever o estado de aglomeração das mesmas em diferentes meios aquosos, devido ao efeito de cargas superficiais.

O Pz (Tab. 2) mostra que a superfície da NP, NC e MP são carregadas por cátions (valor negativo do Pz) e provavelmente por cátions bivalentes (Cu^{+2}), que podem adsorver matéria orgânica e/ou outras moléculas orgânicas (Chen e Elimelech, 2006), afetando o equilíbrio entre forças de atração e repulsão que controlam o estado de aglomeração das partículas e a interação com o sistema biológico influenciando na toxicidade.

Em meios aquáticos, segundo Batley et al. (2013), as partículas tendem a se aglomerar, e a extensão da aglomeração é dependente de carga de superfície, forma e tamanho de partícula e pH do meio. Nota-se, que quanto maior o grau de complexidade do meio diluente, maior o estado de aglomeração. Esta observação foi também apresentada no estudo realizado por Zhu et al. (2008) que mostram que o tamanho das NP e seu estado de aglomeração estão relacionados com a complexidade do meio diluente.

Em relação aos resultados obtidos, observa-se que todos os meios diluentes utilizados favoreceram a aglomeração das NP, NC e MP.

Observa-se no Quadro 2, quando utilizou-se o meio diluente água ultra pura, a formação de aglomerados em todas as suspensões de NP, NC e MP analisadas. O tamanho das partículas variou entre 30-150 nm, sendo que as maiores NP foram a NP CuO-MTI. Foi possível confirmar o revestimento com polianilina do NC CuO-PANI e que este revestimento favoreceu o estado de aglomeração da NP CuO-LABTOX, e por fim, foi possível diferenciar o maior tamanho das MP e relação a NP e NC.

Analisando as imagens com o meio diluente ISO no Quadro 2 observou também a formação de aglomerados. Costa (2014) observou em seu estudo a formação de aglomerados com NP Cr₂O₃ quando utilizado o mesmo meio diluente. Rossetto (2014^a) observou a formação de aglomerados de NP CuO utilizando o meio ISO. Em todas as NP visualizadas, os aglomerados formados foram superiores a 100 nm. As NP apresentaram tamanho variados.

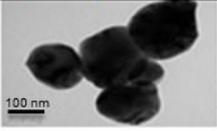
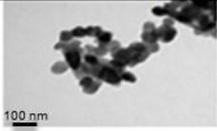
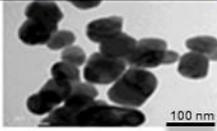
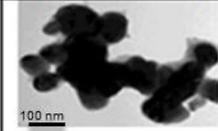
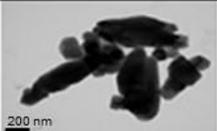
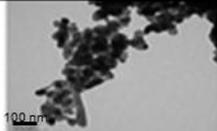
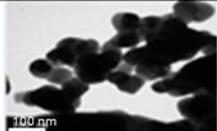
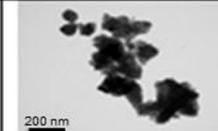
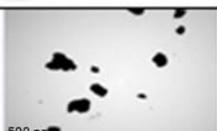
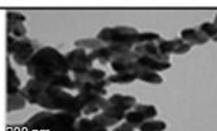
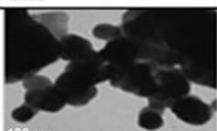
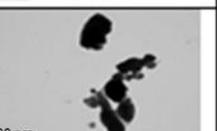
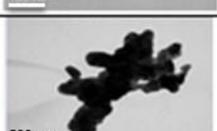
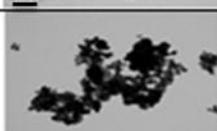
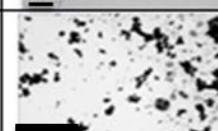
O meio M4 também observou a formação de aglomerados e tamanho variados das NP. O meio M4 possui mais compostos em relação ao ISO, ou seja, possuía menor força iônica, do que o meio M4, pois ele era composto apenas pelas 4 primeiras soluções do meio M4.

No meio CHU foi o que apresentou a formação de aglomerados mais densos e com tamanho superior a 1 µm para todas as NP, isso já era esperado pois este meio é o que possuía a maior força iônica entre todos os meios analisados.

A presença de sais monovalentes tais como Na⁺ e Cl⁻, constituintes do meio de teste da bactéria *A. fischeri*, aumenta a força iônica do meio conforme reportado por Baker et al. (2014). Em água salgada o aumento da salinidade, e, por conseguinte, a força iônica, reduz a negatividade da mobilidade electroforética das partículas incentivando assim a aglomeração (BATLEY et al. 2013). A aumento do estado de aglomeração devido a força iônica pode ser observado no quadro 2 para o meio NaCl 2%. Observa-se entre estas imagens a diferenciação entre tamanho nanométrico e micrométrico.

Portanto, com base na imagens obtidas, verifica-se que, para todos os meios, a NP CuO-SIGMA foi a que apresentou menor tamanho de partículas e maiores aglomerados formados. Os tamanhos das NP eram inferiores a 100 nm. A NP CuO-MTI apresentou maior tamanho de partículas em comparação com as outras NPs em todos os meios analisados. As NP CuO-LABTOX e NC CuO-PANI apresentaram tamanhos similares variando entre 50-100nm, e também foi possível confirmar o revestimento do NC CuO-PANI com polianilina. E por fim, foi possível confirmar a diferença entre escala nanométrica e micrométrica das NP e MP em todos os meios utilizados.

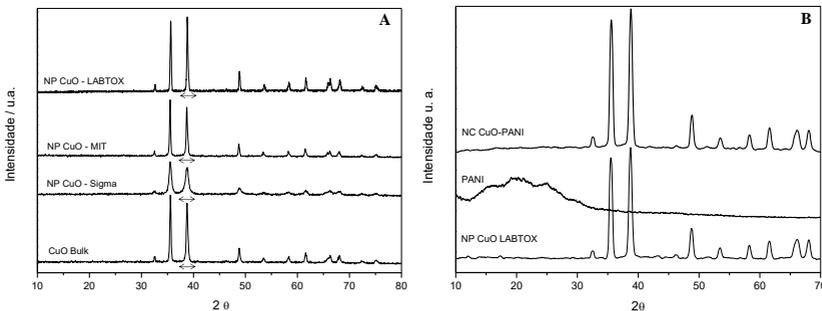
Quadro 2: Microscopia eletrônica de transmissão das NP em diferentes meios diluentes.

Meio	NP CuO-MTI	NP CuO-SIGMA	NP CuO-LABTOX	NC CuO-PANI	MP CuO
Água Ultrapura					
ISO					
M4					
CHU					
NaCl 2%					

4.1.2 Difração de Raio-X

Os difratogramas da figura 13a mostraram os picos de difrações das NP e MP CuO identificados em $2\theta = 32.50^\circ$ (110), 35.42° (002), 38.70° (111), 48.72° (202), 53.49° (020), 58.27° (202), 61.52° (113), 66.22° (311) e 68.12° (220). A partir dos picos foi identificada a estrutura de fase cristalina com sistema cristalino monoclínico característico do CuO na fase tenorita com geometria cúbica de fase centrada conforme os bancos de dados ICSD code (JCPDS No. 89-5898) como também reportado por Massarotti et al. (1998). A figura 13B mostra os difratogramas das NP de CuO, PANI e NC CuO-PANI. O difratograma da PANI mostrou um comportamento amorfo característico com picos em $2\theta = 14.98^\circ$, 19.65° e 24.50° (Du et al., 2004). Os picos amorfos da PANI não foram visualizados no difratograma do NC CuO-PANI devido a pequena quantidade de PANI em relação à NP CuO.

Figura 13: Difratogramas: A) NP CuO (Sigma, MIT e LABTOX) e MP CuO Bulk e B) da NP CuO LABTOX, PANI e NC CuO-PANI.



O diâmetro do cristalito foi calculado através da equação de Debye-Scherrer. A distância da base dos picos é inversamente proporcional ao diâmetro do cristalito, ou seja, quanto mais larga for a base do pico menor é o diâmetro cristalito. Uma seta de indicação da base do pico foi inserida abaixo do terceiro pico nos difratogramas da figura 13a. Com o diâmetro médio encontrado pode-se afirmar que cada NP possuem de dois a três cristalitos na sua formação, e a MP possui em média 50 cristalitos na sua composição. Segundo Vieira et al. (2009) o valor médio do diâmetro do cristalito encontrado para o CuO variou entre 22,4 e 30,4 nm, valores estes que estão próximos aos encontrados nesta tese. Com base nos difratogramas (Figura 13A) os valores médios dos

crystalitos foram calculados e os valores obtidos foram são apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Diâmetro dos cristalitos

Partículas	Diâmetro do cristalito (nm)
NP CuO-MTI	37,83 ± 3,95
NP CuO-SIGMA	19,83 ± 2,57
NP CuO-LABTOX	25,20 ± 2,43
NC CuO-PANI	25,20 ± 2,43
MP CuO	30,65 ± 3,23

4.1.3 Área superficial (AS)

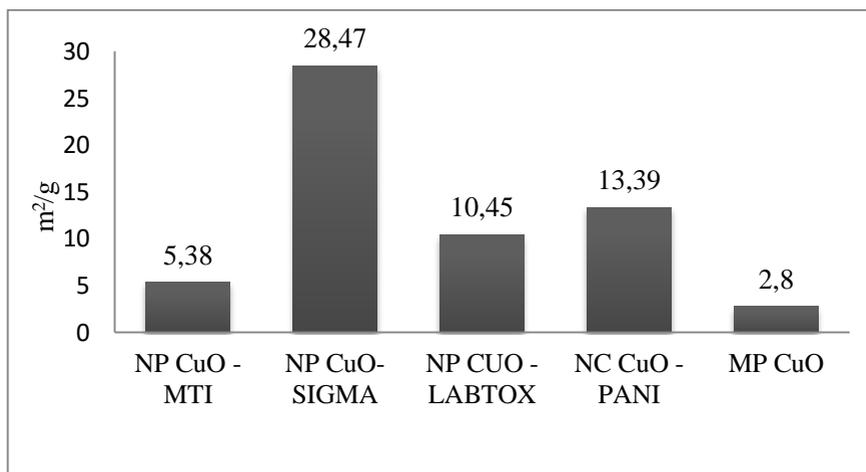
Os resultados apresentados na Figura 14 referem-se à área superficial das NP e MP de CuO e mostram que a ordem decrescente em relação ao tamanho da área superficial foi: NP CuO-SIGMA > NC CuO-PANI > NP CuO-LABTOX > NP CuO – MTI > MP CuO.

A NP CuO-SIGMA apresentou a maior área superficial (28,48 m²/g) em relação as demais NP, NC e MP, esta diferença já era esperada, pois, segundo o fabricante Sigma-Aldrich, a NP CuO-SIGMA possui tamanhos de NP inferiores a 50 nm, sendo esta então, as menores NP avaliada. Segundo o fabricante, a área superficial da NP é de 29 m²/g, validando assim a metodologia utilizada.

Observa-se que apesar da NC CuO-PANI aumentou em 10 nm o tamanho na NP CuO-LABTOX (NP sem revestimento) esta apresentou área superficial maior do que a NP sem revestimento (NP CuO-LABTOX), isso pode ser explicado devido ao fato do revestimento favorecer a formação de aglomerados (Quadro 2) e também devido ao fato da mesma possuir maior área de contato devido à polimerização da anilina na superfície da NP. Adicionalmente, o polímero pode apresentar elevada porosidade aumentando assim a superfície de contato com o gás durante a análise, aumentando assim a área superficial. Melegari et al. (ainda não publicado) mostra que também foi observado aumento da área superficial do NC ZnO em comparação a NP ZnO. Em um estudo publicado por Bondarenko et al. (2012), a área superficial específica da NP CuO foi de 25,5 m²/g, corroborando com os resultados obtidos da NP CuO-SIGMA e para a MP CuO. No entanto, a MP apesar de apresentar a menor área superficial, ou seja, menor área de interação com o meio apresentou área superficial superior à encontrada neste estudo.

A relação entre área superficial e toxicidade foi apresentada com os resultados de toxicidade.

Figura 14: Comparação da área superficial entre NP e MP.



4.1.4 Quantificação iônica

4.1.4.1 Espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS)

A análise por ICP-MS foi realizada a fim de quantificar a liberação de íons de Cu total nas suspensões de NP CuO-LABTOX e NC CuO-PANI nos meios de teste ISO (toxicidade aguda *D. magna*), meio M4 (toxicidade crônica *D. magna*) e NaCl 2% (solução utilizada para o ensaio com *A. fischeri*) nos tempos de exposição de 0 h e 48 h (Tabela 2). Cada valor de dado é uma média de três medidas \pm desvio padrão.

Os resultados indicaram que o revestimento com o polímero PANI impede significativamente ($p < 0,05$) a liberação de íons de Cu em cerca de 20% nos meios de testes utilizados quando comparado as NP sem revestimento. Estes resultados sugerem que o revestimento com a PANI regula a liberação de íons de Cu.

Tabela 2: Quantificação de íons de Cu total

Suspensões	Meio diluente	0 h (mg L ⁻¹)	48 h (mg L ⁻¹)
NP CuO-LABTOX	ISO	112,5 ± 11,88	94,81 ± 7,64
NC CuO-PANI		91,13 ± 2,76	78,42 ± 3,45
NP CuO-LABTOX	M4	88,86 ± 7,20	109,98 ± 4,24
NC CuO-PANI		69,20 ± 7,40	82,71 ± 4,18
NP CuO-LABTOX	NaCl 2%	82,74 ± 6,34	n/a
NC CuO-PANI		66,22 ± 2,32	n/a

A dissolução de íons está relacionada com o pH do meio. Segundo Wu (2012), em pH menor que 4,5 a NP libera maior concentração de íons de Cu. Com base no pH (Tabela 3) da NP CuO-LABTOX e NC CuO-PANI, pode-se afirmar que a maior liberação de íons em meio ISO se deu provavelmente devido ao menor pH em comparação com o meio M4 durante a preparação das amostras antes da leitura. No meio NaCl 2% a menor concentração se deu provavelmente devido a complexação no meio de teste antes da leitura.

Tabela 3: pH em diferentes meios diluentes

Meio diluente	NP CuO-LABTOX	NC CuO-PANI
ISO	7,12 ± 0,02	7,42 ± 0,03
M4	7,69 ± 0,05	7,84 ± 0,00
NaCl 2%	6,08 ± 0,01	6,39 ± 0,02

4.1.4.2 Cinética de liberação de íons durante 21 dias – D. magna Espectrometria de absorção atômica – forno de grafite

A seguir são apresentados os resultados da quantificação total de íons de Cu, não foi possível quantificar a parcela biodisponível das amostras devido a sensibilidade do equipamento.

Os resultados (Figura 15) mostram o comportamento irregular de liberação de íons durante o período avaliado. Em média, ocorreu apenas 10% da liberação de íons com a técnica utilizada para a abertura das amostras. Segundo Semich et al. (2014), a NP CuO libera maior

quantidade de íons quando comparado com a MP CuO, afirmação esta que corrobora com os resultados aqui obtidos.

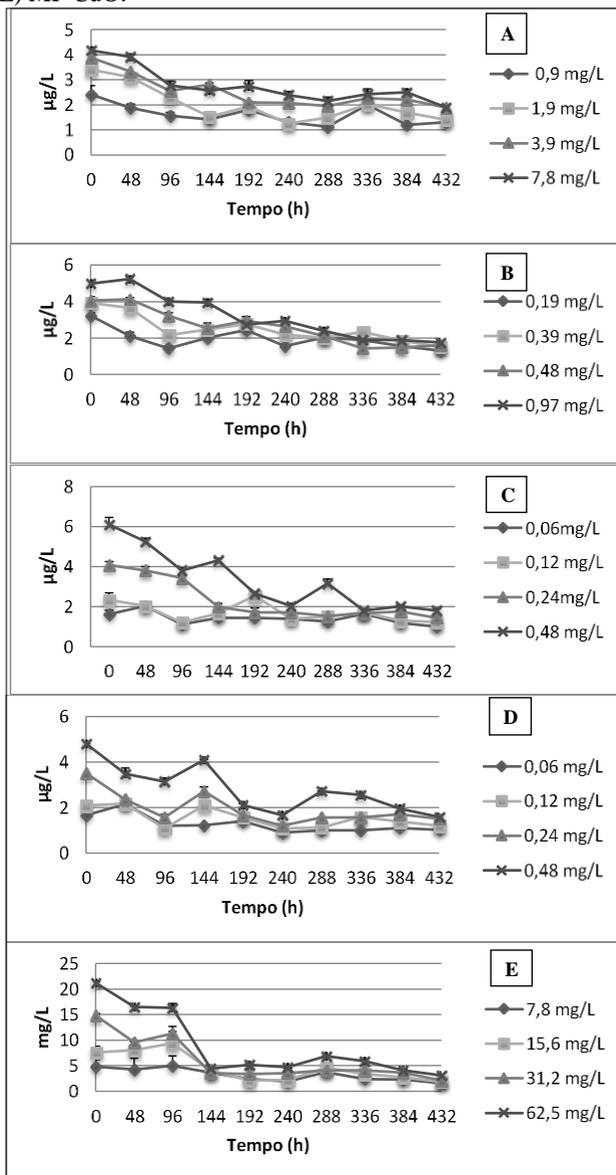
A maior quantificação de íons de Cu aconteceu no tempo zero da análise, sendo que a liberação tendeu a se estabilizar após 144 horas, ou seja, após 6 dias de teste. No tempo de 144 horas, a porcentagem liberada foi de 2,79% para NP CuO-MTI, 3,28% para NP CuO-SIGMA, 4,05% para NP CuO-LABTOX, 3,73% para NC CuO-PANI e 1,45% para MP CuO. Segundo Semich et al (2014) a liberação na NP ocorre mais rapidamente do que a do MP. Isso ocorre devido a maior área superficial das NP em relação a MP. Isso pode ser provado com esta tese pois em até 6 dias, a NP CuO liberou em média 3,63%, enquanto que a MP 1,45% e a mesma possui área superficial maior do que a MP. Além disso, segundo Bondarenko et al. (2012) a solubilidade da NP CuO é de 10% enquanto que para a MP é 0,1%. A diferença nas porcentagens obtidas nesta tese se dá ao fato de possuímos 4 diferentes NP com diferentes tamanhos e área superficial, e a MP apresentar maior área superficial do que a MP avaliado por este autor.

Segundo Perreault et al. (2012), que em seu estudo avaliou a toxicidade da NP CuO revestida por um polímero em algas verdes, o revestimento com o polímero altera a solubilidade da NP CuO, pois a fração solúvel de Cu da NP sem revestimento foi 70% maior do que a NP revestida em meio HSM. Os resultados desta tese corroboram com os resultados obtidos por Perreault et al. (2012), pois a NP CuO em 6 dias, liberou 4,05% da concentração inicial enquanto que a NC CuO-PANI liberou 3,73%, podendo, portanto observar que apesar de não haver diferença significativa no tempo zero, o revestimento inibiu em curto prazo a liberação de íons de Cu podendo prolongar o efeito biocida da NP CuO.

Ao analisar a cinética de liberação de íons de Cu observa-se que a NP que liberou maior concentração de íons de Cu nas primeiras 144 horas foi a NP CuO-LABTOX seguido pelo NC CuO-PANI, NP CuO-SIGMA, NP CuO-MTI e MP CuO. Os gráficos obtidos indicam que tanto a NP CuO-LABTOX como o NC CuO-PANI apresentou picos de liberação de íons, fato este que pode estar relacionado com os resultados obtidos no teste de toxicidade crônica com *D.magna*.

O pH não foi considerado um fator físico-químico que pudesse interferir na liberação dos íons de cobre, pois durante toda a realização do teste, o pH não sofreu alteração, sendo-se neutro.

Figura 15: Cinética de liberação de íons de Cu durante 21 dias em meio M4. (A) NP CuO-MTI; (B) NP CuO-SIGMA; (C) NP CuO-LABTOX; (D) NC CuO-PANI e (E) MP CuO.



4.1.4.2 Cinética de liberação de íons durante 6 horas – *S. Subspicatus* - Spectrometria de absorção atômica – forno de grafite

A cinética de liberação de íons de Cu na forma biodisponível foi realizada no meio de teste CHU utilizado para o teste de toxicidade com as algas verdes *S. Subspicatus* no tempo de 0h e 6h, tempo de duração do teste de toxicidade. Cada valor de dado é uma média de três medidas \pm desvio padrão. μ

Na Tabela 4 são apresentados os resultados da cinética de liberação de íons. Considerando a maior concentração de CuO testados (100mg/L), a NP CuO-LABTOX foi o NM que mais liberou íons em ambos os tempos analisados (5,63% em 0 hora e 7,16% em 6 horas) apresentando um aumento significativo ($p < 0,05$). Estes valores corroboram com o estudo de Bondarenko et al. (2012), onde foram demonstrados que apenas 10% de íons de Cu são solubilizados da NP CuO como mencionado anteriormente. Além disso, para esta concentração, a ordem de liberação de maior concentração de íons de Cu no tempo zero foi: NP CuO-LABTOX, NP CuO-SIGMA, NC CuO/PANI, NP CuO-MTI e MP CuO. No tempo zero é possível afirmar que a NP libera maior concentração de íons de Cu quando comparada com a MP. Para tempo de exposição de 6 horas, a ordem de liberação de íons foi: NP CuO/LABTOX, NC CuO/PANI, NP CuO/SIGMA, NP CuO/MTI e MP CuO, com isso também pode-se afirmar que na mesma concentração, a NP libera maior concentração de íons quando comprado com a MP.

Uma particularidade foi observada em relação aos resultados, no tempo zero a NP CuO-SIGMA liberou maior quantidade de íons de Cu do que o NC, já em 6 horas, o NC liberou maior quantidade de íons de Cu. Isso aconteceu provavelmente, porque no tempo zero, a NP apresentava-se menos aglomerada do que o NC, uma vez que seu tamanho em pó era < 50 nm e o NC entre 50-100nm, e já em 6 horas as NP trabalhavam em blocos de aglomerados diminuindo a liberação de íons em comparação ao NC como mostrado no Quadro 2, a NP CuO-SIGMA foi a que apresentou menor tamanho de partículas e maiores aglomerados formados.

O pH não foi considerado como um facilitador da dissolução de íons de cobre, pois todas as suspensões apresentaram pH neutro estando dentro do intervalo de 7,00-8,00.

	0,1 mg/L	1 mg/L	10 mg/L	100mg/L	0,1 mg/L	1 mg/L	10 mg/L	100mg/L
	0 horas				6 horas			
NP CuO-MTI	0,04±0,01	0,01±0,01	0,36±0,01	2,07±0,01	0,02±0,03	0,04±0,04	0,71±0,01	0,99±0,01
NP CuO-SIGMA	0,05±0,02	0,61±0,03	1,72±0,01	4,36±0,06	0,06±0,04	0,07±0,08	1,35±0,01	2,55±0,01
NP CuO-LABTOX	0,10±0,03	0,16±0,07	1,53±0,01	5,63±0,01	0,02±0,23	0,11±0,06	2,79±0,09	7,16±0,01
NC CuO-PANI	0,01±0,32	0,12±0,03	0,79±0,09	4,21±0,01	0,02±0,01	0,05±0,02	2,59±0,03	3,65±0,08
MP CuO	0,01±0,05	0,18±0,09	0,84±0,01	1,13±0,01	0,01±0,04	0,19±0,04	0,28±0,01	0,51±0,07

Tabela 4: Cinética de liberação de íons de Cu em meio CHU no tempo de 0 e 6 horas

4.1.5 Potencial zeta (Pz) e Diâmetro hidrodinâmico (Dh)

Os resultados aqui apresentados referem-se à cinética do Pz e Dh da NP e MP em água UP e nos meios diluentes utilizados nos testes de toxicidade (ISO, NaCl 2%, M4 e CHU). Assim eles foram mensurados nos tempos de exposição inicial e final dos referidos testes para avaliar o efeito do tempo sobre esses parâmetros. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 5 e 6. Os resultados foram expressos em média de três medidas \pm desvio padrão.

O Pz está diretamente relacionado com a estabilidade das suspensões, e com isso a interação das partículas com o meio devido à dupla camada. Quanto mais estável, menor a sedimentação das partículas. Segundo Jo et al. (2012), NP que possuem valores absolutos de Pz maior que 30 mV são consideradas mais estáveis. Além disso, sabe-se que o Pz pode ser influenciado pelo pH (BERG et al., 2009), concentração e tipo de íons presentes (força iônica) e a concentração de outras moléculas (DOORLEY e PAYNE, 2011) no meio dispersante.

Com base nos resultados apresentados (Tabela 5) foi possível observar que tanto a NP como MP estão carregadas positivamente e que a estabilidade das suspensões aumento consideravelmente com a mudança do meio diluente. A MP mostrou-se mais estável em todos os meios diluentes analisados.

Os resultados apresentados (Tabela 5) são referentes ao Pz de todas as suspensões em água ultra pura. Todas as NP apresentaram mais instáveis do que a MP. A NP CuO-SIGMA, apesar do menor tamanho das partículas entre as NP, foi a que apresentou melhor estabilidade. Observa-se que o revestimento com anilina do NC favoreceu a maior estabilidade do NC em comparação com a NP CuO-LABTOX.

Analisando os resultados apresentados de Pz em meio ISO nos tempos de exposição do teste agudo com *D. magna* (0 e 48h), observa-se uma diminuição significativa ($p < 0,05$) quando comparados a água UP para todas as NP, exceto para NP-MTI e NC que apesar do pequeno aumento do Pz, não apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao meio diluente água UP. Este incremento provavelmente aconteceu devido ao revestimento com PANI, pois a PANI (Pz $-17,03 \pm 3,13$) se apresentou menos instável quando analisada separadamente, podendo influenciar no Pz do NC. Em 48 h, verificou-se que as suspensões tendem a se tornarem mais estáveis, com o incremento dos valores de Pz. Este fato pode estar relacionado com o aumento do diâmetro das NP (Tabela 6), favorecendo a sedimentação de grandes aglomerados e mantendo em suspensão apenas partículas de menor diâmetro. Segundo Costa (2014) para a NP Cr_2O_3 , observou-se

variabilidade nos valores de Pz e Dh com a alteração do meio da suspensão. A NP Cr₂O₃ suspensa nos meios diluentes ISO, M4, NaCl 2% e RPMI demonstrou uma forte aglomeração, visualizada pela aumento do Dh em relação à mesma NP suspensa em água UP. Este mesmo fato foi observado nos resultados mostrados nas tabelas 5 e 6.

Observando os resultados do Pz em meio diluente NaCl 2%, verifica-se que todas as suspensões apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao meio diluente água UP. Os parâmetros Pz e Dh no meio diluente NaCl 2% foram apresentados apenas no tempos 0 h, pois o tempo de exposição (15 e 30 minutos) não foram considerados relevantes para que ocorressem modificações significativas desses parâmetros. Quando comparada a estabilidade deste meio com os outros meios diluentes testados, este apresentou-se o mais instável. Este fato pode estar relacionado com o aumento da força iônica devido à presença dos íons Na⁺ e Cl⁻. Carneiro da Cunha et al. (2011) reportaram que o aumento na concentração de NaCl do meio diminuiu o valor médio do Pz. Buffet et al. (2010) mostraram que, em água do mar, houve um aumento significativo dos diâmetros das NP e as suspensões tornaram-se mais instável devido à diminuição do Pz em comparação ao controle. Entre as NP, o NC apresentou menor Pz em relação as outras partículas. A MP mostrou-se mais estável neste meio. Na Tabela 6 é possível observar os Dh dos materiais testados neste meio. Nota-se que todas as amostras possuem diâmetros superior a 1 μ m, e a formação de aglomerados pode novamente ser relacionada com a força iônica do meio.

Observando os resultados de Pz do meio diluente M4 nos tempos de exposição 0 e 432 h (21 dias), tempos de exposição do teste de toxicidade crônica, verificou-se que todas as suspensões apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle água UP. Mais uma vez, a força iônica pareceu influenciar a estabilidade da suspensão, pois o meio M4 possui muitos íons presentes em sua composição (DOORLEY e PAYNE, 2011). Após 21 dias, todas as suspensões apresentaram um incremento significativo ($p < 0,05$) na estabilidade quando comparado com o tempo de 0 h. Isso pode ter ocorrido pelo fato de que grandes aglomerados tenham se sedimentado mantendo em suspensão apenas partículas de menor tamanho, favorecendo assim ao aumento da estabilidade das suspensões (Tabela 5).

Avaliando os resultados de Pz para o meio CHU nos tempos de 0 e 6 horas, observa-se que este meio apresentou a melhor estabilidade quando comparados os outros meios. Para este meio, também foi observado um incremento significativo ($p < 0,05$) na estabilidade das suspensões com o passar do tempo. Este fato pode estar relacionado

também com a sedimentação dos grandes aglomerados formados. Costa (2014) também observou aumento do Pz para suspensões expostas ao meio HSM utilizado para cultura com as algas verdes *C. reinhardtii* quando comparado com os meios ISO e M4.

Em relação ao diâmetro hidrodinâmico, em todos os meios, foi observado a formação de grandes aglomerados. Este fato está relacionado com a formação de forças de Van Der Waals que influencia as forças de atração e repulsão entre NP e compostos químicos presentes no meio diluente, favorecendo o estado de aglomeração.

Tabela 5: Comportamento dos valores de Pz dos materiais testados nos diferentes meios de cultivo e tempos de exposição (média ± desvio padrão; n=3; *p<0,05 com relação a água UP).

Amostras	Pz (mV)							
	Água UP	ISO		NaCl 2%	M4		CHU	
		0h	48h	0 h	0h	432h	0h	6h
NP CuO-MTI	-14,13±0,98	-13,20±2,76	-11,30±1,24	-11,06±0,98	-9,97±1,87	-9,10±1,11	-35,19±0,21	-36,52±3,21
NP CuO-SIGMA	-22,47±2,82	-5,87±0,23	-8,70±0,76	-3,28±0,10	-2,58±0,43	-13,16±1,09	-27,44±1,91	-33,10±1,23
NP CuO-LABTOX	-11,73±0,06	-8,00±1,54	-7,52±1,58	-3,66±0,75	-5,57±1,76	-9,87±1,30	-12,73±2,27	-19,91±0,76
NC CuO-PANI	-12,80±0,25	-14,60±2,76	-16,20±0,67	-3,40±0,24	-11,82±0,87	-14,21±1,07	-25,75±1,25	-27,31±1,01
MP CuO	-33,68±0,74	-23,30±1,89	-24,20±1,76	-10,70±1,46	-20,81±2,54	-29,52±1,12	-36,41±2,58	-37,53±0,23

Tabela 6: Comportamento do Dh dos materiais testados nos diferentes meios de cultivo e tempos de exposição (média ± desvio padrão; n=3; *p<0,05 com relação a água UP).

Amostras	Dh (nm)							
	Água UP	ISO		NaCl 2%	M4		CHU	
		0h	48h	0h	0h	432h	0h	6h
NP CuO-MTI	302,01±31,31	1564,71±54,45	2308,2±63,10	1581,36±67,62	1017,21±136,32	810,95±76,93	929,60±39,56	1215,32±59,88
NP CuO-SIGMA	458,25±14,95	2091,20±33,92	2115,1±73,81	1382,07±31,08	809,81±98,29	1138,74±42,90	1153,59±12,9	1254,38±61,91
NP CuO-LABTOX	358,56±25,30	2034,14±84,77	1731,3±52,22	1344,51±87,90	782,90±27,14	1468,60±54,11	743,37±39,10	851,60±14,45
NC CuO-PANI	401,11±36,23	1811,19±39,35	1673,8±78,99	1363,17±64,74	897,39±58,72	1632,39±102,32	795,32±61,40	987,82±54,97
MP CuO	1890,21±88,58	2397,78±87,12	3950,9±130,21	n/d	1651±230	1954,51±89,40	1568,01±146,54	n/d

Sabe-se que o Pz e liberação de íons podem ser influenciados pelo potencial Hidrogeniônico (pH) do meio (Chang et al 2012), sendo o pH o fator mais importante que influencia o Pz. Sabe-se que suspensões com pH entre 4 e 8 podem ser consideradas instáveis.

Quando analisados os resultados da Tabela 7, observa-se que houve um incremento significativo ($p < 0,05$) do pH de todas as NP e MP em todos os meios utilizados, exceto no meio NaCl 2% onde houve uma diminuição significativa quando comparado com a mesma suspensão em UP. A diminuição do pH está relacionada com o aumento da força iônica.

Tabela 7: pH das suspensões em diferentes meios diluentes

pH	UP	ISO	M4	NaCl 2%	CHU
NP CuO-MTI	6,78±0,01	7,56±0,12	7,65±0,09	6,51±0,23	7,56±0,01
NP CuO-SIGMA	6,54±0,01	7,24±0,35	7,83±0,01	6,47±0,00	7,26±0,02
NP CuO LABTOX	6,32±0,02	7,12±0,02	7,69±0,05	6,08±0,01	7,02±0,01
NC CuO-PANI	6,46±0,03	7,67±0,08	7,84 ± 0,0	6,39±0,02	7,43±0,02
MP CuO	6,98±0,01	8,23±0,05	8,42±0,01	6,75±0,08	7,87±0,07

4.1.6 Especificação metálica

Os resultados da especificação de íons de Cu (Tabela 8) mostram que as principais espécies formadas quando o CuO foi adicionado ao meio ISO, utilizado para o teste de toxicidade aguda com *D. magna*, foram íons de Cu^{+2} e os complexos iônicos $\text{Cu}_3(\text{OH})_4^{+2}$ e $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{+2}$. No meio M4, utilizado para teste de toxicidade crônica com *D. magna*, observou-se uma maior concentração de íons de Cu^{+2} , seguidos da formação dos complexos $\text{Cu}_3(\text{OH})_4^{+2}$ e $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{+2}$, carbonato de Cu ($\text{CuCO}_3(\text{aq})$). Estas espécies são normalmente encontradas em meios aquosos com concentrações elevadas de Cu II e pH=6, como descrito por Powell et al. (2007). Quando a especificação foi realizada no meio NaCl (2 %), meio utilizado para o teste de toxicidade com a bactéria bioluminescente observou-se uma maior quantidade de íons de Cu^{+2} em solução. No meio CHU, utilizado para teste com as algas verdes *S. subspicatus*, observou-se com a especificação química que a espécie em maior abundância no meio de teste, após a adição do CuO na forma de nanopartícula e micropartícula, foi Cu^{+2} seguidos da formação dos complexos CuNO_3^+ e $\text{CuSO}_4(\text{aq})$. Com base na especificação química nota-se que Cu^{+2} na forma de íons e de complexos iônicos estão presentes em maior quantidade em todos os meios usados nos testes de toxicidade, por isso, os resultados da

especiação estão diretamente relacionados com os resultados de toxicidade que serão apresentados na sessão 4.2. De acordo com Olivero-Verbel, Padilla-Bottet e De la Rosa (2007), a presença de nutrientes nas soluções pode aumentar a dissolução do Cu^{+2} devido à complexação entre o CuO e nutrientes, podendo produzir reações químicas que facilitam a solubilização de substâncias tóxicas a partir da matriz sólida em fase aquosa.

Tabela 8: Especificação química do CuO nos meios de teste de toxicidade

Teste de toxicidade	Meio diluente	Espécies químicas	% da concentração total
Teste agudo (<i>D. magna</i>)	ISO	Cu ²⁺	37,903
		CuOH ⁺	3,654
		Cu ₂ OH ³⁺	0,068
		Cu(OH) ₂ (aq)	0,024
		Cu ₂ (OH) ₂ ²⁺	22,72
		Cu ₃ (OH) ₄ ²⁺	21,392
		CuCl ⁺	0,491
		CuSO ₄ (aq)	1,457
		CuHCO ₃ ⁺	0,506
		CuCO ₃ (aq)	11,778
Teste crônico (<i>D. magna</i>)	M4	Cu ²⁺	4,717
		CuOH ⁺	2,875
		Cu(OH) ₂ (aq)	0,121
		Cu ₂ (OH) ₂ ²⁺	14,05
		Cu ₃ (OH) ₄ ²⁺	65,742
		CuCl ⁺	0,062
		CuSO ₄ (aq)	0,188
		CuHPO ₄ (aq)	0,018
		CuCO ₃ (aq)	11,624
		CuEDTA ⁻²	0,441
		CuHCO ₃ ^{+(aq)}	0,079
		CuH ₂ BO ₃ ⁺	0,028
		Cu(CO ₃) ₂ ²⁻	0,048
		Teste agudo (<i>A. fischeri</i>)	NaCl 2%
CuOH ⁺	2,769		
Cu ₂ OH ³⁺	0,135		
Cu ₂ (OH) ₂ ²⁺	16,77		
Cu ₃ (OH) ₄ ²⁺	10,714		
CuCl ⁺	14,053		
CuCl ₂ (aq)	0,526		
Teste toxicidade (<i>S. subspicatus</i>)	CHU	Cu ²⁺	92,725
		CuOH ⁺	0,278
		Cu ₂ OH ³⁺	0,013
		Cu ₂ (OH) ₂ ²⁺	0,123
		CuSO ₄ (aq)	2,212
		CuCl ⁺	0,145
		CuNO ₃ ⁺	4,472
		Cu(NO ₃) ₂ (aq)	0,014
CuH ₂ BO ₃ ⁺	0,018		

4.2 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

4.2.1 Toxicidade Aguda com *D. magna*

Os resultados apresentados a seguir referem-se a comparação de valores da $CE_{50,48 \text{ horas}}$ para *D. magna* (Tab. 9) expostas a NP, MP e controles positivos. Os resultados de toxicidade aguda indicaram que a NP é tóxica para *D. magna* e os valores de $CE_{50,48 \text{ horas}}$ seguiram a seguinte ordem de toxicidade: NP CuO-LABTOX > NC CuO-PANI > NP CuO-SIGMA > NP CuO-MTI > MP CuO. Todas as NP foram mais tóxicas do que a MP. O controle positivo com $CuSO_4$ apresentou alta toxicidade devido a presença de íons de Cu solubilizados. Foi realizado teste com a PANI (revestimento do NC) que não foi considerada como sendo causadora de toxicidade do NC. O pH durante a realização do teste não foi considerado causador de toxicidade (Tabela 7), pois estavam dentro da faixa proposta pela ABNT 12713/2009.

Tabela 9: Comparação da $CE_{50,48 \text{ horas}}$ da NP e MP em *D. magna*. Resultados expressos em média (n=3) \pm desvio padrão.

Suspensões-testes	Tamanho em pó (nm)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	$CE_{50,48 \text{ horas}}$ (mg/L).
NP CuO-MTI	30-40	2308,2	22,01 \pm 3,87
NP CuO-SIGMA	<50	2115,1	9,87 \pm 2,65
NP CuO- LABTOX	50-100	1731,3	0,32 \pm 0,02
NC CuO-PANI	50-100 + 10	1673,8	0,48 \pm 0,05
MP CuO	>1000	3950,9	223,6 \pm 12,34
PANI	n/d	n/d	99,21 \pm 5,76
$CuSO_4$	n/d	n/d	0,17 \pm 0,09

Os resultados deste estudo são muito próximos dos valores apresentados por Heinlaan et al. (2008), de $CE_{50,48 \text{ horas}}$ de 3,2 para a NP CuO, 164,8 mg L⁻¹ para a MP CuO e 0,17 mg L⁻¹ para $CuSO_4$. Blinova et al. (2010) também apresentaram valores de toxicidade próximos dos encontrados de 2,6 mg L⁻¹ para a NP CuO, 132 mg L⁻¹ para a MP CuO e 0,07 mg L⁻¹ para a $CuSO_4$.

As diferenças entre os valores de toxicidade encontrados e os estudos citados podem estar relacionadas com a diferença nas características específicas das NP CuO avaliadas e também na liberação de íons para meio do teste através de reações de oxidação devido à quantidade de OD no meio do teste.

Os resultados obtidos nesta tese indicam que os valores de CE_{50} estão diretamente relacionados com os dados obtidos na caracterização. Observa-se que apesar do menor tamanho da NP CuO-SIGMA (estado pó), a mesma não apresentou a maior toxicidade entre as NP testadas. Com base neste fato é possível afirmar que em meio líquido, a NP tende a aglomerar-se e trabalhar em forma de grandes aglomerados (Quadro 2) devido a ação de forças de atração e repulsão (forças de Wan Der Valls). Segundo o fabricante Sigma Aldrich, fornecedores da NP CuO-SIGMA, o tamanho médio caracterizado por eles foi de $NP < 50\text{nm}$. Este dado é confirmado nas imagens de TEM (Quadro 2), no entanto, a mesma teve a habilidade de formar maiores aglomerados de NP quando comparado com as demais NP, provavelmente devido a sua grande área superficial (Figura 14).

Observa-se que a NP CuO-LABTOX apresentou maior toxicidade aguda para *D. magna*, com base neste dado, é possível afirmar que o tamanho da NP em estado pó não é o principal causador de toxicidade para a NP CuO. A NP CuO-LABTOX tinha tamanho de partículas após a síntese variando entre 50-100 nm. Portanto, é possível afirmar que os principais fatores causadores de toxicidade são um conjunto de características tais como o estado de aglomeração (Quadro 2) em meio líquido, menor diâmetro hidrodinâmico após 48 horas (Tabela 6), menor pH (Tabela 7) e conseqüentemente maior liberação de íons após 48 horas (Tabela 2). Observa-se também que os valores de CE_{50} obtidos com as NP CuO e NC CuO estão muito próximos aos valores do controle positivo de CuSO_4 , mostrando que após a combinação das características citadas acima, os íons de Cu são os principais causadores de toxicidade.

Foi observado um comportamento dose-resposta semelhante entre os NP CuO-LABTOX e o NC CuO-PANI. Observou-se também que o revestimento com polímero não alterou de forma significativa os efeitos toxicológicos da NP CuO, que difere de outros estudos relatados na literatura. Perreault et al. (2012) relataram que a elevada toxicidade de NC CuO- PSBA foi devido ao aumento da capacidade das partículas revestidas com polímeros em penetrar em células quando comparado com NP CuO sem revestimento, e Saison et al. (2010) relataram que estes mesmos NC CuO-PSBA têm a capacidade de induzir fortes efeitos de toxicidade em algas verdes; no entanto, nem a NP CuO nem o

revestimento polimérico sozinhos foram capazes de produzir este efeito. Com base nos resultados apresentados, pode-se supor que, em curto prazo, PANI e sua propriedade redox poderá retardar a penetração deste NC em membranas biológicas, que são predominantemente apolares. Na avaliação toxicológica, observou-se que a PANI sozinha somente causou mortalidade na maior concentração testada (125 mg/L) provavelmente devido ao efeito da forte cor apresentada na amostra e pela grande quantidade de polímeros dispersos em solução, resultando na morte dos organismos através da inibição da locomoção da *D. magna*. Quando PANI foi usado como revestimento para as NP, o NC exibiu uma maior estabilidade do que a NP CuO-LABTOX e não alterou significativamente o pH da solução.

Os resultados mostraram também que a toxicidade não pode ser completamente relacionada com a capacidade que o revestimento tem em penetrar nas células, devido às suas afinidades químicas e biológicas, mas que pode estar relacionada com o tamanho das partículas e a liberação de íons. O revestimento facilitou o estado de aglomeração (Quadro 2) devido a maior área superficial do NC (Figura 14) e também aumentou em 10 nm o tamanho da NP CuO (Quadro 2). A Tabela 2 mostra que o NC funcionou como uma barreira física que impede a solubilização do núcleo da NP, reduzindo, assim, a liberação de íons de Cu em solução, mostrando mais uma vez que a causa da toxicidade é a soma dos fatores (estado de aglomeração, área superficial, liberação de íons, e afinidade biológica) e não apenas um fator isolado tal como o tamanho.

Microscopia de luz foi empregada antes de microscopia eletrônica, a fim de avaliar a interação das partículas com as *D. magna* expostas. Com isso teríamos uma compreensão geral e melhor dos órgãos ou tecidos, facilitando o reconhecimento e a compreensão daquilo que iríamos visualizar por microscopia eletrônica, que é uma técnica mais específica.

As micrografias de microscopia de luz (Figura 16) mostram a presença de ambos os tipos de partículas no intestino médio de *D. magna*, fato este que não foi possível observar em algas verdes *S. subspicatus* quando expostas às mesmas partículas. Estes dados serão apresentados a seguir. As imagens em corte transversal da *D. magna* após 48 horas de exposição à CE₅₀ mostram a presença de NP dentro do interior do intestino médio através de microscopia de luz e a presença de aglomerados de NP CuO (Figura 17A) por MET. A ingestão de NP, bem como o contato direto da *D. magna* com a NP (que têm uma maior área de superfície) pode potencializar os efeitos toxicológicos no diluente do teste.

O contato mais próximo das NP com a parede do intestino pode acelerar a indução de processos toxicológicos através da liberação de íons Cu dissolvidos diretamente no intestino médio de *D. magna* por meio da geração de ROS. Chan et al. (2012) reportam em seu estudo que a NP CuO pode gerar danos mitocondriais e conseqüentemente gerar ROS. Segundo Gomes et al. (2012), glândulas digestivas são suscetíveis a NP CuO em relação à geração de ROS e o tecido mais provável para ele se bioacumular.

Figura 16: Micrografias por microscopia de Luz. *D. magna* exposta a NP e MP CuO a CE 50,48 horas (A) *D. magna* exposta a NP CuO-MTI no intestino médio. Nota-se no canto direito superior apresenta e aglomerados de NP por MET; (B) Detalhe do intestino médio da *D. magna* exposta a NP CuO-MTI; (C) Detalhe da *D. magna* exposta a MP com a presença de células epiteliais e aglomerado de MP; (D) *D. magna* exposta a MP com a presença de MP no trato intestinal.

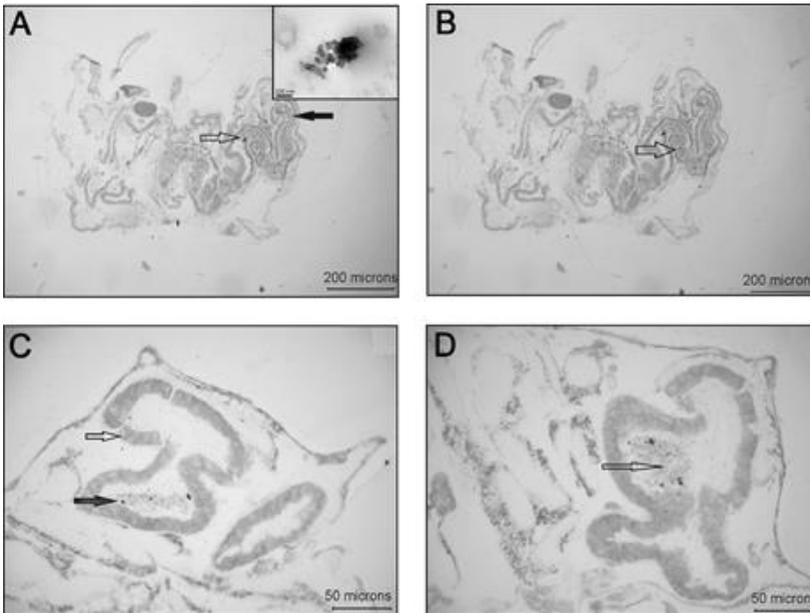
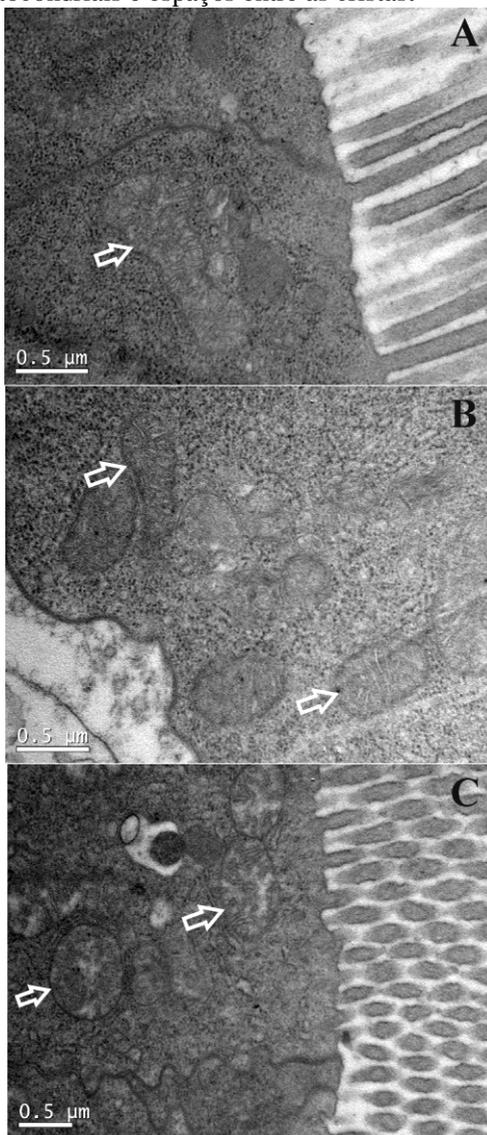


Figura 17: Micrografias de *D. magna* exposta a NP e MP CuO por microscopia de transmissão eletrônica. (A) organismo controle com mitocôndrias normais; (B) organismos exposto a MP CuO com a cristas levemente não organizadas e (C) organismos expostos a NP CuO-MTI com danos mitocondriais e espaços entre as cristas.



Em organismos expostos a NP (Figura 17), é possível observar grandes espaços dentro das mitocôndrias. O dano mitocondrial está diretamente relacionado com a geração de ROS e pode iniciar danos ao DNA que podem, portanto levar a apoptose celular.

Os resultados do controle com CuSO_4 , que é um sal altamente solúvel, confirmou a elevada toxicidade esperada para os íons de cobre, e esta alta toxicidade pode ser justificada pelo fato que os íons de Cu^{+2} podem competir com outros cátions existentes na solução do meio de teste e podendo aumentar a toxicidade.

Vários mecanismos podem contribuir para interações tóxicas de NP metálicas com sistemas celulares. Heinlaan et al. (2008) relataram a relação entre a toxicidade e a liberação de íons de Cu em *D. magna* e *V. fischeri* (*A. fischeri*). No entanto, Baek e An (2011), que estudou várias NP de óxidos metálicos (incluindo NP CuO), relataram que toxicidade relacionada com os íons metálicos dissolvidos era insignificante em *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, e *Streptococcus aureus*, indicando que a indução da toxicidade por NP de óxidos metálicos pode estar associado com as propriedades intrínsecas dos metais pesados. A toxicidade real da NP CuO até então não era totalmente conhecida; no entanto, em nosso estudo, verificamos que a toxicidade das NP CuO para *D. magna* em teste agudo não só é dependente da liberação de íons Cu, mas também sobre o estado de aglomeração e das propriedades específicas das NP CuO.

4.2.2 Toxicidade Aguda com *A. fischeri*

Os resultados referentes a toxicidade com *A. fischeri* após 15 minutos de exposição a NP, MP e controle positivo com CuSO_4 são apresentados na Tabela 10. A diferença entre os valores de $\text{CE}_{50, 15 \text{ min}}$ estão relacionados com as reduções dos processos metabólicos das bactérias expostas às suspensões-teste. A perda de viabilidade celular e alteração na dimensão entre as NP e as MP podem influenciar a sua toxicidade, porque estas partículas podem tornar-se menos disponível para organismos, uma vez que não se espera que as partículas com essas dimensões atravessem a membrana das células das bactérias.

Tabela 10: Comparação da $CE_{50, 15 \text{ min}}$ da NP e MP em *A. fischeri*. Resultados expressos em média ($n=3$) \pm desvio padrão.

Suspensões-teste	Tamanho em pó (nm)	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	$CE_{50, 15 \text{ min}}$ (mg/L)
NP CuO-MTI	30-40	1581,3	304,4 \pm 12,9
NP CuO-SIGMA	<50	1380,0	40,79 \pm 5,65
NP CuO-LABTOX	50-100	1344,5	7,79 \pm 1,87
NC CuO-PANI	50-100 + 10	1363,1	9,05 \pm 2,05
MP CuO	>1000	n/d	.>1000
PANI	n/d	n/d	n/d
CuSO ₄	n/d	n/d	6,77 \pm 0,09

Neste estudo, a NP CuO-LABTOX, apresentou-se mais tóxica entre as NP, seguida pela NC CuO-PANI, NP CuO-SIGMA e NP CuO-MTI. A maior toxicidade da NP CuO-LABTOX, esta, mais uma vez, relacionada com suas características específicas tais como menor estado de aglomeração pelo diâmetro hidrodinâmico (Tabela 6) área superficial (Figura 14) e pela liberação de íons (Tabela 2). Observa-se que os resultados entre NP CuO-LABTOX e controle positivo CuSO₄ apresentaram respostas parecidas em torno da CE_{50} . Para estes organismos testes a NP mostrou-se mais tóxica do que a MP.

Zhang et al. (2002) verificaram que a emissão de bioluminescência é influenciada pela concentração celular e pela liberação de ferormônios. A redução da emissão de bioluminescência é um resultado da diminuição da atividade metabólica e/ou de danos à parede celular.

As bactérias com sensor Cu mostraram-se que a toxicidade de *V. fischeri* (atualmente denominada *A. fischeri*) expostos a NP CuO foi explicada em grande parte por íons Cu solúvel (HEINLAAN et al. 2008). Esta dissolução é um dos principais contribuintes para a toxicidade em crustáceos, algas, peixes, bactérias e *V. fischeri* (BONDARENKO et al. 2013). As características das NP e os íons de Cu podem interagir com a *A. fischeri*, resultando numa diminuição da bioluminescência. A bioluminescência é um resultado de uma complexa cadeia de reações

bioquímicas, onde a redução do mononucleótido de flavina (FMNH₂), um aldeído de ácidos graxos de cadeia longa e luciferase são os principais participantes (MORTIMER et al., 2008). Segundo Hastings et al. (1987), esta via especial utiliza NADH como cofator e está intrinsecamente ligada ao metabolismo central do microrganismo. Assim, Segundo Bulich, (1982) a redução da emissão de luz é um reflexo da inibição da atividade metabólica bacteriana e proporcional à toxicidade da amostra de teste.

A adição de sal ao diluente provoca um aumento da força iônica, o que pode afetar a aglomeração das NP de CuO (Quadro 2). Buffet et al. (2010) mostraram que, em água do mar, o diâmetro das NP foi significativamente aumentado em poucos dias, e a suspensão tornou-se mais instável devido à diminuição em Pz em comparação com o controle. Os resultados obtidos neste estudo indicam que a aglomeração e a estabilidade da NP estão correlacionadas com a sua toxicidade. Um aumento no diâmetro do NP se correlaciona com uma diminuição na área de superfície e reatividade, influenciando nas respostas toxicológicas.

Ao comparar os resultados de toxicidade aguda, observou-se que o CuO (ambos NP e formas MP) foi mais tóxico para *D. magna* do que para *A. fischeri*. Este comportamento pode ser explicado além da caracterização, também pelo fato que o Cu é mais tóxico para os organismos de água doce (Brooks et al. 2007), pois certos cátions, tais como Na⁺ e Cl⁻ podem reduzir a toxicidade do Cu pelo aumento na competição biológica, a maior competitividade entre os íons de Cu e estes cátions pode potencialmente reduzir os impactos dos íons de Cu em sistemas biológicos e ser uma das razões do motivo pelo qual o Cu tende ser mais tóxico em organismos de água doce do que em organismos de água salgada.

A turbidez é considerada como interferente do teste, por isso, para realização dos testes, as amostras permaneceram em repouso por 30 min. Então, após este tempo, a concentração de Cu nos sobrenadantes foram estimados por FAAS. Os valores obtidos em relação às concentrações iniciais foram de 1,5% (30,55 mg L⁻¹) de NP e 0,8% (35,25 mg L⁻¹) para MP. Se considerarmos usar esses valores para calcular a percentagem do EC₅₀ com o Cu disponível no sobrenadante, os valores da CE_{50, 15min} seriam muito menores do que os relatados acima (Tab. 15). No entanto, nestes testes (sob mesmas as condições NP e MP), NP CuO ainda foram 8 vezes mais tóxicas, em termos de CE_{50, 15 min}, em relação ao MP. Embora testes com *A. fischeri* revelaram toxicidade tanto para NP como para MP, devido esta diferença de valores devido a interferentes nos testes, podemos concluir que esta metodologia, em particular, não parece ser a forma mais apropriada para o estudo de toxicidade neste caso.

4.2.3 Toxicidade Crônica

A toxicidade crônica (Tabela 11) foi investigada para NP CuO-MTI, NP CuO-SIGMA, NP CuO-LABTOX, NC CuO-PANI, MP CuO, PANI e CuSO₄ (controle positivo). Após 21 dias de exposição, foram analisados os parâmetros de reprodução, crescimento e longevidade. Nenhuma mortalidade ocorreu no controle de ensaio durante o período de teste (21 dias). Uma tabela completa com todos os dados coletados nos testes de toxicidade crônica é apresentada no Apêndice 3. Neste item estão apresentados apenas os resultados em termos de CEO e CENO (mg/L) para os parâmetros que foram observados algum efeito significativo. O número médio de neonatos vivos produzidos em cada réplica do controle foi de 147, e o número mínimo foi de 99, sendo que estes valores são considerados válidos de acordo com a OECD Guideline 211, por critérios biológicos (OCDE, 2012). Não foi observado mortalidade nas concentrações de testes, portanto o parâmetro longevidade não apresentou efeito em relação ao controle.

Tabela 11: Resultados das avaliações de toxicidade crônica dos organismos *D. magna* expostas à NP e MP CuO e aos controles do teste. Resultados expressos em termos de CEO e CENO (mg/L) para os parâmetros reprodução e crescimento (n=10).

AMOSTRAS	TOXICIDADE CRÔNICA			
	CEO (mg/L)		CENO (mg/L)	
	REPRO	CRESC	REPRO	CRESC
NP CuO - MTI	7,8	0,9	3,9	< 0,9
NP CuO - SIGMA	0,39	0,97	0,19	< 0,97
NP CuO - LABTOX	0,12	0,01	0,06	< 0,01
NC CuO - PANI	< 0,12	0,01	< 0,01	< 0,01
MP CuO	31,2	7,8	15,6	< 7,8
PANI	7,81	1,95	3,9	0,97
CuSO ₄	0,06	0,06	-	-

No que se refere ao parâmetro reprodução, não foi observado diferença em relação ao início da reprodução entre *D. magna* exposta as NP, MP e controles positivos em relação ao controle do teste, indicando que não houve efeito sobre o início da reprodução, no entanto um aumento no número de neonatos gerados na presença de todas as NP e MP foi observado quando comparado com o controle de ensaio (meio M4,

$p < 0,05$). Este comportamento (aumento de neonatos) pode estar relacionado à tentativa dos organismos para preservação da espécie quando expostos a uma condição estressante. Terra et al. (2008) relatou anteriormente esse comportamento. Além disso, este fato pode estar relacionado a um aumento no Cu disponível nos meios de teste, devido à liberação de íons Cu.

Ao analisar os resultados apresentados na Tabela 11, observa-se que entre as NP, o NC CuO-PANI apresentou maior toxicidade para o parâmetro reprodução.

A NP CuO-MTI foi a NP que apresentou menor efeito tóxico crônico quando comparado com as demais. Foi observado um aumento em relação à reprodução em todas as concentrações, no entanto apenas na maior concentração (7,8 mg/L) foi observado efeito estatisticamente significativo, sendo esta concentração definida como CEO para o teste. A CENO do teste, ou seja, a concentração que não apresentou efeito significativo em relação ao controle foi definida 3,9 mg/L. A NP CuO-SIGMA, também não apresentou efeito significativo em relação ao início da reprodução. Nota-se também um aumento significativo de neonatos quando comparado com o controle.

Quando comparado com o controle de teste, o número total de nascimentos nas diluições da NP CuO-LABTOX aumentou nas duas maiores concentrações (0,12 mg/L e 0,06 mg/L) e diminuiu nas duas menores concentrações (0,01 e 0,03 mg/L). Embora na concentração de 0,01 mg/L o número nascimento tenha sido menor do que o controle não foi observado efeitos significativos ($p < 0,05$). Para NP CuO-LABTOX, a CEO foi definida como sendo de 0,12 mg/L e a CENO de 0,06 mg/L (Tabela 16). Para o NC CuO-PANI, foi observado um aumento nos nascimentos em todas as concentrações testadas, não sendo possível determinar a CENO para esta suspensão-teste. A CEO foi uma concentração inferior a 0,12 mg/L (uma vez que em todas as concentrações houve um aumento significativo na reprodução) e a CENO uma concentração inferior a 0,01 mg/L. Com base nestes resultados, pode-se afirmar que o NC apresentou maior toxicidade do que as outras NP em relação ao parâmetro reprodução.

No que diz respeito à PANI, uma diminuição no número de nascimento foi observado em comparação com o controle do teste. Esta diminuição pode estar associada com níveis elevados de PANI na superfície dos béqueres de teste, funcionando como uma barreira física à penetração de luz durante o tempo de exposição, inibindo assim o desenvolvimento completo dos organismos. Observa-se que o NC CuO-PANI (que utiliza a PANI como revestimento) não apresentou a mesma

coloração em solução, provavelmente porque a PANI foi estabilizada sobre a NP e não foi completamente dissolvida nos meios de teste.

Em relação a MP, observa-se que as concentrações testadas foram maiores do que para a NP, isso foi definido a partir da menor concentração do teste agudo que não causou efeito tóxico. Observa-se também o mesmo comportamento das demais suspensões-testes em relação ao aumento no parâmetro reprodução. A CEO foi definida como sendo 31,2 mg/L e a CENO 7,8 mg/L. Quando comparado os resultados com as outras NP, chama a atenção o fato que na concentração definida como CENO (7,8 mg/L) para a MP, foi a concentração CEO para todas as NP, mostrando mais uma vez que a NP é mais tóxica do que a MP para teste de toxicidade crônica.

Em relação ao CuSO_4 observa-se também um aumento significativo na reprodução, onde a CEO foi igual a 0,06 mg/L e a CENO menor do que 0,06 mg/L mostrando assim a relação da toxicidade além das características intrínsecas da NP, que os íons de Cu são responsáveis pela toxicidade.

No que se refere ao parâmetro de crescimento, foi observada uma redução no tamanho dos organismos expostos em comparação com o controle do teste ($p < 0,05$), em todas as suspensões testadas. Esta redução de tamanho pode ser associada com a má qualidade e quantidade do alimento durante o teste, devido à toxicidade da NP CuO para *D. magna* e *S. subspicatus* (alimento para *D. magna*). Este fato pode ser provado na sessão 4.3 onde as algas verdes *S. subspicatus* foram expostas a todas as suspensões e foi observada uma diminuição da quantificação de pigmentos, diminuição da eficiência do Fotossistema II, geração de ROS, bioacumulação que interfere em todo o processo fotossintético da mesma, podendo até causar a morte celular. Vários artigos (Wang et al, 2011; Ji et al. 2011; Perreault et al. 2012, Melegari, et al. 2013) relataram que NP CuO foram tóxicos para algas verdes, como a espécie *Chlamydomonas Reinhardtii* (PERREAULT et al 2012) e a NP revestida com polímero NP CuO resultou em interações intracelulares entre as NC e o celular sistema de algas, mostrando-se mais tóxica do que a NP CuO.

De Schamphelaere et al. (2003) relataram que a toxicidade Cu pode ser atribuída aos íons de Cu^{2+} dissolvidos nos meios de teste para a alga verde *Pseudokirchneriella subcapitata*. Embora Cu seja um micronutriente essencial usado em enzimas envolvidas em vários processos metabólicos, os íons Cu podem afetar negativamente os organismos em concentrações mais elevadas do que fisiologicamente necessário, e em longo prazo, em concentrações sub-letais de metais traço pode causar alterações no crescimento, ciclo de vida e reprodução em

invertebrados de água doce (Timmermans,1993). De Schamphelaere et al. (2004) mostraram um aumento na reprodução em *D. magna* alimentada com células de *P. subcapitata* expostas ao cobre a 70 µg/L, confirmando os resultados aqui apresentados. Nanopartículas de prata (Zhao and Wang, 2011) e nanopartículas de dióxido de cério (Van Hoecke et al. 2011) foram capazes de causar uma diminuição no tamanho de *D. magna* durante o teste crônico, corroborando com nossos resultados.

Em relação ao crescimento de *D. magna* exposta a NP CuO-MTI, observa-se que houve um decréscimo significativo ($p < 0,05$), no crescimento em todas as diluições testadas. A diminuição do tamanho variou entre 3-9% em relação ao controle do teste. A CEO foi definida sendo 0,9 mg/L e a CENO menor do que 0,9 mg/L. Em relação a NP CuO-SIGMA, também foi observado um decréscimo significativo ($p < 0,05$). A diminuição do tamanho variou entre 4-10% do tamanho da *D. magna* controle. A CEO foi definida como 0,97 mg/L e a CENO menor do que 0,97 mg/L. Em relação a NP CuO-LABTOX também foi observado um decréscimo significativo no tamanho dos organismos exposto, onde o tamanho diminuiu 8–14% dos organismos em relação ao controle. Esta foi a NP mais tóxica em relação ao parâmetro crescimento. A CEO foi definida como 0,01 mg/L e a CENO uma concentração menor do que 0,01 mg/L. Observou-se também um decréscimo no tamanho dos organismos expostos, e esta variação foi entre 4–8% para NC CuO-PANI. A CEO foi definida como 0,01 mg/L e a CENO uma concentração menor do que 0,01 mg/L, por fim para a MP CuO, também foi observado um decréscimo significativo em relação ao controle. A variação observada foi entre 4-12% do tamanho dos organismos controle. A CEO foi definida como 7,8 mg/L e a CENO uma concentração inferior a esta. Para o teste com PANI, uma diminuição no crescimento de 4-22 % foi observada também em comparação com o controle de ensaio. Sendo a CEO definida como 1,95 mg/L e a CENO 0,95 mg/

4.3 BIOENSAIO COM ALGA VERDE *S. subspicatus*

Os resultados referentes aos ensaios realizados com as algas *S. subspicatus* foram realizados durante o período de estágio doutoral na Universidade du Quebec a Montreal (UQAM).

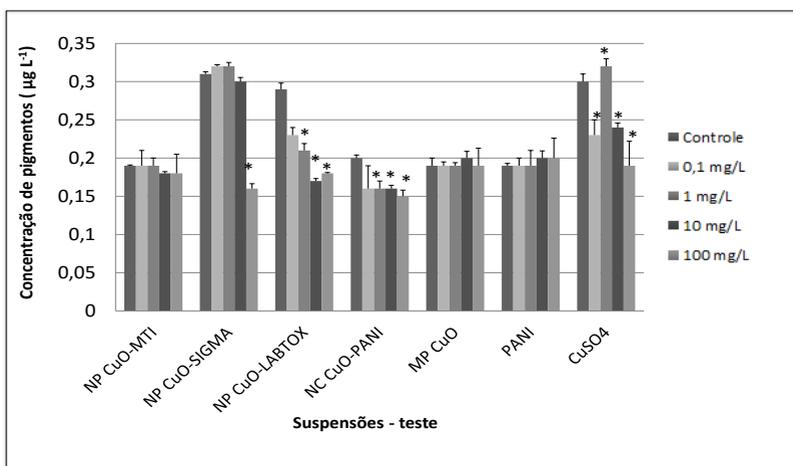
4.3.1 Dosagem dos Pigmentos Fotossintéticos

Os resultados aqui apresentados referem-se a quantificação dos pigmentos clorofilianos, clorofila *a* (Chl *a*), clorofila total (Chl *a+b*), clorofila *b* (Chl *b*) e carotenoides (Carot) das algas *S. subspicatus*

expostas às concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 mg/L de NP e MP durante 6 horas.

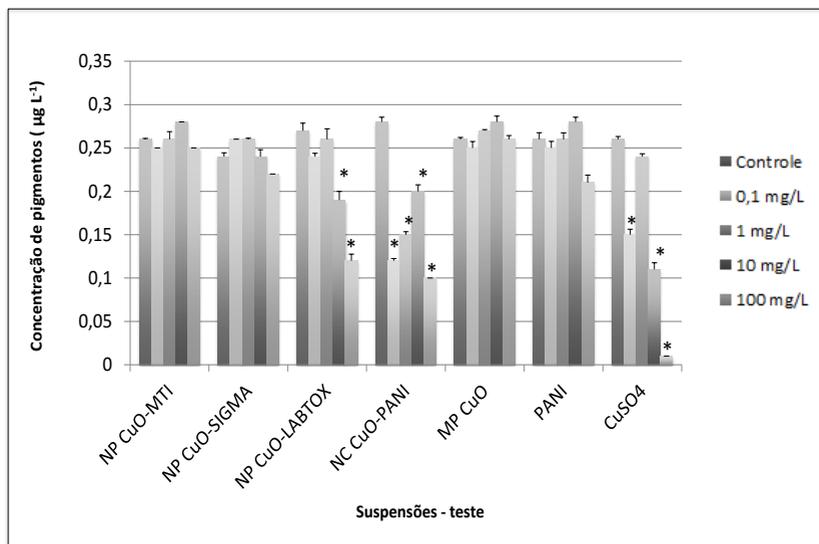
Apesar do curto tempo de exposição entre algas e NP e MP, alterações significativas nos pigmentos clorofilianos foram observadas. O nível de Chl *a* (Figura 18) para todas as NP, exceto NP CuO-MTI, diminuiu em relação ao controle. Observou-se também uma diminuição significativa ($p < 0,05$) dos pigmentos das algas expostas ao controle positivo CuSO₄. Não foram observadas alterações significativas para a suspensão de MP CuO e com a PANI. Observa-se que para as suspensões de NP (SIGMA) e MP houve um pequeno aumento no nível de Chl *a* na concentração de 0,1 e 1 mg/L, sem diferença significativa em relação ao controle, no entanto nas maiores concentrações, foi observado uma diminuição significativa do mesmo. Este aumento pode estar relacionado ao fato das algas estarem utilizando o Cu da concentração como fonte de nutrição. A Chl *a*, pigmento primário, tem como a principal função a captação de energia luminosa, segundo Dhir et al. (2009), a mesma pode ser reduzida pela redução dos conteúdos de Ferro (Fe) nos tecidos, na queda da eficiência das enzimas responsáveis pela síntese de clorofila e/ou pela substituição do átomo de Magnésio (Mg) no centro das moléculas de clorofila, prejudicando a produção desse pigmento e com isso podendo afetar o sistema fotossintético.

Figura 18: Níveis de pigmentos Chl *a* em algas verdes *S. subspicatus* após 6 horas de exposição às NP e MP CuO (média \pm desvio padrão; n=3, * $p < 0,05$ comparado ao controle do teste).



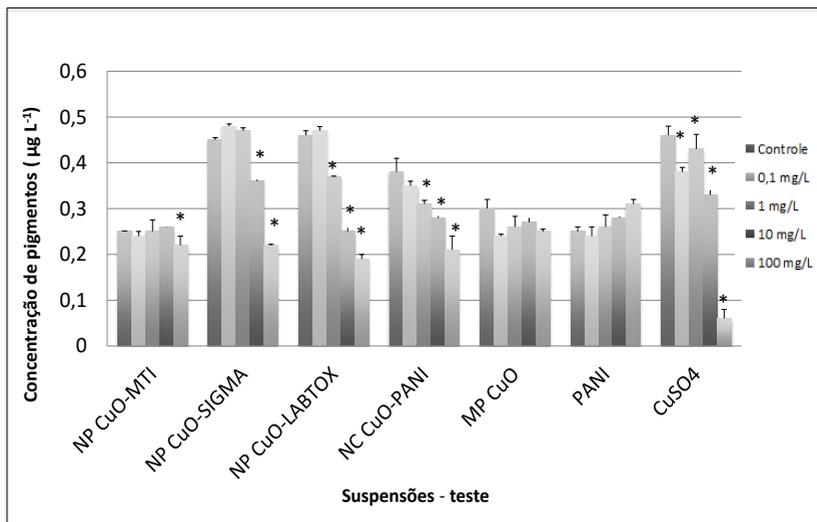
Em relação à Chl *b* (Figura 19) não foram observadas alterações significativas para NP CuO MTI, NP CuO-SIGMA MP e PANI, no entanto foram observadas alterações significativas NP CuO-LABTOX, NC e CuSO₄ em relação ao controle. Melegari et al.(2013) também observou uma diminuição no conteúdo de Chl *b* em um estudo que avaliou a toxicidade da NP CuO em algas verdes *C. reinhardtii*.

Figura 19: Níveis de pigmentos Chl *b* em algas verdes *S. subspicatus* após 6 horas de exposição às NP e MP CuO (média ± desvio padrão; n=3, * p<0,05 comparado ao controle do teste).



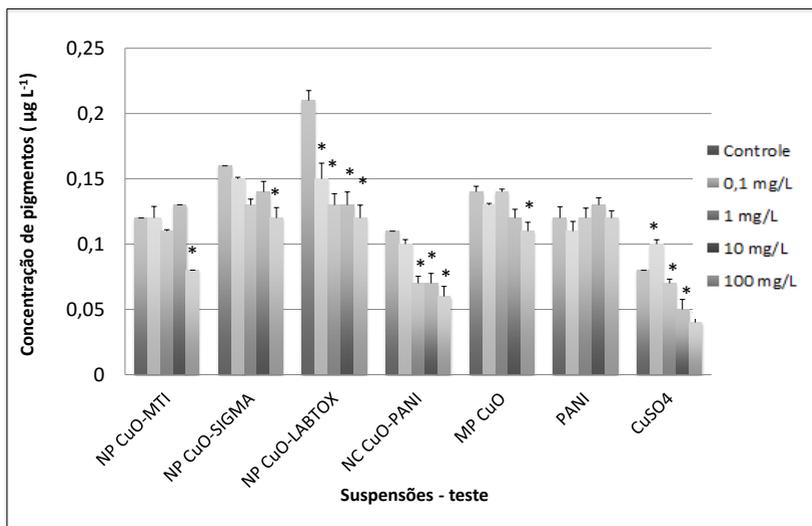
Em relação ao conteúdo de Chl *total* (Figura 20), observa-se um decréscimo significativo neste conteúdo para todas as NP e CuSO₄, não sendo observadas alterações para MP e PANI. Segundo Saison et al. (2010) em seu estudo observaram um decréscimo no conteúdo de Chl *total* para algas verdes *C. reinhardtii*, que induziriam alterações no sistema fotoquímico primário do fotossistema desta alga.

Figura 20: Níveis de pigmentos Chl *total* em algas verdes *S. subspicatus* após 6 horas de exposição às NP e MP CuO (média \pm desvio padrão; n=3, * p<0,05 comparado ao controle do teste).



E por fim, para conteúdo de Carotenóides (Figura 21), foram observadas diminuições significativas para todas as suspensões-teste, sendo que as algas expostas ao CuSO_4 foram as que apresentaram maior efeito. Os carotenoides têm como principal função a proteção a dissipação de energia excedente, então uma diminuição no nível de concentração poderá acarretar danos nos cloroplastos, bem como nos desempenhos metabólicos. Diminuição no conteúdo de carotenoides foi observada também nos estudos realizados por Melegari et al. (2013). Lalau et al. (2014) observou uma diminuição na concentração de carotenoides na concentração de 10 g/L de NP CuO-LABTOX em um estudo com *Lemna punctata*.

Figura 21: Níveis de pigmentos Carot. em algas verdes *S. subspicatus* após 6 horas de exposição às NP e MP CuO (média \pm desvio padrão; n=3, * $p < 0,05$ comparado ao controle do teste).

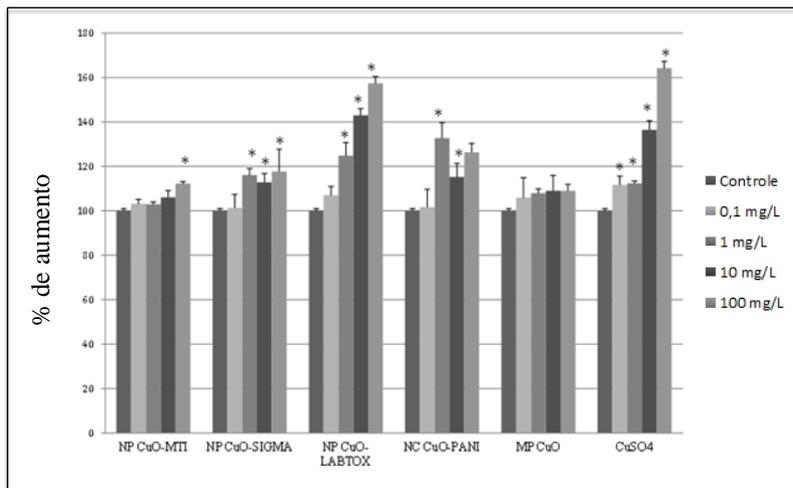


4.3.2 Formação intracelular de ROS

Os resultados sobre a formação intracelular de ROS tanto para NP e para MP após 6 horas de exposição são apresentados na Figura 22. A taxa de geração de ROS foi calculada em relação ao FDA.

Com base nos resultados observa-se que todas as suspensões foram capazes de produzir espécies reativas de oxigênio após 6 horas. No entanto apenas a MP CuO não apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) em relação ao controle. Observa-se que o maior incremento significativo foi obtido nas concentrações de 1, 10 e 100 mg/L. A NP CuO-LABTOX (157 ± 5 %) produziu maior quantidade de ROS quando comparada com as demais suspensões-teste na maior concentração. Este fato está relacionado com a maior liberação de íons disponíveis (Tabela 4) no tempo de 0 e 6 horas, maior instabilidade da NP no meio de teste (Tabela 5) e menor diâmetro hidrodinâmico (Tabela 6). Observa-se que a NP CuO-LABTOX estava apta a gerar níveis de ROS próximo ao controle positivo com CuSO₄ (164 ± 6 %) em relação ao controle.

Figura 22: Níveis de formação de ROS em algas verdes *S. subspicatus* após 6 horas de exposição às NP e MP CuO (média \pm desvio padrão; n=3, * p<0,05 comparado ao controle do teste).



A NP CuO-MTI apresentou aumento no nível de ROS na concentração de 100 mg/L de 112 ± 7 %, NP CuO-SIGMA de 118 ± 2 %, NC CuO-PANI 126 ± 3 % e MP CuO 109 ± 11 % em relação ao controle.

Segundo Nel et al. (2006), o estresse oxidativo ocorre quando espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS) perturbam o equilíbrio entre a pressão oxidativa e a defesa antioxidante. ROS podem, por exemplo, ser formado através de um radical de metal de transição. Metais de transição tais como o cobre (Cu) estão envolvidos na produção de ROS através dos mecanismos como Haber-Weiss ou reações do tipo Fenton (MANKE et al. 2013; VALKO et al. 2006; YIP et al. 2005; KNAAPEN et al. 2004). Espécies reativas como radicais hidroxila (OH^\bullet), ânions superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ou peróxido de hidrogênio (H_2O_2) podem induzir a lipoperoxidação, causando danos principalmente na membrana plasmática e cloroplastos das algas (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007; MELEGARI et al., 2013). A formação de ROS pode levar às alterações nas funções celulares e nas propriedades físico-químicas das membranas celulares, que perturbam as funções vitais (RIKANS e HORNBOOK, 1997), além de reduzir a viabilidade celular (OUKARROUM et al., 2012).

Segundo Perreault et al. (2012) a NP CuO foi apta a induzir forte produção de ROS na concentração de 0,04g/L durante um tempo de exposição de 6 horas para as algas *C. reinhardtii*, corroborando com os resultados aqui apresentados. Melegari et al. (2013) avaliaram o estresse oxidativo da NP CuO em *C. reinhardtii* observando um aumento de $190 \pm 0,45$ % no nível de ROS para 1000 mg/L de NP CuO após 72 h de exposição.

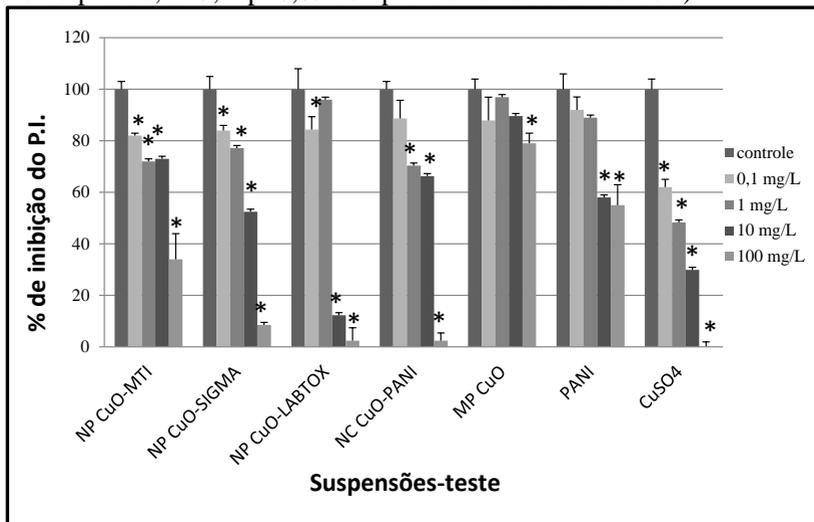
Além dos danos plasmáticos e aos cloroplastos das algas em organismos fotossintetizantes, a produção de ROS está diretamente associada com a fotoinibição e a diminuição da eficiência fotossintética (NISHIYAMA et al., 2006), diminuindo assim a atividade do fotossistema II, prejudicando a fotossíntese de alga. Este fato será melhor discutido na sessão 4.3.3 quando serão apresentados os resultados da eficiência do fotossistema II.

4.3.3 Eficiência do fotossistema II - Índice de Performance (P.I. PSII)

Aqui serão apresentados os resultados referentes a alterações no índice de performance do fotossistema II (P.I. PSII) (Figura 23) em algas verdes *S. subspicatus* após 6 horas de exposição a NP e MP CuO e controles positivos.

Todas as NP, MP e controles positivos foram capazes de causar uma diminuição significativa na eficiência do fotossistema II (PI) em relação ao controle. Tanto a NP CuO-LABTOX como o NC CuO-PANI foram capazes de baixar o PI a apenas $2 \pm 0,2\%$ e $2 \pm 1\%$ respectivamente de sua eficiência máxima na concentração de 100 mg/L. A NP CuO-MTI apresentou diminuição da eficiência para $34 \pm 12\%$, NP CuO-SIGMA $9 \pm 5\%$, MP CuO $79 \pm 10\%$ e PANI $55 \pm 12\%$. O Controle positivo com CuSO_4 foi extremamente tóxico, sendo que na maior concentração 100 mg/L, a P.I teve valor 0. A NP CuO-MTI apresentou menor redução da atividade do PSII, estando este fato provavelmente relacionado com a menor liberação de íons de Cu no tempo 0 e 6 horas (Figura 17), maiores aglomerados (Figura 13), menor área superficial (Figura 15), maior pH e por ser mais estável neste meio (Tabela 8) quando comparado com as demais NP. A MP apresentou redução de apenas 21%, sendo possível afirmar que para este parâmetro, a NP é mais tóxica do que a NP. A maior toxicidade da NP está relacionada com os dados apresentados na sessão de caracterização e também devido a maior bioacumulação que será apresentada na sessão 4.3.4.

Figura 23: Porcentagem da redução da eficiência do PSII em algas verdes *S. subspicatus* após 6 horas de exposição aa NP e MP CuO (média \pm desvio padrão; n=3, * p<0,05 comparado ao controle do teste).



A redução no P.I. indica uma fotoinibição sobre o sistema fotossintético, decorrente da geração de ROS (Figura 22) e pela redução dos pigmentos fotossintéticos provocando um decréscimo na eficiência do FSII como mostrado nas Figuras 18-21, reduzindo a capacidade do PSII em converter a luz dentro do transporte de elétrons fotossintético prejudicando o transporte de elétrons entre o PSII e PSI, pois segundo Maxwell and Johnson (2000) quando o PSII absorve luz e quinona A (Qa) aceita em forma de elétrons, o mesmo não está apto a aceitar outro elétron até que este seja transferido para o carregador seguinte de elétrons (Qb), mostrando que a diminuição do P.I. PSII pode bloquear todo o transporte de elétrons entre os fotossistemas. Elfadl e Luukkanen (2006) observaram que a presença de poluentes como metais pesados em altas concentrações, podem levar a redução do rendimento quântico da fotossíntese e, por sua vez, reduzir a assimilação de CO₂, afetando o metabolismo da planta. Além disso, segundo Rai et al. (1995), o cobre (Cu) foi responsável por interferir em diferentes locais do transporte de elétrons, sendo particularmente em algas, o fotossistema II, o local mais sensível (PRASAD et al. 1991; SINGH et al. 1991; RAI et al. 1996). Perreault et al. (2012) e sua equipe avaliaram a formação de ROS e a inibição das

atividades do fotossistema II (P.I. PSII) em algas *C. reinhardtii* após 6 horas de exposição a NP CuO. Em seu estudo foi observado uma forte formação de ROS e grande diminuição no P.I PSII para $13 \pm 12 \%$, corroborando com os resultados aqui apresentados.

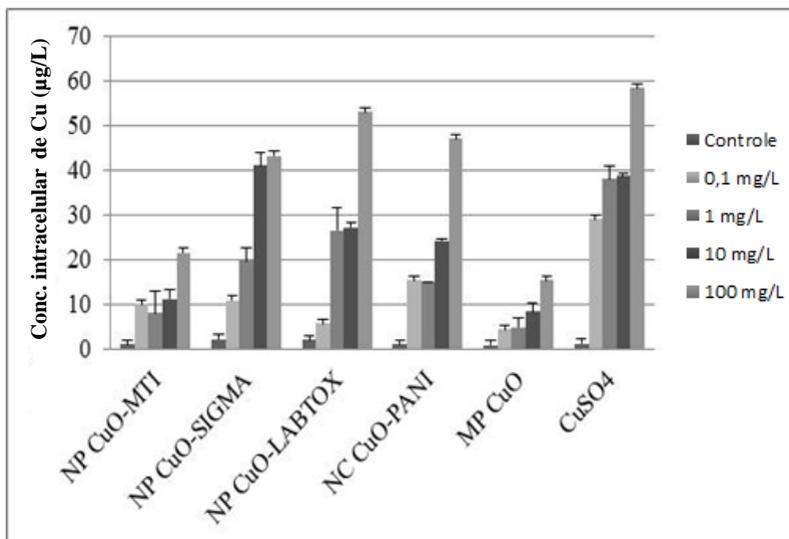
Portanto, com os resultados aqui apresentados e na sessão anterior, é possível afirmar que a interação entre NP e MP com as algas *S. subspicatus* é capaz de reduzir fortemente a atividade do fotossistema II e diminuir o conteúdo de pigmentos de Chl *a*, consequentemente afetando todo o sistema de fotossíntese das algas.

4.3.4 Acumulação de Cu intracelular

Aqui serão apresentados os resultados (Figura 24) da bioacumulação da NP, MP CuO e controle positivo em algas verdes *S. subspicatus* após 6 horas de exposição.

Os resultados indicam que todas as suspensões avaliadas foram capazes de causar um aumento significativo ($p < 0,05$) na concentração de Cu intracelular quando comparado com o controle. O controle positivo com CuSO₄ foi o que causou maior concentração intracelular de Cu ($58,45 \pm 1,2$ mg/g) de algas expostas. Entre as NP, a NP CuO-LABTOX ($53,12 \pm 1,43$ mg/g) foi a que causou maior acumulação, seguido pela NC CuO-PANI ($47,09 \pm 2,43$ mg/g) e NP CuO-SIGMA ($43,40 \pm 3,73$ mg/g). A bioacumulação da NP CuO-LABTOX se deu devido à características específicas da mesma, e principalmente pela maior liberação de íons de Cu no tempo de 0 e 6 horas. Dentre as NP, a NP CuO-MTI ($21,49 \pm 4,23$ mg/g) foi a que apresentou menor bioacumulação, fato este relacionado as características específica mostrada na sessão de caracterização e também pela menor liberação de íons de Cu. Com os resultados apresentados é possível afirmar que as algas expostas a MP ($15,37 \pm 5,65$ mg/g) tem menor capacidade de bioacumular altas concentrações de Cu quando comparada com algas expostas a NP. Todas as concentrações apresentaram um aumento significativo ($p < 0,05$) de acumulação de Cu em relação ao controle.

Figura 24: Concentração de Cu intracelular em algas verdes *S. subspicatus* após 6 horas de exposição às NP e MP CuO (média \pm desvio padrão).



Os resultados da bioacumulação aqui apresentados podem ajudar a explicar a maior produção de ROS e diminuição da eficiência do PSII para as NP e MP. Como mostrado na Figura 25 e Figura 26, houve uma maior produção de ROS em algas expostas a NP CuO-LABTOX, seguidas do NC e NP CuO-SIGMA, mesma sequência observada na redução do P.I. PSII. Este fato está relacionado com o aumento da bioacumulação nas algas expostas. Segundo Verna et al. (2008), quando íons de Cu^{+2} tem a habilidade de adentrar em compartimentos celulares, os mesmos tem a capacidade de competir com outros cátions existentes durante o processo, induzindo o efeito de ROS, e também, pode aumentar a sua concentração local e perturbar a homeostase celular, resultando em toxicidade celular. Além disso, a diminuição dos pigmentos fotossintéticos também está relacionada com o aumento da concentração intracelular de Cu. O aumento da concentração de Cu intracelular não está somente relacionada com o tamanho das partículas e sim com seu tamanho hidrodinâmico, estabilidade em suspensão e liberação de íons de Cu como mostrado na sessão de caracterização.

Alguns autores estudaram a bioacumulação da NP CuO em diferentes organismos. Perreault et al. (2012) avaliaram a bioacumulação da NP CuO em algas verdes *C. reinhardtii* e observaram um aumento

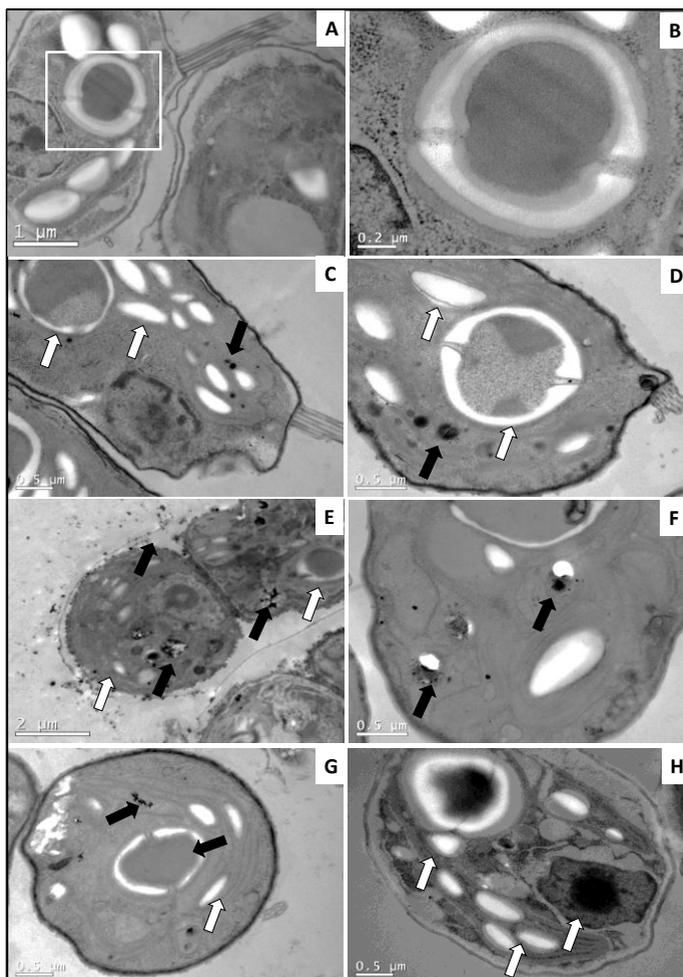
significativo na concentração de 0,04 g/L estando este valor relacionado a grande formação de ROS. Tripathi et al. (2006), observou um aumento significativo de íons de Cu^{+2} em algas verdes *S. subspicatus* quando expostas ao Cu^{+2} e grande geração de ROS intracelular. Lalau et al. (2015), também observaram um aumento na concentração intracelular de Cu em *duckweed Landoltia punctata* expostas a NP CuO na concentração de 10 g/L. Estes resultados corroboram com os resultados em relação a aumento da bioacumulação em diferentes organismos expostos a NP CuO.

4.3.5 Interação entre NP e MP com algas *S. subspicatus*

As micrografias de MET (Figura 25) foram obtidas através de MET em algas verdes *S. subspicatus* após 6 horas de exposição à suspensões com NP e MP CuO e CuSO_4 na concentração de 100 mg/L. Com base nas imagens, observa-se que a NP CuO teve a habilidade de penetrar (seta preta) nos compartimentos celulares das algas *S. subspicatus* e causar danos celulares (seta branca) após período de 6 horas de exposição. Autores como Wang et al. (2011), Perreault et al. (2012), Melegari et al. (2013) que avaliaram a interação entre NP CuO em algas e plantas, em diferentes tempo de exposição, observaram também a internalização da NP.

Ao analisar as micrografias, observa-se que organelas, tais como o pirenoide, sofreram pequena diminuição de tamanho em relação às imagens dos organismos controles. A população de alga exposta ao CuSO_4 (Figuras 25-H) foi a que apresentou maiores danos celulares que provavelmente causaram a morte celular. Estas alterações podem estar relacionadas com a bioacumulação de íons de Cu mostrada na sessão 4.3.4. Pirenoides são regiões diferenciadas dos cloroplastos, que correspondem a centros de formação de amido. Eles podem estar associados à conversão do açúcar em amido e é em torno deles que se encontram, geralmente, os depósitos desse polissacarídeo. Observa-se que houve uma pequena diminuição nos grãos de amidos das algas expostas a NP, MP e CuSO_4 quando comparado ao controle. De acordo com Gouveia (2013), o decréscimo de grãos de amido em plantas expostas ao cobre pode estar relacionado a alterações na rota de biossíntese das enzimas de amido do ciclo de Calvin, processo esse possivelmente ligado à ativação das vias de degradação dessa atividade. Esse fato pode indicar que a exposição à NP CuO afeta o metabolismo celular da planta e conseqüentemente das algas aqui avaliadas. Figura 25:

Micrografias das algas verdes *S. subspicatus* após 6 horas de exposição à concentração de 100 mg/L de NP e MP CuO e CuSO₄. (A) população de algas controle; (B) Pirenoide da alga controle; (C) população exposta a NP CuO-MTI, seta branca danos biológicos, seta preta, presença de NP; (D) população exposta a NP CuO-SIGMA seta branca danos biológicos, seta preta, presença de NP; (E) população exposta a NP CuO-LABTOX seta branca danos biológicos, seta preta, presença de NP; (F) população exposta ao NC CuO-PANI, seta branca, danos biológicos, seta preta, presença de NC; (G) população exposta a MP CuO, seta branca, danos biológicos, seta preta, presença de MP e (H) população exposta ao controle positivo com CuSO₄.



CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento da nanotecnologia impulsionou o surgimento de diversos produtos, dentre eles as nanopartículas metálicas, especialmente a NP CuO, que são conhecidos devido a suas novas propriedades físico-químicas devido a sua grande reatividade em virtude do tamanho, forma e química da superfície (LEWINSKI et al. 2008). A NP CuO, devido a sua aplicabilidade na composição de tintas anti-incrustantes de navios (Saison et al. 2010) e a maior quantidade de íons de Cu que podem ser liberados por ela em relação a MP CuO como mostrado neste estudo, proporciona um grande risco de contaminação do meio ambiente aquático, podendo se internalizar em microcústácios de água doce, como a *D. magna* na forma de NP e em algas verdes *S. subspicatus* na forma de NP, MP e íons de Cu. Metais tais como cobre, são considerados contaminantes ambientais importantes pela sua não degradação e persistência na cadeia trófica.

Com estas constatações, a hipótese 1 que afirma: “se as características específicas, tais como o tamanho e área superficial, são responsáveis pela maior toxicidade da NP CuO, então devido a isso, o principal indutor da toxicidade da NP são os íons liberados de Cu devido estas características” pode ser considerada verdadeira se levarmos em consideração o estado físico da NP. Com base nos resultados aqui apresentados, a toxicidade está relacionada a diversos fatores-chaves, que combinados, facilitam a liberação de íons de Cu para o meio. Destaca-se que a NP CuO-SIGMA, que quando em pó, foi a NP com menor tamanho (< 50nm) e a que apresentou maior área superficial (28,47 m²/g em pó), no entanto apresentou-se menos tóxica para todos os testes de toxicidade empregados neste estudo quando comparados a NP CuO-LABTOX e NC CuO/PANI, que possuíam maior tamanho e menor área superficial em pó. Com base nas micrografias obtidas após a realização das suspensões de NP em água UP e meios diluentes dos testes de toxicidade, observa-se que, devido a maior reatividade, a NP CuO-SIGMA apresentou maior estado de aglomeração em relação a NP CuO-LABTOX (tamanho em pó 50-100nm e AS 10,45 m²/g), isso fez com que a NP CuO-SIGMA atuasse em blocos de aglomerados muito maiores do que seu tamanho em pó, diminuindo com isso a liberação de íons de cobre e conseqüentemente a sua toxicidade, pois com os resultados da cinética de liberação de íons de Cu nos meios diluentes, conclui-se que para as condições utilizadas para este estudo, a NP CuO-LABTOX e NC CuO-PANI ionizam também maior concentração de íons de cobre quando comparada, por exemplo, com a NP CuO-SIGMA que em pó, apresentava menor tamanho.

Com isso, podemos considerar também a segunda hipótese “se a toxicidade da NP CuO está relacionada com o seu tamanho e forma devido a sua maior reatividade, então quanto menor o estado de aglomeração, maior será a toxicidade da NP” como verdadeira, pois quanto menor o estado de aglomeração, maior será a toxicidade da NP principalmente devido à combinação entre tamanho, estabilidade da suspensão e diâmetro hidrodinâmico que leva a maior interação e liberação de íons de Cu, tanto no meio diluente, para *D. magna*, *A. fischeri* e *S. subspicatus*, como também nos compartimentos celulares da *D. magna* devido à presença de NP no seu intestino e nas algas *S. subspicatus*.

Portanto, os resultados mostram que a NP CuO (em diferentes tamanhos) foi mais tóxica do que a MP em diferentes níveis da cadeia trófica:

- Foi capaz de causar efeitos de toxicidade em microscutáceo de água doce *D. magna* que são consumidores primários.
- Afetou a emissão de bioluminescência das bactérias marinhas *A. fischeri* que são consideradas como decompositores primários.
- Foi tóxica para as algas verdes *S. subspicatus* que são produtores primários e base da cadeia trófica, podendo com isso, interferir em todo sistema aquático.

Além disso, é importante ressaltar que a NP e MP, por possuírem a mesma formulação química CuO, possuem um registro único no banco de dados do Chemical Abstracts Service (mesmo CAS number), no entanto apresentam características intrínsecas e efeito toxicológicos muito diferentes. Essa constatação mostra uma latente necessidade atual de uma correta e mais completa classificação de registro químico dos reagentes, uma vez que o tamanho do particulado deste reagente pode influenciar na sua toxicidade e não apenas sua composição química.

CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES

Este trabalho teve com objetivo geral avaliar os efeitos tóxicos da NP de CuO e MP de CuO em diferentes organismos aquáticos, de forma a elucidar qual o principal fator responsável pelos efeitos deletérios sobre estes organismos. As principais conclusões deste estudo podem ser agrupadas em dois grandes grupos, que estão apresentados a seguir.

Quanto às avaliações de caracterização:

- Tanto a NP como MP foram caracterizadas em água UP, e nos meios de cultivo ISO, M4, NaCl 2% e CHU através de MET, onde foi possível observar que NP e MP tendem a aglomera-se quando em meio líquido, levando-se em consideração a interação entre NP–NP e NP-meio diluente, através de forças de atração e repulsão.
- As análises de DRX mostram que todas as NP e MP estão numa fase cristalina pura e com base nos picos dos difatogramas, o tamanho do cristalito de cada NP e MP, variaram entre 25-39 nm apresentando estrutura cristalina com geometria cúbica de fase centrada.
- Com base AS foi possível obter que a NP CuO-SIGMA apresentou maior área superficial do que as demais NP e devido a isso, o seu estado de aglomeração foi maior do que as demais partículas (micrografias obtidas pelo MET).
- Em relação à liberação de íons, foi possível concluir que a NP CuO-LABTOX liberou maior concentração de íons para todas as cinéticas realizadas.
- Em relação ao Pz, observa-se que em cada meio de teste, as estabilidades das suspensões foram estatisticamente diferentes do que em água UP, e a estabilidade das suspensões está relacionada com o tamanho do diâmetro hidrodinâmico e pH das amostras, sendo que este resultado pode ser um interferente em relação à liberação de íons de Cu.
- Observa-se que as NP possuem menor diâmetro hidrodinâmico, maior área superficial, são mais instáveis facilitando a liberação de íons de Cu. Observa-se que a liberação de íons de Cu foi maior

para a NP CuO-LABTOX em todas as cinéticas realizadas e a mesma se mostrou mais tóxicas para todos os organismos-teste.

- Na cinética de liberação da fração solúvel de íons de Cu no tempo de contato de zero e 6 horas com o meio CHU, a NP pode liberar maior concentração de íons devido às características intrínsecas das NP, potencializando os efeitos toxicológicos em relação a MP.
- Em relação à especiação química, observa-se que o CuO tanto na forma de NP como MP sofrem especiação com os compostos químicos presente no meio, formando complexos iônicos, interferindo com isso na toxicidade de cada amostra.

Quanto às avaliações toxicológicas:

- Numa visão mais ampla, para todos os organismos testados as NP CuO foram sempre potencialmente mais tóxicas que as MP CuO.
- Dentre as NP testadas, para todos os organismos testados a sequência de toxicidade foi sempre NP CuO-LABTOX > NC CuO-PANI > NP CuO-SIGMA > NP CuO-MTI.
- Nos testes de toxicidade aguda com *D. magna*, observou-se que a toxicidade está diretamente relacionada com as características intrínsecas das suspensões-teste que proporciona maior liberação de íons. Quanto menor o estado de aglomeração das NP, maior a toxicidade. Através da MET foi possível observar que NP estava presente no intestino da *D. magna* expostas, causando danos mitocondriais nas mesmas.
- Nos testes de toxicidade crônica foi possíveis observar que tanto a NP como a MP afetaram os parâmetros reprodução e crescimento da *D. magna*, mas as NP apresentaram-se mais tóxicas. O NC CuO-PANI foi a NP mais tóxica para o parâmetro reprodução. A NP CuO-LABTOX foi a NP mais tóxica para o parâmetro crescimento. Não foi observado efeito em relação ao parâmetro longevidade. A toxicidade crônica em *D. magna* está diretamente relacionada as características intrínsecas das NP e MP e consequentemente a liberação dos íons de Cu.
- Nos testes de toxicidade com *A. fischeri* observou-se que a toxicidade está relacionada com a diminuição dos processos metabólicos da bactéria devido a fatores-chaves de características específicas que levaram a maior liberação de íons

de Cu resultando assim na perda da bioluminescência da *A. fischeri*.

- Após 6 horas de exposição à NP e a MP, houve uma diminuição na eficiência do PSII das algas verdes *S. subspicatus*. Todas as NP foram capazes de interferir no transporte de elétrons entre o PSII e PSI podendo assim comprometer todo o processo de fotossíntese da alga. Neste caso, a maior toxicidade da NP está relacionada com os dados apresentados de caracterização e também devido a maior bioacumulação em relação a MP.
- Em relação à bioacumulação é possível concluir que a mesma ocorreu devido aos íons de Cu e devido a internalização de NP e MP. As algas *S. subspicatus* podem bioacumular maior concentração de íons de Cu provenientes das NP do que das MP. O aumento da concentração de Cu intracelular está relacionado com o tamanho hidrodinâmico da NP, estabilidade em suspensão e liberação de íons de Cu.
- Houve um aumento na quantidade de ROS gerado nas algas *S. subspicatus* expostas a NP e MP, com a NP apresentando-se mais tóxica. Isso está relacionado devido a interações entre algas e NP e MP e devido à bioacumulação de íons de Cu.
- Com base no tamanho é possível concluir que para efeitos toxicológicos, o estado de aglomeração e com isso o tamanho das NP em meio líquido é um dos principais responsáveis pela toxicidade, pois devido a combinação com o Pz, AS e pH podem liberar maior ou menor concentração de íons de Cu.

CAPÍTULO VII – RECOMENDAÇÕES

Com base nos ensaios realizados neste trabalho e os resultados obtidos recomenda-se para a continuação e o aprimoramento dos conhecimentos:

- ✓ Realizar emblocamento a fim de cortes para MET dos organismos expostos a NP e MP após 21 dias de teste.
- ✓ Avaliar a bioacumulação em *D. magna* expostas a NP e MP.
- ✓ Quantificar a geração de ROS em *D. magna* expostas a NP e MP após o teste de toxicidade aguda.
- ✓ Avaliar a atividade enzimática de *D. magna* exposta a NP e MP CuO nos teste de toxicidade aguda e crônica.
- ✓ Avaliar a atividade enzimática em algas verdes *S. subspicatus* em maior tempo de exposição.
- ✓ Analisar todos os cortes feitos com os organismos *D. magna* e *S.subspicatus* com espectroscopia de raio -X por dispersão em energia (EDX) com o objetivo de confirmar a internalização de NP e MP.

CAPÍTULO VIII - REFERÊNCIAS

AHAMED, M.; SIDDIQUI, M.; AKHTAR, M.; AHMAD, I.; PANT, A. B.; ALHADLAQ, H. A. **Genotoxic potential of copper oxide nanoparticles in human lung epithelial cells.** *Biochemical And Biophysical Research Communications*, Riyadh, v. 396, n° 2, p. 578-583, 2010.

ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T. C.; SOUSA, O. de. **Marine paints: The particular case of antifouling paints.** *Progress In Organic Coatings*, Lisboa, v. 59, n°1, p. 2-20. 2007.

ALVES, A. C. B.; SILVANO, J. **Avaliação da Sensibilidade de *Daphnia magna Straus*, 1820 (Cladóceras, crustácea) ao Dicromato de Potássio.** Universidade do Extremo Sul Catarinense. Criciúma, 2006.

American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation; ***Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 20th ed.**, American Public Health Association: Washington, 1998.

ANDREIADIS, E. S.; CHAVAROT-KERLIDOU, M.; FONTECAVE, M.; ARTERO, V.; **Artificial Photosynthesis: From Molecular Catalysts for Light-driven Water Splitting to Photoelectrochemical Cells** *Photochem. Photobiol.*, v. 87, Issue 5, p 946–964, 2011.

ARAGÃO, M. A; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos. In: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. (Org.) **Ecotoxicologia Aquática - princípios e aplicações.** São Carlos: RIMA, p. 464, 2006.

ARUOJA, V.; DUBOURGUIER, H.; KASEMETS, K.; KAHRU, A. **Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*.** *Science Of The Total Environment*, Tallinn, Estonia, p. 1461-1468, 2009.

ARNOLD, W.; MITRENGA, D. e MAYRESBACH, H. **Gefriertro und einbsttung in glycolmethacrylat (GMA) - Ergebnisse Histochemischer Reaktionen.** *Acta Histochem*, v. 14, p. 271-277, 1975.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp.* (Cladocera, Crustacea).** Rio de Janeiro: ABNT, 2009.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411-1: Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente): Parte 1 –Método utilizando bactérias recém cultivadas.** Rio de Janeiro: ABNT, 2006a.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411-2: Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente): Parte 2 – Método utilizando bactérias desidratadas.** Rio de Janeiro: ABNT, 2006b.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15.411-3: Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente): Parte 3 – Método utilizando bactérias liofilizadas.** Rio de Janeiro: ABNT, 2006c.

AVENSON, T.J., A. KANAZAWA, J.A. CRUZ, K. TAKIZAWA, ETTINGER, W.E. E KRAMER, D. M. **Integrating the proton circuit into photosynthesis: progress and challenges.** *Plant Cell Environ.*, v. 28, p. 97-109, 2005.

STANDARD TERMINOLOGY RELATING TO NANOTECHNOLOGY. **ASTM Standard E 2456–06.** American Society for Testing and Materials, West Conshohocken, 2006.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** São Paulo: Rima e InterTox, 2003. 321p.

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

BAPTISTA, I. E. **Avaliação da Toxicidade de Efluentes Gerados em uma Indústria Têxtil Catarinense.** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, p.145, 2001.

BATLEY, G. E.; KIRBY, J. K.; MCLAUGHLIN, M. J. **Fate and Risks of Nanomaterials in Aquatic and Terrestrial Environments.** *Acc. Chem. Res.*, v. 46 (3) , p. 854–862, 2013.

BHADRA, S.; KHASTGIR, D., SINGHA, N.K.; LEE, J.H. **Progress in preparation, processing and applications of polyaniline.** *Progress in Polymer Science*, v. 34, p. 783 – 810, 2009.

BIJU, V.; ITOH, T.; ANAS, A.; SUJITH, A.; ISHIKAWA, M. **Semiconductor quantum dots and metal nanoparticles: syntheses, optical properties and biological applications.** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, p. 2469-2495, 2008.

BITTON, G.; DUTKA, B. J. **Toxicity testing using microorganisms,** V.1and 2, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1989.

BLINOVA, I.; IVASK, A.; HEINLAAN, M.; KAHRU, A. **Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water.** *Environmental Pollution*, Estonia, p. 41-47, 2010.

BOETTCHER, K. J.; RUBY, E. G. Depressed light emission by symbiotic *Vibrio fischeri* of the sepiolid squid, *Euprymna scolopes*. **Journal of Bacteriology**, v. 172, p. 3701-3706, 1990.

BONDARENKO, O.; IVASK, A.; KÄKINEN, A.; KAHRU, A. **Sub-toxic effects of CuO nanoparticles on bacteria: Kinetics, role of Cu ions and possible mechanisms of action.** *Environ. Pollut.*, v. 169, p. 81–89, 2012.

BRAR, S. K.; VERMA, M.; TYAGI, R. D.; SURAMPALLI, R. Y. **Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts.** *Waste Management*, Québec, p.504-520, 2009.

BRASIL. CONGRESSO NACIONAL. Constituição da República Federativa do Brasil de 1988. Casa Civil, 05 de outubro de 1988. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm. Acesso em: 20 nov 2014.

_____. CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA nº 357. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água edretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e de outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 17 de março de 2005.

BROOKS S. J., BOLAM T., TOLHURTS L., BASSETT J., LA ROCHE J., WALDOCK M., et al. **Effects of dissolved organic carbon on the toxicity of copper to the developing embryos of the pacific oyster (*Crassostrea gigas*).** *Environ Toxicol Chem.* v.26, p.1756-1963, 2007.

BRUNNER, T.J.; WICK, P.; MANSER, P.; SPOHN, P.; GRASS, R. N.; LIMBACH, L. K.; BRUININK, A.; STARK, W.J. **In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: Comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility.** *Environ. Sci. Technol.*, v. 40, p. 4374–4381, 2006.

BUFFET, P. E.; TANKOUA, O. F.; BERHANU, D., HERRENKNECHT, C.; POIRIER, L.; AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.C.; BÉARD, J.B.; RISSO, C., GUIBBOLINI, M.; ROMÉO M.; REIP, P.; VALSAMI-JONES, E. e MOUNEYRAC, C. **Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles.** *Chemosphere.* v. 84, nº 1, p.166-174, 2010.

CAVA, R.J. **Structural chemistry and the local charge picture of copper oxide superconductors.** *Science*, v. 247, p. 656–662, 1990.

CHANG, Y-N; ZHANG, M; XIA, L; ZHANG, J E XING, G. **The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles.** *Materials.* V. 5, p. 2850-2871. 2012.

CHEN, K. L. e ELIMELECH, M. **Interaction of Fullerene (C60) Nanoparticles with Humic Acid and Alginate Coated Silica Surfaces: Measurements, Mechanisms, and Environmental Implications.** *Environ. Sci. Technol.*, v. 42, p. 7607-7614, 2006.

CHEN, J., J. ZHU, H.-H. CHO, K. CUI, F. LI, X. ZHOU, J.T. ROGERS, S.T.C. WONG AND X. HUANG. **Differential cytotoxicity of metal oxide nanoparticles.** *J. Exp. Nanosci.*, v. 3, p. 321-328. 2006.

CHOI, J. S.; OH, J. M.; CHOY, J. H., **Human-related application and nanotoxicology of inorganic particles: complementary aspects.** *Journal of Materials Chemistry.* Seoul, v. 18, nº 6, p. 605-712, 2008.

CHOWDHURI, A.; GUPTA, V.; SREENIVAS, K.; KUMAR, R.; MOZUMDAR, S.; PATANJALI, P.K. **Response speed of SnO₂-based H₂S gas sensors with CuO nanoparticles.** *Appl. Phys. Lett.* V. 84, p. 1180–1182, 2004.

CHU, S. P. **The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. I – methods and culture media.** *Journal of Ecology*, n.30, p. 284-325, 1942.

CLARE, J. **Daphnia: Na Aquarist's Guide.** Disponível em: www.caudata.org/daphnia Acessado em: Janeiro de 2011.

CENTRE OF MARINE AND ENVIRONMENTAL RESERCHH. CIMAR. Disponível em: <http://www.cimar.org/biolVerao/daphnia.htm>. Acessado em: Janeiro 2011.

CHRISTIAN, P.; Von der KAMMER, F.; BAALOUSHA, M.; HOFMANN, T. **Nanoparticles: Structure, properties, preparation and behaviour in environmental media.** *Ecotoxicology.* v.17, nº 5, p. 326-343, 2008.

COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL. CETESB. **Norma técnica L5.227 – Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio.** São Paulo: CETESB, p.13. 2001.

COMISSÃO DAS COMUNIDADES EUROPEIAS - COMUNICAÇÃO DA COMISSÃO AO CONSELHO, AO PARLAMENTO EUROPEU E

AO COMITÉ ECONÓMICO E SOCIAL EUROPEU: **Nanociências e Nanotecnologias: Plano de Acção para a Europa 2005-2009**. Bruxelas. Disponível em: <http://ec.europa.eu/nanotechnology/pdf/nano_action_plan2005_pt.pdf>. Acesso em: 07 out. 2009.

COSTA, C. H. **Estudo ecotoxicológico para valorização do resíduo produzido no processo de polimento de piso porcelanato na indústria cerâmica**. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2010.

COSTA, C. H. **Avaliação toxicológica da nanopartícula de óxido de cromo iii através de ensaios in vivo e in vitro**. Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2014.

COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M.; ESPINDOLA, E. J. G. **A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação**. *Química Nova*, v. 31, nº 7, p. 1820-1830, 2008.

COSTA, A. C. F. M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A.; CORDEIRO, V. V.; VIANA, K. M. S.; SOUZA, A. C., LIRA, H. L. (2009). **Hidroxiapatia: Obtenção, caracterização e aplicações**. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 4.3, p. 29-38, 2009.

DAR, M.A.; KIM, Y.S.; KIM, W.B.; SOHN, J.M.; SHIN, H.S. **Structural and magnetic properties of CuO nanoneedles synthesized by hydrothermal method**. *Appl. Surf. Sci.* v. 254, p. 7477–7481, 2008.

DAS, D., NATH, B.C., PHUKON, P., DOLUI, S.K. **Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 101, p. 430–433, 2013

D'AUTRÉAUX, B. ET M.B. TOLEDANO. **ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis**. *Nature Reviews*, v. 8, p. 813-824, 2007.

Da SILVA, B.F., S. PEREZ, P. GARDINALLI, R.K. SINGHAL, A.A. MOZETO e D. BARCELO. **Analytical chemistry of metallic nanoparticles in natural environments.** *Trend Anal. Chem.*, v. 30, p. 528-540, 2011.

DENG, J., HE, C. L., PENG, Y., WANG, J., LONG, X., LI, P., CHANG, A. S. C. **Magnetic and conductive Fe₃O₄-polyaniline nanoparticles with core-shell structure.** *Synthetic Metals*, v. 139, p. 295-301, 2003.

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG - DIN. **Testverfahren mit Wasserorganismen (gruppe L) Bestimmung der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber daphnien über Verdünnungsstufen:** DIN 38412-11. Berlin: DIN, 1989

DEUTSCHES INSTITUT FÜR NORMUNG - DIN. **Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L) - Teil 37: Bestimmung der Hemmwirkung von Wasser auf das Wachstum von Bakterien (Photobacterium phosphoreum; Zellvermehrungs-Hemmtest) (L 37):** DIN 38412-37. Berlin: DIN, 1999.

DHIR, B.; SHARMILA, P.; SARADHI P.P.; NASIM S.A. Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 72, n. 6, p. 1790-1797, 2009

DROBNE, D. **Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology.** *Arh Hig Rada Toksikol*, Ljubljana, Slovenia, p. 471-478, 2007.

EL-TRASS, A., ELSHAMY, H., EL-MEHASSEB, I., EL-KEMARY, M. **CuO nanoparticles: Synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids.** *Applied Surface Science*, v. 258, p. 2997-3001, 2012.

ELFADL, M.A.; LUUKKANEN, O. **Field studies on the ecological strategies of *Prosopis juliflora* in a dryland ecosystem.** 1- A leaf gas exchange approach. *J. Arid Environ.* v. 66, p. 1-15, 2006.

FAHMY, B.; CORMIER, S.A. **Copper oxide nanoparticles induce oxidative stress and cytotoxicity in airway epithelial cells.** *Toxicol. In Vitro*, v. 23, p. 1365-1371, 2009.

FALAGUASTA, M. C. R.; **Estudo do desempenho de um precipitador eletrostático operando na captura de partículas submicrométricas e nanométricas.** Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2005.

FURLANETO, F. P. B. 2011. **Nanotecnologia no setor agropecuário.** Pesquisa & Tecnologia, vol. 8, n. 69, outubro de 2011.

FUZINATTO, C.F. Avaliação da Qualidade da Água de Rios Localizados na Ilha de Santa Catarina utilizando Parâmetros Toxicológicos e o Índice de Qualidade de Água. **Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 243 p. 2009.**

GALHARDI, C.M.; DINIZ, Y.S.; FAINE, L.A.; RODRIGUES, H.G.; BURNEIKO, R.C.M.; RIBAS, B.O.; NOVELLI, E.L.B. **Toxicity of copper intake: Lipid profile, oxidative stress and susceptibility to renal dysfunction.** *Food Chem. Toxicol.*, v. 42, p. 2053–2060, 2004.

GALHARDI, C.M.; DINIZ, Y.S.; RODRIGUES, H.G.; FAINE, L.A.; BURNEIKO, R.C.; RIBAS, B.O.; NOVELLI, E.L.B. **Beneficial effects of dietary copper supplementation on serum lipids and antioxidant defenses in rats.** *Ann. Nutr. Metab.*, v. 49, p. 283–288, 2005.

GOMES, T.; PEREIRA, C.G.; CARDOSO, C.; PINHEIRO, J.P.; CANCIO, I.; BEBIANNO, M.J. **Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*.** *Aquat. Toxicol.*, v. 118–119, p. 72–79, 2012.

GORDON, E.M. e MCCANDLESS, E.L.. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stack. *Proceedings of Nova Scotia Institute of Science*, v. 27, p.111-133, 1973.

GOUVÊA, D. & MURAD, B. B. S, 2001. Influência das características ácido-básicas da superfície dos óxidos na estabilidade de suspensões cerâmicas de Al₂O₃ ou SnO₂ com dispersantes comerciais. *Cerâmica*47, v. 301, p. 51-56, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ce/v47n301/a1047301.pdf>. Acesso em: julho/2012.

GRIFFITT, R.J.; WEIL, R.; HYNDMAN, K.A.; DENSLOW, N.D.; POWERS, K.; TAYLOR, D.; BARBER, D.S. **Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in Zebrafish (*Danio rerio*)**. *Environ. Sci. Technol.*, v. 41, p. 8178–8186, 2007.

GROSELL, M.; BLANCHARD, J.; BRIX, K.V.; GERDES, R. **Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates**. *Aquat. Toxicol.*, v. 84, p. 162–172, 2007.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURSTON, R. V. **Trimmed Spearman-Kaber Method for Estimating Median Lethal Concentration in Toxicity Bioassays**. *Environmental Science & Technology*, v. 11, n° 7, p. 714-719, 1977.

HAN, X., R. GELEIN, N. CORSON, P. WADE-MERCER, J. JIANG, P. BISWAS, J.N. FINKELSTEIN, A. ELDER ET G. OBERDÖRSTER. **Validation of an LDH assay for assessing nanoparticle toxicity**. *Toxicology*, v. 287, p. 99-104, 2011

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress, **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 1147–1150, 2007

HARMEL, V. C. **Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* para análise da qualidade de águas superficiais**. Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental - Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau – SC. 100p. 2004.

HEINLAAN, M.; IVASK, A.; BLINOVA, I.; DUBOURGUIER, H-C.; KAHRU, A. **Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus***. *Chemosphere*, Estonia, p. 1308-1316. 2008.

HOLLEBONE, B. P.; FIELDHOUSE, B.; LANDRIault, M. **Aqueous Solubility, Dispersibility and Toxicity of Biodiesels**. *International Oil Spill Conference*, p. 929 – 935, 2008.

HOLUB, O.; SEUFFERHELD, M. J.; GOHLKE, C.; HEISS, G. J.; CLEGG, R. M.; **Fluorescence lifetime imaging microscopy of**

Chlamydomonas reinhardtii: non-photochemical quenching mutants and the effect of photosynthetic inhibitors on the slow chlorophyll fluorescence transient. *J. Microsc.*, v. 226, p. 90-120, 2007.

HOLSAPPLE, M. P.; FARLAND, W. H.; LANDRY, T. D.; MONTEIRO-RIVIERE, N. A.; CARTER, J. M.; THOMAS, K. V.; **Research strategies for safety evolution of nanomaterials part II: toxicological and safety evolution of nanomaterials, current challenges and data needs.** *Toxicological Sciences*, v. 88, n° 1, p. 12-17, 2005.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*:** ISO 8692. USA: ISO, 1989.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Stratus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test:** ISO 6341. USA: ISO, 1996.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 1: Method using freshly prepared bacteria.** ISO 11348-1. USA: ISO, 1998^a.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 2: Method using liquid-dried bacteria.** ISO 11348-2. USA: ISO, 1998^b.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 1: Method using freeze-dried prepared bacteria.** ISO 11348-3. USA: ISO, 1998^c.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Water quality -- Determination of long term toxicity of substances to**

Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea). ISO 11348-3. USA: ISO, 1998^c.

JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M. E WILLIAMS, P. L. **Principles of Toxicology: Environmental and Industrial Applications;** 2nd ed., John Wiley & Sons: New York, 2000, cap. 1.

JAMMI, S.; SAKTHIVEL, S.; ROUT, L.; MUKHERJEE, T.; MANDAL, S.; MITRA, R.; SAHA, P.; PUNNIYAMURTHY, T. **CuO nanoparticles catalyzed C-N, C-O, and C-S cross-coupling reactions: Scope and mechanism.** *J. Org. Chem* v.74, p. 1971–1976, 2009.

JIANG, J.; OBERDÖRSTER, G.; BISWAS, P. **Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies.** *Nanoparticles And Occupational Health*, St. Louis, p. 77-89. 25 jun. 2008.

KARLSSON, H.L.; CRONHOLM, J.; GUSTAFSSON, J e MÖLLER, L. **Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes.** *Chem. Res. Toxicol.*, p. 1726–1732, 2008a.

KARLSSON, H.L.; HOLGERSSON, A. e MÖLLER, L. **Mechanisms related to the genotoxicity of particles in the subway and from other sources.** *Chem. Res. Toxicol.*, v. 21, p. 726–731, 2008b.

KARLSSON, H.L.; GUSTAFSSON, J; CRONHOLM, J e MÖLLER, L. **Size-dependent toxicity of metal oxide particles – A comparison between nano and micrometer sizer.** *Toxicology Letters*, Stockholm, Sweden, v. 188, p. 112-118, 2009.

KNAUERT, S. AND K. KNAUER. **The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae .** *J. Phycol.*, v. 44, p. 311-319, 2008.

KNIE; J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes Ecotoxicológicos: Métodos, Técnicas e Aplicações.** Florianópolis: FATMA/ GTZ, 2004. 289 p.

KRUG, H.F. E WICK, P. 2011. **Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge**. *Angew. Chem. Int. Ed.*, v. 50, p. 1260-1278, 2011.

LALAU, C. M.; MOHEDANO, R.A.; SCHMIDT, E.C. ; BOUZON, Z.L. ; OURIQUES, L.C. ; DOS SANTOS, R.W. ; DA COSTA, C. H.; VICENTINI, D.S. ; MATIAS, W.G. . Toxicological effects of copper oxide nanoparticles on the growth rate, photosynthetic pigment content, and cell morphology of the duckweed *Landoltia punctata*. **Protoplasma**, v. 252, p. 221-229, 2015

LANONE, S. AND J. BOCZKOWSKI. “**Les sources de nanoparticules**”. *Revue française d’allergologie*, vol. 50, p. 211-213, 2010.

LEWIS M.A **Use of freshwater plants for phytotoxicity testing: a review**. *Environ. Pollut.*, v.87, p. 319–336, 1995.

LIN, Albert C. **Regulating Nanotechnology, Harvard Environmental Law, Review** , *Size Matters*, v. 31 , issue 2 , p. 349-408, 2007.

LINCHTENTHALER, H. K. **Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembrane**. *Methods Enzymol*, v. 148, p. 350-382, 1987.

LOCKMAN, P. R.; OYEWUMI, M.O.; KOZIARA, J.M.; RODER, K.E.; MUMPER, R.J.; ALLEN, D.D. Brain uptake of thiamine-coated nanoparticles. **Journal Of Controlled Release**, Amarillo, p. 271-282. ago. 2006.

MA, J. **Differential sensitivity of three cyanobacterial and five green algal species to organotins and pyrethroids pesticides**. *Science Of The Total Environment*, China, v. 341, p. 109-117, 2004.

MALISKA, Ana Maria. **MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA**. Disponível em: http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_index.htm. Acesso em: 14 mar. 2012

MARQUIS, B. J.; LOVE, S. A.; BRAUN, K.L. e HAYNES, C. L. **Analytical methods to assess nanoparticle toxicity**. *Analyst*, Usa, p. 425-439, 2009.

MATIAS, W. G.. **Apostila de Toxicologia Ambiental**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. 2009.

MATIAS, W. G. **Etude des mecanismes moleculaire d'action de l'acide okadaïque, une toxine marine diarrheique, in vivo et in vitro**. 1996. 183p. Tese (Doutorado em Toxicologia Ambiental). Universite de Bordeaux, Bordeaux, França. 1996.

MCCULLY, M. **Histological studies on the genus Fucus**. *Protoplasma*, Ottawa, v. 66, p. 205 – 230, 1968.

MEDEIROS, A. M. L.. **Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Cr₂O₃ através do Método Sol-Gel Protéico**. Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais, Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza (Ceará), 2007.

MELEGARI, S.P.; PERREAULT, F.; RIBEIRO DA COSTA, R.H.; POPOVIC, R. ; MATIAS, W.G. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, v. 142, p. 431-440, 2013.

MERCHANT, S. E.M.R. SAWAYA **Light Reactions: The A Guide to Recent Acquisitions for the Picture Gallery**. *Plant Cell*, v. 17, p. 648-663, 2005.

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

MYUNG, C.L. AND S. PARK. **Exhaust nanoparticle emissions from internal combustion engines: a review**. *Int. J. Automotive Technology*, v. 13, p. 9-22. 2012.

MOORE, M.N. **Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?** *Environment International*, Plymouth, p. 967-976, 2006.

MOREIRA, Eliane Cristina P. Nanotecnologia e Regulação: as inter-relações entre o Direito e as ciências. In: MARTINS, Paulo Roberto (Org.). Nanotecnologia, sociedade e meio ambiente. São Paulo: Xamã, 2006. p. 309-313.

MORTIMER, M.; KASEMETS, K.; HEINLAAN, M.; KURVET, I. e KAHRU, A. **High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles.** *Toxicology In Vitro*, Tallinn, p. 1412-1417, 2008.

NAGARAJAN, R.; HATTON, T.A.. **Nanoparticles: Synthesis, Stabilization, Passivation and Functionalization.** Washington,dc: American Chemical Society, p.449, 2008.

NAMBURU, P.K.; KULKARNI, D.P.; MISRA, D.; DAS, D.K. **Viscosity of copper oxide nanoparticles dispersed in ethylene glycol and water mixture.** *Exp. Therm. Fluid Sci.*, v. 32, p. 397–402, 2007.

NANOREG - Uma abordagem europeia comum para os testes regulamentares dos nanomateriais manufaturados. Disponível em:<http://www.nanoreg.eu/>. Acesso em: 31 de Julho 2015.

NEL, A., XIA, T., MÄDLER, L. e LI, N.. **Toxic potential of materials at the nanolevel.** *Science*, v. 311, p. 622–627, 2006.

NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; MURATA, N. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1757, p. 742–749, 2006.

NGÔ, Christian; VAN DE VOORDE, Marcel H. **Nanomaterials in Industrial Application.** In: **Nanotechnology in a Nutshell.** AtlantisPress, p. 393-402, 2014.

NOWACK, B. ; BUCHELI, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, Gallen, p. 5-22, 2007.

OBERDÖRSTER, G.; MAYNARD, A.; DONALDSON, K.; CASTRANOVA, V., FITZPATRICK, J., AUSMAN, K.; CATER, J.; KARN, B.; KREYLING, W.; LAI, D., OLIN, S.; WARHEIT, D.; YANG,

H. Principles for Characterizing the Potential Human Health Effects from Exposure to Nanomaterials: Elements of a Screening Strategy. *Particle Fibre Toxicol.*, v. 2, p. 1–8, 2005.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J., **Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles**, *Env. Health Perspect.*, v. 113, nº 7, pp. 823–839, 2005.

ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO TRABALHO – OIT. Riesgos emergentes y nuevos modelos de prevención en um mundo de trabajo en ransformación. 2010, Genebra. Disponível em: http://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---ed_protect/---protrav/---safework/documents/publication/wcms_124341.pdf. Acesso em: 31/07/2015.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AD DEVELOPMENT. OECD. Test N°. 211: ***Daphnia magna* Reproduction Test, in: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - Effects on Biotic Systems**. OECD Publishing. Section 2, p. 23. 2012.

OUKARROUM, A., BRAS, S., PERREAULT, F., POPOVIC, R. **Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta***. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. v. 78, p 80-85. 2012

OURIQUES, L.C., SCHMIDT, E.C.; BOUZO, Z.L. **Cytochemical Study of Spore Germination in *Nemalion helmintoides* (Nemaliales, Rhodophyta)**. *Journal of Advanced Microscopy Research*, v. 6, nº 2, p.1-8, 2011.

PADILHA, A. F. **Microscopia Eletrônica de Transmissão**. Engenharia Metalúrgica e de Materiais da EPUSP. Disponível em: <http://www.angelfire.com/crazy3/qfl2308/1_multipart_xF8FF_3_MET_PMI-2201.pdf>. Acesso em: 14 mar. 2011.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. **Os Nanomateriais e a Questão Ambiental**. *Quim. Nova*, Campinas, Brasil, p. 421-430, 2010.

PETIT, A. N., T. DEBENEST, P. EULLAFFROY AND F. GAGNÉ. **Effects of a cationic PAMAM dendrimer on photosynthesis and ROS production of *Chlamydomonas reinhardtii*.** *Nanotoxicology*, v. 6, p. 315-326, 2012.

PERREAULT, F., OUKARROUM, A., MELEGARI, S.P.,MATIAS. W.G., POPOVIC, R. **Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.** *Chemosphere*, v.87, p. 1388–1394, 2012.

POPOV, A.P.; PRIEZZHEV, A.V.; LADEMANN, J.; MYLLYLÄ, R. **TiO₂ nanoparticles as an effective UV-B radiation skin-protective compound in sunscreens.** *Moscow*, v. 38, n° 15, p. 2564-2570, 2005.

POWERS, K. W.; PALAZUELOS, M.; MOUDGIL, B.M.; ROBERTS, S. R. **Characterization of the size, shape, and state of dispersion of nanoparticles for toxicological studies.** *Nanotoxicology*. Gainesville, v. 1, n° 1, p. 42-51, 2007.

Prasad, S. M., Singh, J. B., Rai, L. C., Kumar, H. D. **Metal-induced inhibition of photosynthetic electron transport chain of the cyanobacterium *Nostoc muscorum*.** *FEMS Microbiol. Lett.* v. 82, p. 95-100. 1991.

QUINA, F. H. **Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos 2004.** Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000600031>. Acesso em: 12 maio 2014.

Rai, L.C., Tyagi, B., Mallick, N., Rai, P.K. **Interactive effects of UV-B and copper on photosynthetic activity cyanobacterium *Anabaena doliolum*.** *Environ. Exp. Bot.* v. 35, p. 177-185. 1995.

Rai, L.C., Tyagi, B., Mallick, N. **Alteration in photosynthetic characteristics of *Anabaena doliolum* following exposure to UV-B and Pb.** *Photochem.* v. 64, p. 658-663. 1996

Singh, J. B., Prasad, S.M., Rai, L.C. **Inhibition of photosynthetic electron transport in *Nostoc muscorum*.** *J. Gen. Appl. Microbiol.* v. 10, p. 167-174. 1991.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. eds. (1985). **Fundamentals of aquatic toxicology**. Methods and applications. Washington. USA, Hemisphere Publishing. p. 666. 1985.

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

RENWICK, L C; BROWN, D.; CLOUTER, A.; DONALDSON, K. **Increased inflammation and altered macrophage chemotactic responses caused by two ultrafine particle types**. *Occup Environ Med*, Edinburgh, v. 61, p. 442-447, 2004.

RIKANS, L. E.; HORNBROOK, K. R. **Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging**. *Biochimica Et Biophysica Acta*, Oklahoma City, v. 1362, p. 116-127, 1997.

ROSENKRANZ, P. W. **The ecotoxicology of nanoparticles in *Daphnia magna***. 2010. 175 f. Tese (Doutor) - Edinburgh Napier University, Edinburgh, 2010.

ROSSETTO, A.L.O.F. Estudo comparativo entre os efeitos tóxicos agudos e crônicos do óxido de cobre na forma de nanopartícula e micropartícula **Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 243 p. 2011**

ROSSETTO, A.L.O.F. ; VICENTINI, D.S. ; COSTA, C.H. ; MELEGARI, S.P. ; MATIAS, W.G.. **Synthesis, characterization and toxicological evaluation of a core-shell copper oxide/polyaniline nanocomposite**. *Chemosphere* (Oxford), v. 108, p. 107-114, 2014a.

ROSSETTO, A. L. O.F. ; MELEGARI, S. P.; OURIQUES, L.C. ; MATIAS, W.G. **Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri***. *Science of the Total Environment*, v. 490, p. 807-814, 2014b.

ROTTGERS, R. **Comparison of different variable chlorophyll a fluorescence techniques to determine photosynthetic parameters of natural phytoplankton**, *Deep-Sea Res.*, v. 54, p.437–451, 2007.

SAISON, C., PERREAULT, F., DAIGLE, J.-C., FORTIN, C., CLAVERIE, J., MORIN, M., POPOVIC, R. **Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii***. *Aquatic toxicology* (Amsterdam, Netherlands) v. 96, p. 109–14, 2010.

SAMPAIO, O., DA SILVA, MF., VEIGA, T., KING-DÍAZ, B., LOTINA-HENNSEN, B. LOTINA-HENNSEN. **Avaliação de furanocumarinas como inibidores da fotossíntese através de ensaios de fluorescência da clorofila a**. *Quim. Nova*, v. 35, n. 11, p. 2115-2118, 2012

SCAPIN, M. A., 2003. **Aplicação da Difração e Fluorescência de Raios X (WDXRF): Ensaios em Argilominerais**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. **Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos**. *Quim. Nova*, v. 26, nº 5, p. 726-737, 2003.

SEATON, A.; DONALDSON, K. **Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small**. *The Lancet*, Edinburgh, v. 365, p. 923-924, 2005.

SEMISCH A, OHLE J, WITT B, HARTWIG A. **Cytotoxicity and genotoxicity of nano - and microparticulate copper oxide: role of solubility and intracellular bioavailability**. *Part Fibre Toxicol*. doi: 10.1186/1743-8977-11-10. 2014

SEGALA, K. **Síntese e Caracterização de nanocompósitos funcionais**. 2009. 299 f. Tese (Doutor) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SING, S.; DEBUS, R. J.; WYDRZYNSKI, T.; HILLIER, W.; **Investigation of substrate water interactions at the high-affinity Mn site in the photosystem II oxygen-evolving complex.** *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, v. 363, 1229, 2008.

SINGH, N.; MANSHIAN, B.; JENKINS, M. J. S.; GRIFFITHS, S. M.; WILLIAMS, P. M.; MAFFIES, T. G. G.; WRIGHT, C. J.; DOAK, S. H.; **NanoGenotoxicology: the DNA damaging potential of engineered nanomaterials,** *Biomaterials*, Wales, v. 30, nº 23-24, p. 3891-3914, 2009.

STEFFENS, J.; **Desempenho de filtros fibrosos operando na remoção de partículas nanométricas de aerossóis.** Tese de Doutorado. Departamento de Engenharia Química. Universidade de São Carlos, São Carlos-SP, 2007.

SUAREZ, I.J., R. ROSAL, A. RODRIGUEZ, A. UCLES, A.R. FERNANDEZ-ALBA, M.D. HERNANDO E E. GARCIA-CALVO. **Chemical and ecotoxicological assessment of poly(amidoamine) dendrimers in the aquatic environment.** *Trends Anal. Chem.*, v. 30, p. 492-506, 2011.

TANIGUCHI, N. On the basic concept of “NanoTechnology”. **Proc. Intl. Conf. Eng. Tokyo, Part II, Japan, Society of Precision Engineering**, p. 18-23, 1974.

TRANQUADA, J.M.; STERNLIEB, B.J.; AXE, J.D.; NAKAMURA, Y.; UCHIDA, S. **Evidence for stripe correlations of spins and holes in copper oxide superconductors.** *Nature*, v. 375, p. 561–563, 1995.

TSIRIDIS, V.; PETALA, M.; SAMARAS, P. **Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*.** *Ecotoxicology And Environmental Safety*, Thessaloniki, Greece, p. 158-167, 2005.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. USEPA. **EPA-821-R-02-013: Short-term Methods for Estimating the chronic Toxicity of effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms.** 4th ed. Washington, USA, 2002.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. USEPA. **Acid Digestion of Aqueous Samples and Extracts for Total Metals for Analysis by FLAA or ICP Spectroscopy. METHOD 3010 A,** 2007a. Disponível em <http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3010a.pdf>, acesso em 01/2012.

UPADHYAY, D.; PANDURI, V.; GHIO, A.; KAMP, D.W. **Particulate matter induces alveolar epithelial cell DNA damage and apoptosis: role of free radicals and the mitochondria.** *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, Chicago, v. 29, n° 2, p. 180–187, 2003.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODE, C.J.; TELSER, J. **Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence.** *Molecular And Cellular Biochemistry*, Chicago, USA, v. 266, n° 1-2, p. 37-56, 2004.

VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* v. 160, p. 1-40. 2006.

VERMA, A.; UZUN, O.; HU, Y.; HU, Y.; HAN, H.S.; WATSON, N.; CHEN, S.; IRVINE, D.J.; STELLACCI, F. **Surface-structure—regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles.** *Nat. Mater.*, v. 7, p. 588–595, 2008.

VIEIRA, D. C; CARDOSO, S.X; DURAN, R B. **Análises térmicas e processo de sinterização da cerâmica $\text{KSr}_2\text{Nb}_5\text{O}_{15}$ dopada com CuO.** *Quím. Nova* v. 32, n.7, 2009.

ZHANG, D.-W.; YI, T.-H; CHEN, C.-H. **Cu nanoparticles derived from CuO electrodes in lithium cells.** *Nanotechnology* ,v. 16, p. 2338–2341, 2005.

ZHANG, H.B.; WANG, L.H.; ZHANG, L.H. **Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*.** *Proc Natl Acad Sci. USA.* v. 99, p. 4638–4643, 2002.

ZHU, Z.J., CARBONI, R., QUERCIO, M. J., YAN, B., MIRANDA, O. ANDERTON, D. L., ARCARO, K. L., ROTELLO, V. M. AND VACHET, R. W. **Surface properties dictate uptake, distribution,**

excretion, and toxicity of nanoparticles in fish. *Small*, v. 6, p. 2261-2265, 2010.

ZIETZ, B.P.; DIETER, H.H.; LAKOMEK, M.; SCHNEIDER, H.; KEßLER-GAEDTKE, B.; DUNKELBERG, H. **Epidemiological investigation on chronic copper toxicity to children exposed via the public drinking water supply.** *Sci. Total Environ.*, v. 302, p. 127–144, 2003.

ZHOU, C.M.; WANG, W-X. **Biokinetic uptake and efflux of silver nanoparticles in *Daphnia magna*.** Kowloon, Hong Kong, v. 44, n°19, p. 7699-7704, 2010.

ZHOU, K., WANG, R., XU, B. e LI Y. **Synthesis, characterization and catalytic properties of CuO nanocrystals with various shapes.** *Nanotechnology*. v. 17, n° 15, p. 3939–3943, 2006.

YAN, L.; ZHAO, F.; LI, S.; HU, Z.; ZHAO, Y. **Low-toxic and safe nanomaterials by surface-chemical design, carbon nanotubes, fullerenes, metallofullerenes, and graphenes.** *Nanoscale*, v. 3, p. 362–382, 2011.

YIN, M.; WU, C.-K.; LOU, Y.; BURDA, C.; KOBERSTEIN, J.T.; ZHU, Y.; O'BRIEN, S. **Copper oxide nanocrystals.** *J. Am. Chem. Soc.* v. 127, p. 9506–9511, 2005.

YIN, Z., DING, Y., ZHENG, Q., GUAN, L. **CuO/polypyrrole core-shell nanocomposites as anode materials for lithium-ion batteries.** *Electrochemistry Communications*, v. 20, p. 40-43, 2012.

YOKOHIRA, M.; HASHIMOTO, N.; YAMAKAWA, K.; SUZUKI, S.; SAOO, K.; KUNO, T.; IMAIDA, K. **Lung carcinogenic bioassay of CuO and TiO₂ nanoparticles with intratracheal instillation using F344 male rats.** *J. Toxicol. Pathol.*, v. 22, p. 71–78, 2009.

WANG, Z.; LI, J.; ZHAO J.; XING, B. **Toxicity and Internalization of CuO Nanoparticles to Prokaryotic Alga *Microcystis aeruginosa* as Affected by Dissolved Organic Matter.** *Environ. Sci. Technol*, China, n° 45 , p.6032-6040, 2011.

WARHEIT, D.B., WEBB, T.R., SAYES, C.M., COLVIN, V.L., and REEDM, K.L. **Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area.** *Toxicol. Sci.*, v. 91, p. 227–236, 2006.

WEBB, P. A.; ORR, C. **Analytical methods in fine particles technology.** *Norcross: Micromeritics Instrument Corp.*, 1997

WEBER, C. I. **Method for mensuring the acute toxicology of effluents and receiving water to freshwater and marina organisms.** Cincinnati, Ohio: EPA, 253 p. 1993.

SHI, J.; ABID, A.D.; KENNEDY, I.M.; HRISTOVA, K.R.; SILK, W.K. **To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution.** *Environ. Pollut.*, v. 159, p. 1277–1282, 2011.

XIA, T., KOVOCHICH, M., BRANT, J., HOTZE M., SEMPFF, J., OBERLEY, T., SIOUTAS, C., YEH, J.I., WIESNER, M.R. and NEL, A.E, **Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm.** *Nano. Lett.*, v. 6 p. 1794–1807, 2006.

CAPÍTULO IX – APÊNDICES

A1. Artigo Rossetto et al.(2014^a)

Author's personal copy

Chemosphere 108 (2014) 107–114



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Synthesis, characterization and toxicological evaluation of a core-shell copper oxide/polyaniline nanocomposite



Ana Letícia de O.F. Rossetto, Denice S. Vicentini, Cristina H. Costa, Sílvia P. Melegari, William G. Matias*

Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil

HIGHLIGHTS

- Synthesis of CuO NP coated with polyaniline (PANI) to form core-shell (CS) CuO/PANI.
- In acute tests, CuO NP and CS CuO/PANI were toxic to *D. magna* and *V. fischeri*.
- PANI presented no acute and chronic toxicity.
- To chronic exposition, CS CuO/PANI showed more toxic on reproduction parameter.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 August 2013
 Received in revised form 1 February 2014
 Accepted 8 March 2014
 Available online 12 April 2014

Handling Editor: S. Jobling

Keywords:

Nanotoxicology
 CuO nanoparticle
 Polyaniline
 Core-shell
Daphnia magna
Vibrio fischeri

ABSTRACT

The newest generation of copper oxide NPs (CuO NPs) is the CuO core-shell (CS), which has potential applications in several areas (e.g., electronics and paint) and is able to provide a greater service life due to its coating; however, its toxicity is not fully understood. The objective of this study was to synthesize, characterize and evaluate the aquatic toxicology of CuO NPs and CuO core-shells through acute and chronic toxicity tests with the freshwater microcrustaceans *Daphnia magna* and to evaluate its acute toxicity with the marine bioluminescent bacteria *Vibrio fischeri*. The NPs were synthesized by direct thermal decomposition after being coated as a CS with polyaniline (PANI). With respect to acute toxicity with *D. magna*, the CuO NPs and CS CuO/PANI presented EC₅₀ values of 0.32 mg L⁻¹ and 0.48 mg L⁻¹, respectively. For the tests with *V. fischeri*, the CuO NPs (EC_{50-15min} = 7.79 mg L⁻¹) exhibited behavior similar to that of the CS CuO/PANI (EC_{50-15min} = 9.05 mg L⁻¹) after 15 min of exposure. Regarding chronic toxicity, both forms showed a statistically significant effect ($p < 0.05$) on the growth and reproduction parameters. Based on the characterization and toxicity results, it can be concluded that both forms of CuO were toxic and presented similar behaviors during the acute tests; however, after 21 d of exposure, CS CuO/PANI showed higher toxicity to the reproduction parameter, highlighting the importance of a complete study of the NP to better understand its toxicity mechanism.

© 2014 Published by Elsevier Ltd.

1. Introduction

In recent years, research in the field of nanomaterials (NMs) has led to the discovery that dramatically different properties may be present at this scale with respect to those of bulk materials (Curtis et al., 2006). Human and environmental exposures to NMs are inevitable because of their widespread use in many technological fields; consequently, nanotoxicology research is gaining greater

attention. However, the variety of NMs and the applications developed for these materials continue to increase, whereas studies to characterize the effects of exposure and to identify the toxicological potential of NMs are lacking.

The use of NMs may lead to contamination of aquatic ecosystems by nanosized contaminants (Jatine et al., 2008). However, the ecotoxicological risks of NMs are difficult to evaluate because the mechanisms of toxicity of nanosized materials are still not fully understood. Several physicochemical properties of NMs that can be related to their toxicity have been identified through toxicological research, such as their size, shape, composition, aggregation and solubility, especially for NMs composed of toxic metals (Griffitt et al., 2008; Johnston et al., 2010).

* Corresponding author. Address: Laboratório de Toxicologia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Caixa Postal 476, CEP 88.010-970, Florianópolis, SC, Brazil. Tel.: +55 48 3721 7742; fax: +55 48 3721 9823.

E-mail address: william.g.matias@ufsc.br (W.G. Matias).

In the paint and textile industries, copper oxide nanoparticle (CuO NPs) are frequently used in a polymer-coated form, also called core-shell (CS), for their antimicrobial properties. The application of antifouling paints on the hulls of boats is a commonly used technique to reduce the growth and colonization of marine micro- and macro-organisms, which are responsible for a decrease in boat speed and an increase in fuel consumption (Almeida et al., 2007). Studies of polymer-coated CuO NPs have shown that, in some cases, the polymeric shell may potentiate the toxicity due to an effect known as the "Trojan horse." The polymeric shell can promote intracellular interactions, which increase interactions between the nanocomposites (NC) and cells, tissues or organs, thus increasing the toxicity of the NMs. An example of this effect was reported by Perreault et al. (2012). The effect of the polymer coating (poly(styrene-co-butyl acrylate) (PSBA) on CuO NP toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* enhanced the toxicological effects of the CuO NPs. Saison et al. (2010) investigated the toxic effect of CS CuO/PSBA NP on the green alga *C. reinhardtii* and observed changes in the algal population structure and in the primary photochemistry of photosystem II as well as the formation of reactive oxygen species (ROS). This study demonstrated the ability of CS CuO NPs to induce strong toxic effects in algae at the cellular level. Notably, neither the CuO NPs nor the polymeric shell alone induced such an effect. This result indicates that the morphological properties of NPs play an important role in the possible induction of a toxic effect in algae. The results from this study revealed that CuO NPs are more toxic to algal cellular systems when they are contained within an organic polymeric layer. Therefore, both the chemical nature of the NPs and their surface properties may determine the toxic effects.

Conducting polymers are promising materials because of their potential applications in multidisciplinary areas, such as electronics, thermoelectrics, electromagnetics, chemicals, membranes, and sensors (Bhadra et al., 2009). Among the conducting polymers, polyaniline (PANI) is one of the most studied polymers due to its excellent environmental stability, ease of synthesis, low cost of the monomer, redox properties, large conductivity range, and the different redox states that can be obtained: the fully reduced form, leucoemeraldine (yellow); the half-oxidized form, emeraldine (blue); and the fully oxidized form, pernigraniline (purple) (de Albuquerque et al., 2004). PANI can also be doped/dedoped by protonation, forming the so-called salt forms. The emeraldine salt (green) is the most conductive form of PANI (Salvatierra et al., 2010). Some studies describe the PANI CS structure synthesized with Fe_2O_4 (Deng et al., 2003; Lee et al., 2007) and SiO_2 (Jeong et al., 2011). However, few studies are found that describe the toxicity of PANI. The cellular toxicity of PANI was evaluated in nanodiamond-PANI under *in vitro* conditions using human embryonic kidney cells, and this study indicated that at low concentrations, the material can be used for bioapplications without a negative influence on the life processes of cells (Villalba et al., 2012). In another study, Yslas et al. (2012) assessed the ecotoxicity and teratogenic effect of PANI nanofibers in *Rhinella arenarum* larvae and embryos under controlled laboratory conditions. The results showed a low risk potential for *R. arenarum* after acute exposure to PANI nanofibers.

In this study, we synthesized, characterized and evaluated the acute and chronic toxicities of the NMs CuO NPs, PANI and CS CuO/PANI (NC) by exposing the freshwater microcrustacean *Daphnia magna* and the bioluminescent bacteria *Vibrio fischeri* to these NMs. Microcrustaceans and bacteria are good representatives of different trophic levels, and they are widely used in toxicity tests and as bioindicators in toxicology studies with NPs. The conducting polymeric shell may reduce toxicity and chemical/physical degradation and facilitate manipulation. These NMs were characterized using X-ray diffraction (XRD), transmission electron microscopy

(TEM), inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), speciation of metallic ions and zeta potential (ζ) measurements.

2. Materials and methods

2.1. Materials

The following materials were used to synthesize the PANI and NMs: 37% hydrochloric acid (HCl) and double-distilled nitric acid (HNO_3) from Merck® (Darmstadt, Germany); aniline (ANI) from Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, United States); ammonium persulfate ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$), ammonium hydroxide (NH_4OH), copper sulfate hydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sodium carbonate (Na_2CO_3), sodium dodecyl sulfate (Na-SDS), and super-pure hydrogen peroxide (H_2O_2) from Vetec® (Duque de Caxias, RJ, Brazil); and ethanol and acetone from Nuclear® (Diadema, SP, Brazil). All chemicals were of reagent grade and were used as received.

2.2. PANI synthesis

To 100 mL of HCl (15 mmol, in water) at 0 °C (ice bath) was added ANI (26.7 mmol), and then 100 mL of $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (6.7 mmol, in water) was slowly added over the course of 10–15 min. After stirring at 0 °C for an additional 3 h, the solids that formed (PANI salt) were collected by filtration and were thoroughly washed with ethanol, acetone and water to yield a dark-greenish solid after drying at 50 °C for 48 h. The PANI salt was deprotonated with a 0.1 M NH_4OH solution and stirred for 24 h. Then, the product was washed several times with water and ethanol and dried at 50 °C for 24 h. A dark blue powder was obtained.

2.3. CuO NP synthesis

CuO NPs were prepared via a direct thermal decomposition method with a few modifications (Das et al., 2013). The precursor was synthesized by adding 100 mL of a 60 mmol Na_2CO_3 solution to 100 mL of a 50 mmol $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solution, and the mixture was ultrasonicated in an ultrasonic cell disruptor (Unique – 100 W, 99% maximum power) for 60 min at 60 °C. The resulting precipitate was separated by centrifugation and washed several times with warm distilled water to remove any possible ions remaining in the final product. Then, the precipitate was transferred to a silica crucible and placed in an oven at 70 °C for 12 h. Finally, it was placed in a preheated muffle furnace at 600 °C for decomposition. After 2 h, the silica crucible was removed from the furnace and allowed to cool to room temperature, and the resulting dark brown powder was ground and sieved.

2.4. CS CuO/PANI synthesis

CuO NPs were dispersed in 50 mL of distilled water containing 40 mg of Na-SDS under ultrasonication for 20 min, followed by stirring overnight at room temperature. Subsequently, ANI monomer and 0.5 mL of a 1 M HCl solution (as a dopant) were successively added to the suspension. The ratio between the CuO NPs and ANI was 3:1 (m/m). $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ (114 mg in 5 mL of distilled water) was added to the system as an oxidant to initiate polymerization. After stirring the mixture in an ice/water bath for 3 h, the CS CuO/PANI were recovered by centrifugation and rinsed several times with water and ethanol. The samples were dried at 50 °C for 24 h. Finally, the CS CuO/PANI was deprotonated with a 0.1 M NH_4OH solution and stirred for 24 h. The product was then washed several times with water and dried at 50 °C for 24 h.

2.5. Characterization of the NMs

All of the synthesized NMs were characterized using X-ray diffraction (XRD) over the angular range of $2\theta = 20\text{--}70^\circ$ using a Philips X'Pert diffractometer equipped with a copper tube (Cu K α , $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$). The zeta potentials of the NMs were measured using a Malvern Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600). Images revealing the morphologies and sizes of the NPs were obtained using a transmission electron microscope (TEM; JEM-1011 TEM microscope). An inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS; Perkin–Elmer, Nexlon 300 D, Shelton, USA) was used to quantify the total Cu release of the NMs. Sample solutions with a concentration of 125 mg L^{-1} in ISO, M4 and 2% NaCl media were acidified with HNO_3 and diluted 200 times. ICP-MS measurements recorded total Cu at both 0 h and after 48 h. The samples for the zeta potential measurements and transmission electron microscopy observations were prepared in ultrapure water (UW) (1 g L^{-1}). The speciation of CuO NPs in the medium tests was performed using the program Visual MINTEQ 3.0 (Stockholm, Sweden). The concentration was 125 mg L^{-1} .

2.6. Toxicity tests

2.6.1. *D. magna* culture

D. magna Straus 1820 (Cladocera, Crustacea) was cultivated according to the ISO 6341 (ISO, 2012a) and DIN 38412-30 (DIN, 1989) standards. The *D. magna* culture was fed with the algae *Scenedesmus subspicatus* (ISO, 2012b), which was cultivated in CHU growth media (Chu, 1942).

2.6.2. Acute test with *D. magna*

Acute toxicity tests with *D. magna* were performed according to ISO 6341 (ISO, 2012a) with neonates (2–26 h) exposed for 48 h. The samples were diluted with ISO media, and the endpoint used for the toxicological evaluation was the immobility of the organism. The CuO NP, CS CuO/PANI and PANI stock solutions were prepared at a concentration of 1000 mg L^{-1} , and dilutions were performed from 125 to 0.12 mg L^{-1} . CuSO_4 at a concentration range of $125\text{--}0.48 \text{ mg L}^{-1}$ was used as a positive control. ISO media was used as a test control. The EC_{50} was calculated using the trimmed Spearman–Kärber statistical method according to the EPA (EPA, 2002a).

2.6.3. Chronic test with *D. magna*

Chronic toxicity tests were performed according to ISO 10706 (ISO, 2000) and Flohr et al. (2012). The parameters analyzed were fecundity (number of neonates), longevity (surviving organisms) and growth (length of the organisms) after 21 d of exposure. Each test was performed with 4 dilutions, a test control (M4 media) and a positive control (CuSO_4). The dilutions were defined based on the results observed in the acute toxicity test and followed a geometric progression at a ratio of 2 from the concentration that had no effect on the exposed organisms in 48 h. The CuO NP, CS CuO/PANI and PANI stock solutions were prepared at a concentration of 1000 mg L^{-1} and sonicated for 30 min (100 W, 99%). The dilutions analyzed were $0.12\text{--}0.01 \text{ mg L}^{-1}$ for the CuO NPs and CS CuO/PANI, $15.6\text{--}0.9 \text{ mg L}^{-1}$ for PANI and $0.12\text{--}0.06 \text{ mg L}^{-1}$ for CuSO_4 . For each dilution, 10 replicates were used, and each replicate consisted of one neonate of *D. magna* in an individual 50 mL beaker with a 50 mL aliquot of the test solution. The tested samples were maintained under the same conditions as those used for cultivation.

Daily observations were performed to determine the number of surviving organisms and the growth and numbers of neonates. The results were statistically analyzed using a one-way ANOVA according to the EPA (EPA, 2002b). A level of $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

2.6.4. Acute test with *V. fischeri*

The acute toxicity test with the bioluminescent marine bacteria *V. fischeri* (lyophilized) followed the methodology proposed by ISO 11348-3 (ISO, 2007). This test determines toxicity based on the inhibition of luminescence emitted by the bacteria after a contact time of 15 min with the samples. The toxicity tests were conducted under controlled temperatures with the Microtox[®] equipment at $15 \pm 1^\circ\text{C}$ and the bacterial reagent at 3°C . The $\text{EC}_{50,15\text{min}}$ was calculated using Microtox Omni software 4.0. The stock solutions were prepared at a concentration of 1000 mg L^{-1} , and the dilutions were performed from 125 to 3.90 mg L^{-1} . The CuO NP and CS CuO/PANI suspensions remained at rest for 30 min prior to the start of the toxicity test to reduce the interference caused by the colored samples due to the loss of luminescence via the absorption or scattering of light, as recommended by CETESB (CETESB, 2001).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of NMs

The crystalline structures of the NMs were examined by XRD (Fig. 1A and C). All of the diffraction peaks from the CuO NPs and CS CuO/PANI are consistent with the standard structure and can be indexed to the monoclinic phase of CuO (JCPDS No. 89-5898) (Massarotti et al., 1998). The results indicated that the products consisted of a single phase. Different peaks were observed at $2\theta = 32.50^\circ$ (110), 35.42° (002), 38.70° (111), 48.72° (202), 53.49° (020), 58.27° (202), 61.52° (113), 66.22° (311) and 68.12° (220), which correspond to the different lattice planes of the CuO NPs. This observation confirms the formation of CuO NPs. Fig. 1B shows the amorphous nature of the typical PANI peaks at $2\theta = 14.98^\circ$, 19.65° and 24.50° (Du et al., 2004). The amorphous peak from PANI in the CS CuO/PANI was not visible in the XRD pattern due to the small amount of PANI in the NC. The crystallite size based on X-ray peak broadening was estimated using Debye–Scherrer's equation (Eq. (1)) (Deng et al., 2003; El-Trans et al., 2012):

$$d(\text{\AA}) = \frac{k\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (1)$$

where k is an empirical constant equal to 0.9, λ is the wavelength of the X-ray source (1.5405 Å), β is the full width at half maximum of the diffraction peak, and θ is the angular position of the peak. The average crystallite size calculated for the CuO NPs is 25.2 nm .

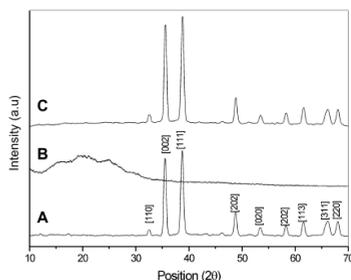


Fig. 1. XRD patterns of synthesized CuO NPs (A), PANI (B) and CS CuO/PANI (C).

TEM images of the synthesized CuO NPs and CS CuO/PANI are shown in Fig. 2A–C. The TEM image in Fig. 2A shows that the NPs are nearly spherical, with diameters ranging from 50 to 100 nm. Fig. 2B and C shows that both the agglomerates (2B) and the isolated CS CuO/PANI (2C) are coated with a PANI shell with a thickness of approximately 10 nm.

The zeta potential measurements revealed that the PANI shell on the CuO NPs promoted an increase in the zeta potential and solution stability values (Table 1). The pH of the UW for the NC was larger than for either of the individual materials. In the M4 medium, the pH increased due to the pH buffer solution of M4. This result is evidence that the NPs were coated by PANI.

The ICP-MS analysis was used to quantify the total Cu released from the CuO NP and CS CuO/PANI samples in the ISO (acute) and M4 (chronic) media used for the test cultures with *D. magna* and in the NaCl (2%) solution used for the test with *V. fischeri* at 0 h and 48 h (Table 2). Samples with a concentration of 125 mg L⁻¹ were acidified with HNO₃ and diluted 200 fold before the ICP-MS

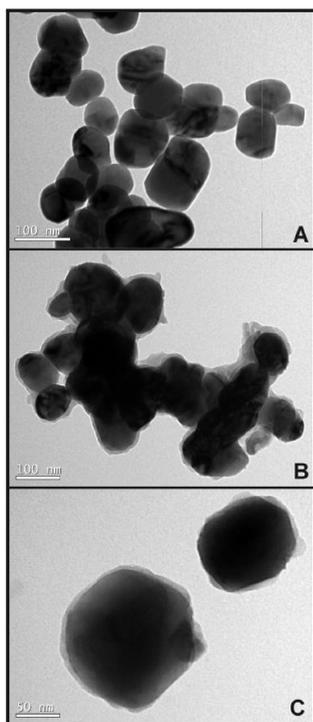


Fig. 2. TEM images of CuO NPs (A) and CS CuO/PANI (B and C).

Table 1
Zeta potentials and pH (UW and M4) of the NMs.

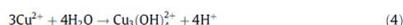
NMs	ζ (mV)	pH in UW (1 g L ⁻¹)	pH in M4 (1 g L ⁻¹)
PANI	-17.03 ± 3.13	6.31	8.08
CuO NPs	-11.73 ± 0.06	6.07	7.69
CS CuO/PANI	-12.80 ± 0.25	6.55	7.84

Table 2
CuO NPs speciation in ISO, M4 and 2% NaCl.

Toxicity tests	Medium	Species	% of total concentration		
Acute test (<i>D. magna</i>)	ISO	Cu ²⁺	37.903		
		CuOH ⁺	3.654		
		Cu ₂ (OH) ²⁺	0.068		
		Cu(OH) _{2(aq)}	0.024		
		Cu ₂ (OH) ₃ ⁺	22.72		
		Cu ₃ (OH) ₄ ²⁺	21.392		
		CuCl ⁺	0.491		
		CuSO _{4(aq)}	1.457		
		CuHCO ₃ ⁺	0.506		
		CuCO _{3(aq)}	11.778		
		Chronic test (<i>D. magna</i>)	M4	Cu ²⁺	4.717
				CuOH ⁺	2.875
				Cu(OH) _{2(aq)}	0.121
Cu ₂ (OH) ₃ ⁺	14.05				
Cu ₃ (OH) ₄ ²⁺	65.742				
CuCl ⁺	0.062				
CuSO _{4(aq)}	0.188				
CuHPO _{4(aq)}	0.018				
CuCO _{3(aq)}	11.624				
CuEDTA ²⁻	0.441				
CuHCO _{3(aq)}	0.079				
Cu ₂ H ₂ BO ₃ ⁺	0.028				
Cu(CO ₃) ₂ ²⁻	0.048				
Acute test (<i>V. fischeri</i>)	2% NaCl	Cu ²⁺	55.021		
		CuOH ⁺	2.769		
		Cu ₂ (OH) ₃ ⁺	0.135		
		Cu ₂ (OH) ₂ ²⁺	16.77		
		Cu ₃ (OH) ₄ ²⁺	103.714		
		CuCl ⁺	14.053		
		CuCl _{2(aq)}	0.526		

analysis. The results indicated that the polymeric shell in the CS prevented the release of total Cu by approximately 20% in both the acute and chronic tests at 0 h and 48 h. These results suggest that the polymeric coating PANI regulates the release of Cu ions in the medium, thus contributing to an increase in the biocidal activity of the CuO NPs in the NMs.

The Visual MINTEQ 3.0 calculated the ionic strength of the mediums, where the value was estimated as 0.0304. The results of the Cu ions speciation (Table 2) show that the principal species formed in the ISO medium were from the Cu²⁺ ions and complex (Cu₃(OH)₄²⁺ and Cu₂(OH)₃⁺). In the M4 medium, it was observed a greater quantity Cu²⁺ complex ions (Cu₃(OH)₄²⁺ and Cu₂(OH)₃⁺) were formed, followed by the Cu carbonate (CuCO_{3(aq)}). These species are usually found in aqueous media at high concentrations of Cu II and pH ≈ 6, as described by Powell et al. (2007) according to the following equations (Eqs. (2)–(6)):



Finally, in the NaCl (2%) medium, it was observed a greater quantity of Cu^{2+} ions in solution. The Cu^{2+} in ionic and complex forms are present in greater amounts in all media used in toxicity tests, therefore, the results of this speciation are directly related to the toxicity results presented in this paper.

3.2. Toxicological evaluation

3.2.1. Acute toxicity with *D. magna*

The acute toxicities of the CuO NPs, CS CuO/PANI, PANI and CuSO_4 (positive control) were evaluated, and these results showed that the CuO NPs and CS CuO/PANI presented high toxicity to *D. magna* (Fig. 3A). The same concentrations of CuO NPs and CS CuO/PANI were tested, and for both NMs, the concentration that resulted in the death of 100% of organisms after 48 h of exposure was 0.97 mg L^{-1} . The effective concentrations that resulted in an immobility of 50% of the exposed organisms in 48 h ($\text{EC}_{50,48\text{h}}$) for CuO NPs and CS CuO/PANI NC were 0.32 and 0.48 mg L^{-1} , respectively. PANI exhibited no acute toxicity to *D. magna* ($\text{EC}_{50,48\text{h}}$ of 99.21 mg L^{-1}). As expected, the positive control for this evaluation showed high toxicity ($\text{EC}_{50,48\text{h}}$ of 0.17 mg L^{-1}). The no observed effect concentration (NOEC) for the CuO NPs was 0.06 mg L^{-1} , and it was 0.012 mg L^{-1} for CS CuO/PANI.

A similar dose–response behavior between the CuO NPs and CS CuO/PANI was observed. It was also observed that the polymer coating did not significantly change the toxicological effects of the CuO NPs, which differed from other studies reported in the literature. Perreault et al. (2012) reported that the high toxicity of CS CuO NPs (CS of PSBA) was due to an increased capacity of the polymer-coated particles to penetrate the cell compared to bare CuO NPs, and Saison et al. (2010) reported that these same CS CuO NPs have the ability to induce strong toxicity effects in green alga; however, neither the CuO NPs nor the polymeric shell alone induced such an effect. Based on these results, it can be hypothesized that in the short term, PANI and their redox properties will delay the permeation of this NC through biological membranes, which are predominantly apolar. In our toxicological evaluation, we verified that PANI alone can also be considered non-toxic, and during the tests, mortality was observed only at the highest concentration (125 mg L^{-1}), possibly due to the effect of the strong color of the sample and the large amount of dispersed polymers in solution, resulting in death of the organisms by inhibition of the locomotion of *D. magna*. When PANI was used as the CS for the NPs, the NC exhibited greater stability than bare CuO NPs and did not change the pH of the solution (Table 1), which was then not considered as a cause of toxicity of the CS CuO/PANI.

Our results also showed that the toxicity cannot be completely related to the ability of the coating to penetrate cells due to their chemical and biological affinities but that it can be related to the size of the particles and the release of ions. Fig. 2 shows that agglomeration increased the size of the CS CuO/PANI by a few nanometers, but the toxicity between both NMs was similar. Table 3 shows that the CS functioned as a physical barrier that stops the solubilization of the NP core, thereby reducing the release of ions in solution and revealing that the cause of toxicity is the sum of factors (size, release of ions, and biological affinity) and not only isolated factors. Rossetto et al. (in preparation) verified that bulk CuO is less toxic and less soluble than CuO NPs, and in this case, the toxicity was due to the size and solubility of ions, and it was possible to observe that the CuO NPs can cause mitochondrial damage in *D. magna* after a short exposure time (48 h of exposure at the EC_{50}). The results of the control with CuSO_4 , which is a highly soluble salt, confirmed the high toxicity expected of copper ions, and this high toxicity can be justified by the fact that the Cu^{2+} ions can compete with other existing cations in solution on diluent test media and can increase the toxicity (Table 2).

Several mechanisms can contribute to toxic interactions of metal NPs with cellular systems. Heinlaan et al. (2008) also reported the relationship between toxicity and the release of Cu ions in *D. magna* and *V. fischeri*. However, Baek and An (2011), who studied several metallic oxide NPs (including CuO NPs), reported that toxicity related to the dissolved metal ions was insignificant in *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*, indicating that the induction of toxicity by metallic oxide NPs can be associated with the intrinsic toxic properties of heavy metals; furthermore, the apparent toxicities of the tested NPs to bacteria were identified as a function of particle toxicity. The actual toxicity of CuO NPs is still not fully known; however, in our study, we verified that the toxicity of CuO NPs to *D. magna* is not only dependent on the release of Cu ions but also on the size and properties of the CuO NPs. The sizes and types of coatings are also related to the interactions of the particles with culture media and with biological systems.

D. magna are filter feeders of materials in suspension, and this behavior, combined with the small size and solubility of Cu ions and the interactions of intracellular CuO NPs, can intensify the toxicological effects. This phenomenon is known and identified as the "Trojan Horse" effect. This effect was reported by Studer et al. (2010), who found that the intracellular solubilization of CuO NPs in mammalian cells was the major process in the toxicity of this NP.

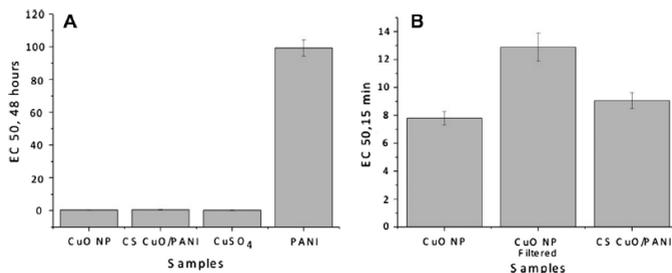


Fig. 3. EC_{50} to acute toxicities to *D. magna* and *V. fischeri*.

112

Ana Letícia de O.F. Rossetto et al./Chemosphere 108 (2014) 107–114

Table 3
Total Cu ions measured via ICP-MS.

NMs	Diluent	0 h (mg L ⁻¹)	48 h (mg L ⁻¹)
CuO NPs	ISO (acute)	112.5 ± 11.88	94.81 ± 7.64
CS CuO/PANI		91.13 ± 2.76	78.42 ± 3.45
CuO NPs	M4 (Chronic)	88.86 ± 7.20	109.98 ± 4.24
CS CuO/PANI		69.20 ± 7.40	82.71 ± 4.18
CuO NPs	2% NaCl (<i>V. fischeri</i>)	82.74 ± 6.34	n/a
CS CuO/PANI		66.22 ± 2.32	n/a

3.2.2. Chronic toxicity with *D. magna*

Chronic toxicity (Table 4) was investigated with CuO NPs, CS CuO/PANI, PANI and CuSO₄ (positive control). After 21 d of exposure, the reproduction and growth parameters were analyzed (Table 5). No adult mortality occurred in the test control over the 21 d test period. The mean number of live offspring produced per control parent animal was 147, and the minimum number was 99, and these values are considered valid according to OECD Guideline 211 for biological criteria (OECD, 2012).

With regard to the reproduction parameter, an increase in the numbers of neonates generated in the presence of CuO NPs, CS CuO/PANI and CuSO₄ was observed compared to the test control (M4 media; $p < 0.05$). This behavior (increase of neonates) may also be related to the organisms' attempt to preserve species when exposed to a stressful condition and can be related to an increase in disposable Cu in media due to the release of Cu ions from the CuO NPs. Compared to the test control, the total numbers of births in the NM dilutions increased over the two largest concentrations (0.12 mg L⁻¹ and 0.06 mg L⁻¹) and decreased in the two lower concentrations (0.01 and 0.03 mg L⁻¹). Although with the concentration of 0.01 mg L⁻¹ the number born was lower than the control ($p < 0.05$), more significant effects of CuO NPs were not verified, showing that at these concentrations, the Cu will most likely interfere with mitochondrial and enzymatic processes related to reproduction in the sub-lethal doses used for chronic tests. In our

chronic test with CuO NPs, the OEC was 0.12 mg L⁻¹ and the NOEC was 0.06 mg L⁻¹ (Table 4). For the CS CuO/PANI, an increase in births was observed in all the concentrations tested, making it impossible to determine the NOEC from this NM. For chronic test with CS CuO/PANI, the OEC was less than 0.12 mg L⁻¹ and the NOEC was less than 0.01 mg L⁻¹ (Table 3). With these chronic toxicity results, we can conclude that CS CuO/PANI was more toxic than CuO NPs for reproduction, regardless of the results of the acute test. With regard to PANI, a decrease in the number of neonates was observed compared to the control test. This decrease can be associated with high levels of PANI on the media, which may have functioned as a physical barrier to the penetration of light during the exposure time, thereby inhibiting complete development of the organisms. However, CS CuO/PANI did not exhibit the same coloration in solution, most likely because the PANI was immobilized on the NM and was not completely dissolved in the media.

Regarding the growth parameter, a reduction in the size of the exposed organisms was observed compared to the test control ($p < 0.05$) at all the concentrations of NM tested. This decrease was 8–14% for CuO NPs and 4–8% for CS CuO/PANI when compared with the test control. This size reduction can be associated with the poor quality and quantity of food during the test due to the toxicity of CuO NPs to *D. magna* and to *S. subspicatus* (food for *D. magna*). Several reports (Wang et al., 2011; Perreault et al., 2012) have shown that CuO NPs are toxic to green algae, such as *C. reinhardtii*, and that polymer-coated CuO NPs can result in intracellular interactions between the NPs and the cellular system of the algae. De Schampheleere et al. (2003) reported that Cu toxicity can be attributed to the dissolved Cu²⁺ ions in the media for the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Although Cu is an essential micronutrient used in enzymes involved in several metabolic processes, Cu ions may affect organisms negatively at concentrations higher than physiologically necessary, and long term, sub-lethal concentrations of trace metals may cause changes in growth, life cycle and reproduction in freshwater invertebrates (Timmermans,

Table 4
Chronic (reproduction and growth) toxicities of CuO NPs, CS CuO/PANI, PANI and CuSO₄ in *D. magna*.

Tests	CuO NPs		CS CuO/PANI		PANI		CuSO ₄	
	Reproduction	Growth	Reproduction	Growth	Reproduction	Growth	Reproduction	Growth
OEC (mg L ⁻¹)	0.12	0.01	<0.12	0.01	7.81	1.95	0.06	0.06
NOEC (mg L ⁻¹)	0.06	<0.01	<0.01	<0.01	3.12	0.97	–	–

Table 5
Behavior of *D. magna* in chronic exposure (reproduction and growth) to CuO NPs, CuO/PANI NC PANI and CuSO₄.

Samples	Concentration (mg L ⁻¹)	Reproduction (no. of neonates/SD)	Growth (Length: mm)
CuO NPs	Control	23.11/1.51	5.0/0.1
	0.01	23.05/1.64	4.5/0.4
	0.03	24.47/8.20	4.3/0.3
	0.06	23.47/3.60	4.4/0.3
	0.12	26.22/4.21	4.6/0.2
CS CuO/PANI	Control	23.11/1.51	5.0/0.1
	0.01	25.40/4.6	4.8/0.2
	0.03	26.36/4.01	4.5/0.3
	0.06	25.02/4.72	4.5/0.4
	0.12	25.45/3.19	4.6/0.3
PANI	Control	13.50/2.38	4.7/0.2
	1.9	14.64/1.67	4.2/0.2
	3.9	12.98/2.09	4.1/0.3
	7.8	11.05/1.94	4.0/0.1
	15.8	10.91/2.19	3.6/0.3
CuSO ₄	Control	23.11/1.51	5.0/0.1
	0.06	25.46/4.06	4.6/0.6

1993). De Schampelaere et al. (2004) showed an increase in reproduction in *D. magna* fed with cells of *P. subcapitata* exposed to copper at $70 \mu\text{g L}^{-1}$, confirming our results that also showed an increase of neonates 21 d after exposure. For the test with PANI, a decrease in growth of 4–22% was also observed compared to the test control.

3.2.3. Acute toxicity with *V. fischeri*

The initial concentration tested for the CuO NPs and CS CuO/PANI was 125 mg L^{-1} . When comparing the results of the CuO NPs and CS CuO/PANI (Fig. 3B), a mild decrease in toxicity to CS CuO/PANI was observed ($p > 0.05$). This reduction can also be associated with the encapsulation of CuO by the PANI shell, which inhibits the release of Cu ions in the medium (Table 3) and increases the particle size due to the coating, modifying the reactivity of the particle. A filtration procedure ($0.45 \mu\text{m}$) was performed to ensure that the color did not affect the results. It was verified that this process did not interfere significantly in the toxicity of the particle, as one time the results presented values that were close to $\text{EC}_{0.15\text{min}}$ (Fig. 3B), and the NM also had a smaller size than the membrane pore used in this filtration and could pass through the membrane.

4. Conclusions

CuO NPs and CS CuO/PANI were synthesized, and the characterizations of these materials confirmed the polymeric coating of the CuO NPs with PANI. Our study showed that the CS of PANI decreased the release of ions, which may subsequently prolong the working life of the particle and the potential toxicological effects. When our results were compared with those from other authors, it was evident that there is a difference in sensitivities among crustaceans, algae and bacteria. Our study demonstrated that *D. magna* and bacteria were more sensitive to CuO NPs than to CS CuO/PANI in the acute test; however, for the chronic test (*D. magna*) in the reproduction parameter, CS CuO/PANI was shown to be more toxic than CuO NPs, highlighting the need for short- and long-term testing to better understand the toxicity of NPs.

Acknowledgments

The authors acknowledge the *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES) and *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico* (CNPq) Brazil for their financial support, and the support of LCME/UFSC for the TEM analysis.

References

Almeida, E., Diamantino, T.C., de Sousa, O., 2007. Marine paints: the particular case of antifouling paints. *Prog. Org. Coat.* 59, 2–20.

Baek, Y.-W., An, Y.-J., 2011. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb_2O_3) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Sci. Total Environ.* 409, 1603–1608.

Bhadra, S., Khashtgir, D., Singha, N.K., Lee, J.H., 2009. Progress in preparation, processing and applications of polyaniline. *Prog. Polym. Sci.* 34, 783–810.

CETESB, 2001. L5227 – Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio. Sao Paulo, SP.

Chu, S.F., 1942. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae: Part I. Methods and culture Media. *Int. J. Ecol.* 30, 284–325.

Curtis, J., Greenberg, M., Kester, J., Phillips, S., Krieger, G., 2006. Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians. *Toxicol. Rev.* 25, 245–260.

Das, D., Nath, B.C., Phukon, P., Dolui, S.K., 2013. Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles. *Colloids Surf., B* 101, 430–433.

de Albuquerque, J.E., Mattoso, L.H.C., Faria, R.M., Masters, J.G., MacDiarmid, A.G., 2004. Study of the interconversion of polyaniline oxidation states by optical absorption spectroscopy. *Synth. Met.* 146, 1–10.

De Schampelaere, K.A.C., Vasconcelos, F.M., Heijerick, D.G., Tack, F.M.G., Delbeke, K., Allen, H.E., Janssen, C.R., 2003. Development and field validation of a

predictive copper toxicity model for the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Environ. Toxicol. Chem.* 22, 2454–2465.

De Schampelaere, K.A.C., Heijerick, D.G., Janssen, C.R., 2004. Comparison of the effect of different pH buffering techniques on the toxicity of copper and zinc to *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Ecotoxicology* 13, 697–705.

Deng, J., He, C., Peng, Y., Wang, J., Long, X., Li, P., Albert, S.C.C., 2003. Magnetic and conductive Fe_3O_4 -polyaniline nanoparticles with core-shell structure. *Synth. Met.* 139, 295–301.

DIN, 1989. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; bio-assays (group I); determining the tolerance of *Daphnia* to the toxicity of waste water by way of a dilution series (1.30) (German).

Du, X.S., Xiao, M., Meng, Y.Z., 2004. Facile synthesis of highly conductive polyaniline/graphite nanocomposites. *Eur. Polym. J.* 40, 1489–1492.

El-Trass, A., Elshamy, H., El-Mehasseb, I., El-Kemary, M., 2012. CuO nanoparticles: synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids. *Appl. Surf. Sci.* 258, 2997–3001.

EPA, 2002a. EPA-821/R02-012 – Methods for Measuring Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. Washington, DC.

EPA, 2002b. EPA-821/R02-013 Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Water to Freshwater Organisms. Washington, DC.

Flohr, L., de Castilhos Júnior, A.B., Matias, W.G., 2012. Acute and chronic toxicity of soluble fractions of industrial solid wastes on *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Sci. World J.* 2012, 643984.

Griffith, R.J., Luo, J., Gao, J., Bonzong, J.-C., Barber, D.S., 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem./SETAC* 27, 1972–1978.

Heinlaan, M., Ivask, A., Bilnova, I., Dubourguier, H.-C., Kahru, A., 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere* 71, 1308–1316.

ISO, 2000. ISO 10706:2000 – Water quality – Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ISO/TC 147/SC5 – Water quality/Biological methods. Switzerland.

ISO, 2007. ISO 11948-3:2007 – Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried bacteria. ISO/TC 147/SC5 – Water quality/Biological methods. Switzerland.

ISO, 2012a. ISO 6341:2012 – Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test. Switzerland.

ISO, 2012b. ISO 8692:2012 – Water quality – Fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae. Switzerland.

Jeong, Y.S., Oh, W.-K., Kim, S., Jang, J., 2011. Cellular uptake, cytotoxicity, and ROS generation with silica/conducting polymer core/shell nanoparticles. *Biomaterials* 32, 7217–7225.

Johnston, H.J., Hutchison, G.R., Christensen, F.M., Aschberger, K., Stone, V., 2010. The biological mechanisms and physicochemical characteristics responsible for driving fullerene toxicity. *Toxicol. Sci.* 114, 162–182.

Klaine, S.J., Alvarez, P.J.J., Batley, G.E., Fernandez, T.F., Handy, R.D., Lyon, D.Y., Mahendra, S., McLaughlin, M.J., Lead, J.R., 2008. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 1825.

Lee, S.-P., Chen, Y.-J., Ho, C.-M., Chang, C.-P., Hong, Y.-S., 2007. A study on synthesis and characterization of the core-shell materials of Mn1-xZnxFe₂O₄-polyaniline. *Mater. Sci. Eng. B* 143, 1–6.

Massarotti, V., Capsoni, D., Bini, M., Altomare, A., Moliterni, A.G.G., 1998. X-ray powder diffraction ab initio structure solution of materials from solid state synthesis: the copper oxide case. *Z. Kristallogr.* 213, 259–265.

OECD, 2012. Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals – Effects on Biotic Systems. OECD Publishing, Section 2, 23 p.

Perreault, F., Ouakroum, A., Melegari, S.P., Matias, W.G., Popovic, R., 2012. Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere* 87, 1388–1394.

Powell, K.J., Brown, P.L., Byrne, R.H., Gajda, T., Heffer, G., Sjöberg, S., Wanner, H., 2007. Chemical speciation of environmental significant metals with inorganic ligands Part 2: The Cu^{2+} -OH⁻, Cl⁻, CO₃²⁻, SO₄²⁻, and PO₄³⁻ systems. *Pure Appl. Chem.* 79, 895–950.

Rossetto, A.O.F., Melegari, S.P., Ouriques, L.C., Matias, W.G., CuO nanoparticles enhance chronic and acute toxicity compared to bulk CuO. *Sci. Total Environ.* (in preparation).

Saison, C., Perreault, F., Daigle, J.-C., Fortin, C., Claverie, J., Morin, M., Popovic, R., 2010. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicol.* 96, 109–114.

Salvaterra, R.V., Oliveira, M.M., Zarbin, A.J.G., 2010. One-pot synthesis and processing of transparent, conducting, and freestanding carbon nanotubes/polyaniline composite films. *Chem. Mater.* 22, 5222–5234.

Saeder, A.M., Limbach, L.K., Van Daele, L., Krumeich, F., Athanassiou, E.K., Cerber, C.L., Moch, H., Stark, W.J., 2010. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 197, 169–174.

Timmermans, K.R., 1993. Accumulation and effects of trace metals in freshwater invertebrates. In: Dallinger, R., Rainbow, P.S. (Eds.), *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*. CRC Press, London, UK, pp. 133–148.

Author's personal copy

114

Ana Leticia de O.F. Rossetto et al./Chemosphere 108 (2014) 107–114

Villalba, P., Ram, M.K., Gomez, H., Bhethanabotla, V., Helms, M.N., Kumar, A., Kumar, A., 2012. Cellular and in vitro toxicity of nanodiamond-polyaniline composites in mammalian and bacterial cell. *Mater. Sci. Eng., C* 32, 594–598.

Wang, Y., Aker, W.G., Hwang, H., Yedjou, C.G., Yu, H., Tchounwou, P.B., 2011. A study of the mechanism of in vitro cytotoxicity of metal oxide nanoparticles using

catfish primary hepatocytes and human HepG2 cells. *Sci. Total Environ.* 409, 4753–4762.

Yslas, E.I., Ibarra, L.E., Peralta, D.O., Barbero, C.A., Rivarola, V.A., Bertuzzi, M.L., 2012. Polyaniline nanofibers: acute toxicity and teratogenic effect on *Rhinella arenarum* embryos. *Chemosphere* 87, 1374–1380.



Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*



Ana Letícia de O.F. Rossetto^a, Sílvia Pedrosa Melegari^a, Luciane Cristina Ouriques^b, William Gerson Matias^{a,*}

^a Laboratório de Toxicologia Ambiental, IARTOX, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, ZIP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^b Laboratório de Biologia Celular Vegetal, Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 88049-900, CP-475, Florianópolis, SC, Brazil

HIGHLIGHTS

- CuO NPs were more toxic than MPs in acute toxicity with *D. magna* and *V. fischeri*.
- CuO NPs affected reproduction and growth of *D. magna*.
- Morphological changes were observed for *D. magna* after chronic toxicity tests.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 October 2013

Received in revised form 7 May 2014

Accepted 7 May 2014

Available online 5 June 2014

Editor: Daniela Baraloto

Keywords:

Chronic test

Daphnia magna

Vibrio fischeri

Copper oxide nanoparticle

Copper oxide microparticle

ABSTRACT

Copper oxide (CuO) has various applications, as highlighted by the incorporation of this compound as a biocide of antifouling paints for coating ships and offshore oil platforms. The objective of this study was to evaluate and compare the aquatic toxicity of CuO nanoparticles (NPs) and microparticles (MPs) through acute and chronic toxicity tests with the freshwater microcrustacean *Daphnia magna* and anaerobic toxicity test with the bioluminescent marine bacterium *Vibrio fischeri*. Acute toxicity results for *D. magna* in tests with CuONPs ($EC_{50, 24 h} = 22.36 \text{ mg L}^{-1}$) were ten times higher than those for tests with CuOMPs ($EC_{50, 24 h} = 223.6 \text{ mg L}^{-1}$). In both periods of exposure of *V. fischeri*, the CuONPs ($EC_{50, 30 d} = 248 \pm 56.39$ – equivalent to 12.40% ; $EC_{50, 30 d} = 257.6 \pm 30.8 \text{ mg L}^{-1}$ – equivalent to 1.28%) were more toxic than the CuO MPs ($EC_{50, 15 d} = 2404.6 \pm 277.4$ – equivalent to 60.1% ; $EC_{50, 30 d} = 1472.9 \pm 244.7 \text{ mg L}^{-1}$ – equivalent to 36.82%). In chronic toxicity tests, both forms of CuO showed significant effects ($p < 0.05$) on the growth and reproduction parameters of the *D. magna* relative to the control. Additionally, morphological changes, such as lack of apical spine development and malformed carapaces in *D. magna*, were observed for organisms after the chronic test. The toxicity results demonstrate that CuO NPs have a higher level of toxicity than CuO MPs, emphasizing the need for comparative toxicological studies to correctly classify these two forms of CuO with identical CAS registration numbers.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Although nanotechnology has brought great technological advances, there has been uncertainty regarding the behavior of nanomaterials and their interactions with the environment (Cerdeira et al., 2011; Silva et al., 2011), especially the aquatic ecosystem, which is one of the final destinations where these materials accumulate (Sánchez et al., 2013). The aquatic ecosystem can be contaminated by nanopollutants (Bair et al., 2010), especially metallic nanoparticles, the principle type of

nanoparticles (NPs). These NPs are synthesized and utilized in large-scale industrial applications, e.g., copper oxide (CuO) NPs are used as antifouling agents in paints (Perreault et al., 2012) for ships and offshore oil platforms and applications in antimicrobial textiles (Ren et al., 2009; Dasjetti and Montazer, 2010; Delgado et al., 2011). Thus, these NPs can interact with and affect aquatic organisms.

Comparative studies of nanoscale and microscale materials are important because the intrinsic characteristics of NPs may be directly related to their toxicity, and comprehensive characterization of suspensions of these particles is necessary (Ribeiro et al., 2013). The size, shape, composition, aggregation and solubility of NPs, especially metal-based nanomaterials, may be related to their toxicity (Griffith et al., 2007). Moreover, several studies have shown that the total dissolved Cu in CuO nanoparticles is the major source of their toxicity (Heinrich et al., 2008; Araujo et al., 2009; Kazemets et al., 2009; Mortimer et al., 2010).

* Corresponding author at: Lab. oxidolo de Toxicologia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Caixa Postal 476, CEP 88.010-970 Florianópolis, SC, Brazil. Tel.: + 55 48 3721-7742; fax: + 55 48 3721-9823.

E-mail address: willgersonmatias@ufsc.br (W.G. Matias).

Due to their small size, NPs may cross biological barriers and reach various organs (Perreault et al., 2002). Observations of the effects of size and surface properties on the accumulation of metal NPs in different organisms *in vivo* have been reported (Li and Chen, 2011). Heinlian et al. (2008) affirmed that a principle mechanism of the toxicity of ZnO, CuO and TiO₂ NPs is related to oxidative stress, which damages lipids, carbohydrates, proteins and DNA.

Reisner and Matsuura (1997) demonstrated that reactive oxygen species (ROS) may be formed by radicals of transition metals or other chemical species on particle surfaces or as a consequence of interactions between particles and cellular components. Fenton and Haber–Weiss reactions catalyzed by Cu ions produce ROS *in vitro* that cause oxidative damage. Knauer and Knauer (2008) recently demonstrated that ROS production plays a key role in the toxicity of Cu and is associated with effects of Cu on photosynthetic activity. Additionally, the formation of ROS can change the cellular integrity of green algae (Saison et al., 2010). Thus, oxidative stress enables the entry of nanomaterials into trophic levels, initially damaging producers, then primary consumers, and finally presenting a risk to humans (Zarbin, 2007).

CuO NPs are highly toxic at different trophic levels: fish (Griffith et al., 2007), invertebrates (Buffet et al., 2011), protozoa (Mortimer et al., 2010), bacteria (Baek and An, 2011) and yeast (Kasemets et al., 2009). Perreault et al. (2010) used fluorescence imaging of chlorophyll to assess the toxicity of CuO NPs in *Lemma gibba*. Additionally, Perreault et al. (2012) investigated the toxicity of CuO NPs in *Chlamydomonas reinhardtii* green algae by observing the intracellular bioaccumulation of CuO NPs. Both studies reported important toxicological effects of CuO NPs. Furthermore, Wang et al. (2011) evaluated the toxicity of CuO NPs in *Microcystis aeruginosa* algae and observed a greater than 54% growth inhibition after exposure for 4 days to a concentration of 0.5 mg L⁻¹. The above findings demonstrate the need for studies that can confirm the hypothesis that NPs have greater toxicity than MPs.

Although there are several studies in the literature, much is still unknown about the behavior of CuO NPs in direct contact with cells in human beings, animals, bacteria and plants. Furthermore, Karlsson et al. (2009) compared the toxicity of CuO NPs and microparticles (MPs) at the cellular level (human cell line A549) and reported greater toxicity for NPs than MPs.

Microcrustaceans and bacteria are good representatives of different trophic levels, and they are used widely in toxicity tests and as bioindicators in toxicology studies with NPs. The present study evaluated and compared acute and chronic toxicities of CuO in NPs and MPs by exposing fresh water microcrustacean *Daphnia magna* and marine bacteria *Vibrio fischeri* to the materials. Additionally, this study investigated physical interactions of CuO NPs with *D. magna* using light and transmission electronic microscopies to determine the penetration of CuO NPs into this organism.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

CuO nanopowder was obtained from MTI Corporation (Richmond, CA) and, according to the manufacturer, had an average size of 30–40 nm and a minimum purity of 99%. Stock solutions of CuO nanoparticles were prepared in ultrapure water (2000 mg L⁻¹) and sonicated for 30 min using an ultrasonic cell disruptor (Ultracup – 100 W) at 99% of its maximum power. These suspensions were stored in the dark at 4 °C. The CuO MPs were obtained from Vetec (Rio de Janeiro, Brazil), and their purity was 99%. Stock solutions of CuO MPs were prepared at a concentration of 4000 mg L⁻¹, which was analogous to the stock solutions of NPs, but the stock solutions of MPs were not sonicated. The pH was measured with a potentiometer, a multi-parameter pH analyzer (Consort C535, Belgium), for *D. magna* and *V. fischeri*. The salinity was measured with a salinity refractometer (Impac IPS-105, Brazil), and *V. fischeri* (NRRL B-11177, recently named *Allivibrio fischeri*) was purchased from SD88-

Microtox acute reagent. Parameters were monitored during the course of these procedures to minimize any interference in the results of the toxicity tests, which were performed with the particle suspensions.

2.2. Characterization of CuO NPs and MPs

CuO NP and MP suspensions were characterized in ultrapure water at a concentration of 2000 mg L⁻¹. Transmission electron microscopy (TEM) (JEM-1011 TEM, 100 kV) was used to determine the sizes and shapes of the particles. Drops of the NP suspension were placed on a carbon-Cu grid (300 mesh) and dried in a desiccator under vacuum for 24 h. Additionally, particle sizes and shapes were characterized by scanning electron microscopy (SEM-FEG) (JEDL – JSM-6701 F). Droplets of suspensions were placed on stubs, coated with 5 nm of gold and stored in a desiccator under vacuum for 24 h. The zeta potential (Pz) of the NPs and MPs were determined in ultrapure water using the electrophoretic mobility method with the ZetaPlus system (Brookhaven Instruments Corporation, USA). The hydrodynamic diameter was measured for solutions of 2 g L⁻¹ in ultrapure water by dynamic light scattering with a ZetaPlus particle sizer (Brookhaven Instruments Corporation, USA). The concentrations of free fraction Cu ions were evaluated by centrifuging samples (3000 g, 10 min), filtering and acidifying the supernatant (0.20 μ) and performing graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) measurements. The ratios of Cu ions to NPs and MPs were determined using solutions of 2 g L⁻¹ in ultrapure water. The surface areas of the original NP and MP powders were determined using a NOVA® surface area analyzer (Quantachrome Instruments) and methodology based on procedures described by Webb and Orr (1997). The crystallite size was determined by X-ray diffraction (XRD); X-ray diffractograms were recorded in the angular range of 2θ = 20°–30° with a step size of 0.05 and a time step of 1 s using a Philips X'Pert diffractometer equipped with a copper tube (CuKα, λ = 1.54056 Å). The mean crystallite size (D) was calculated for each type of CuO particle using the Scherrer Eq. (1),

$$D = \frac{0.9\lambda}{\beta \cos \theta} \quad (1)$$

where λ is the radiation wavelength, β is the full-width at half-maximum of the principle peak in radians, and θ is half of the diffraction angle.

2.3. Toxicity tests

2.3.1. *D. magna* culture

D. magna Strain 1820 (Gadoceia, Crustacea), was cultivated according to ISO 6341 (ISO, 2012a) and DIN 38412-30 (DIN, 1989) protocols. These microcrustaceans were cultivated in lots of 25 to 30 adult organisms in M4 culture medium in 2 L beakers with diffuse luminosity, a photoperiod of 16 h of light and a controlled temperature of 20 ± 2 °C. The *D. magna* culture was fed with algae, *Skeletonema subspicatus* (ISO, 2012b), which were cultivated in CHU growth medium (Chu, 1942) (Supplementary Table S1).

2.3.2. Acute toxicity test with *D. magna*

Acute toxicity tests with *D. magna* were performed according to ISO 6341 (ISO, 2012a) with neonates (2–26 h) exposed for 48 h. The samples were diluted in reconstituted water called ISO media (23.52 mg L⁻¹ CaCl₂·2H₂O; 98.64 mg L⁻¹ MgSO₄·7H₂O; 4.64 mg L⁻¹ KCl; 51.84 mg L⁻¹ NaHCO₃) at a controlled temperature of 20 ± 2 °C without luminosity. The endpoint used for the toxicological evaluation was the immobility of the organism. Toxicity tests were performed in 50 mL beakers by exposing 20 organisms per dilution. The NP and MP stock solutions were prepared at a concentration of 2000 mg L⁻¹, and dilutions were prepared from 2000 to 3.60 mg L⁻¹. CuSO₄ in a concentration range of 125 to 0.48 mg L⁻¹ was used as a positive control, and ISO medium was used as a negative control. The EC₅₀ was calculated using the trimmed

Spearman–Kärber statistical method according to EPA 821-R-02-012 (EPA, 2002a).

2.3.3. Chronic toxicity test with *D. magna*

Chronic toxicity tests were performed according to ISO 10706 (ISO, 2000), and each organism was fed with *S. subspicatus* (5×10^6 cells per individual organism). The fecundity (number of neonates), longevity (of surviving organisms) and growth (organism length) were analyzed after 21 days of exposure. Each test was performed with 4 dilutions, a negative control (M4 medium) and a positive control (CuSO_4). These dilutions, defined according to results observed in the acute toxicity test, followed a geometric progression with a ratio of 2 starting from the concentration that had no effect on the exposed organisms over 48 h. The NP and MP stock solutions were prepared at a concentration of 2000 mg L^{-1} . The dilutions were 7.80 to 0.79 mg L^{-1} for NPs, 62.5 to 7.80 mg L^{-1} for MPs and 0.06 mg L^{-1} for CuSO_4 . For each dilution, there were 10 replicates that each contained one neonate of *D. magna* in an individual 50 mL beaker. Each beaker received an aliquot of 25 mL of test solution. Test samples were maintained under the same conditions as those used for cultivation, i.e., diffuse luminosity, a photoperiod of 16 h and a temperature of $20 \pm 2^\circ \text{C}$. During the test, organisms were fed with *S. subspicatus* algae cultivated in CHU growth media, and the medium was changed every 48 h.

Daily observations were performed to determine the number of surviving organisms and the growth and number of neonates. Results were analyzed statistically using one-way ANOVA according to EPA 821-R-02-013 (EPA, 2002b). A level of $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

2.3.4. Acute toxicity test with *V. fischeri*

The acute toxicity test with the bioluminescent marine bacteria *V. fischeri* (lyophilized) was performed according to the methodology proposed by ISO 11348-3 (ISO, 2007) and NBR 15411-3 (ABNT, 2012). Samples were diluted with 2% NaCl. This test was used to determine toxicity based on inhibition of bioluminescence emitted by bacteria after contact times of 15 and 30 min for each sample ($\text{EC}_{50, 15 \text{ min}}$ and $\text{EC}_{50, 30 \text{ min}}$, respectively). Toxicity tests were conducted under controlled temperatures in a Microtox® equipment at $15 \pm 1^\circ \text{C}$ for exposures and $3^\circ \text{C} \pm 3^\circ \text{C}$ for the bacterial reagent. The $\text{EC}_{50, 15 \text{ min}}$ and $\text{EC}_{50, 30 \text{ min}}$ were calculated using a Microtox Omni v. 4.0 software (AZUR Environmental – Carlsbad, CA, USA). The initial concentration analyzed for NPs was 2000 mg L^{-1} , whereas for MPs, the initial concentration was 4000 mg L^{-1} . The dilutions tested for NPs were 1000, 1000, 667, 500, 333, 250, 167 and 125 mg L^{-1} , and the dilutions tested for MPs were 2000, 2000, 1333, 1000, 667, 500, 333 and 250 mg L^{-1} . NP and MP suspensions remained at rest for 30 min prior to the start of the toxicity test to reduce the interference caused by sample color, i.e., the loss of luminescence resulting from the absorption or scattering of light, as recommended by CETESB 15.2227 (CETESB, 2001). The supernatant was used for these tests.

2.4. Analysis by light microscopy

D. magna organisms were exposed to NPs and MPs for the $\text{EC}_{50, 48 \text{ h}}$ assay and fixed in a solution of 2.5% paraformaldehyde diluted in phosphate buffer (0.2 M), pH 7.2, for 4 h at 4°C . After the fixation process, organisms were washed twice for 10 min in phosphate buffer (0.2 M) (Ouriques et al., 2011). Next, the fixed organisms were dehydrated through a gradient of ethanol solutions (30% to 100%) where the concentration was changed every 15 min except for the 100% ethanol, which was changed twice. Then, the material was pre-inked with a 1:1 mixture of 100% ethanol and Historesin (Leica Historesin, Heidelberg, Germany) for 24 h; shortly thereafter, samples were infiltrated with pure Historesin for 24 h. The inclusion was performed in histo-molds for 2–3 h at room temperature. Samples were cut with a manual paraffin microtome (LEICA RM 2135) fitted with a tungsten

knife. Sample sections ($5 \mu\text{m}$) were observed and photographed using an Olympus light microscope system with image capture capability and a digital camera (Olympus Q-Color-3C, America Ind.).

2.5. Analysis by electronic microscopy – TEM

D. magna organisms exposed to NPs and MPs for the $\text{EC}_{50, 48 \text{ h}}$ assay were fixed in a solution of 4% paraformaldehyde and 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, for 4 h. The fixation step was followed by 3 washes of 10 min each with the same buffer. Then, the material was post-fixed in 1% osmium tetroxide (OsO_4) in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, for 2 h at room temperature. The material was washed in 0.1 M cacodylate buffer at pH 7.2 ($3 \times 10 \text{ min}$) and dehydrated through a gradient of acetone solutions (30%, 50%, 70%, 90% and 100%) for 20 min at each concentration except the 100% acetone, which was changed twice after 15 min per dehydration. The dehydrated samples were infiltrated with Spurr resin by using a sequence of solutions with increasing concentrations of Spurr in acetone with 100% acetone + 3:1 resin (4 h), 2:1 (4 h), 1:1 (4 h) 1:2 (4 h) and 1:3 (4 h), and twice in pure resin for 4 h each time. The material was polymerized in histological molds in an oven at 70°C for 24 h. Ultrathin slices were made using a diamond knife and contrasted with 2% uranyl acetate for 10 min in the dark and, subsequently, with 1% lead citrate for 5 min. Ultrathin sections were observed and photographed using a JEOL (JEM) 1001 transmission electron microscope at the Central Laboratory for Electron Microscopy (LCME-UFSC).

3. Results and discussion

3.1. Characterization of NP and MP suspensions

The sizes and shapes of agglomerates were evaluated using TEM and SEM-EDC (Fig. 1). According to TEM and SEM-EDC micrographs, the average NP size was 200–300 nm in ultrapure water, and the average MP size was greater than 1.5 μm . Studies have reported that nanoparticles are more toxic than MPs (Kasemets et al., 2009) and have suggested that the size is one of the key factors influencing the toxic effects of NPs. The surface and sizes of particles were evaluated from FEG-SEM micrographs of CuO NPs (Fig. 1B) and CuO MPs (Fig. 1D). The NP size correlates directly with many characteristics, such as surface properties, solubility and chemical reactivity, and some characteristics affect interactions between nanomaterials and biomolecules that subsequently influence the nanotoxicological behavior of NPs *in vivo* (Zhao et al., 2007). The surface area of CuO NPs and MPs in this study were 5.38 and $2.80 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, respectively. The P_z for the initial solutions of NPs and MPs were -34.13 mV (more unstable) and -33.68 mV , respectively. The hydrodynamic diameters of the NPs and MPs were $302 \pm 31.37 \text{ nm}$ and $1.89 \pm 88.5 \mu\text{m}$, respectively, and the NP distribution is shown in Fig. 1E.

The average crystallite sizes of the two types of CuO particles were calculated from X-ray diffractograms (Fig. 1F). From the obtained diffraction peaks, it was evident that these CuO NPs and CuO MPs have crystalline structures with face-centered cubic geometry. The average crystallite sizes were calculated using expression (1) to obtain average values of $D \approx 38.47 \pm 3.95 \text{ nm}$ and $D \approx 35.48 \pm 4.83 \text{ nm}$ for NPs and MPs, respectively.

3.2. Quantification of the free fraction of Cu ions

The free fraction of Cu ions in these samples was quantified using GFAAS. CuO NPs and MPs released 2.51 ± 0.12 and $0.37 \pm 0.08 \text{ mg Cu L}^{-1}$, respectively. This result indicates that the intrinsic characteristics of NPs enable them to release a greater amount of Cu ions into solution compared to MPs. Shi et al. (2011) reported that the solubility of CuO NPs changes with pH and the presence of other ions. According to Shi et al. (2011), the dissolution of CuO NPs increases with time over a 2 day period; within 48 h after the addition of water,

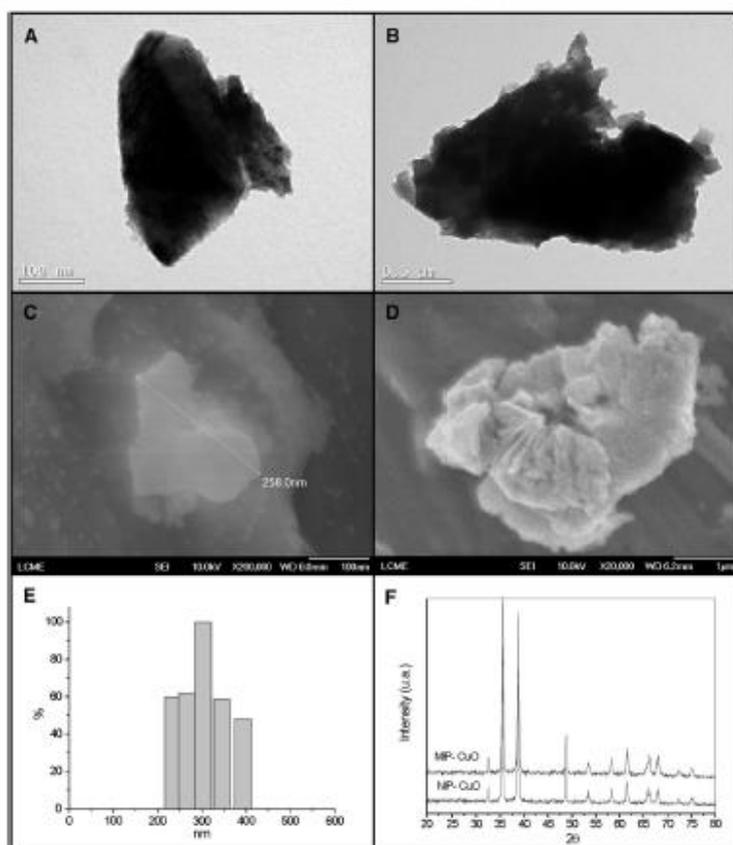


Fig. 1. TEM images of CuO NPs (A) and CuO MPs (B) in ultrapure water; SEM-EDS images of CuO NPs and CuO MPs (C) and CuO MPs (D) in ultrapure water; (E) Histogram of the hydrodynamic diameter distribution of Pz; (F) X-ray diffractograms of the CuO NPs and CuO MPs.

more than 80% of the total soluble Cu is released. According to Olivero-Verbe et al. (2008), the presence of the nutrient solution can increase Cu^{2+} dissolution because complexation of CuO with the nutrient may produce chemical reactions that facilitate the solubilization of toxic substances from the solid matrix into the aqueous phase. Thus, these results relate directly to results presented in Section 3.3.

3.3 Toxicological evaluation

3.3.1 Acute toxicity with *D. magna*

The results of the $\text{EC}_{50,48\text{h}}$ determination for CuO NPs, CuO MPs and CuSO_4 are presented in Table 1. These results indicate that CuO NPs

were 30 times more toxic than CuO MPs. The concentrations that resulted in 100% mortality of organisms after 48 h of exposure (Fig. 2) were 125 mg L^{-1} for NPs and 500 mg L^{-1} for MPs. The no-observed effect concentration (NOEC) for NPs was 7.6 mg L^{-1} , whereas the NOEC for MPs was 31.2 mg L^{-1} . These results demonstrate that MPs behave differently from NPs, which relates directly to $\text{EC}_{50,48\text{h}}$. For the positive control, CuSO_4 , the concentration that yielded an organism mortality of 100% after 48 h of exposure was 0.15 mg L^{-1} , and the NOEC was 0.0195 mg L^{-1} . The positive control reveals that *D. magna* is very sensitive to Cu ions, which can be explained by competition between existing cations in the diluent medium of the test that increased the toxicity of Cu.

Table 1
Results of acute and chronic toxicity tests. Effective concentrations for acute toxicity at 48 h (EC_{50}) and effects on the reproduction, longevity and growth of *D. magna* exposed to CuO nanoparticles and CuO microparticles for 21 days for chronic toxicity. Each result is expressed as the mean (10 replicates) \pm standard deviation.

Sample	Acute		Chronic		
	EC_{50} (mg L ⁻¹)	Concentration (mg L ⁻¹)	Reproduction: No. of neonates/brood	Growth: length (mm)	Longevity: No. of survivors
NP CuO		Control	18 \pm 2	5.02 \pm 0.11	1 \pm 0
		0.9	17 \pm 2	4.49 \pm 0.36 ^{a,b}	1 \pm 0
	22 \pm 0.70	1.9	18 \pm 3	4.42 \pm 0.34 ^a	1 \pm 0
		3.9	18 \pm 7 ^a	4.00 \pm 0.20 ^a	1 \pm 0
		7.8	21 \pm 3 ^{a,b}	4.39 \pm 0.37 ^a	1 \pm 0
MP CuO		Control	18 \pm 2	5.02 \pm 0.11	1 \pm 0
		7.8	19 \pm 2	4.61 \pm 0.44 ^{a,b}	1 \pm 0
	223.6 \pm 9.2	15.6	18 \pm 3 ^a	4.95 \pm 0.39 ^a	0.9 \pm 0.31
		31.2	20 \pm 2 ^{a,b}	4.23 \pm 0.41 ^a	1 \pm 1
		62.5	19 \pm 2 ^{a,b}	4.44 \pm 0.46 ^a	0.9 \pm 0.31
CuSO ₄		Control	18 \pm 2	5.02 \pm 0.11	1 \pm 0
	0.10 \pm 0.25	0.05	21 \pm 4	4.27 \pm 0.44	1 \pm 0

^a Values which differ significantly from control ($p < 0.05$).

^b OEC – observed effect concentration.

^c NOEC – no observed effect concentration.

The effects observed in our study are consistent with those presented by Hehner et al. (2008), who reported EC_{50} values of 3.2 mg L⁻¹ for CuO NPs, 164.8 mg L⁻¹ for CuO MPs and 0.17 mg L⁻¹ for CuSO₄. Bilinova et al. (2010) also presented toxicity values of 2.6 mg L⁻¹ for CuO NPs, 1.32 mg L⁻¹ for CuO MPs and 0.07 mg L⁻¹ for CuSO₄. The differences between the toxicity values found in this study and those cited in studies from the literature may relate to discrepancies of sizes and surface areas of the evaluated NPs and the release of Cu ions from the test media, which occurs through an oxidation reaction due to dissolved oxygen (DO) in the test medium. Bilinova et al. (2010) reported that the toxicity of CuO NPs in river water is related to dissolved metal ions. However, Baik and An (2011), who evaluated CuO NPs, NiO NPs, ZnO NPs and Sb₂O₃ NPs, reported that the toxicity related to dissolved metal ions is insignificant with respect to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Streptococcus aureus*, indicating that the induction mechanism of toxicity of metal NPs is still not fully known. Additionally, the correlation between toxicity and the bioavailability of Cu ions in media can be explained by the fact that *D. magna* is a microcrustacean filter feeder of suspended material.

Light microscopy micrographs (Fig. 3A and C) show the presence of both types of particles in the midgut of *D. magna*. The cross-sectional images of *D. magna* after 48 h of exposure to the EC_{50} values show the presence of NPs inside the midgut by light microscopy and the presence of agglomerates of CuO NPs (Fig. 3B) by TEM. However, there was greater visual accumulation of NPs compared with MPs in the midgut. The ingestion of NPs as well as the direct contact of *D. magna* with NPs (which have greater surface area and release more Cu ions than MPs) may potentiate toxicological effects in the diluent test. The close contact of

NPs with the midgut wall may accelerate the induction of toxicological processes through the release of Cu ions directly into the midgut of *D. magna* by oxygen reduction reactions.

Mitochondrial damage observed in all organisms exposed to CuO NPs on TEM micrographs (data not shown) can be related to the generation of reactive oxygen species (ROS) that can initiate DNA damage. However, this evaluation is not conclusive, and further investigations should be conducted to evaluate this effect.

3.3.2 Acute toxicity with *V. fischeri*

The initial NP and MP concentrations in these tests were 2000 and 4000 mg L⁻¹, respectively. The concentration-dependent behavior of NP and MP CuO is shown in Fig. 4A and B. The NPs induced a substantial decrease in bioluminescence in comparison to MPs. Using the initial concentrations of NPs and MPs and the ISO 11348-3 (ISO, 2007) standard, EC_{50} values for 15 and 30 min are shown. The NPs had an $EC_{50, 15 \text{ min}}$ of 248 \pm 56.39 (12.40%) and an $EC_{50, 30 \text{ min}}$ of 257.6 \pm 30.8 mg L⁻¹ (12.88%). The MPs had an $EC_{50, 15 \text{ min}}$ of 2404.6 \pm 277.4 (61.0%) and an $EC_{50, 30 \text{ min}}$ of 1472.9 \pm 244.7 mg L⁻¹ (36.82%). Due to the presence of color in the samples of CuO NPs and MPs and the need to use the supernatant (clean extract) for performing tests, Cu concentrations in supernatants were estimated by FAAS. The values obtained in relation to initial concentrations were 1.5% (30.55 mg L⁻¹) for NPs and 0.8% (35.25 mg L⁻¹) for MPs. If we consider using these values to calculate the percentage of the EC_{50} with available Cu in the supernatant, then the values would be much lower than those reported above. However, in these tests (under both NP and MP conditions), CuO NPs were 8 times more toxic in terms of $EC_{50, 15 \text{ min}}$ and approximately 6 times more toxic in terms of $EC_{50, 30 \text{ min}}$ relative to CuO MPs. The *Cu*-sensor bacteria showed that toxicity to *V. fischeri* exposed to CuO NP was largely explained by soluble Cu ions (Heinlian et al., 2008). This dissolution is one of the main contributors for the toxicity to crustaceans, algae, fish, bacteria and *V. fischeri* (Bondarenko et al., 2013). The Cu ions can interact with *V. fischeri* resulting in a decrease in bioluminescence. The bioluminescence is a result of a complex chain of biochemical reactions, where reduced flavin mononucleotide (FMN), a long-chain fatty acid aldehyde and luciferase are the key players (Mortimer et al., 2008). This special pathway uses NADH as a cofactor and is intrinsically linked to the central metabolism of the microorganism (Hastings et al., 1987). Thus, the reduction of light output is a reflection of the inhibition in bacterial metabolic activity and proportional to the toxicity of test sample (Bullrich, 1982).

The addition of salt to the diluent increases the ionic strength, which can affect the agglomeration of CuO NPs. Buffet et al. (2011) showed that in seawater, NP diameters increased significantly within several days, and the suspension became more unstable due to the decrease

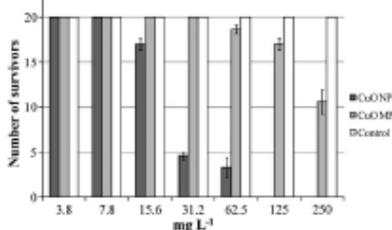


Fig. 2. Survival of *D. magna* exposed to CuO NPs and CuO MPs for 48 h. Values are reported as the mean of 3 replicates \pm standard deviation.

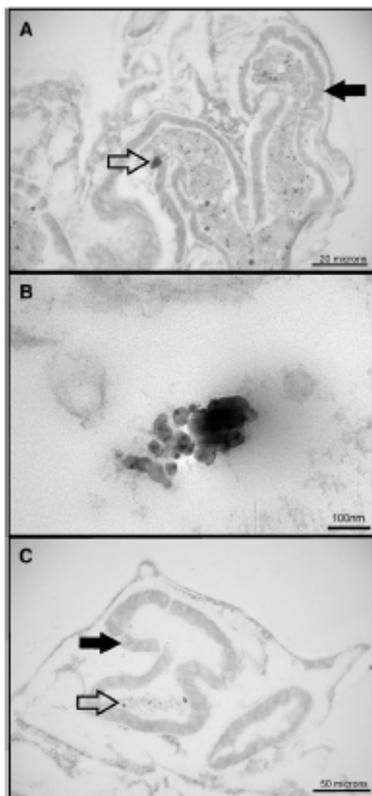


Fig. 3. Detail of the *D. magna* midgut exposed to CuO NPs. Cross-sections of *D. magna* exposed to CuO NPs for 48 h at the EC50 concentration, stained with AT-O and observed with light microscopy (A). Highlights of the *D. magna* midgut showing the presence of CuO NPs inside the organ (white arrow) and the presence of intestinal epithelial cells (black arrow). (B) The presence of CuO NP agglomerates by TEM in the midgut. (C) Portion of the microtubule showing the presence of CuO NPs (white arrow) in the midgut. Note the presence of intestinal epithelial cells (black arrow).

In Pz compared to the control. The results obtained in this study indicate that the agglomeration and the stability of NP correlated inversely with the irt toxicity. An increase in NP diameter correlates with decreases in surface area and reactivity. This explanation can justify the low toxicity of CuO NP to *V. fischeri*. In this case, we hypothesize that the presence of a high concentration of chloride ion in the sample induces the complexation of Cu to form $CuCl_4^{2-}$, decreasing the availability of ionic Cu.

Our acute toxicity results showed that CuO (both NP and MP forms) was more toxic for *D. magna* than for *V. fischeri*. This behavior can be explained by the fact that Cu is more toxic to freshwater organisms (Brooks et al., 2007), and thus, Cu is less bioavailable in seawater than

in freshwater. According to Blinova et al. (2010), the type and quantity of natural organic matter present in water directly affect bioavailability and stability of NPs.

3.3.3. Chronic toxicity with *D. magna*

Concentrations were evaluated in the chronic toxicity test based on $EC_{50,48h}$ values of acute toxicity for *D. magna*. After 21 days of exposure, the reproduction, growth and longevity parameters were analyzed for CuO NPs, CuO MPs and $CuSO_4$. The average numbers of neonates born at the tested concentrations varied slightly among the dilutions tested. The onset of the birth of organisms in the presence of CuO NPs, CuO MPs or $CuSO_4$ did not differ from the control and began on the 7th day of the test, indicating that the materials had no effect on the start of reproduction. However, there was a significant increase in the number of neonates generated in the presence of both types of particles relative to the control (at concentrations of 7.8, 31.2 and 0.06 mg L^{-1} for NPs, MPs and $CuSO_4$, respectively). This behavior may be related to the organisms' attempt to preserve the species under stressful conditions. Terra et al. (2008) previously reported this behavior. At lower concentrations, this effect was insignificant. For NPs at a concentration of 7.8 mg L^{-1} , there was a significant increase in reproduction ($p < 0.05$) compared to the control test; this concentration was defined as the observed effect concentration (OEC). The NOEC for NPs was 3.9 mg L^{-1} . For MPs, significant effects on reproduction were observed at the two highest concentrations (62.5 and 31.2 mg L^{-1}). For MPs, the OEC was 31.24 mg L^{-1} , and the NOEC was 15.6 mg L^{-1} . The positive control $CuSO_4$ (at a concentration of 0.06 mg L^{-1}) had significant effects on reproduction and decreased the organism size compared to the negative control (Table 1), corroborating the results with NPs and MPs and illustrating the relationship with the release of ions.

At all CuO concentrations, the organism size decreased relative to the control ($p < 0.05$) after 21 days of exposure. From this observation, it was expected that the NOEC for NPs would be greater than 0.79 mg L^{-1} and that the OEC would be greater than or equal to 0.79 mg L^{-1} . Moreover, for MPs, it was expected that the NOEC would be less than 7.8 mg L^{-1} and that the OEC would be greater than or equal to NOEC. De Schampelaere et al. (2008) confirmed that the toxicity of Cu could be attributed to dissolved Cu^{2+} ions in the media. It is possible to compare the results obtained for this parameter with GFAAS analysis results for the fraction of Cu released into the solution, which reflects the concentrations of total Cu characterized in test suspensions. According to Ma (2005), the presence of Cu ions inhibits the growth of algae *S. subspicatus* (used as food for *D. magna* during testing). Thus, we propose that one of the factors that may influence the difference in the average organism size is associated with decreased cell density of algae, causing a deficiency of food that is essential for their growth and development. Silver NPs (Zhao and Wang, 2011) and cerium dioxide NPs (Van Hoekke et al., 2011) were reported to decrease the growth of *D. magna* during chronic toxicity tests. The main explanation for this effect was the low quality of food ingested by the organisms, which resulted from the mixture of NPs with algae, leading to a decrease in the absorption of nutrients by the organisms. Due to the small size and high reactivity of CuO NPs, these particles can enter the digestive system of *D. magna* through algae (biomagnification) and the suspension and thus lead to the potentiation of toxic effects due to the release of ions and the reactivity of particles within the organism (Fig. 3).

Regarding the longevity parameter during the 21-day test, no differences in the number of deaths of organisms exposed to CuO NPs or CuO MPs were observed compared to the control ($p < 0.05$; Table 1). Although no significant effects on longevity were observed at the tested NP and MP concentrations, some morphological changes were observed at the end of the test in organisms exposed to CuO NPs and MPs. The main morphological changes observed to *D. magna* exposed to NPs were deformations in the carapace and lack of development of the apical spine. For the *D. magna* exposed to MPs shortening of the apical spine was observed. These morphological changes of *D. magna* can be related to the generation of ROS that may damage cell membranes,

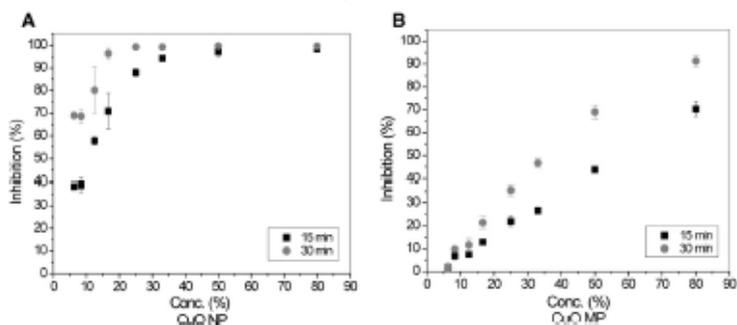


Fig. 4. Inhibition of the fluorescent emission of *V. fischeri* bacteria exposed to CuO NPs (A) and MP (B). The values of X-axis were expressed as a relative percentage to the initial concentration of NH₃ (2000 mg L⁻¹) and NH₃ (4000 mg L⁻¹).

although further investigations should be conducted to confirm this correlation.

4. Conclusions

Our study evaluated and compared the toxicological effects of CuO NPs and MPs on *D. magna* and *V. fischeri*. TEM and SEM results confirmed that NPs in contact with a dilute medium tend to form agglomerates, which directly influence particle dispersion. X-ray diffraction analysis confirmed that CuO NPs and MPs have the same crystallite size. The Pz value of the CuO NPs indicated that this suspension is more unstable when compared to MPs. This instability, additionally to differences in surface area and size, can be directly related to results obtained from toxicity tests. The results of toxicity tests indicated that CuO NPs are 10 times more toxic than CuO MPs for the organisms tested in this study. Additionally, effects on reproduction and morphological deformation of *D. magna* and decreased metabolic processes, as evidenced by decreases in the bioluminescence of *V. fischeri*, were observed. Although tests with *V. fischeri* have shown toxicity to CuO NPs and MPs, some limitations were observed due to the presence of color (turbidity) in these samples. Thus, we conclude that this particular methodology does not appear to be the most appropriate for the study of toxicity in this case. These results call attention to the toxicity of these nanomaterials that, when present in aquatic ecosystems, can cause irreversible damage in both the short and the long terms. These toxicological results demonstrate the need for improved techniques that permit the removal and possible reuse of these nanomaterials in the supply chain, minimizing their potentially deleterious effects on this ecosystem. The importance of comparative studies between nanometric and micrometric structures are essential for chemical products that are already in use and for those that are being developed to enable a suitable classification of the CAS number, as CuO NPs and CuO MPs have the same registration number but different toxicological potentials.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.036>.

Ethical standards

The authors declare that the experiments presented in this manuscript comply with the current laws of the country in which these experiments were performed.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível (CAPES - Proc. No 017/2010) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Proc. No 552112/2011-9) Brazil for their financial support, and the Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-LFSC) for the TEM and SEM-EDS images, the Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM-LFSC) for X-ray diffractograms and the Laboratório de Biologia Celular Vegetal (UFSC) for the preparation of slides for light microscopy and TEM.

References

- ABNT. ABNT NBR 15411-3:2012 – apuração toxicológica – determinação da inibição e efeito de águas samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) part 3: method using freeze-dried bacteria; 2012 [23 pp].
- Araújo V, Dubourgier H-C, Kawano K, Kubota A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Parachlorella kuetzingii* subsp. nov. Sci Total Environ 2009; 407(4):1463–8.
- Baek Y-W, An Y-J. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and SnO₂) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. Sci Total Environ 2011;408(8):1603–8.
- Bilova L, Ivank A, Mandan M, Mestrovic M, Kubota A. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. Environ Pollut 2010;138(1):41–7.
- Bondarini O, Aggoun K, Ivank A, Kawano K, Mestrovic M, Kubota A. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. Arch Toxicol 2013;87(7):1181–200.
- Braz SK, Verma M, Tyagi RD, Sarin SK. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge—evidence and impacts. Waste Manag 2010;30(3):504–20.
- Brodoski J, Balian T, Tolhurst L, Bawiec J, La Roche J, Waldeck M, et al. Effects of dissolved organic carbon on the toxicity of copper to the developing embryos of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*). Environ Toxicol Chem 2007;26(8):1756–63.
- Buller P-E, Tankoska CP, Pan J-F, Berhans D, Heremans C, Peiner L, et al. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Artemia salina* and *Hydra diversicolor* to copper oxide nanoparticles. Chemosphere 2008;71:165–74.
- Bulch AA. A practical and reliable method for monitoring the toxicity of aquatic samples. Protoplasma 1982;17:45–7.
- Carvalho B, Veiga RA, Serra C, Silva LID. An easy ML Time of flight secondary ion mass spectrometry and high-resolution ion emission electron microscopy/energy dispersive spectroscopy: a preliminary study of the distribution of Cu²⁺ and Cu²⁺/Fe²⁺ on a filamentous cyanobacterium. J Hazard Mater 2011;195:422–31.
- CITISOL 05.22.7 – teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* método de ensaio; 2001 [São Paulo, SP, 13pp].
- Chu SP. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae. I – methods and culture media. J Ecol 1942;3(2):284–325.
- Daque RB, Metzger M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textile: focus on anti-microbial properties. Colloids Surf B Biointerfaces 2010;79(1):5–18.

- De Schampelaere KAC, Vancanina FM, Hejzdek DG, Dick IMG, DeRiolo K, Allen HE, et al. Development and field validation of a predictive copper toxicity model for the green alga *Parachlorella kuetzingii*. *Environ Toxicol Chem* 2003;22(10):2454–65.
- Delgado K, Gajardo R, Palma R, Palma R. Polypropylene with embedded copper metal or copper oxide nanoparticles as a novel plastic antimicrobial agent. *Let Appl Microbiol* 2011;53(1):50–4.
- DIN. German standard methods for the examination of water, waste water and sludge; bioassays (group 1): determining the tolerance of *Daphnia* to the toxicity of waste water by way of a dilution series (1.30); 1989 (German, 4 pp.).
- EPA. EPA-821-R-02-012 – methods for measuring acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. ed.; 2002a (Washington, DC, 275 pp.).
- EPA. EPA-821-R-02-013 – short-term methods for assessing the chronic toxicity of effluents and receiving water to freshwater organisms. ed.; 2002b (Washington, DC, 250pp.).
- Ferreira AA, Matsuda IS. Radicals (free: zincates, disease relationships, sistemas de defesa e estresse oxidativo. *Rev Assoc Med Bras* 1997;43(1):61–8.
- Crith R, J. Windl R, Hyndman KA, Demkow ND, Powers K, Taylor D, et al. Exposure to copper nanoparticles causes gill injury and acute lethality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environ Sci Technol* 2007;41(21):8178–86 [Spec].
- Hartings JW, Malmgren J, Dunlop PV. How are growth and lysine biosynthesis regulated independently in light organ symbiosis. *Symbiosis* 1987;4:3–24.
- Hellmann M, Inake A, Blinova J, Dubouquier H-C, Kahru A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and the sea anemone *Glycera magna* and *Thalassaphys polydora*. *Chemosphere* 2008;71(7):1308–16.
- ISO 15017:05:2000 – water quality – clear estimation of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). ED/TC 147/SC5 – water qual. method (1). (Switzerland, 17 pp.).
- ISO 15348-3:2007 – water quality – determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) – part 3: method using fresh-wed med bacteria. ED/TC 147/SC5 – water qual. method; 2007 (Switzerland, 21 pp.).
- ISO 6341:2012 – water quality – determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) – acute toxicity test; 2012a (Switzerland, 22 pp.).
- ISO 6342:2012 – water quality – fresh water algal growth inhibition test with unicellular green algae; 2012b (Switzerland, 21 pp.).
- Karimian HR, Gustafsson J, Cronholm P, Moller L. Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol Lett* 2009; 188(2):112–8.
- Kawamata K, Inake A, Dubouquier H-C, Kahru A. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicol In Vitro* 2009;23(6):1116–22.
- Rozado S, Rozado K. The role of reactive oxygen species in copper toxicity in two freshwater green algae. *J Physiol* 2008;94(2):311–8.
- Li Y-F, Chen C. Size and toxicity of metallic and metal-containing nanoparticles for biomedical applications. *Small* 2011;7(21):2985–90.
- Ma J. Differential sensitivity of three cyanobacterial and five green algal species to organotin and pyrethroid pesticides. *Sci Total Environ* 2005;341(1–3):105–17.
- Martinez M, Kawamata K, Hellmann M, Kurose I, Kahru A. High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles. *Toxicol In Vitro* 2008;22(5):1412–7.
- Martinez M, Kawamata K, Kahru A. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to related prokaryote *Bradyrhizobium lotifolium*. *Toxicology* 2010;269(2–3):182–9.
- Olivieri-Werbel J, Padilla-Robles C, De la Hoz G. Relationships between physicochemical parameters and the toxicity of leachates from a municipal solid waste land fill. *Environ Toxicol Water* 2008;70(2):294–8.
- Ortega M, Schmitt IC, Brazner JS. Cytotoxicity study of copper germination in *Neurospora tetraspora* (Strain 55). *Phycologia*. *J Adv Microsc Biol* (62). American Scientific Publishers; 2011. p. 81–8.
- Pereira E F, Oskamers A, Prasad L, Simo L, Geron Matias W, Popovic R. Evaluation of copper oxide nanoparticles toxicity using a chromatographic fluorescence imaging in *Leucosphaera*. *J Bio* 2010;2010:1–5.
- Pereira E F, Oskamers A, Melegari SP, Matias WG, Popovic R. Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticle uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Chemosphere* 2012;87(11):1388–94.
- Ren G, Hu D, Cheng EW, Vargas-Ruiz MA, Reip P, Akaior RP. Characterization of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. *Int J Antimicrob Agents* 2009; 33(4):587–90.
- Ribeiro J, Dallot K, Flores D, Krombhaar MA, Silva LFG. Extensive FIS-REM/EDS, HR-TEM/EDS and TGA-SEM studies of micro- to nano-particles in an invertebrate host. *Sci Total Environ* 2013;452–453:98–107.
- Saban C, Prensadori F, Dalghe JC, Fierro C, Caviede J, Martin M, et al. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (Photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquat Toxicol* 2010;96(2):109–14.
- Sanchez J, Bedyne D, Al-Harbi NA, Silva LF, Bardi M, Barzola D. Quantitative trace analysis of fulvic acids in river sediment from Spain and soils from Saudi Arabia. *Anal Bioanal Chem* 2013;405(18):5915–23.
- Shi J, Abid AD, Kennedy JM, Hettiaratne KR, Sillik WK. Toxicity of dihalogenated (Landschot particles), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution. *Environ Pollut* 2011;159(5):1277–82.
- Silva LFG, Oliveira MS, Nogueira ER, O'Shea MK, Henke KR, Howe J. Nanotoxicity and ultrafine particles in inhibition from the Bath Mill iron coal fire. *Pervy County, Eastern Kentucky, USA*. *Int J Coal Geol* 2011;85(2–3):217–45.
- Terra N, Reiden I, Fiedler J. Impact of zinc on the growth of *Daphnia magna* (Crustacea) in a toxicology test. *Environ Pollut* 2010;159(5):1277–82.
- Van Hoek K, De Schampelaere KAC, Van der Meer P, Smayda G, Janssen CR. Aggregation and ecotoxicity of Cu₂O nanoparticles in synthetic and natural waters with variable pH, organic matter concentration and ionic strength. *Environ Pollut* 2011; 159(4):370–8.
- Wang Z, Li J, Zhao J, Xing B. Toxicity and internalization of CuO nanoparticles to prokaryotic alga *Microcystis aeruginosa* as affected by dissolved organic matter. *Environ Sci Technol* 45(14). American Chemical Society; 2011. p. 6032–40.
- Webb P, Orr C. Analytical methods in fine particle technology. *Micromeritics Instrum Corp*; 1997. p. 301.
- Zarbin AJG. Química de (nan)partículas. *Quim Nova* 2007;30(5):1469–79. [30 Q].
- Zhao C-M, Wang W-K. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environ Toxicol Chem* 2011;30(4):805–62.
- Zhao Y, Meng M, Chen Z, Feng Z, Dai Z. Dependence of nanotoxicity on nanoscale characteristics and strategies for reducing and eliminating nanotoxicity. In: Zhan Y, Singh NP, editors. *Nanotoxicology*. Valencia, CA – USA: American Scientific Publishers; 2007. p. 205–80.

A3. Comportamento dos parâmetros reprodução e crescimento

Suspensão-teste	Concentração (mg/L)	Reprodução (n° neonatos ±SD)	Crescimento - nm (comprimento ±SD)
NP CuO-MTI	Controle	18,23±2,58	5,0±0,1
	0,9	17,10±2,36	4,5±0,3 ^{a,*}
	1,9	17,98±3,32	4,4±0,3 [*]
	3,9	18,14±7,45 ^{b,*}	4,0±0,2 [*]
	7,8	21,87±3,43 ^{a,*}	4,4±0,4 [*]
NP CuO-SIGMA	Controle	17,91±1,48	4,2±0,2
	0,09	19,53± 3,31	4,1±0,1 [*]
	0,19	19,42± 3,80 ^{b,*}	4,1±0,1 [*]
	0,39	20,19± 2,38 ^{a,*}	4,0±0,2 [*]
	0,97	22,47±3,45	3,9±0,4 ^{a,*}
NP CuO-LABTOX	Controle	23,11±1,5	5,0±0,1
	0,01	23,05±1,64	4,5±0,4 ^{a,*}
	0,03	24,47±8,20	4,3±0,3 [*]
	0,06	23,47±3,60 ^{b,*}	4,4±0,3 [*]
	0,12	26,22±4,21 ^{a,*}	4,6±0,2 [*]
NC CuO-PANI	Controle	23,11±1,51	5,0±0,1
	0,01	25,40±4,6 [*]	4,8±0,2 ^{a,*}
	0,03	26,36±4,01 [*]	4,5±0,3 [*]
	0,06	25,02±4,72 [*]	4,5±0,4 [*]
	0,12	25,45±3,19 ^{a,*}	4,6±0,3 [*]
MP CuO	Controle	18,12±2,45	5,0±0,1
	7,8	19,31±2,12	4,6±0,4 ^{*, a}
	15,6	17,65±3,10 ^b	4,3±0,4 [*]
	31,2	20,01±2,65 ^{*, a}	4,2±0,4 [*]
	62,5	19,48±2,32 ^{*, a}	4,4±0,4 [*]
PANI	Controle	13,50±2,38	4,7±0,2
	0,97	14,64±1,67	4,2±0,2 ^{b,*}
	1,9	12,98±2,09 ^{b,*}	4,1±0,3 ^{a,*}
	3,9	11,05±1,94 ^{a,*}	4,0±0,1
	7,8	10,91±2,19	3,6±0,3
CuSO ₄	Controle	23,11±1,51	5,0±0,1
	0,6	25,46±4,06 ^{a,b,*}	4,6±0,6 ^{a,b,*}