

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
AMBIENTAL**

Ana Letícia de Oliveira Franco Rossetto

**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 da Universidade Federal de Santa Catarina, para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. William Gerson Matias, Dr.

Co-orientadora: Dr^a Silvia Pedroso Melegari.

Florianópolis (SC)

2012

Catálogo na fonte pela Biblioteca Universitária
da
Universidade Federal de Santa Catarina

R829e Rossetto, Ana Letícia de Oliveira Franco
Estudo comparativo entre os efeitos tóxicos agudos e crônicos do óxido de cobre na forma de nanopartícula e micropartícula [dissertação] / Ana Letícia de Oliveira Franco Rossetto ; orientador, William Gerson Matias. - Florianópolis, SC, 2012.
123 p.: il., tabs.

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

Inclui referências

1. Engenharia ambiental. 2. Toxicologia. 3. Nanopartículas. 4. Óxidos - Cobre. I. Matias, William Gerson. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. III. Título.

CDU 628.4

“Estudo Comparativo entre Efeitos Tóxicos Agudos e Crônicos do Óxido de Cobre na Forma de Micropartícula e Nanopartícula”

ANA LETÍCIA DE OLIVEIRA FRANCO ROSSETTO

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós - Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL

na Área de Engenharia Ambiental.

Aprovado por:



Prof. Paulo Belli Filho, Dr.



Prof.^a Rejane Helena Ribeiro da Costa, Dr.^a.



Prof. Fábio Kummrow, Dr.



Prof. William Gerson Matias, Dr.
(Orientador)



Prof. Flávio Rubens Lapolli
(Coordenador)

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL
MARÇO/2012

Com muito amor, carinho, respeito e admiração dedico este trabalho ao meu esposo Ash e aos meus pais Antonio e Dagmar, que com amor estão sempre presentes ao meu lado me apoiando e me ajudando a ver um mundo mais humano e feliz. Obrigada

AGRADECIMENTOS

Com muito carinho, meus agradecimentos à:

Primeiramente à Deus, por me conceder o milagre diário da vida, discernimento e guia para conclusão deste trabalho;

Aos meus pais Antonio e Dagmar, aos meus irmãos Marcio, Tiago e Giovana e a minha sobrinha Gabriela por estarem sempre ao meu lado me dando força, incentivo e amor incondicional;

Ao meu esposo Ash, pelo amor, paciência e incentivo constante nesta etapa da minha vida;

Ao professor William Gerson Matias por estar presente sempre nos momentos de dúvidas, pelas orientações e pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho;

À Silvia Pedroso Melegari pela amizade, coorientação e ajuda para a realização deste trabalho;

À CAPES pelo apoio financeiro;

Ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA) pelos serviços prestados e ensinamentos;

Aos membros da banca, Prof^a Rejane Helena Ribeiro da Costa, Dr^a, Prof. Paulo Belli Filho, Dr., Prof. Flávio Rubens Lapolli, Dr. e Prof. Fábio Kummrow, Dr. pela disponibilidade e contribuições para a melhoria deste trabalho;

Aos colegas do Labtox – Laboratório de Toxicologia Ambiental pela amizade e ajuda para o desenvolver desta pesquisa;

À equipe do LIMA (Laboratório Integrado do Meio Ambiente), em especial a Dona Eliane e Vitor;

Ao LCME (laboratório de Microscopia Eletrônica da UFSC) pela cooperação na realização da caracterização via microcopia;

Ao LAMAR (Laboratório de Algas Marinhas) e em especial a Prof^a Luciane Ouriques pela ajuda na realização dos emblocamentos para visualização em microscopia de Luz;

Ao LaMaTe (Laboratório de Materias Elétricos) pela cooperação para a caracterização da área Superficial;

Ao José Barrios, pela amizade e ajuda na leitura dos íons de cobre;

À Cristiane Fuzzinato pelas importantes orientações experimentais para meu estudo;

À Cristina Henning pela leitura do P_z no Canadá e pelas importantes orientações experimentais para meu estudo;

À Juliana Braum Müller pela amizade e orientações experimentais;

À Bianca e Ariane pela ajuda laboratorial;

E a todas as pessoas que de alguma forma direta ou indireta me ajudaram nesta etapa da minha vida profissional.

Muito obrigada!

“Estudar é polir a pedra preciosa;
cultivando o espírito, purificamo-lo.”
(Confúcio)

RESUMO

A nanotecnologia desperta interesse crescente devido às vantagens que as propriedades físicas, químicas e biológicas apresentam. Consequentemente, a crescente sintetização e a incorporação de novos nanomateriais em produtos de uso diário, se faz necessário a compreensão dos efeitos toxicológicos sobre os organismos aquáticos, uma vez que o meio ambiente aquático é um dos possíveis destino final para essas substâncias. O óxido de cobre (CuO) é comumente utilizado na composição de tintas anti-incrustantes de revestimento para embarcações, e o presente trabalho teve como objetivo avaliar e comparar a toxicidade aquática do CuO na forma de nanopartícula (NP) e micropartícula (MP), por meio de teste de toxicidade com microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* e a bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri*. Foram realizados testes de toxicidade aguda com os dois organismos testes. Os testes de toxicidade crônica foram realizados com a *D. magna*, e os parâmetros avaliados foram a reprodução, crescimento e longevidade durante um período de 21 dias. Para o desenvolvimento dos ensaios, as duas formulações foram caracterizadas através de MET, MEV, área superficial, potencial zeta (P_z) e quantificação de íons Cu^{+2} dissolvidos. Como os resultados observou-se que a NP ($\text{CE}_{50} = 22 \text{ mg/L}$) apresentou toxicidade dez vezes mais elevada que a MP CuO ($\text{CE}_{50} = 223,6 \text{ mg/L}$) para os testes de toxicidade aguda com *D. Magna*. Para os testes com a *V. Fischeri*, a NP ($\text{CE}_{50-15\text{min}} = 304,4 \text{ mg/L}$) foi ser oito vezes mais tóxica que a estrutura MP ($\text{CE}_{50-15\text{min}} = 2696,8 \text{ mg/L}$), e quando exposta a 30 min., NP ($\text{CE}_{50-30\text{min}} = 288,4 \text{ mg/L}$) foi seis vezes mais tóxica do que a MP ($\text{CE}_{50-30\text{min}} = 1635 \text{ mg/L}$). Em relação aos parâmetros crônicos avaliados, as duas formulações apresentaram efeito estatisticamente significativos para os parâmetros crescimento e reprodução. Com base nestes resultados pode-se concluir que para os testes avaliados, a NP mostrou-se mais tóxica do que a MP CuO.

Palavras-Chaves: Toxicologia; Nanopartícula; Micropartícula; Óxido de Cobre

ABSTRACT

Nanotechnology has attracted growing interest due to the advantages that the physical, chemical and biological features present. Consequently, the increased synthesizing and the incorporation of these new nanomaterials in everyday products, has made it necessary to understand the possible toxicological effects on aquatic organisms, since the aquatic environment is one of the possible final destinations for these substances. The copper oxide (CuO) is commonly used in the composition of antifouling paints for vessels, and this study aimed to evaluate and compare the aquatic toxicity of CuO in the form of nanoparticle (NP) and microparticle (MP), by testing aquatic toxicity with microcrustacean of fresh water *Daphnia magna* and the bioluminescence marine bacteria *Vibrio fischeri*. We performed acute toxicity tests with two test organisms. The chronic toxicity tests were performed with *D. magna*, and the parameters evaluated were reproduction, growth and longevity during a period of 21 days. For the development of tests, the two formulations were characterized by MET, MEV, surface area, potential zeta (P_z) and quantification of dissolved Cu +2 ions. The results showed that the NP ($CE_{50} = 22 \text{ mg / L}$) presented ten times higher toxicity than the MP CuO ($CE_{50} = 223.6 \text{ mg / L}$) for the acute toxicity tests with *D. Magna*. For the tests with *V. Fischeri*, the structure NP ($CE_{50-15\text{min}} = 304.4 \text{ mg / L}$) showed to be eight times more toxic than the MP structure ($CE_{50-15\text{min}} = 2696.8 \text{ mg / L}$), and when exposed to 30 min., NP ($CE_{50-30 \text{min}} = 288.4 \text{ mg / L}$) showed it was six times more toxic than the MP ($CE_{50-30\text{min}} = 1635 \text{ mg / L}$). In relation to the chronic parameters evaluated, the two formulations showed statistically significant effects for growth and reproduction parameters. Based on these results it can be concluded that for the tests evaluated the NP was more toxic than the MP CuO.

Key-Words: Toxicology; Nanoparticle, Microparticle; Copper Oxide

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ilustração da escala nanométrica	28
Figura 2: Aplicação da nanotecnologia.....	30
Figura 3: Comportamento da nanopartícula no meio ambiente	32
Figura 4: Estado e comportamento das NP	35
Figura 5: Morfologia do microcústáceo <i>D. magna</i>	46
Figura 6: Representação da bactéria <i>V. fischeri</i>	47
Figura 7: Esquema da montagem do teste de toxicidade aguda com <i>D. magna</i>	56
Figura 8: Ilustração do teste de toxicidade crônica	58
Figura 9: <i>D.magna</i> após 21 dias	59
Figura 10: Ilustração do teste de toxicidade aguda com <i>V. fischeri</i>	61
Figura 11: Imagens das NP CuO obtidas através de MET	64
Figura 12: Imagens das MP CuO em água ultra pura obtidas através de MET.	65
Figura 13: Imagens das NP e MP CuO obtidas através MEV em água ultra pura.	66
Figura 14: Quantificação de íons biodisponíveis através da FAAS.	69
Figura 15: Comportamento da NP e MP.....	72
Figura 16: Comparação entre organismos expostos e não expostos a NP e MP CuO.....	75
Figura 17: Detalhe do intestino da <i>D. magna</i> exposta à NP CuO.	76
Figura 18: Detalhe do intestino da <i>D. magna</i> exposta à MP CuO.	77
Figura 19: Resultados para o efeito crônico da <i>D. magna</i> exposta à NP CuO para o parâmetro reprodução.	83
Figura 20: Detalhe da bolsa embrionária das <i>D.magna</i> exposta a NP CuO em relação com controle.)	83
Figura 21: Resultados para o efeito crônico da <i>D. magna</i> exposta à NP CuO para o parâmetro crescimento.	84
Figura 22: Resultados para o efeito crônico da <i>D. magna</i> exposta à NP CuO para o parâmetro longevidade.....	86
Figura 23: Modificações morfológicas da <i>D. magna</i> exposta à NP CuO.....	87
Figura 24: Resultados para o efeito crônico da <i>D. magna</i> exposta à MP CuO para o parâmetro reprodução.	90
Figura 25: Resultados para o efeito crônico da <i>D. magna</i> exposta à MP CuO para o parâmetro crescimento.	91
Figura 26: Resultados para o efeito crônico da <i>D. magna</i> exposta à MP CuO para o parâmetro longevidade.....	92
Figura 27: Modificações morfológicas da <i>D. magna</i> exposta à MP CuO.....	93
Figura 28: Quadro resumo dos ensaios toxicológicos.....	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características das Nanopartículas.....	31
Tabela 2: Principais técnicas utilizadas para caracterização das NP.....	36
Tabela 3: Comparação entre NP e MP CuO através do Pz.....	67
Tabela 4: Valores de toxicidade aguda para NP e MP.....	71
Tabela 5: Resultados apresentados por outros autores.....	73
Tabela 6: Comparação dos valores obtidos para o teste de toxicidade aguda para a <i>V. fischeri</i>	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)
FD – Fator de Diluição
LABTOX – Laboratório de Toxicologia Ambiental
LAMAR – Laboratório de Algas Marinhas
LAMATE – Laboratório de Materiais Elétricos
LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
MET – Microscopia de Transmissão Eletrônica
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
P_z - Potencial Zeta

ROS – Espécie Reativa de Oxigênio

RNS – Espécie Reativa de Nitrogênio

SCENIHR – Scientific Committee on Emerging and Newly Identified
health Risk

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
1.1 JUSTIFICATIVA.....	23
1.2 OBJETIVOS.....	25
1.2.1 Objetivo Geral.....	25
1.2.2 Objetivos Específicos.....	25
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA	27
2.2 NANOPARTÍCULA	30
2.3 USO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE	33
2.4 CARACTERIZAÇÕES DAS SUSPENSÕES PARA ESTUDOS TOXICOLÓGICOS	34
2.5 TOXICOLOGIA AMBIENTAL	38
2.5.1 Nanotoxicologia	40
2.5.2 Testes de Toxicidade.....	43
2.5.3 Organismos - testes	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	50
3.1 SUBSTÂNCIA-TESTE.....	50
3.1.1 Preparo das suspensões-testes	50
3.1.2 Caracterização das suspensões-testes.....	51
3.2 QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS Cu^{+2}	52
3.3 DETERMINAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL.....	53
3.4 PROCEDIMENTOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ	53
3.5 ANÁLISES TOXICOLÓGICAS.....	54
3.5.1 Metodologia do cultivo para <i>D. magna</i>	54
3.5.2 Controle da Sensibilidade dos organismos.....	55
3.5.3 Metodologia de teste agudo com <i>D. magna</i>	55
3.5.4 Metodologia do teste de toxicidade crônica com <i>D. magna</i>	56
3.5.5 Metodologia de teste agudo com a bactéria bioluminescente <i>Vibrio fischeri</i> - Sistema Microtox.....	59
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES-TESTES	62
4.1.1 Microscopia eletrônica	62
4.1.2 Potencial Zeta.....	67
4.2 QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS Cu^{+2}	68

4.3 AVALIAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL	70
4.4 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA.....	70
4.4.1 Toxicidade Aguda	70
4.4.2 Toxicidade Crônica	81
5 CONCLUSÕES.....	95
6 RECOMENDAÇÕES	97
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98
APÊNDICE A	115
APÊNDICE B	118
APÊNDICE C	121

1. INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, a área da ciência denominada nanotecnologia, que envolve processos, materiais e produtos na escala nanométria (10^{-9} m), tem despertado interesse crescente, pois além de utilizar materiais e sistemas cujos componentes apresentam propriedades físicas, químicas e/ou biológicas significativamente novas, geram também expectativas em relação aos impactos que os materiais nanoestruturados podem causar na qualidade de vida e na preservação do meio ambiente.

Estas novas propriedades oferecem a possibilidade de compreender novos fenômenos que podem ser utilizadas à escala microscópica e macroscópica tais como, maior dureza, resistência, eficiência, luminosidade entre outros.

Além dos impactos que podem ser gerados, segundo Duran, Morais e Matosso (2008), espera-se que o avanço da nanociência estimule a exploração de novos fenômenos, como também lidere uma nova revolução industrial, sendo a força motora de crescimento econômico neste século.

Em vista ao grande número de produtos tecnológicos no mercado, o uso da nanotecnologia vem sendo amplamente discutido quanto aos potenciais riscos, como a contaminação do meio ambiente e o lançamento de efluente resultante deste processo, que pode apresentar toxicidade elevada ou desconhecida.

O desenvolvimento da nanotecnologia está à frente da avaliação dos seus impactos sobre o meio ambiente, plantas, animais e seres humanos, além disso, no momento os dados disponíveis são variados e contraditórios (OBERDÖRSTER, G. *et. al.*, 2005; OBERDÖRSTER, OBERDÖRSTER e OBERDÖRSTER, 2005; KOLESNICHENKO, TIMOFEEV e PROTOPOPOVA, 2008).

O uso de nanomateriais (NM) pode representar importantes riscos toxicológicos, devido à dificuldade para avaliar os seus possíveis efeitos toxicológicos. Segundo Dhawan e Parmar (2009), o mecanismo de interação entre NM e sistemas

biológicos depende do tamanho, forma, composição e propriedades da superfície do NM em questão. Devido ao rápido crescimento do domínio da nanotecnologia, os ecossistemas aquáticos podem ser contaminados por poluentes nanométricos, dentre eles as nanopartículas metálicas que são largamente sintetizadas e utilizadas para aplicações industriais (BRAR *et al.*, 2009).

A nanotoxicologia é uma subárea da toxicologia que estuda os efeitos deletérios que NM exercem sobre os seres humanos e o meio ambiente. Segundo Stone *et al.* (2010), nanotoxicologia refere-se ao estudo dos potenciais efeitos nocivos dos NM e nanopartículas (NP).

A preocupação acerca da nanotoxicidade surge à medida da crescente sinterização, manipulação e descarte destes produtos, que podem ser lançados em meio ambientes naturais sem controle ou regulamentação, pois ainda não são totalmente conhecidos os potenciais riscos ocasionado pelo contato com ambientes aquáticos ou terrestres.

Segundo Castro, Westphal e Fillmann (2011), dentre os diversos tipos de produtos comercializados que são potencialmente danosos aos ambientes aquáticos, encontra-se um grupo de contaminantes orgânicos denominados biocidas, cujo uso vem crescendo consideravelmente na formulação de tinturas.

Os biocidas são utilizados como princípio ativo em tintas anti-incrustantes 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. Segundo Almeida, Diamantino e Souza (2007), a aplicação de tintas anti-incrustantes nos cascos das embarcações é uma técnica comumente usada para reduzir o crescimento e colonização de organismos marinhos que são responsáveis pela diminuição na velocidade dos barcos e conseqüentemente um aumento no consumo de combustível, e segundo Faria *et al.* (2006) e esta técnica é utilizada em embarcações fluviais e marítimas, plataformas petrolíferas *offshore*, tubulações submarinhas, comportas de represas, tanques aquáticos, entre outras estruturas utilizam essas tinturas como proteção.

Um grande número de tintas anti-incrustantes existe atualmente, muitas delas contendo em sua formulação Óxido de Cobre na forma de nanopartículas (NP CuO) Almeida, Diamantino e Souza (2007). A aplicação desta tinta gera uma maior eficiência econômica e ambiental devido ao menor consumo de combustível e manutenção das embarcações, porém o contato direto das mesmas com o meio ambiente aquático faz com que cresça também a preocupação dos possíveis efeitos deletérios sobre este ecossistema. Além disso, segundo Stone *et al.* (2010), estudos toxicológicos com as NP CuO são importantes, pois apesar da taxa de dissolução ser relativamente baixa, o potencial toxicológico pode ser elevado.

1.1 JUSTIFICATIVA

Segundo a Comissão das Comunidades Europeias (2009), as NP existem na natureza ou podem ser produzidas por atividades humanas, intencional ou involuntariamente. Tendo em vista que as partículas de menores dimensões têm uma superfície reativa superior por unidade de massa à das partículas de maiores dimensões, a toxicidade e os potenciais efeitos na saúde podem igualmente aumentar. Existem, por conseguinte, preocupações quanto ao potencial impacto das NP na saúde humana e no ambiente.

No domínio científico, poucos estudos foram realizados, como citado no item 1.1 desta seção, referentes à comparação e avaliação da toxicidade da NP CuO e MP CuO em ambientes aquáticos. Este trabalho baseia-se nos estudos realizados com a NP CuO em relação à toxicidade aguda e os complementam com a avaliação e comparação dos efeitos toxicológicos crônicos sobre os parâmetros reprodução, longevidade e crescimento do microcrustáceo de água doce *D. magna* exposta a estas partículas em seu ambiente de cultivo. Além disso, o Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX), do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, traz algumas experiências

envolvendo o estudo toxicológico com NP e a experiência do professor William Gerson Matias, coordenador do LABTOX. A escolha quanto CuO na forma NP e MP é justificada pelo seu crescente uso em tintura anti-incrustantes de revestimento de embarcações. Ao contrário das tintas convencionais, a secagem da tinta anti-incrustante não estabiliza quimicamente as NP CuO, ocorrendo oxidação e liberando íons tóxicos que inibe a aderência de organismos na superfície dos cascos de embarcações. Assim, pela quantidade de embarcações que circulam pelo planeta, podem ser liberadas quantidades expressivas em ambientes aquáticos apresentando risco à biota aquática.

Em relação ao domínio legal, no Brasil, não existe legislação específica relacionada à nanotecnologia e nanotoxicologia, porém, este trabalho encontra-se baseado na constituição federal 1988, que no artigo 225 que dispõe sobre a proteção ao meio ambiente: "*Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações*". Entender e comparar a toxicidade de um produto na forma de NP e micropartícula (MP) é fundamental para compreender os riscos associados ao seu uso e descarte. O lançamento dos mesmos em estações de tratamento de efluentes convencionais, sem o prévio tratamento adequado do nanoresíduo poderá causar perturbações no equilíbrio de todo o sistema aquático, uma vez que o uso da nanotecnologia em produtos de uso diário em crescendo significativamente como já mencionado.

E por fim no âmbito social, de acordo com BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, GOLIMOWSKI e URBAN (2009), as NP estão sendo incorporadas em muitos produtos de uso diários, como por exemplo, em catalisadores, produtos farmacêuticos, lubrificantes, cosméticos, em dispositivos eletrônicos e eletrodomésticos. Devido a isso, as NP podem ser liberadas de forma acidental ou não no meio ambiente, atingindo diferentes compartimentos ambientais (água, solo e ar). Um dos principais problemas ocasionados a isso são os riscos

ecotoxicológicos e biomagnificação na cadeia alimentar conforme reportado no relatório do Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risk (SCENIHR) em 2006.

Mediante a facilidade que as NP podem possuir em penetrar em organismos vivos devido ao pequeno tamanho e grande reatividade, os efeitos toxicológicos sobre estes organismos precisam ser averiguados, pois o desconhecimento de seu poder toxicológico aumenta a incerteza sobre os seus potenciais efeitos mostrando assim a importância desta pesquisa.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar e comparar a toxicidade aguda e crônica do CuO na forma de nanopartícula e micropartícula, através da exposição do microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* e bactéria marinha bioluminescente *Vibrio fischeri*.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar as suspensões de nanopartícula e micropartícula de CuO em água ultra pura através de microscopia eletrônica, estabilidade da suspensão, área superficial e solubilidade de íons de cobre.
- Realizar ensaios de toxicidade aguda utilizando *Daphnia magna* para suspensões de nanopartícula e micropartícula de CuO.
- Realizar ensaios de toxicidade aguda utilizando a bactéria *Vibrio Fischeri* para suspensões de nanopartícula e micropartícula de CuO.
- Avaliar os efeitos da nanopartícula e micropartícula de CuO causados sobre a *Daphnia magna* quanto à

longevidade, fecundidade e crescimento, empregando ensaios de toxicidade crônica.

- Avaliar a diferença de efeitos toxicológicos do CuO em escala nano e micrométrica.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo é apresentada uma breve revisão bibliográfica sobre estudos desenvolvidos sobre este assunto com o objetivo destacar as principais linhas seguidas para a elaboração desta dissertação e selecionar as metodologias mais adequadas para a execução deste trabalho. Esta revisão é composta pela definição sobre nanociência e nanotecnologia, definição e origem das NP. No âmbito específico do tema, é apresentada uma descrição sobre as NP CuO, o seu uso e os tipos de caracterização. Por fim, é apresentada uma breve revisão sobre toxicologia ambiental, nanotoxicologia, teste de toxicidade aquática e organismos teste utilizados neste estudo.

2.1 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA

A nanociência é uma área emergente da ciência que trata do estudo dos materiais que possuem dimensões extremamente reduzidas. Conseqüentemente a isso, a nanotecnologia se refere à preparação desses 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”. Segundo Melo e Pimenta (2004), as estruturas produzidas nesta escala podem variar entre 1 e 100 nm assumindo, devido ao seu pequeno tamanho, novas propriedades físicas, químicas, biológicas.

Na figura 1 é representada esquematicamente a escala nanométrica em relação a elementos conhecidos.

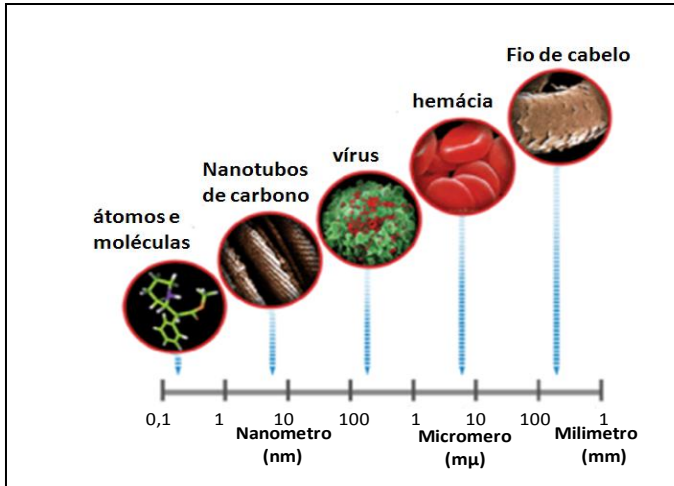


Figura 1: Ilustração da escala nanométrica
 Fonte: TOMA, 2004

Segundo Segala (2009) a origem da nanotecnologia remonta a meados do século XX e o primeiro cientista a referir-se sobre esta nova ciência foi o físico americano Richard Feynman. Asiyanbola e Soboyejo (2008) reportam que em 29 de dezembro de 1959, em seu discurso na reunião anual da Sociedade Americana de Física, Richard Feynman discutiu a primeira visão sobre nanotecnologia, onde as dimensões a serem tratadas estariam próximas ao nível atômico, chamando a atenção o fato que em dimensão atômica, trabalha-se com leis diferentes, esperando-se portanto, novos efeitos e novas possibilidades, nascendo assim à nanotecnologia moderna. Apesar da grande afirmação feita por ele em 1959, os 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 pelo cientista.

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 que corresponde a 0,1-0,2 nm de comprimento. Segala (2009) menciona que a área da nanotecnologia é mundialmente reconhecida como uma das chaves para o século XXI e a competência tecnológica na área será uma condição necessária ao sucesso competitivo em mercado futuro com valor agregado.

A ciência e tecnologia em nano-escala têm atraído considerável atenção nos últimos anos, pela expectativa dos impactos que os materiais nano-estruturados podem causar na melhoria econômica, na qualidade de vida e na preservação do meio ambiente. Esta nova área está apoiada conforme relatado por Zarbin (2007) sobre um grande alicerce: o fato de que as propriedades dos materiais, da maneira pela qual as conhecemos, são fortemente dependentes do tamanho das suas partículas, ou seja, todas as propriedades dos materiais (ópticas, elétricas, magnéticas, de transporte, catalíticas, etc), manifestam-se a partir de um determinado tamanho.

Segundo Biju *et al.*, (2008), a nanotecnologia é uma ciência verdadeiramente multidisciplinar com potenciais aplicações em quase todos os ramos da ciência e da tecnologia atual. A habilidade de caracterizar, manipular e organizar materiais em escala nanométrica está promovendo uma revolução científica e tecnológica de proporções ainda não identificadas (LEE, 2004). A figura 2 apresenta as diferentes áreas do conhecimento onde à nanotecnologia esta presente e a sua interdisciplinaridade.

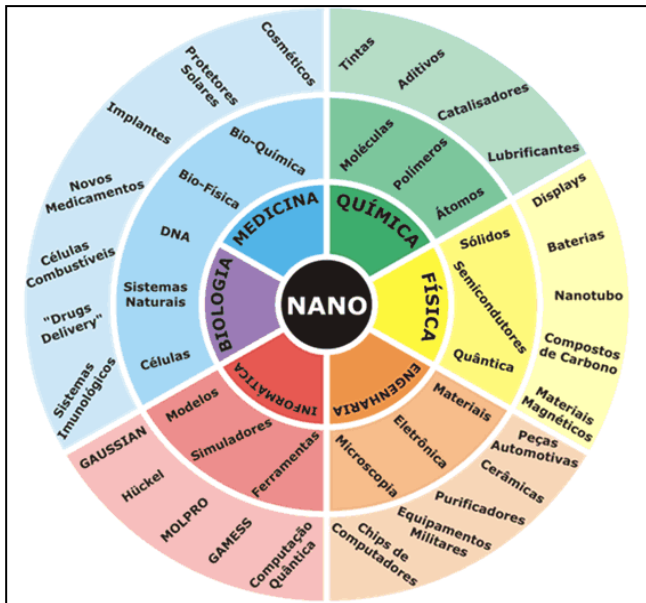


Figura 2: Aplicação da nanotecnologia
Fonte: SEGALA, 2009

2.2 NANOPARTÍCULA

Nanopartículas segundo Poole e Owens (2003) são definidas como compostos formados por átomos ou moléculas de tamanho bastante reduzido, sendo intermediário entre o átomo e a micropartícula (bulk), e são caracterizadas com tamanho variável entre 1-100nm, da mesma forma que Schulte e Salamanca-Buentello (2006) afirmam. Segundo Nagarajan (2008), as NP possuem diversas morfologias e para Jiang, Oberdörster e Biswas (2008), são geralmente projetadas e sintetizadas com modificações superficiais específicas para atender as necessidades de aplicação.

Devido ao tamanho e as superfícies específicas, as NP podem apresentar propriedades únicas, quando comparadas com as suas forma bulk. As novas propriedades (físicas, químicas e

biológicas) comportam-se de maneira diferente na nano-escala por possuírem uma grande área superficial em relação à sua massa. Isso implica que o átomo não fica localizado muito longe de uma interface e, portanto, ficará sujeito a maiores interações com o mundo exterior, tornando-se assim mais reativo (GONGORA-RUBIO, SEABRA, 2005).

Para Falaguasta (2005) e Steffens (2007), as nanopartículas podem ser divididas em pelo menos duas categorias: nanopartículas engenheiradas e nanopartículas naturais. As nanopartículas engenheiradas são desenvolvidas em laboratórios com propriedades muito específicas. A tabela 1 refere-se a comparação entre nanopartículas naturais e as nanopartículas engenheiradas, comparando o tamanho, o estados de agregação, composição química e significancia tóxica.

Tabela 1: Características das Nanopartículas

Partículas primárias	Nanopartículas Naturais (ultrafinas)	Nanopartículas Engenheiradas
Tamanho	< 100nm	< 100nm
Distribuição de tamanho	Poli dispersa	Mono dispersa
Agregação 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)

Para Christian *et al.* (2008), dois tipos de classificação das nanopartículas possuem grande relevância ambiental as nanopartículas inorgânicas e orgânicas. Pode-se citar como exemplo, para nanopartículas inorgânicas, as de nano-ouro, nanocobre, nano-prata; os óxidos metálicos, tais como, nano óxido de

cobre, dióxido de titânio e os quantum dots. Já as nanopartículas orgânicas, são exemplos clássicos os nanotubos de carbono e o fulereno(C_{50} e C_{70}).

Devido a este crescente uso, Paschoalino, Marcone e Jardim (2010) avaliar o contato com o meio ambiente ou com os organismos vivos em estudos toxicológicos é muito importante, pois as mesmas podem encontrar-se na forma livre (nanopartículas primárias), aglomeradas e até mesmo agregados interferindo diretamente na toxicidade. Este processo de aglomeração, agregação e funcionalização da superfície por diferentes grupamentos químicos presentes no meio, como ácidos húmicos e fúlvico é um processo dinâmico conforme ilustrado na figura 3, onde uma NP primária pode passar por processo de aglomeração e desaglomeração devido a fatores tais como pH e dispersantes. NP funcionalizadas ao entrar em contato com o ambiente em geral (água, solo e ar) ou com organismos vivos poderá ocorrer a desfuncionalização de suas superfícies através de fatores ambientais (pH, salinidade, compostos químicos orgânicos e inorgânicos, entre outros) transformando-as em NP primária e com isso aumentando o seu poder toxicológico.

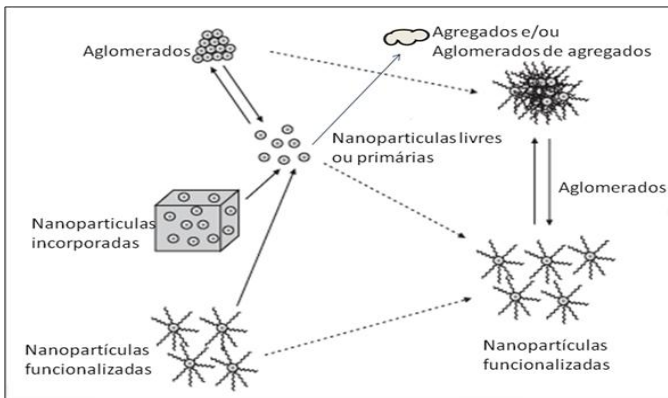


Figura 3: Comportamento da nanopartícula no meio ambiente
 Fonte: Adaptado Paschoalino, Marcone e Jardim, (2010)

2.3 USO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE

As nanopartículas 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. As NP se destacam por possuírem uma grande área superficial em relação as partículas micrométricas e com isso mais reativas devido a ao carregamento de cargas. Esta propriedade as torna altamente desejáveis para diversas aplicações comerciais, médicas, setores militares e ambientais como é o caso dos óxidos metálicos.

Segundo Popov *et al.* (2005), as nanopartículas 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, CuO tem atraído muita atenção, pois podem ser utilizados 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). As nanopartículas de CuO (nanofluído) tem uma excelente condutividade térmica podendo ser utilizado como fluído de transferência de calor em máquinas (CHANG *et al.*, 2005). Além disso, as NP CuO podem ser utilizadas na composição de tintas anti-incrustantes (ALMEIDA, DIAMANTINO e SOUSA, 2007).

Devido a crescente aplicação das nanopartículas de óxido metálicos, entre eles o 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.

2.4 CARACTERIZAÇÕES DAS SUSPENSÕES PARA ESTUDOS TOXICOLÓGICOS

Ao iniciar um estudo de toxicidade de NP em organismos vivo e meio ambiente, é necessário caracterizar as suspensões-testes para compreender os possíveis causadores de efeitos deletérios. Existem muitos diferentes tipos de caracterização que podem ser realizadas para uma nanopartícula/nanomaterial. Para Powers *et al.* (2007), a caracterização completa de uma nanopartícula 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.

Porém, a caracterização de todos os aspectos mencionados se torna muito caro e complexo. Assim, Bucher *et al.* (2004) propuseram que, no mínimo, em estudos toxicológicos, devem ser levados em consideração a caracterização em relação ao tamanho, forma, estado de dispersão, propriedade físicas, químicas e área superficial.

As alterações das características das nanopartículas no estado seco (em pó) e aquoso são ilustrados na figura 4, onde Jiang, Oberdörster e Biswas (2008) observam que as nanopartículas 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 (fortes ligações químicas entre as partículas) que podem ser controlados durante a síntese.

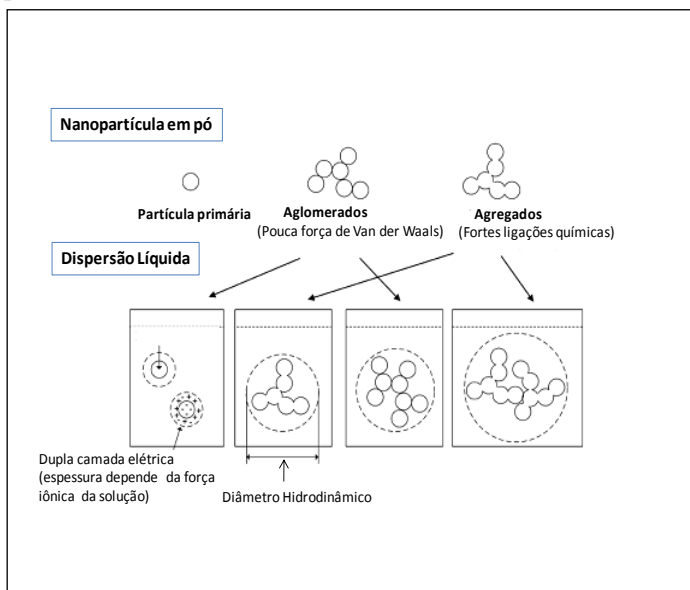


Figura 4: Estado e comportamento das NP

Fonte: Adaptado de Jiang, Oberdörster e Biswas (2008).

Ainda segundo Jiang, Oberdörster e Biswas (2008), após a dispersão em solução, as NP podem permanecer em aglomerados ou na forma de agregados, cobertos por dupla camada elétrica. Normalmente, quando encontram-se em forma de aglomerados, as nanopartículas podem ser separadas (devido a forças mais fracas) por diversas metodologias, enquanto que os agregados nanopartículas não podem ser separados. Ainda há duas situações importantes a serem tratadas no mecanismo de dispersão: a desaglomeração dos nanoparticulados e estabilidade da dispersão.

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 ultra-sônicas), ou químicos, que envolvem adição de surfactantes ou funcionalização da superfície. A estabilidade da dispersão 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. Na tabela 2 segundo Paschoalino, Marcone e Jardim, (2010) é resumido as principais técnicas utilizadas para determinar o tamanho, a área superficial e a composição de nanopartículas, assim como suas características morfológicas

Tabela 2: Principais técnicas utilizadas para caracterização das NP.

Técnica	Característica e Aplicação
Difração de Raio-X	Estrutura cristalina e tamanho
Espalhamento Dinâmico de Luz	Tamanho (suspensão) e distribuição das partículas
Sedimentação por Centrifugação	Distribuição dos tamanhos das partículas/complexo
Cromatografia de exclusão por tamanho	Boa resolução, pequeno volume de amostra/lenta
Microscopia de força atômica	Boa resolução/imagens 3D, só analisa a superfície
Área superficial específica (BET)	Tamanho das partículas, área superficial
Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	Morfologia da superfície, tamanho das partículas
Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	Estrutura local e morfologia
Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX)	Composição da superfície e mapeamento elementar
Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS)	Análise química da superfície

Fonte: Adaptado de Paschoalino, Marcone e Jardim, (2010)

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 Microscópio 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).

Outra forma de caracterização das suspensões é através da medição do potencial zeta das partículas. 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 potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento. Depende não somente da superfície da partícula, mas do dispersante. Pode ser afetado pelo

pH ou força iônica do meio. Dessa forma, pode-se prever estabilidade de suspensões coloidais. Esta técnica, contudo não tem em conta a heterogeneidade das cargas de cada molécula, fornecendo sempre um valor médio.

Além das caracterizações citadas acima, segundo Powers *et al.*, (2007), as interações entre os nanomateriais e organismos biológicos ocorrem geralmente na superfície da partícula é, portanto, área superficial é de fundamental importância na determinação de possíveis tóxicos efeitos. Segundo Webb *et al.*, (1997), a área superficial das nanopartículas normalmente é medida através da metodologia BET que utiliza a adsorção de gás pela superfície da partícula, o gás nitrogênio é o adsorbato mais comum sendo utilizado por muitos grupos de pesquisa.

Quando a caracterização das suspensões é bem conduzida, torna-se aparente como os fenômenos biológicos que observados estão relacionados às características das partículas. Segundo Singh *et al.*(2009) muitos problemas ao se comprar estudos nanotoxicológicos está no fato da não caracterização das suspensões em questão.

2.5 TOXICOLOGIA AMBIENTAL

A toxicologia tem como principais objetivos identificar os riscos associados a uma determinada substância e determinar em quais condições de exposição esses riscos são induzidos (JAMES, ROBERTS E WILLIAMS, 2000). Ela não serve somente para proteger os seres vivos e o ambiente dos efeitos deletérios causados pelas substâncias tóxicas, mas também para facilitar o desenvolvimento de agentes químicos nocivos mais seletivos (HODGSON, 2004).

A toxicologia ambiental é o estudo dos efeitos ecológicos de substâncias antropogênicas e naturais liberadas no meio ambiente (RUSSOM, 2002), podendo ser definida segundo Yu (2005) como uma ciência multidisciplinar que engloba muitas áreas de estudo, como biologia (anatomia, genética, fisiologia, microbiologia, ecologia, epidemiologia), química (orgânica, analítica), bioquímica, estudos de solo, água, e atmosfera,

estatística e lei, e conforme James, Robert e Williams (2000), tendo como objetivo o estudo dos perigos resultantes das interações entre substâncias químicas e organismos vivos. A ecotoxicologia é a ciência que estuda os efeitos de substâncias químicas no meio ambiente, sobre populações, considerando a degradação, bioacumulação, bioamplificação e mobilidade dessas substâncias (MATIAS, 1996).

Apesar de muitas vezes os termos ecotoxicologia e toxicologia ambiental serem utilizados como sinônimos (COSTA *et al.*, 2008), esta colocação é errônea, pois a ecotoxicologia é uma extensão da toxicologia ambiental (MATIAS, 2009). Ainda segundo MATIAS (2009), baseando-se nos fundamentos da toxicologia tradicional, observa-se que é possível um fator ambiental exercer efeitos graves sobre organismos individuais e não apresentar impacto sobre populações ou ecossistemas.

Segundo Kahru e Dubourguier (2009), o termo ecotoxicologia foi definido por René Truhaut em 1969, que a definiu como "o ramo da toxicologia preocupado com o estudo de efeitos tóxicos, causados por poluentes naturais ou sintéticos, para os componentes dos ecossistemas, animais (incluindo humanos) e vegetais em um contexto integral". Para Azevedo e Chasin (2003), o termo toxicologia ambiental é utilizado para referir-se ao estudo dos efeitos nocivos causados pela interação de agentes contaminantes do ambiente com organismos vivos, enquanto o termo ecotoxicologia é empregado para relacionar os efeitos tóxicos das substâncias químicas e dos agentes físicos sobre comunidades e populações de um ecossistema bem definido, incluindo o estudo dos caminhos de transferência desses agentes e sua interação com o ambiente.

Qualquer que seja o termo empregado, essa área da 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 para organismos aquáticos, pois os ecossistemas aquáticos representam os receptáculos finais de qualquer poluição causada, sendo ela aquática, atmosférica ou depositada no solo (MATIAS, 2009) e segundo Rand, Wills e

Mccarty (1995), ela tem como objetivo de avaliar o efeito de xenobióticos sobre organismos aquáticos representativos.

A toxicologia é o estudo quantitativo e qualitativo do efeito adverso ou tóxico de substâncias químicas em organismos aquáticos. Os efeitos tóxicos compreendem efeitos letais e subletais, tais como mudanças nas taxas de crescimento e reprodução. Rand e Petrocelli (1985) mencionam que os efeitos podem ser expressos por critérios quantificáveis, tais como o número de organismos imobilizados ou mortos e número de ovos eclodidos.

2.5.1 Nanotoxicologia

A crescente produção e aplicação de nanomateriais 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 nanomateriais em relação ao homem e ao meio ambiente.

Segundo Marquis *et al.*, (2009) e Choi, Oh e Choy (2008), nanotoxicologia é uma área emergindo que tem como objetivo caracterizar e categoriza os efeitos na saúde causados por nanomateriais para determinar relações de estrutura/função entre nanopartículas e toxicidade. Holsapple *et al.* (2005) afirma que estudos sobre nanotoxicologia estão voltados para caracterizar a segurança dos nanomateriais, com foco especial em definir seus mecanismos de ação bem como seus perfis toxicológicos, verificando desde os efeitos agudos em teste preliminares, subcrônicos e crônicos extremamente necessários para estudos dos nanomateriais.

Os primeiros estudos sobre a toxicidade de nanomateriais 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, Marcone e Jardim, 2010). Um dos primeiros trabalhos sobre esta temática foi realizado por Seaton em 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 nanopartículas 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 nanopartículas, e a capacidade de causar estresse oxidativo é um deles. NP pode cruzar as mais fortes barreiras biológica 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 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, 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 nanopartículas, pois proporciona alterações nas propriedades da membrana celular que por sua vez pode perturbar as funções celulares vitais (Rikans e Hornbrook, 1997). Além disso, a oxidação da proteínas no DNA 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 nanopartículas. 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 à 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 epiteliais pulmonares 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 (2006), a aplicação de partículas com diâmetros menores que 100 nm incita 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 as nanopartículas possuem maiores toxicidade quando comparado com suas formas micrométricas, levantando a hipótese amplamente assumida que as nanopartículas em geral são mais potentes em causar danos. Renwick *et al.*, (2004) descreveram um estudo em dois diferentes tamanhos do TiO_2 que foram administrada diretamente no pulmão de ratos e as respostas inflamatórias foram observadas. Os resultados mostram que, enquanto o as partículas micrométricas foram tidas como "não tóxico", a partícula na escala nanométrica foi classificada como "tóxico".

Porém esta hipótese não pode ser totalmente aceita uma vez que alguns estudos demonstram a existência de nanopartículas que não se mostraram mais tóxica do que a sua formulação bulk: por exemplo segundo Warheit *et al.*, (2006), que 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 nanopartículas engenheiradas, a sua libertação para o ambiente aquático e seus efeitos nocivos permanecem largamente desconhecidos (MOORE, 2006).

Como a água é um dos bens essenciais para os ecossistemas e um dos possíveis receptáculos finais de poluentes, 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 nanopartículas, 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 nanomateriais (QUINA, 2004).

2.5.2 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. Para tal, 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 e funcionais, entre outros (MATIAS, 2009).

De acordo com Rand, Wells e Mccarty (1995), a toxicidade depende 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 no local (*in situ*) ou em laboratório e podem causar efeitos agudos ou crônicos.

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 desses a uma única dose ou concentração da substância-teste 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 são a

letalidade ou a inibição do movimento em organismos aquáticos. De acordo com a ABNT NBR 12713/2004, 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, 2004). O resultado dos testes de toxicidade aguda normalmente é expresso através da concentração letal média (CL_{50}) ou da concentração efetiva mediana (CE_{50}) (COSTA *et al.*, 2008; MATIAS, 2009). A concentração letal mediana (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 concentração efetiva mediana (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 inibição da respiração (MATIAS, 2009).

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).

2.5.3 Organismos - testes

Existem inúmeros organismos aquáticos que podem ser utilizados como organismo-teste para avaliação da toxicidade aquática. 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), este organismo possui um 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).

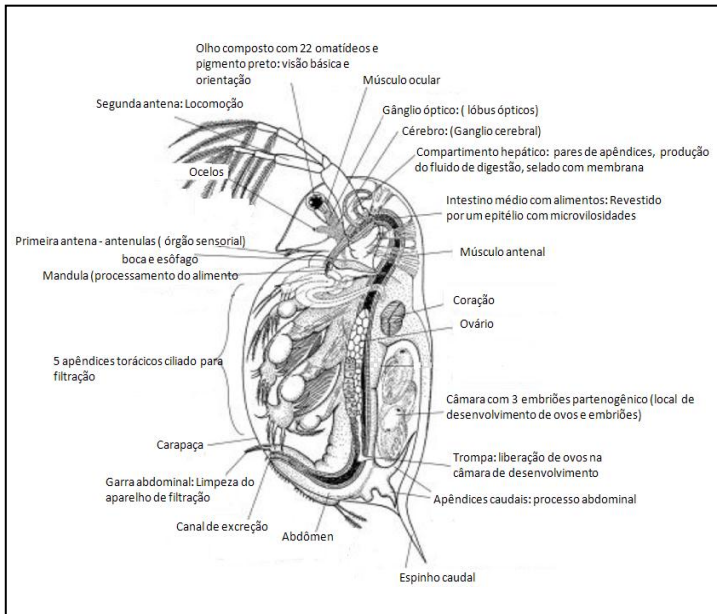


Figura 5: Morfologia do microcústáceo *D. magna*

Fonte: traduzido de Rosenkranz (2010)

Sua principal fonte de alimentação é através da filtração de algas unicelulares do meio ambiente (KNIE e LOPES, 2004). Em condições ambientais favoráveis esses microcústáceos reproduzem-se por partenogênese, originando apenas fêmeas (ALVES e SILVANO, 2006), ou seja, são gerados filhotes idênticos aos originais, padronizando desta forma os organismos a serem testados (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006). Quando ocorrem condições ambientais desfavoráveis, como baixas temperaturas ou grande densidade e subsequente acumulação de produtos

excretoras, estas induzem o aparecimento de ovos sexuais, 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).

Vibrio fischeri

A bactéria bioluminescente *V. fischeri* é uma proteobactéria, da ordem Vibrionales, da família Vibrionaceae e é gram-negativa, heterótrofa, podendo ser encontrada como simbiote de várias espécies (Harmel, 2004), como patógenos de invertebrados e como saprófito de vida livre. São bactérias anaeróbias facultativas que emitem luz em condições ambientais favoráveis (KNIE e LOPES, 2004) e necessitam de condições de oxigênio acima de 0,5 mg/L (KNIE e LOPES, 2004) emitindo luz quando em alta densidade celular (BAPTISTA, 2001).

A figura 6 representa a bactéria luminescente *V. fischeri* em meio ambar, sob a luz normal (esquerda) e no escuro (direita)

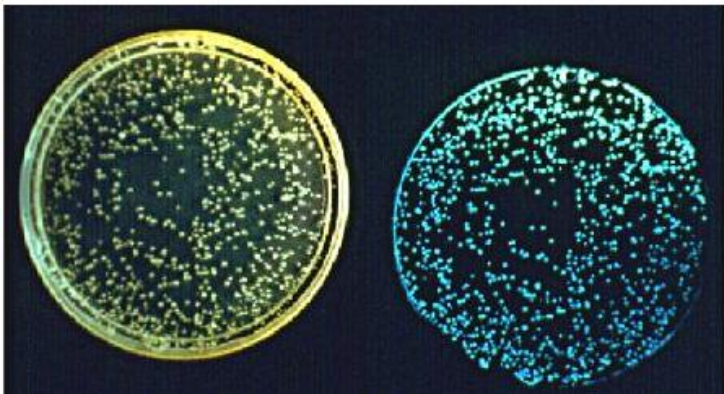


Figura 6: Representação da bactéria *V. fischeri*
Fonte: <http://www.ou.edu/cas/botany-micro/faculty/dunn.html>

Segundo Mortimer *et al.*, (2008), testes toxicológicos usando a bactéria *V. fischeri* são uma poderosa ferramenta para testes de toxicidades para NP. A bioluminescência produzida pela *V. fischeri* é a base para testes de toxicidade. Atualmente há várias normas padronizando os testes que utilizam as bactérias *V. 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), e a norma brasileira ABNT 15411-1 (ABNT, 2006^a) ABNT 15411-2 (ABNT, 2006^b) e ABNT 15411-3 (ABNT, 2006^c).

Os testes de toxicidade com bactérias luminescente são padronizados no Brasil pela Norma Técnica L5.227, do ano de 1987 e revisada no ano de 2001 pela CETESB (CETESB, 2001); e pelas normas técnicas 15411-1 (ABNT, 2006^a), 15411-2 (ABNT, 2006^b) e 15411-3 (ABNT, 2006^c), que de maneira similar a ISO 11348 tratam respectivamente de testes de toxicidade utilizando bactérias recém cultivadas, desidratadas e liofilizadas, respectivamente.

Segundo Mortimer (2008), a bioluminescência da *V. 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.

Ensaio laboratoriais utilizando a bactéria *V. fischeri* como organismo-teste apresentam algumas vantagens, já que podem ser realizados com pequeno volume de amostras de água doce ou salina e são relativamente fáceis de executar. Além disso, a rapidez na obtenção dos resultados, após 30 min de exposição, permite uma resposta rápida em casos de acidentes ambientais.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 SUBSTÂNCIA-TESTE

As substâncias-teste avaliadas e comparadas neste estudo foram o CuO na forma de NP e MP, que são dois compostos inorgânicos e insolúveis.

Para a escolha quanto à NP a ser estudada, foi levado em consideração 3 pontos principais: a forma que a mesma vem sendo utilizada, possibilitando que sejam liberadas em grande quantidade em ambientes aquáticos; a facilidade que as mesmas possuem em penetrar em sistemas vivos devido ao seu tamanho nanométrico; e por fim, ao desconhecimento de seu potencial toxicológico, que pode apresentar riscos sobre a cadeia alimentar em diferentes níveis tróficos.

As NP CuO (II), foram adquiridas 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 30-40nm.

A MP utilizada neste estudo foi o Óxido de Cobre (II) – Óxido Cúprico P.A ACS (Vetec-Química) com pureza de 99%. Para a escolha quanto a esta substância, levou-se em consideração a possível comparação dos resultados dos testes toxicológicos entre os tamanhos das duas partículas.

3.1.1 Preparo das suspensões-testes

Para o início dos estudos fez-se necessário o preparo de suspensões com cada uma das substâncias-teste 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 em ambas as formas.

O método de preparo para a obtenção das suspensões de NP tem sido objeto de estudo de diversos autores, porém não há um procedimento padrão para o seu preparo. A principal metodologia utilizada é com o processo de ultrassonicação realizado através de um Desruptor de Células – Ultra-sônico, sonicador, que tem como objetivo romper os possíveis aglomerados de NP formados quando as mesmas

são adicionadas ao diluente e manter as partícula em suspensão. O preparo das suspensões-testes seguiram, 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. A suspensão foi preparada a uma concentração de 2g/L, pesando 2 g da amostra e diluindo em 20 mL de água ultra pura ($\sigma = 18,1 \text{ M}\Omega \text{ cm}$). A solução foi colocada em erlenmeyer de 50 mL em banho de gelo e colocada sobre um agitador magnético dentro do ultra sônico e sonicada por 30 minutos. O desruptor de células ultrassônico (Unique – 100W) trabalhou na potência máxima de 99%. Após este processo, o volume da suspensão final foi aferido até completar 1L com água ultra pura. 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 utilizou-se o processo de ultrassonicação. 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 poderiam afetar os resultados dos testes de toxicidade que seriam realizados posteriormente.

3.1.2 Caracterização das suspensões-testes

Existe um consenso crescente de que a caracterização das nanopartículas é uma parte essencial da avaliação da toxicidade em sistemas biológicos (Hood, 2004). 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 nanopartículas podem influenciar na determinação dos efeitos toxicológicos

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. Este tipo de análise também foi utilizada nos trabalho apresentado por Blinova *et al.*, (2010), Federici, Sham e Handy (2008), Franklin *et al.*, (2007).

Para a análise através do MET, as suspensões-testes foram gotejadas sobre uma grade de carbono-Cu (300 meshes) e armazenadas em um dessecador à vácuo por 24 horas para a secagem. Para a confirmação dos resultados obtidos nas análises do MET, foi utilizado um MEV (JEOL JSM-6390LV), também do LCME-UFSC com o objetivo de verificar o tamanho dos aglomerados e morfologia.

Além dos métodos acima citados, a caracterização das suspensões também foi conduzida através do equipamento Zeta Plus da BTC (BrookHaven Instruments Corporation) realizado no “Laboratoire de Toxicologie Environnementale” da Université du Québec à Montréal (UQAM) cujo objetivo foi verificar o diâmetro hidrodinâmico dos aglomerados e a estabilidade da suspensão através do potencial zeta (Pz) conforme desenvolvido também por Wang *et al.*, (2011) e Qiang *et al.*, (2007).

3.2 QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS Cu^{+2}

A quantificação de íons foi realizada através da técnica de Espectrometria de Absorção Atômica com o objetivo de quantificar os íons Cu^{+2} disponíveis nas concentrações estoques utilizada para o preparo dos testes de toxicidade. Esta análise quantifica os íons de cobre total da amostra, no entanto foi considerado que as amostras eram compostas por íons Cu^{+2} , pois as duas substâncias-teste eram o óxido de cobre (II).

A metodologia foi baseada no método EPA: digestão para absorção atômica de chama n° 3010A (USEPA, 2007) com algumas modificações e consistiu na transferência do volume de 150 mL das suspensões-testes de NP e MP CuO (previamente agitada e acidificada $\text{pH} < 2$) para um béquer de teflon de 50 mL (triplicata). Após esta etapa, adicionou-se 1,5 mL de HNO_3 concentrado, cobriram-se os béqueres com um vidro de relógio e transferindo-os para uma chapa aquecedora entre 90 – 95°C, até evaporação (volume final de aproximadamente 5 mL da amostra). Após o resfriamento, adicionou-se 1,5 mL de HNO_3 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 ultra pura e mais uma vez deixou-se evaporar até que o volume chegasse a 25mL em cada triplicata de cada amostra.

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, foi aferido para 50 mL com água ultra pura, para assim dar início a leitura da mesma.

3.3 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 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°), 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 PROCEDIMENTOS PARA MICROSCOPIA DE LUZ

Os procedimentos necessários para os emblocamentos do microcrustáceo *D. magna* foram realizados no Laboratório de Algas Marinhas (LAMAR) na UFSC. Os organismos utilizados para a observação foram aqueles expostos a CE₅₀ para ambas formulações de estudo. As *D. magna* 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.

As amostras foram coradas 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 e McCully 1968). Os cortes foram observados e fotograados em microscópio de luz Olympus com sistema de captura de imagem, câmara digital (Olympus Q-Color-3C América ind.)

3.5 ANÁLISES TOXICOLÓGICAS

As análises toxicológicas foram realizadas a partir 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 *V. fischeri*. Todos os testes foram realizados na sala de manipulação do LABTOX.

3.5.1 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, 2004), 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 e o mesmo permaneceu em aeração por no mínimo 12 horas antes da utilização para estabilização dos sais, saturação do oxigênio e estabilização do pH.

Os organismos-teste foram cultivados em lotes de fêmeas, onde cada lote possuía de 20 a 30 organismos, mantidos a temperatura controlada $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e com fotoperíodo de 16 horas de luminosidade. Foi realizada a manutenção com troca do meio M4, retirada de filhotes e alimentação com a alga *Scenedesmus subspicatus* (ISO 1989) 3 vezes por semana.

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

3.5.2 Controle da Sensibilidade dos organismos

Os organismos foram testados semanalmente em relação a sua sensibilidade, assegurando que a qualidade dos mesmos estivesse 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 apresentassem $CE_{50,24h}$ entre 0,6 e 1,7 mg/L de $K_2Cr_2O_7$ (ISO, 1996).

3.5.3 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, 2004) que consistiu na exposição de neonatos (2 até 26 horas de vida) a uma dose única da substância a ser testada por um curto intervalo de tempo (48 horas), onde como resultados foram obtidos a CE_{50} observando efeitos sobre 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 sempre realizados em duplicata, onde foram expostos 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 observado o número de indivíduos imóveis por suspensão (concentração) testada.

A partir destes dados, calculou-se 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 7 apresenta um esquema do teste de toxicidade aguda com *D. magna*.

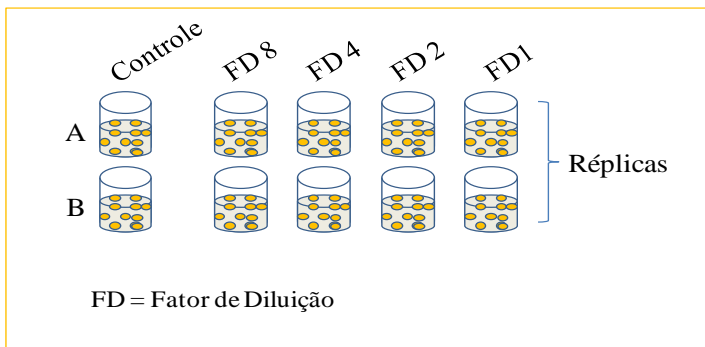


Figura 7: Esquema da montagem do teste de toxicidade aguda com *D. magna*

Para as duas formas a concentração inicial foi de 2g/L, ou seja, 100% da amostra. Para a NP avaliou-se as diluições de 6,25%, 3,125%, 1,56%, 0,79% e 0,38% e para a MP avaliou-se as diluições 25%, 12,5%, 6,25%, 3,125% e 1,256%. 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.

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

O teste de toxicidade crônica busca caracterizar o perfil toxicológico de uma substância sobre uma espécie. As doses foram administradas por um longo período de tempo (21 dias) e compatível com a sobrevivência do organismos-teste neonatos, permitindo verificar os efeitos a longo termo, ou seja, os efeitos cumulativos ou somatizados dos mesmos.

Não há uma metodologia padronizada utilizando o organismo-teste *D. magna*. Existe um protocolo da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD), o guideline 202 (OECD, 1984) que avalia somente o desempenho da reprodução desses organismos, não sendo utilizado para a obtenção da Concentração de efeito não observado (CENO) ou Concentração de efeito observado (CEO). Apesar da inexistência de uma metodologia normatizada, já foram realizados

inúmeros trabalhos utilizando testes de toxicidade crônica com *D. magna*. (HARMEL, 2004; BRENTANO, 2006; FUZINATTO, 2009). A metodologia utilizada neste trabalho foi baseada em Terra, Feiden, e Fachel (2008) com algumas adaptações e também a experiência dos métodos usados no LABTOX – UFSC desde 2004.

Para realização dos testes foram utilizados organismos neonatos com 2 a 26 horas de idade. Estes organismos foram expostos ao controle e as diluições de 0,39% (FD256), 0,195% (FD512), 0,09755% (FD1024) e 0,048% (FD2048) para as NP, e as diluições de 3,125% (FD32), 1,562% (FD64), 0,78% (FD 128) e 0,39% (FD256) para a MP. A concentração inicial para as duas formulações foi de 2g/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 que objetivou a determinação da CEO e CENO.

Os testes tiveram duração de 21 dias e o meio diluente foi o M4 (meio de cultura do cultivo de *D. magna*). Para cada diluição, foram utilizadas 10 réplicas, dispendo 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 algacea *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 8 apresenta um esquema do teste de toxicidade crônica utilizando *D. magna* como organismo-teste.

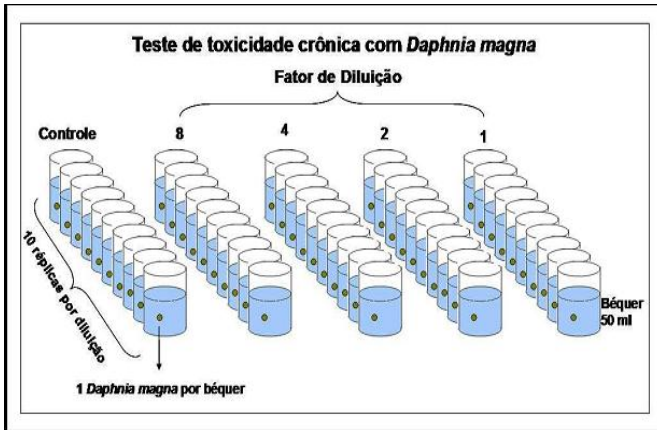


Figura 8: Ilustração do teste de toxicidade crônica

Fonte: Fuzinato, 2009

Os parâmetros analisados no teste foram 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 *Daphnias* adultas 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:

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

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

O crescimento foi avaliado através da variação de comprimento dos organismos testados, 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 9 apresenta a medição do crescimento. A figura 10 ilustra como é realizada a medida do crescimento total da *D. magna* após 21 dias.

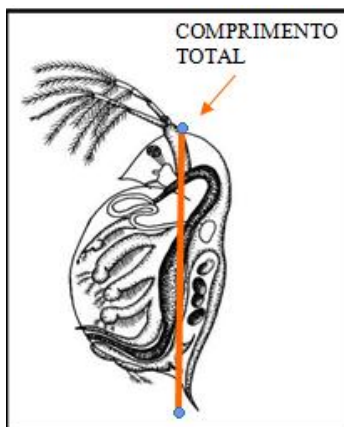


Figura 9: *D.magna* após 21 dias
 Fonte: COSTA(2010)

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, foram utilizados o programa estatístico Statistic 7.0 através da análise de ANOVA – one way que definiu a diferença significativa entre grupos através da variabilidade entre eles. Este Software baseou-se no princípio da comparação, onde realiza a comparação dos resultados obtidos no controle com as diluições ($p = 0,05$). A menor concentração em que esta diferença excede este valor é considerada como CEO. Determinada a CEO, foi originada a CENO como sendo a concentração inferior a CEO.

3.5.5 Metodologia de teste agudo com a bactéria bioluminescente *Vibrio fischeri* - Sistema Microtox

O teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha luminescente *Vibrio 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 e através da metodologia proposta pela ISO 11348-3 (1998^c).

As bactérias foram expostas a uma gama de concentrações das suspensões a serem 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 foi 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 são obtidos através da $CE_{50, 15min}$ e a $CE_{50, 30min}$ (concentração efetiva que causa efeito em 50% dos organismos em 30 minutos de exposição).

Os testes de toxicidade foram realizados em temperatura controlada pelo equipamento, que mantém a série de diluições do teste em $15\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ 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, 15 e 30 minutos 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 foram tomados em relação aos possíveis interferentes tais como: pH, salinidade e turbidez. Iniciou-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 $CE_{50, 15min}$, e $CE_{50, 30min}$, que corresponde à concentração efetiva que causa a inibição de 50% da luminescência em 15 e 30 minutos. Os cálculos foram realizados pelo software do equipamento.

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 é de 80 %. A figura 10 ilustra a realização do teste de toxicidade aguda com a *V. fischeri* com o equipamento Microtox®.

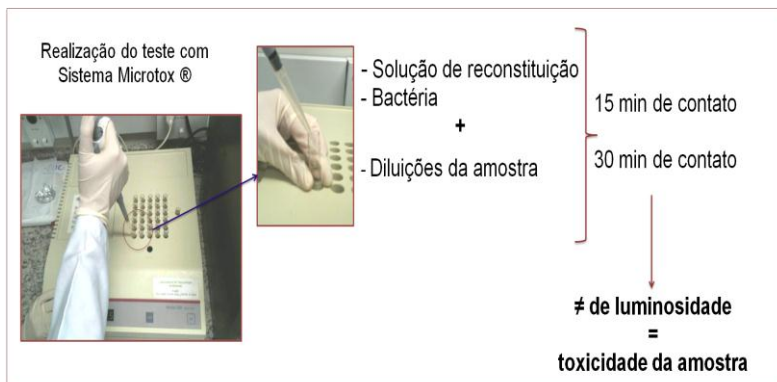


Figura 10: Ilustração do teste de toxicidade aguda com *V. fischeri*

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES-TESTES

A adequada caracterização das suspensões-teste em estudos toxicológicos é importante para garantir que os resultados obtidos sejam reprodutíveis, fornecendo assim uma melhor base para a compreensão das suas propriedades físicas e químicas, podendo determinar os possíveis efeitos tóxicos sobre um organismo aquático.

A caracterização das suspensões das duas formulações do Óxido de Cobre foi realizada com o auxílio de um Microscópio Eletrônico de Transmissão – MET, de um Microscópio de Eletrônico de Varredura – MEV ambos do LCME - UFSC e um Zeta Plus da UCAM.

4.1.1 Microscopia eletrônica

A caracterização através da microscopia eletrônica teve como objetivo fornecer o tamanho dos aglomerados e a sua morfologia. Os microscópios foram operados por um técnico de laboratório - Área Física.

Análises por MET

NP CuO

Com a técnica de microscopia, foi possível obter boas imagens das NP em suspensão para 3 diferentes diluentes (água ultra pura, meio ISO e água ultra pura com adição de 0,2g de NaCl) como mostra a figura 11. As imagens foram obtidas a partir de uma concentração inicial de 2,0 g/L.

Levando em consideração que o contato entre NP e um meio diluente (água ultra pura, por exemplo), tende a formar aglomerados de NP, devido em grande parte a grande área superficial e reatividade.

A figura 11 apresenta 4 análises realizadas com a suspensão de NP CuO com diferentes diluentes através do MET por onde obtiveram-se os tamanhos dos aglomerados e a forma das nanopartículas em suspensão.

Na figura 11A, o meio de diluição utilizado para a preparação da suspensão foi o meio ISO que foi utilizado para o preparo do teste agudo com *D. magna*, este meio contém em sua formulação sais e compostos orgânicos, que pode facilitar a possibilidade de reações químicas entre as NP e íons de cobre liberados, e também a aglomeração. Foi possível observar uma considerável quantidade de aglomerados. Para a figura 11A, o diâmetro médio dos aglomerados foi de 263 nm, medido através do software ImageJ.

Na figura 11B e 11D, o meio de diluição utilizado para a preparação da suspensão foi a água ultra pura utilizada para a preparação de todas as suspensões testes utilizada neste trabalho. O diâmetro médio encontrado dos aglomerados foi de 148 nm, e em sua maioria aglomerados de forma esférica.

A figura 11C representa as imagens obtidas quando se foi utilizado o meio diluente para bactéria *V. fischeri*. O meio é composto por uma solução de 0,2g de NaCl dissolvidos em água ultra pura. Neste diluente é possível observar que as NP apresentaram uma maior tendência à formação de aglomerados de menor diâmetro. As NP apresentaram-se de formas mais dispersas, e os aglomerados formados encontraram-se com diâmetro inferior à 100nm.

Portanto, em todos os meios de diluição utilizados para os estudos toxicológicos, as NP contidas nas suspensões testadas encontraram-se na escala nanométrica caracterizando assim o objetivo deste estudo.

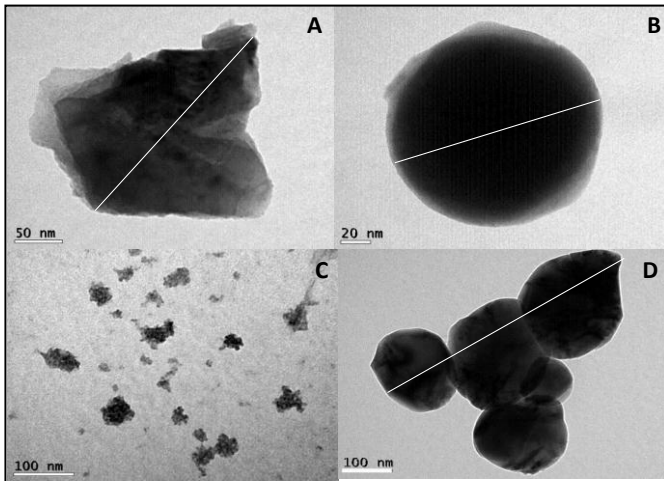


Figura 11: Imagens das NP CuO obtidas através de MET (A: meio ISO; B e D: água ultra pura; C: água ultra pura + 0.2g NaCl).

MP CuO

A caracterização da MP de Óxido de Cobre através do TEM foi realizada com o objetivo de caracterizar e confirmar que esta suspensão encontrava-se na escala micrométrica. A caracterização foi realizada através do diluente água ultra pura. Conforme a figura 12 foi possível caracterizar a partícula como micrométrica. O diâmetro obtido nesta figura foi de 2,5 μ m.

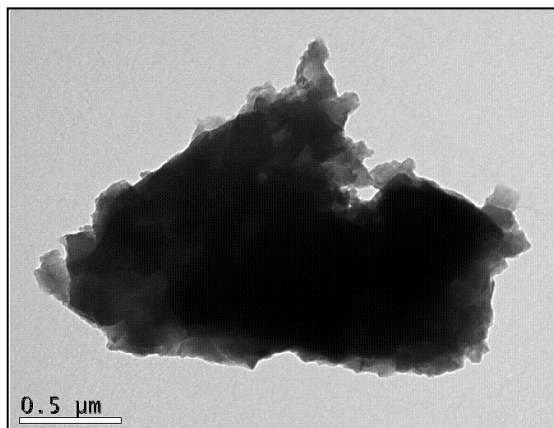


Figura 12: Imagens das MP CuO em água ultra pura obtidas através de MET.

Análises por MEV

Para complementar os resultados obtidos através da MET, foi utilizado o microscópio de varredura com o objetivo de confirmar o tamanho dos aglomerados e a sua morfologia. Todas as imagens foram obtidas a partir de uma suspensão de NP CuO e água ultra pura ($\sigma = 18,1 \text{ M}\Omega \text{ cm}$) na concentração de 2g/L. Os *stubs* utilizados após o gotejamento das amostras foram recobertos com 2nm de ouro para que fosse possível a visualização através da irradiação de um feixe de elétrons.

NP x MP

A figura 13 apresenta as imagens obtidas através da microscopia eletrônica por varredura com o meio diluente água ultra pura para as formulações de NP e MP CuO. Na figura 13A e 13B é possível confirmar a escala nanométrica das NP obtidas através do auxílio do MEV, com diâmetro médio de 229,45 e 258,00nm, respectivamente, obtidos pelo software do próprio microscópio. No entanto, estes valores encontram-se acima de 100nm. Os diâmetros médios encontrados podem ser explicados pelo fato de que a NP, ao entrarem em contato com um líquido,

adquirem uma carga elétrica em sua superfície afetando a distribuição de íons na sua vizinhança, e aumentando a concentração de contraíons junto à sua superfície. Esse comportamento poderá facilitar a aglomeração destas partículas. já as figuras 13C e 13D é possível observar a MP na escala micrométrica, diferenciando assim as duas substâncias testes utilizadas para os estudos toxicológicos.

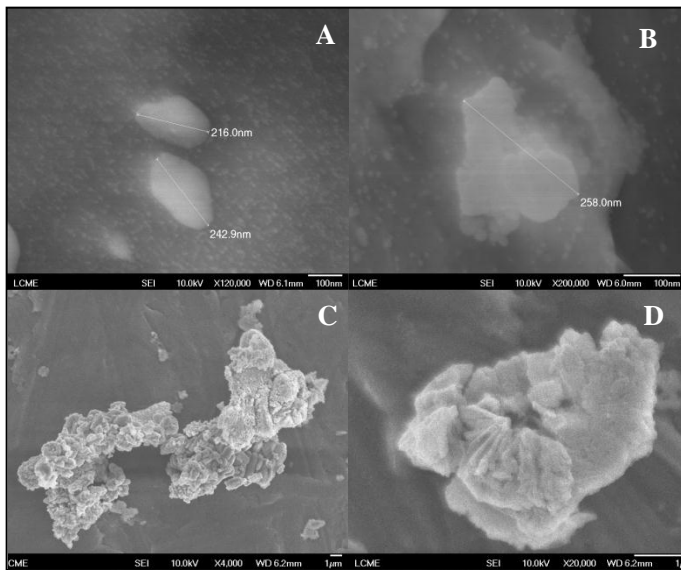


Figura 13: Imagens das NP e MP CuO obtidas através MEV em água ultra pura.

(A: NP CuO – diâmetro médio -229,45nm; B: NP CuO – diâmetro 258,0 nm; C: MP CuO – Diâmetro maior do que 1000nm; D: MP CuO – Diâmetro maior do que 1000nm).

4.1.2 Potencial Zeta

Esta análise foi realizada em cooperação com Departamento de Química e Bioquímica no “Laboratoire de Toxicologie Environnemental” da Université du Québec à Montréal (UQAM) através do equipamento Zeta Plus. Por esta análise, foi possível determinar a estabilidade da suspensão através do potencial zeta (Pz) e o tamanho dos aglomerados encontrados nas suspensões.

Assim como a maioria das outras partículas, as NP em contato com a água adquirem carga elétrica superficial que são geradas através da teoria do DLVO - (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek), que descreve a força entre as superfícies carregadas que interagem com um meio líquido. Esta teoria estabelece que a estabilidade de uma suspensão depende da quantidade de interações das NP, que resultam tanto das forças atrativas (forças de *Van der Waals*) como das repulsivas (eletrostática). Esta carga superficial afeta a distribuição de íons da solução na sua vizinhança que por sua vez leva ao aumento da concentração de contra íons à sua volta, formando uma dupla camada elétrica. O Pz é o potencial eletrocinético dos íons e moléculas do diluente incluso no plano de cisalhamento quando submetidos a um potencial elétrico. Em geral, suspensões com partículas de Pz alto (valor absoluto) são consideradas mais estáveis, enquanto que partículas com valor menor tendem a se aglomerarem e coagularem, tornando-se mais instável.

NP x MP

O Pz foi determinado através da média dos potenciais obtidos em 10 leituras pelo equipamento com a mesma amostra e os valores encontrados para as duas formas estudadas são apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Comparação entre NP e MP CuO através do Pz

	NP CuO	MP CuO
P _z (mV)	- 14,13	- 33,68

O valor encontrado para a suspensão de NP CuO foi de -14,13mV, em água Ultra Pura, caracterizando-a como uma suspensão instável devido baixo valor do P_z . Sabe-se que quanto maior valor absoluto do potencial zeta, mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas se repelem umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação. Segundo um estudo realizado por Qiang et al., (2007), para todas as medições do P_z com NP CuO, foram encontrados valores negativos variando de -22 até -38 mV para diferentes dispersantes, pH e concentração e Buffet *et al.*, (2010) encontraram valores -8,69 t=0 e -7,72mV t=2d de exposição em meio diluente para o teste corroborando com o resultado negativo aqui mostrado, observando a influência da solução utilizada para a estabilidade da suspensão.

O P_z para a suspensão com a MP CuO também foi medido a fim de comparação com a NP. O P_z obtido foi negativo e no valor de -33,68 mV, conforme mostrado na tabela 3 mostrando que esta suspensão é mais estável em relação à suspensão de NP. É importante ressaltar que existem cargas positivas e negativas, sendo que o valor do balanço entre os números de carga é o que determina o valor do P_z .

Os laudos das análises encontram-se no apêndice deste trabalho.

4.2 QUANTIFICAÇÃO DE ÍONS Cu^{+2}

Em geral, um dos mecanismos causadores de toxicidade tanto das NP como na MP CuO pode ser explicado devido a grande solubilidade de íons Cu^{+2} conforme explicado por Kahru e Dubourguier (2009). Segundo Bremner (1998), o cobre é um elemento traço essencial capaz de produzir efeitos tóxicos em animais ou seres humanos, quando ingerido de forma aguda ou crônica em excesso. Devido a esta capacidade, foi realizada uma análise através da Espectrometria de Absorção Atômica em Chama (FAAS) para as duas amostras estudadas. Os valores encontrados para as concentrações de íons Cu^{+2} de uma

suspensão de 2,0 g/L para NP e MP de CuO foi de 1448,0 mg Cu⁺²/L e 673,42mg Cu⁺²/L respectivamente e apresentado na figura 14.

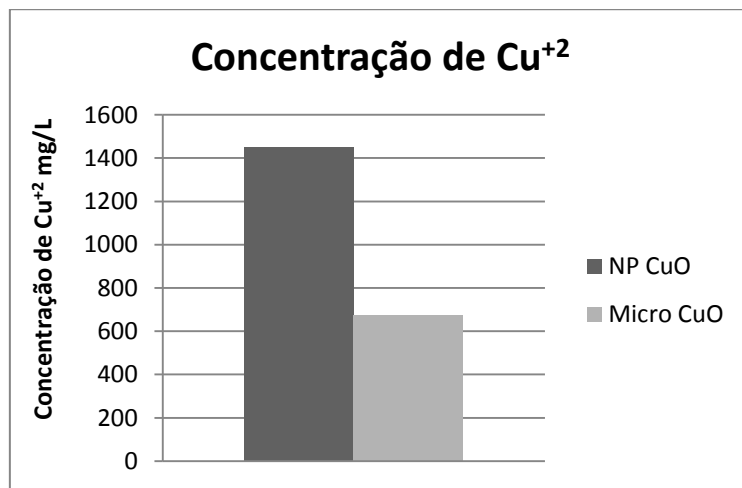


Figura 14: Quantificação de íons biodisponíveis através da FAAS.

Apesar das amostras nesta técnica terem sido acidificadas e com isso forçado a liberação de íons na solução, ela é muito importante uma vez que foi possível quantificar o valor total dos íons Cu⁺² nas suspensões-teste utilizadas como ponto de partida para a caracterização e testes toxicológicos. A partir destes resultados também foi possível comprovar que as NP possuem uma maior liberação de íons de Cu⁺² na forma biodisponível. Esta maior liberação está associada à maior área superficial e reatividade, que as NP apresentam em relação à MP. Conforme mostrado por Cronholm *et al.* (2011), o processo de ultra-som utilizado para preparar as suspensões pode facilitar a liberação de íons de Cu⁺² e conseqüentemente influenciar na toxicidade das NP.

4.3 AVALIAÇÃO DA ÁREA SUPERFICIAL

Os resultados obtidos apresentaram a área superficial para a NP CuO de 5.380 m²/g enquanto que para MP CuO foi de 2.802 m²/g. Durante a análise foram utilizados 0,239g de NP e 0,19g para MP. Apesar dos dois valores obtidos estarem próximos, pois a partículas podem ser heterogenia, é possível observar que a NP possui área maior do que a MP e com isso um tamanho menor. A maior área superficial pode estar relacionada com a maior liberação de íons conforme explicado na sessão 4.2.

4.4 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

4.4.1 Toxicidade Aguda

Os resultados apresentados referem-se à concentração efetiva CE_{50, 48h}, CE_{zero}, FD e pH para a suspensão de NP CuO e MP CuO. Com estes resultados foi possível determinar o efeito toxicológico agudo causado nas primeiras 48 h de exposição do organismo aquático as NP CuO e MP CuO e determinar e comparar qual formulação é mais tóxica aos organismos expostos.

Para a avaliação da toxicidade aguda, foram expostos os organismos aquáticos microcrustáceo da água doce *D. magna* e a bactéria marinha *V. fischeri*. Os resultados foram apresentados através CE_{50, 48h} e CE_{zero} expressos em mg/L.

4.4.1.1 Toxicidade aguda com *D. magna*

NP CuO

Os testes de toxicidade aguda para as NP CuO apresentaram toxicidade elevada e seus valores estão

apresentados na tabela 4. Os organismos expostos à suspensão-teste na concentração de 2g/L (100%) apresentaram mortalidade em 100% dos organismos em menos de 24 h. O pH obtido para suspensão foi em média de $6,37 \pm 0,08$ respeitando os limites 5,0 – 9,0 propostos pela ABNT 12713 (2004) não sendo considerado um interferente e causador de toxicidade na realização do teste.

MP CuO

Os valores obtidos estão apresentados na tabela 4. A concentração da suspensão teste utilizada para a realização do teste foi de 2g/L. Os organismos quando exposto a 100% apresentaram efeitos toxicológicos em menos de 36 horas. O pH obtido foi em média $6,32 \pm 0,18$ estando dentro dos limites propostos pela ABNT 12713 (2004).

NP x MP

Segundo Scenihr (2006) nem todas as formulações de NP induz uma toxicidade mais acentuada do que a as formulações MP da mesma substância. Isto sugere que a avaliação e comparação da toxicidade entre as duas formulações sejam realizadas para a correta diferenciação e uso mais sustentável.

Na tabela 4 são apresentados os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda com as duas formulações. A partir destes é possível comparar e comprovar que as NP CuO foram aproximadamente 10 vezes mais tóxicas do que a sua formulação micrométrica.

Tabela 4: Valores de toxicidade aguda para NP e MP

Amostra	pH	CE_{50. 48horas}	CE_{zero}
NP CuO	6,37	22 mg/L	7,6 mg/L
MP CuO	6,32	223,6 mg/L	31,2 mg/L

Na figura 15 observa-se o comportamento, em relação a sobrevivência, dos microcrustáceos *D. magna* para os testes de toxicidade aguda após 48 horas de teste. Nota-se que houve mortalidade de 100% dos organismos expostos à NP até a concentração de 6,25%, enquanto que para a MP a mortalidade foi até a concentração de 25% da amostra. Em relação concentração que não causou efeito em relação a sobrevivência, observa-se que para a NP foi a partir da concentração de 0,38% enquanto que para a MP foi a partir da concentra de 1,56% da amostra testada.

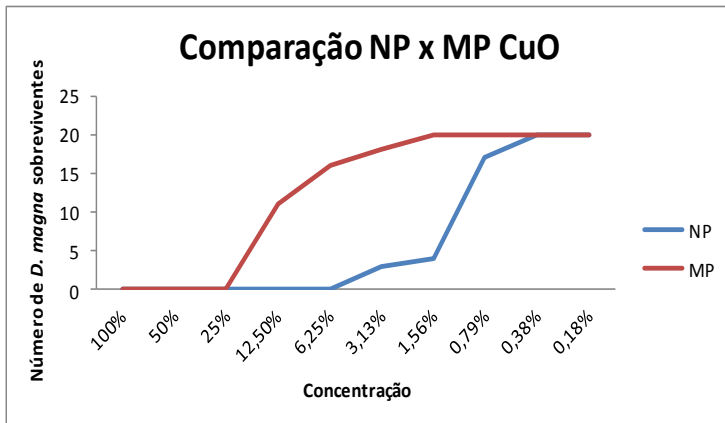


Figura 15: Comportamento da NP e MP

Esses resultados evidenciam que a NP mostrou-se mais tóxica corroborando com os resultados obtidos por Heinlaan *et al.*, (2008), Karlsson *et al.*, (2009) e Blinova *et al.*, (2010). O trabalho desenvolvido por Heinlaan e a sua equipe, utilizou a mesma metodologia para os testes de toxicidade aguda desta dissertação e apresentou em seus resultados que a NP foi mais tóxica do que a MP para *D. magna*, Karlsson também estudou a

comparação das duas formulações a nível celular e mostraram que a NP CuO também apresentou-se mais tóxica do que a MP CuO, e por fim Blinova e sua equipe mostraram que em água doce artificial e natural a NP também apresentou-se mais tóxica do que a MP. A tabela 5 apresenta os resultados obtidos por estes pesquisadores.

Tabela 5: Resultados apresentados por outros autores

	CE ₅₀ – NP CuO (mg/L)	CE ₅₀ – MP CuO (mg/L)
Heinlaan <i>et al</i> (2008)	3,2	164,8
Blinova <i>et al</i> (2010) (água doce artificial)	2,6	132
Blinova <i>et al</i> (2010) (água natural de rio)	170,9 (valor médio entre 6 rios)	1300 (valor médio entre 6 rios)

Com base nos resultados obtidos nestes testes e a partir dos apresentados no item 4.2, pág 69 sobre a quantificação de íons Cu⁺² é possível verificar que as NP possuem uma maior liberação de íons de Cu⁺² na forma biodisponível quando comparadas à MP, sendo esta uma característica importante para explicar sua maior toxicidade. Ao realizar teste de toxicidade aguda com *D. magna* Heinlaan *et al.*, (2008) utilizou CuSO₄ como controle positivo com objetivo de comprovar que os íons de Cu⁺² são muito tóxicos para este microcrustáceo, o valor encontrado para a CE₅₀ para este sal foi 0,17mg/L, podendo assim provar que os valores aqui encontrados estão relacionados com íons de Cu disponíveis.

Outro mecanismo que influencia diretamente o efeito da toxicidade é o fato dos microcrustáceos *D. magna* serem animais filtradores alimentando-se de material orgânico particulado. Por se tratar de uma suspensão de material particulado, tanto as NP quanto as MP de óxido de cobre podem ser ingeridas pelo organismo teste diretamente através da filtração como é mostrado na figura 16. Esse processo facilita a entrada dessas partículas nestes organismos, tornando-as mais biodisponíveis ao seu sistema digestivo. Além da ingestão direta pela filtração, as NP

podem ter uma maior permeabilidade através das membranas celulares devido ao tamanho extremamente reduzido, podendo ter seu efeito tóxico magnificado devido à esta característica.

Outro efeito deletério que pode ocasionar a imobilização/morte dos organismos testados é através do contato direto das NP com as membranas celulares intestinais, podendo gerar danos as mesmas através de stress oxidativo, como reportado por Karlsson, Holgersson e Möller (2008b), através dos resultados obtidos com a leitura do Pz mostrada na sessão 4.1.2, as duas formulações após entrarem no tubo intestinal destes organismos, continuam possivelmente liberando íons de cobre diretamente no seu interior levando a uma acentuação do efeito tóxico dos compostos testados.

Na figura 16, imagem macro do microcústáceo, é possível visualizar e comparar 3 organismos utilizados para a realização do teste de toxicidade aguda. A figura 16A mostra um organismo controle com a presença de algas *Scenedesmus subspicatus* preenchendo todo o intestino do animal, na figura 16B mostra-se a presença de NP no intestino do microcústáceo exposto a NP CuO durante 48 horas confirmando assim que as mesmas são ingeridas pela *D. magna* e na figura 16C é possível observar a presença de MP no intestino de um organismo exposto a MP CuO durante 48 horas.

Com estas imagens, percebe-se que as duas formulações do CuO são ingeridas pela *D.magna*, e devido a isso, o poder toxicológico das mesmas poderá ser magnificado pelo fato da liberação direta de íons Cu^{+2} no interior do microcústáceo.



Figura 16: Comparação entre organismos expostos e não expostos a NP e MP CuO.

(A: *D. magna* – controle (seta: presença de alga no intestino do microcrustáceo)). B: *D. magna* exposta a NP CuO (seta: grande quantidade de NP no intestino). C: *D. magna* exposta a MP CuO (seta: presença de MP no intestino).

As figuras 17 e 18 apresentam as análises das secções transversais de *D. magna*, após 48 h de exposição, por microscopia de luz. Foi possível observar que as NP encontravam-se no tubo digestivo do organismo em maior quantidade de a MP. Na figura 17 é possível observar um corte do organismo exposto a NP CuO e a região que as mesmas estão alocadas.

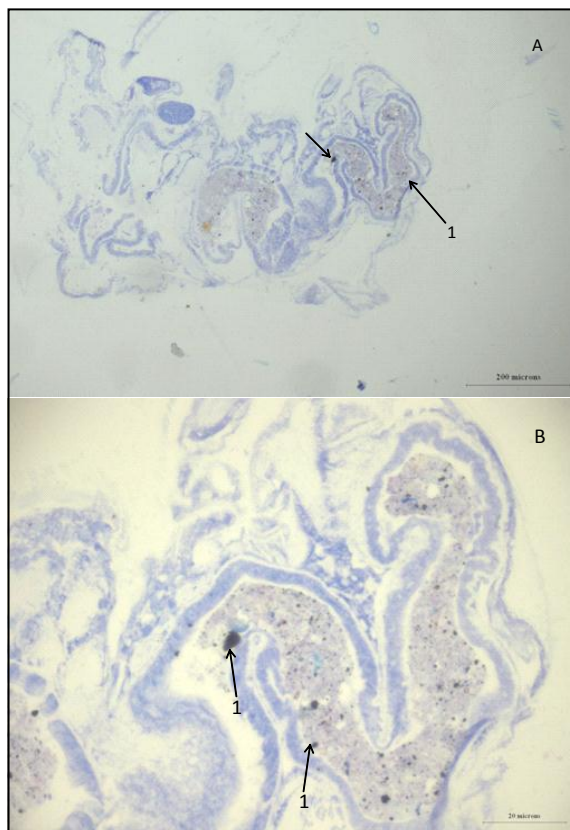


Figura 17: Detalhe do intestino da *D. magna* exposta à NP CuO. (Secções transversais de *D. magna* exposta à NP CuO durante um período de 48 h na concentração da CE₅₀ corado com AT-O e observadas ao M.L. Fig. 16 A - Destaque do intestino da *D. magna* mostrando a presença do NP CuO no interior do órgão (seta). Note a presença de células epiteliais do intestino com coloração ortocromática (seta 1). Fig. 17 B - Detalhe de uma porção do intestino com destaque das NP CuO (seta 1) amplamente distribuídas).

A figura 18 apresenta as secções transversais de *D. magna*, após 48 h de exposição a MP CuO, por microscopia de luz. Mostra-se que as MP também encontravam-se no intestino do microcrustáceo, no entanto, em menor quantidade.

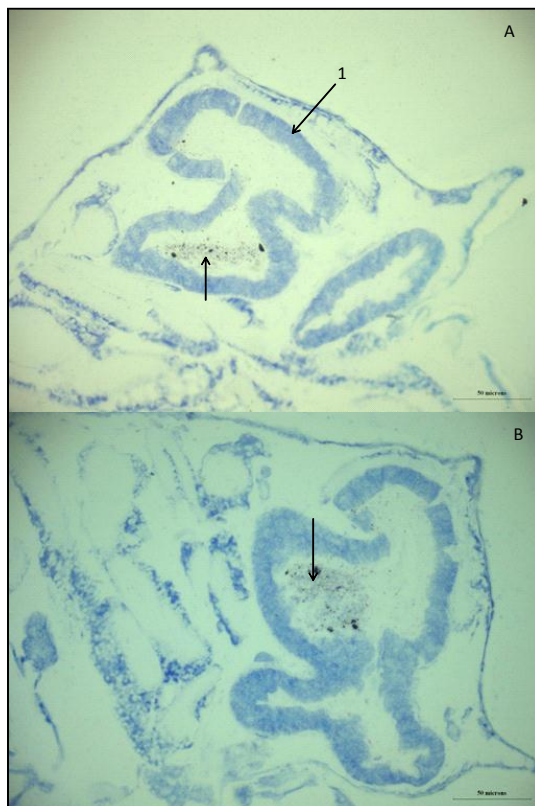


Figura 18: Detalhe do intestino da *D. magna* exposta à MP CuO. (Secções transversais de *D. magna* exposta à MP CuO durante um período de 48 h na concentração da CE₅₀ corado com AT-O e observadas ao M.L. Fig. 18 A - Porção do microcrustáceo mostrando a presença de MP CuO (seta) no interior do intestino. Note a presença de células epiteliais do intestino com coloração ortocromática (seta 1). Fig. 118 B – Destaque maior da MP CuO (seta) no interior do intestino).

Pelas figuras 17 e 18, evidencia-se que as NP possuem maior facilidade para penetrar no organismo através da filtração de material particulado e por isso aparece em maior quantidade no interior do intestino do que a MP. Esta facilidade está relacionada ao tamanho inferior quando comparada à sua formulação micrométrica. A maior toxicidade exercida pelas NP em relação a MP pode estar relacionada a facilidade de penetração das NP. As NP são mais reativas do que as MP devido ao seu menor tamanho, maior área superficial, maior liberação de íons Cu^{+2} , menor P_z conforme mostrado no item 4.1.2 desta dissertação. Os efeitos toxicológicos poderão ser potencializados devido a maior reatividade no interior do organismo.

4.4.1.2 Toxicidade aguda com *V. fischeri*

NP CuO

Para testes de toxicidade aguda com a bactéria marinha bioluminescente *V. fischeri*, um teste de sensibilidade com Sulfato de Zinco Heptahidratado (concentração de 100 mg/L) foi realizado para a validação do lote de bactéria. A sensibilidade apresentou a $CE_{50,15\text{min}}$ em 4,247 mg/L (3 – 10mg/L), estando dentro dos limites estabelecidos pela ISO 11348-3(1998).

A NP CuO apresentou toxicidade elevada e aplicando o software Microtox® a amostra foi classificada como muito tóxica. Os resultados obtidos são apresentados na tabela 6. O pH da amostra após o ajuste osmótico foi de $6,46 \pm 0,03$ encontrando-se dentro do limite estabelecido pela ISO 11348-3(1998) para a realização do teste sem a necessidade da sua correção.

MP CuO

Para os testes de toxicidade aguda para a bactéria marinha bioluminescente *V. fischeri* o teste de sensibilidade com Sulfato de Zinco apresentou a $CE_{50,15min}$ em 9,467 mg/L.

A MP CuO apresentou toxicidade. A tabela 6 apresenta valores obtidos. O pH da amostra após o ajuste osmótico foi de $6,75 \pm 0,44$ encontrando-se dentro do limite estabelecido pela ISO 11348-3(1998).

NP x MP

Na tabela 6 são apresentado os resultados obtidos no teste de toxicidade aguda com a duas formulações. A partir destes é possível comparar e comprovar que as NP CuO foram novamente mais tóxica para os dois tempos de ensaio do que a MP.

Tabela 6: Comparação dos valores obtidos para o teste de toxicidade aguda para a *V. fischeri*

Amostra	pH	$CE_{50, 15min}$ (mg/L)	$CE_{50, 30min}$ (mg/L)
NP CuO	6,46	304,4	288,4
MP CuO	6,75	2696,6	1685

A NP CuO apresentou-se 8 vezes mais tóxica para a $CE_{50, 15min}$ e de aproximadamente 6 vezes mais tóxica para a $CE_{50, 30min}$ quando comparada com a MP CuO. A concentração inicial para a NP foi de 2000mg/L e de 4000mg/L para a MP.

Durante a realização do teste, devido à alta coloração presente nas duas amostras as mesmas ficaram em repouso durante 30 min e só após isso se realizou o teste com o sobrenadante das amostras conforme instruções CETESB L5. 227/ 2001.

A toxicidade sobre a bactéria marinha é medida em relação a diminuição da emissão de bioluminescência. A diferença obtida entre a EC_{50} em 30 min. e 15 min., esta ligada a diminuição dos seus processos metabólicos e perda de viabilidade celular. Zhang *et al.*, (2002) verificaram que a emissão de bioluminescência das bactérias também é influenciada pela concentração celular, quanto maior a concentração de bactérias maior a emissão de bioluminescência através da liberação de feromônios, e, portanto a sua diminuição explica que a exposição do xenobiótico em questão leva à diminuição da concentração celular por morte celular.

As suspensões-teste foram preparadas em água ultra pura, segundo Hand, Owen e Valsami-Jones (2008), a adição de sal ao meio faz com que haja um aumento da força iônica que poderá influenciar na agregação das NP. Conforme foi observado na sessão 4.1.2, as NP quando caracterizadas no meio diluente para a bactéria *V. fischeri*, apresentaram-se de forma mais aglomeradas do que em outros diluentes, podendo ser um evento ligado diretamente a toxicidade, pois em aglomerados de maior tamanho, o comportamento toxicológico é modificado.

Um estudo realizado por Buffet *et al.*, (2010) mostrou que em água salgada, os diâmetros das NP aumentaram significativamente em poucos dias e a suspensão tornou-se mais instável devido a diminuição do Pz em relação ao controle. A aglomeração e a estabilidade das NP estão diretamente ligadas aos resultados de toxicidade obtidos, pois com o aumento do diâmetro a reatividade associada à área superficial poderá ter um decaimento. Esse comportamento reflete diretamente na quantidade de íons biodisponíveis na suspensão e os efeitos deletérios sobre os organismos expostos, ou seja, quanto maior o diâmetro, menor a toxicidade devido à menor liberação de íons de Cu^{+2} . Esse efeito pode ser confirmado através dos dados obtidos pelo FAAS. Gao *et al.*, (2009) afirmam que quanto maiores os valores de Carbono orgânico dissolvido, menor a toxicidade, provavelmente ocasionado pela complexação do metal (Cu) com os compostos orgânicos dissolvidos. Esse tipo de reação pode explicar a menor toxicidade das NP CuO às *V. fischeri* em função

da presença elevada de cloreto na amostra, facilitando a complexação do metal, formando o complexo tetraclorocuprato CuCl_4^{3-} , que poderia diminuir a sua toxicidade.

Tsiridis, Petala e Samaras (2005) apresentaram em um estudo, a redução da toxicidade sobre às *V. fischeri* com o aumento da concentração de ácidos húmicos devido a complexação dos íons metálicos. Os íons utilizados foram o Cu, Zn e Pb. Apesar dos testes do presente estudo não conter ácidos húmicos dissolvidos, esta explicação pode nos fornecer uma visão do que poderia acontecer, em relação a toxicidade, quando a NP CuO atingisse um ambiente aquático marinho devido a sua instabilidade química. Segundo Blinova *et al.*, (2010), o tipo e a quantidade de matéria orgânica natural presente nas águas afetam diretamente a estabilidade e a biodisponibilidade das NP.

Os valores encontrados neste trabalho corroboram com os resultados apresentados por autores como Heinlaan *et al.*, (2008) e Mortimer *et al.*, (2008) que realizaram estudos de diferentes NP com o organismo teste *V. fischeri*, ou seja, a NP CuO mostrou-se mais tóxica do que a sua formulação micrométrica para este organismo teste.

4.4.2 Toxicidade Crônica

Os resultados apresentados referem-se aos valores obtidos da Concentração de Efeito Observado – CEO e as Concentrações de Efeito Não Observado - CENO para as suspensões de NP CuO e MP CuO em relação aos parâmetros de reprodução, longevidade e crescimento. Com estes resultados foi possível determinar o efeito toxicológico crônico causado sobre o microcústáceo *D. magna* durante a exposição por um período de 21 dias. As diluições avaliadas foram definidas a partir da CE_{zero} obtidas nos testes de toxicidade aguda e em uma razão de 2.

Os testes crônicos para as suspensões de NP e MP CuO foram iniciados no mesmo dia com a finalidade de garantir a mesma sensibilidade dos organismos expostos. O teste de sensibilidade foi realizado no início do teste crônico com a

substância de referência o Dicromato de Potássio e apresentou $CE_{50, 24h}$ de 0,98mg/L encontrando-se dentro da faixa de 0,6 a 1,70 mg/L $K_2Cr_2O_7$, proposta pela ISO 6341(1996). Este teste validou o lote de organismos utilizados para realização do teste crônico.

4.4.2.1 Toxicidade crônica com a NP de CuO

Durante o teste, foram avaliadas 4 concentrações e um controle negativo preparados com meio M4 utilizado para o cultivo da *D. magna*. As concentrações testadas foram a 7,8 (FD 256), 3,9 (FD 512), 1,95 (FD1024) e 0,975 (FD 2048) mg/L, para os parâmetros de reprodução, longevidade e crescimento.

Reprodução

A média dos filhotes nascidos nas concentrações testadas mostrou-se ligeiramente oscilante entre as diluições. Os nascimentos dos organismos exposto a NP CuO e ao controle iniciaram-se a partir do 8º dia do teste, não mostrando efeito em relação ao início da reprodução. Na maior concentração testada, ou seja, 7,8mg/L (FD256) foi observado um aumento significativo de nascimentos em relação ao controle, determinando assim a CEO para este parâmetro. A figura 19 apresenta o comportamento da média da reprodução entre as diluições e a concentração que apresentou diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle. A réplica 9 da concentração de 3,9 mg/L (FD 512) não apresentou nascimentos durante todo o período de teste, entretanto esta diluição não apresentou diferença significativa em relação ao controle, possibilitando então defini-la como a CENO. Na figura 20 é possível visualizar a bolsa embrionária para este organismo, excluindo a possibilidade do mesmo ser classificado como macho.

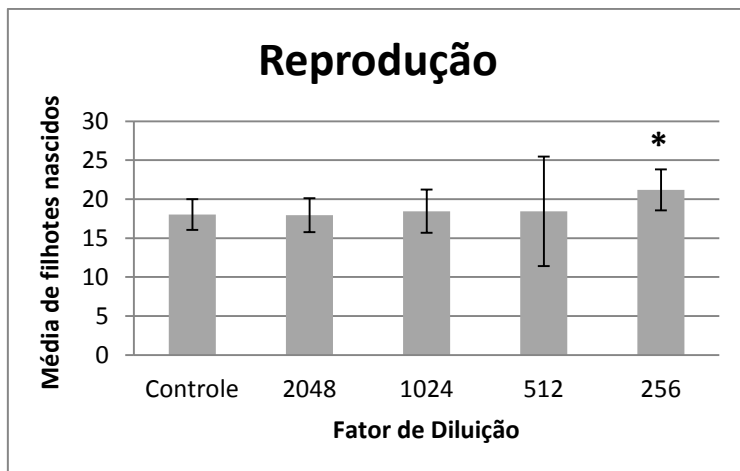


Figura 19: Resultados para o efeito crônico da *D. magna* exposta à NP CuO para o parâmetro reprodução.

(*Concentração que apresentou efeito estatisticamente significativo no aumento da reprodução em relação ao controle com $p < 0,05$).

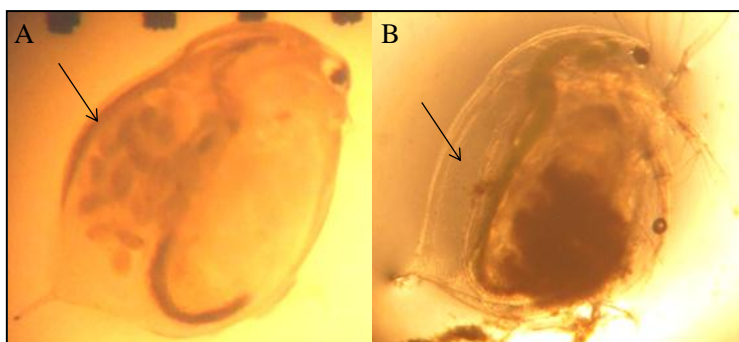


Figura 20: Detalhe da bolsa embrionária das *D. magna* exposta a NP CuO em relação com controle. (A: esquerda, *D. magna* controle com a bolsa embrionária com grande quantidade de ovos; B: *D. magna* exposta a NP CuO sem a presença de ovos na bolsa embrionária durante todo o período de teste (21 dias) exposto a NP).

O aumento no valor médio de filhotes nascidos durante a realização do teste na maior concentração testada pode ser

explicado como sendo uma resposta a um agente causador de estresse na tentativa de preservar a espécie ameaçada pela exposição (neste caso a NP CuO). Terra *et al.*, (2008) relatam terem observado este comportamento em seu estudo de exposição no organismo *D. magna* à sedimentos de rios. Verificou-se também que a medida que a concentração diminuiu, este efeito passou a não ser mais significativo.

Crescimento

Ao final de 21 dias de exposição, todas as concentrações avaliadas apresentaram diminuição no tamanho dos organismos expostos a NP CuO, em todas as diluições foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação ao controle como mostrado na figura 21. A partir dessa observação é previsto que a CENO será uma concentração com FD maior a 2048 e a CEO uma concentração com o FD ≥ 2048 .

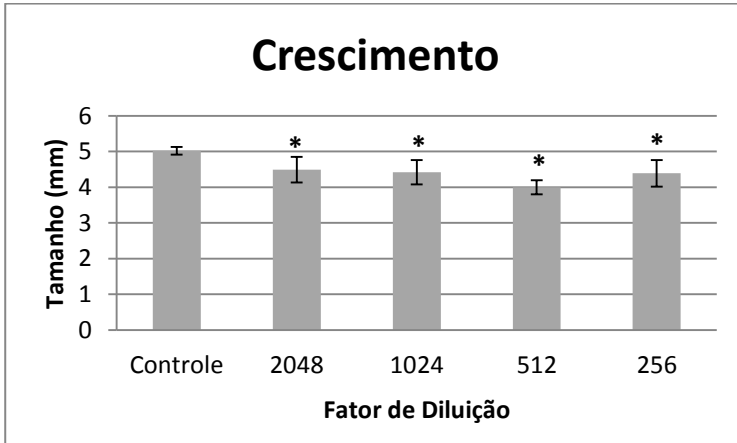


Figura 21: Resultados para o efeito crônico da *D. magna* exposta à NP CuO para o parâmetro crescimento.

(*Concentração que apresentou efeito estatisticamente significativo no aumento da reprodução em relação ao controle com $p < 0,05$).

Com base em estudos realizados por diferentes autores, entre eles Aruoja *et al.*, (2009) e Wang *et al.*, (2011), que mostram que as NP CuO são tóxicas para as algas, e segundo De Schampelaere *et al.*, (2003), que afirmam que a toxicidade pode ser atribuída aos íons Cu^{+2} dissolvidos presentes no meio, é possível comparar os resultados obtidos neste parâmetro e os resultados obtidos através da FAAS que mostra os valores de íons Cu^{+2} dissolvidos na suspensão teste caracterizada.

Segundo um estudo realizado por Ma *et al.*, (2005), a presença de íons de cobre inibe o crescimento das algas *S. subspicatus*, utilizada como alimentos para as *D. magna* durante a realização do teste. Esse estudo fornece informações que permite propor que um dos fatores que podem influenciar na diferença na média dos tamanhos obtidos dos organismos esteja vinculado a diminuição da densidade celular das algas, causando uma deficiência de alimento necessário para o seu crescimento e desenvolvimento.

Zhao e Wang (2010) (estudo realizado com NP de prata) e Hoecke *et al.*, (2010) (estudo realizado com NP de Dióxido de Cério) reportam em seus estudos uma diminuição no crescimento de *D. magna* observado no teste de toxicidade crônica. Zhao e Wang (2010) expõem que um dos principais motivos relacionados a isso possivelmente tenha sido a baixa qualidade do alimento ingerido pelo organismo, devido a mistura da nanopartícula com a alga, acarretando uma menor absorção de nutrientes.

Devido ao pequeno tamanho e alta reatividade da NP CuO, esta poderá entrar no sistema digestivo da *D. magna* através das algas (biomagnificação), e também através de NP que estejam em suspensão, acarretando assim a potencialização do efeito toxicológico devido a liberação de íons no seu interior conforme já explicado anteriormente no item dos efeitos de toxicidade aguda 4.4.1.

Longevidade

Ao final de 21 dias de teste, não foi observada nenhum efeito sobre a longevidade dos organismos expostos em todas as concentrações testadas conforme ilustrado na figura 22. Este resultado já era esperado uma vez que foram utilizadas concentrações subletais.

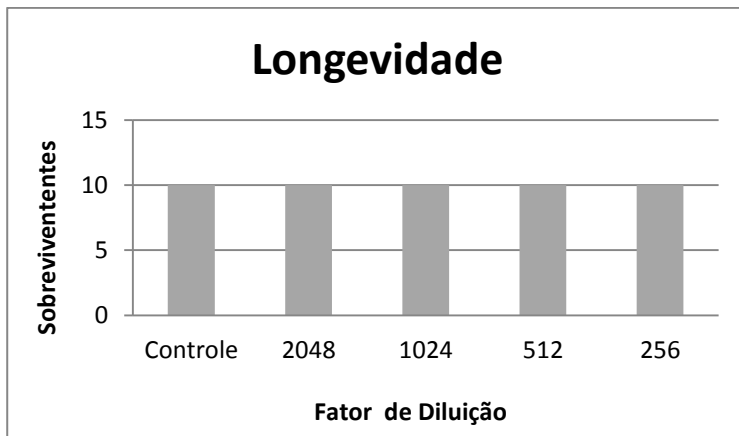


Figura 22: Resultados para o efeito crônico da *D. magna* exposta à NP CuO para o parâmetro longevidade.

Entretanto, ao final do teste, algumas alterações morfológicas foram observadas em organismos expostos a NP. As principais malformações observadas foram as deformações na carapaça e o encurtamento do espinho apical conforme apresentado na figura 23.

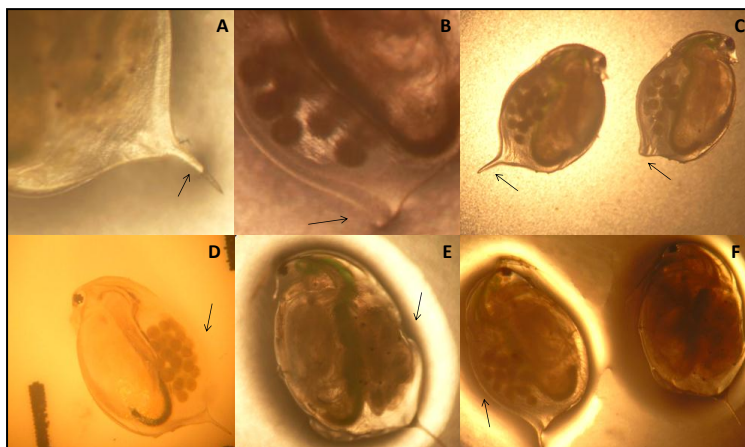


Figura 23: Modificações morfológicas da *D. magna* exposta à NP CuO. (A: Espinho apical normal – Controle; B: Encurtamento do espinho apical na concentração de 1,95 mg/L; C: comparação entre controle e concentração; D: Carapaça normal – Controle; E: Carapaça com deformação na concentração de 3,9 mg/L; F: comparação entre controle e concentração).

As malformações foram encontradas exclusivamente em organismos expostos às NP CuO, portanto, não sendo encontradas em nenhuma réplica do controle. Apenas uma réplica na concentração de 3,9 mg/L apresentou deformação na carapaça. Em relação ao encurtamento do espinho apical, o mesmo foi observado em 3 réplicas da concentração de 1,95mg/L não apresentando com isso dados estatisticamente significativos por não ter ficado evidente um padrão de frequência de aparecimento desta observação.

Anomalias morfológicas em *D.manga* têm sido observadas por alguns autores que desenvolveram ensaios de toxicidade crônica com NP. Bai *et al.*, (2010) relatou que, em seu estudo de toxicidade crônica com a nanopartícula de óxido de zinco - NP ZnO em embriões de *Danio rerio* (paulistinha), ocorreram malformações na cauda do embrião. Em relação a outros xenobióticos estudados, Elmoor-Loureiro (2004), observou anomalias morfológicas em cladóceros presentes em uma amostra

de água retirada do açude Apipucos. Segundo este mesmo autor, as anomalias têm sido observadas, porém, pouco estudadas.

No Labtox, alterações morfológicas em *D. magna* também foram observadas quando as mesmas foram expostas a diferentes xenobióticos. Estas alterações foram apresentadas por Brentano (2006) que avaliou a toxicidade crônica com efluentes tratados de um aterro sanitário e observou malformações na carapaça como também encurtamento do espinho apical. Fuzinato (2009) que avaliou a toxicidade em Bacias Hidrográficas de Florianópolis-SC observou deformação da antena e encurtamento do espinho apical e Costa (2010) que estudou a toxicidade para a valorização de resíduos de indústria cerâmica, observou o encurtamento do espinho apical.

A nível celular, Karlsson *et al.*, (2009), investigaram e compararam diferentes NP, entre elas a NP CuO, em relação a citotoxicidade e a capacidade de causar danos ao DNA e produção de ROS em células epiteliais de pulmão humano, e obtiveram como resultados que as NP CuO possuem alta capacidade de causar dano ao DNA e lesões oxidativas. Segundo Ferreira e Matsubara (1997), as lesões oxidativas têm confirmado a ação catalítica dos metais nas reações de Fenton e Haber – Weiss, e segundo eles, o cobre também pode estar capacitado a catalisar estas reações gerando assim a formação de ROS *in vitro*.

As malformações observadas neste estudo não foram consideradas para a avaliação da toxicidade crônica por não estarem descritas como objetivo deste trabalho, porém, a necessidade de análises futuras a nível citogenético destes organismos poderá ajudar a compreender o porquê destas malformações aconteceram e também compreender em qual estágio de desenvolvimento do organismo isto poderá acontecer.

4.4.2.2 Toxicidade crônica com a MP de CuO

Durante o teste, foram avaliadas 4 concentrações e um controle negativo composto pelo meio utilizado para o cultivo da *D. magna* denominado M4. As concentrações testadas foram a 62,5 (FD 32), 31,24 (FD 64), 15,6 (FD128) e 7,8 (FD 256) todas

expressas em mg/L para os parâmetros de reprodução, longevidade e crescimento.

Reprodução

A média dos filhotes nascidos nas concentrações testadas mostrou-se ligeiramente oscilante entre as diluições. Os nascimentos dos organismos expostos a MP CuO iniciaram-se entre o 7° e 8° dia do teste, não mostrando efeito em relação ao início da reprodução em relação ao controle. Foi observado efeito estatisticamente significativo nas duas maiores concentrações testadas, ou seja, FD 32 e FD 64, sendo esta última definida como a CEO para o teste. A partir desta concentração não foram mais observados efeitos significativos sobre a reprodução sendo então a concentração do FD128 definida como CENO conforme ilustrado na figura 24.

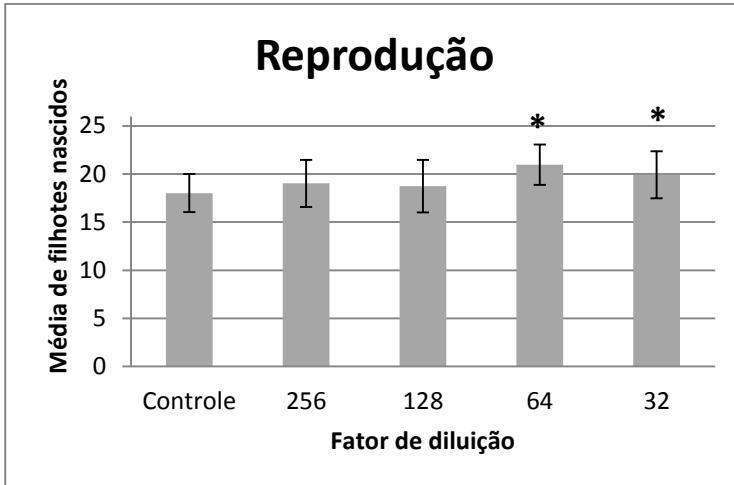


Figura 24: Resultados para o efeito crônico da *D. magna* exposta à MP CuO para o parâmetro reprodução.

(*Concentração que apresentou efeito estatisticamente significativo no aumento da reprodução em relação ao controle com $p < 0,05$)

O aumento na reprodução, conforme mencionado para a NP CuO, pode ser uma resposta a um agente causador de estresse (NP CuO) na tentativa da preservação da espécie. Este comportamento é reforçado conforme a concentração deste agente diminui a média passa a não ter mais diferença significativa em relação ao controle.

Ao comparar os resultados obtidos no teste de toxicidade crônica para as duas formulações do CuO, foi possível observar que na concentração de 7,8 mg/L (FD 256) que houve efeito estatisticamente significativo para a NP enquanto que para a formulação MP não observou-se mais efeito. Essa foi a maior concentração para a NP e a mais diluída testada para MP. Esta diferença pode estar relacionada a maior área superficial que a Np possui em relação a MP, fazendo com haja uma maior liberação de íons Cu^{+2} da NP, conforme exposto no item de caracterização (item 4.2).

Crescimento

Ao final de 21 dias de exposição todas as concentrações avaliadas apresentaram diminuição no tamanho dos organismos expostos a MP CuO com diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle como mostrado na figura 25. Com base nestes resultados pode-se propor que a CENO é uma concentração inferior ao FD 256 e a CEO maior ou igual ao FD 256.

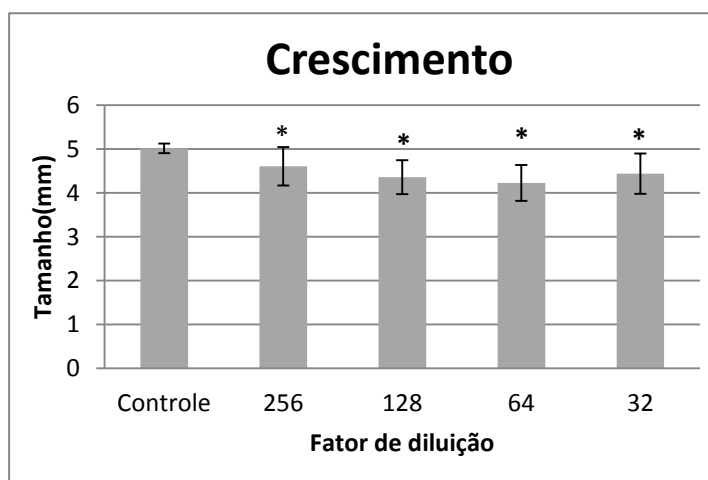


Figura 25: Resultados para o efeito crônico da *D. magna* exposta à MP CuO para o parâmetro crescimento.

(*Concentração que apresentou efeito estatisticamente significativo no aumento da reprodução em relação ao controle com $p < 0,05$).

Uma das principais justificativa para esta diferença é a mesma já explicada para o mesmo parâmetro das NP CuO, ou seja, a baixa qualidade e quantidade do alimento ingerido devido a toxicidade dos íons de cobre.

Longevidade

Ao final de 21 dias de teste, não foi observado efeito significativo sobre a longevidade dos organismos expostos em todas as concentrações testadas conforme ilustrado na figura 26. Apesar de ter ocorrido duas mortes, uma na concentração 7,8mg/L (FD 256) e outra na concentração de 31,24mg/L (FD 64), de acordo com as análises estatísticas realizadas, não houve diferença significativa em relação ao controle. Portanto, não foi possível determinar a CEO para este parâmetro. A CENO pode ser estimada como sendo maior ou igual ao FD 32.

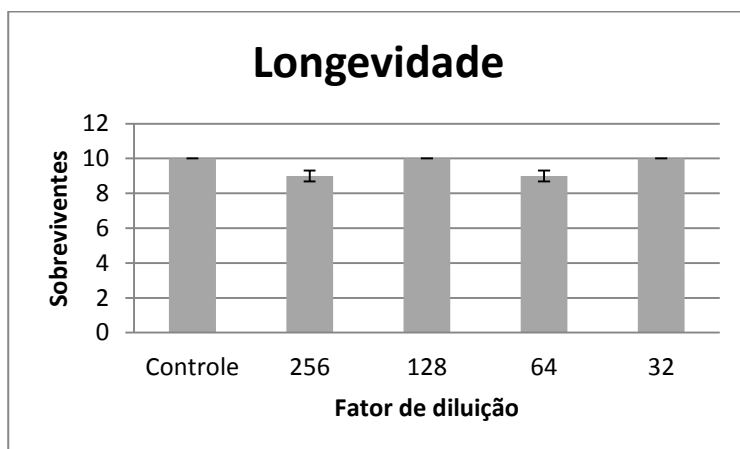


Figura 26: Resultados para o efeito crônico da *D. magna* exposta à MP CuO para o parâmetro longevidade (*Concentração que apresentou efeito significativo no aumento da reprodução em relação ao controle com $p < 0,05$).

Comparando os resultados do parâmetro Longevidade para as duas formulações de CuO, não foi observado efeito para a maior concentração para NP e a mais diluída para MP (ambos com FD 256), porém, também foi observado efeito sobre a morfologia dos organismos expostos. A figura 27 mostra modificações na morfologia nos organismos-teste, neste caso no espinho apical.-.

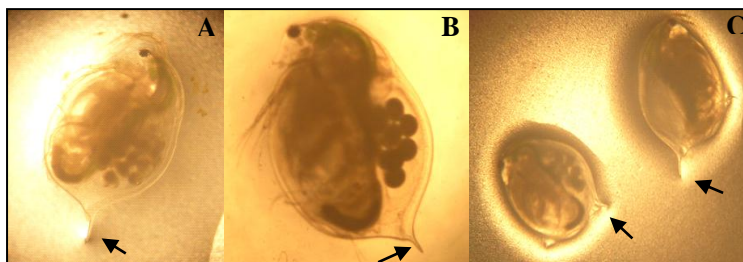


Figura 27: Modificações morfológicas da *D. magna* exposta à MP CuO (A: Espinho apical – Controle; B: Encurtamento do espinho apical na concentração de 62,5 mg/L; C: comparação entre controle e concentração).

As malformações foram encontradas exclusivamente em organismos expostos às MP CuO, portanto, não sendo encontradas em nenhuma réplica do controle. Apenas duas réplicas na concentração de 62,5 mg/L apresentaram encurtamento do espinho apical.

4.4.3 Quadro resumo dos ensaios toxicológicos

Amostra	Teste	Resultado	
NP CuO	Tox. aguda <i>D. magna</i>	CE ₅₀ = 22mg/L	
	Tox. aguda <i>V. fischeri</i>	CE _{50,15 min.} = 304,4 mg/L CE _{50,30 min.} = 288,4 mg/L	
	Tox. crônica <i>D. magna</i>	Reprodução	
		CEO = FD 256 CENO = FD 512	
		Crescimento	
		CEO ≥ FD 2048 CENO > FD 2048	
MP CuO	Tox. aguda <i>D. magna</i>	CE ₅₀ = 223,6 mg/L	
	Tox. aguda <i>V. fischeri</i>	CE _{50,15 min.} = 2696,6mg/L CE _{50,30 min.} = 1685 mg/L	
	Tox. crônica <i>D. magna</i>	Reprodução	
		CEO = FD 64 CENO = FD 128	
		Crescimento	
		CEO ≥ FD 256 CENO > FD 256	

Figura 28: Quadro resumo dos ensaios toxicológicos

5 CONCLUSÕES

Este trabalho avaliou e comparou os efeitos toxicológicos do óxido de cobre na forma de NP e MP. Através das caracterizações das suspensões e dos testes de toxicidade aguda e crônica com *D. magna* e teste de toxicidade aguda com *V. Fischeri*. Com os resultados obtidos neste estudo foi possível concluir que:

- Os dados obtidos através do MET, MEV e P_z verificou-se que as nanopartículas em contato com um meio diluente tendem a se aglomerar. Com os resultados obtidos através do MET, ficou evidenciado que o tipo de diluente pode influenciar diretamente no estado de aglomeração da NP. As duas formulações do CuO encontravam-se em tamanhos diferentes, o que permitiu serem classificadas como NP e MP. O valor do P_z da NP CuO permitiu concluir que esta suspensão é mais instável em relação a sua formulação micrométrica, e esta instabilidade e diferença de tamanho podem ser diretamente relacionadas aos resultados obtidos nos testes de toxicidades;
- Os resultados obtidos através de teste de toxicidade aguda com *D. magna* demonstraram que a NP CuO é mais tóxica do que a MP. Esta diferença da toxicidade está relacionada com a sua maior área superficial, maior liberação de íons, menor tamanho e maior instabilidade. Com as imagens obtidas através da Microscopia de luz, confirmou-se a entrada tanto da NP (maior quantidade) como da MP no intestino do organismo, com isso magnificando o efeito toxicológico encontrado, uma vez que a mesma poderá liberar íons diretamente no interior do microrganismo;
- Através dos resultados obtidos no teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha *V. Fischeri* foi possível concluir que o CuO na forma de NP é a forma mais tóxica. A NP é mais tóxica do que a MP quando comparadas as $CE_{50-15 \text{ min}}$ e mais tóxica em relação a $CE_{50-30 \text{ min}}$, para este organismo-teste.

- Com base nos resultados dos parâmetros reprodução, crescimento e longevidade empregando ensaios de toxicidade crônica foi possível concluir que para ambas formas, NP e MP, foram observados efeitos estatisticamente significativos para os parâmetros reprodução e crescimento. Não foi possível observar, nenhum efeito significativo para o parâmetro longevidade. Ainda observou-se para as duas formulações testadas, deformações na morfologia do microcrustáceo, tais como o encurtamento do espinho apical e deformação na carapaça;
- As NP CuO apresentaram-se mais tóxica do que sua formulação micrométrica. Esta diferença está associada ao seu menor tamanho, maior área superficial, maior liberação de íons para o meio, maior facilidade de entrada no interior do microorganismo, que devido a isso, pode magnificar seu potencial toxicológico. A comparação dos efeitos toxicológicos de um mesmo produto, em escala de tamanho diferente, é importante, pois os resultados apresentados acima mostram que existem diferenças de toxicidade entre as formas (nano e micrométrica), confirmando a necessidade de estudos de comparação entre as formulações.

6 RECOMENDAÇÕES

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

- Caracterizar a suspensão-teste não apenas em água ultra pura, como também no meio diluente de cada teste;
- Caracterizar e quantificar a suspensão-teste no início e final de cada teste para compreender como as partículas podem se apresentar após o contato com o ambiente do teste ou com os organismos vivos;
- Investigar a toxicidade a nível celular de organismos aquáticos afim de compreender os possíveis causadores de deformações morfológicas durante o seu estado de desenvolvimento;
- Implantação da metodologia de emblocamento para microscopia de Luz e Microscopia de Transmissão Eletrônica;
- Analisar através de microscopia de luz e MET a bactéria *V. Fischeri* exposta a NP e MP;
- Observar as gerações seguintes dos organismos *D.magna* expostos à NP no teste de toxicidade crônica para verificar se os efeitos são passados para outras gerações.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

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 einbstung in glycolmethacrylat (GMA) - Ergebnisse Histochemischer Reaktionen.** *Acta Histochem*, v. 14, p. 271-277, 1975.

ASIYANBOLA, B. e SOBOYEJO, W. **For the Surgeon: An Introduction to Nanotechnology.** *Journal Of Surgical Education*, Baltimore, v. 65, p. 155-161, 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea).** Rio de Janeiro: ABNT, 2004.

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.

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

BAI, W.; ZHANG, Z.; TIAN, W.; HE, X.; MA, Y.; ZHAO, Y.; E CHAI, Z. **Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism.** *Journal of Nanoparticle Research.* v. 12, nº 5, p. 1645-1654, 2010.

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.

BREMNER, I. **Manifestations of copper excess.** *American Journal of Clinical Nutrition,* vol. 67, nº 5, 1998.

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.1 and 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.

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.

BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: Avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário.** Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação- Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis – SC. 130p. 2006.

BUCHER, J., MASTEN, S., MOUDGIL, B., POWERS, K., ROBERTS, S., and WALKER N. **Developing Experimental Approaches for the Evaluation of Toxicological Interactions of Nanoscale Materials.** *Final Workshop Report 3–4 November*, University of Florida, Gainesville, p. 1–37, 2004.

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.

BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA,G.; GOLIMOWSKI, J.e URBAN, P. L. **Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management.** *Waste Management.* Poland v. 29, nº 9, p. 2587-2595, 2009.

CASTRO, I B.; WESTPHAL, E.; FILLMANN, G. **Tintas anti-incrustantes de terceira geração: Novos biocidas no ambiente aquático.** *Quím. Nova,* Rio Grande - Rs, p.1-11, 2011.

CHANG, H.; JWO, C. S.; LO, C. H.; TSUNG, T.T.; KAO, M.J. e LIN, H.M.. Rheology of CuO nanoparticle suspension prepared by ASNSS. **Rev. Adv. Mater,** Taiwan, v. 10, p.128-132, 2005.

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.

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/dafnia.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.

CRONHOLM, P.; MIDANDER, K.; KARLSSON, H. L.; ELIHN, K.; WALLINDER, I. O. e MÖLLER, L. **Effect of sonication and serum proteins on copper release from copper nanoparticles and the**

toxicity towards lung epithelial cells. *Nanotoxicology*, Sweden, p.269-281, 2011.

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. 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.

De SCHAMPHELAERE, K.A.C.; VASCONCELOS, F.M.; HEIJERICK, D.G.; TACK, F.M.G.; DELBEKE, K.; ALLEN, H.E.; JANSSEN, C.R. **Development and field validation of a predictive copper toxicity model for the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.** *Environmental Toxicology and Chemistry*, Ghent, Belgium, v. 22, p. 2454-2465, 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.

DHAWAN, V. S.; PARMAR, D. **Nanomaterials: a challenge for toxicologists**. *Nanotoxicology*, v. 3, nº 1, pp. 1–9, 2009.

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

DURAN, N.; DE MORAIS, P.C.; MATTOSO, L.H.C. **Nanotecnologia – introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação**. São Paulo: Artliber, 2008. 208 p.

ELMOOR-LOUREIRO, L. M. A. Morphological abnormalities in the Cladoceran *Ilyocryptus spinifer* (Apipucos Reservoir, Pernambuco State, Brazil). *Brz J. Biol*, v. 64, nº 1, p. 53-58, 2004.

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.

FARIA, E. A.; BRANCO, J.R.T.; CAMPOS, M de C.S.; OLIVEIRA, M.D; ROLLA, M.E. Estudo das características antiincrustantes de materiais. **Revista Escola de Minas**, Ouro Preto, v. 59, nº 02, p.233-238, 2006.

FEDERICI, G.; SHAN, B. J.; HANDY, R. D. **Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects**. *Aquatic Toxicology*, Plymouth, Uk, p. 415-430, 2007.

FERREIRA, A.I.a.; MATSUBARA, L.s.. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, Botucatu, Sp, v. 43, nº 01, p. 61-68, jan. 1997.

FRANKLIN, N. M.; ROGERS, N. J.; APTE. S. C.; BATLEY, G.E.;GADD,G.E. e CASEY, P. S..**Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl₂ to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The Importance of**

Particle Solubility. *Environmental Science & Technology*, Bangor, Australia, v. 41, nº 24, p. 8484-8490, 2007.

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.**

GAO, J.; YOUN, S.; HOVSEPYAN, A.; LLANEZA, V. L.; WANG, Y.; BITTON, G. e BONZONGO, J.J. **Dispersion and Toxicity of Selected Manufactured Nanomaterials in Natural River Water Samples: Effects of Water Chemical Composition.** *Environmental Science & Technology. Flórida*, v. 43, nº 9, p. 3322-3328, 2009.

GONGORA-RUBIO M.R. e SEABRA, A.C. Nanotecnologia: A última fronteira tecnológica. *Revista da FAT (Fundação de Apoio à Tecnologia)*, São Paulo, p.7-13. 2005.

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.

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, nº 7, p. 714-719, 1977.

HANDY, R. D.; OWEN, R.; VALSAMI-JONES, E. **The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs.** *Ecotoxicology*, Plymouth, Uk, nº 17, p. 315-325, 2008.

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.

HODGSON, E. Em: A Textbook of Modern Toxicology; ed.; 3rd ed., John Wiley & Sons: New Jersey, 2004, cap. 1.

HOECKE, K. V.; SCHAMPHELAERE, K. A.c. De; MEEREN, P. V. D.; SMAGGHE, G.; JASSEN C. R. **Aggregation and ecotoxicity of CeO₂ nanoparticles in synthetic and natural waters with variable pH, organic matter concentration and ionic strength.** *Environmental Pollution*, Gent, Belgium, p. 970-976, 2010.

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

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.

HOOD, E. **Nanotechnology: Looking As We Leap.** *Environ Health Perspect*, v. 112, n° 13, p. A740-A749, 2004.

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.

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.

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.

KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H. **From ecotoxicology to nanoecotoxicology.** *Toxicology*, Estonia, p. 105-119, 2009.

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

KOLESNICHENKO, A. V.; TIMOFEEV, M. A. e PROTOPOPOVA, M.V. **Toxicity of Nanomaterials: 15 Years of Studies,** *Ros. Nanotekhnol.*, v. 3, n° 34, p. 54–61, 2008.

LEE, V. H. L. **Nanotechnology: challenging the limit of creativity in targeted drug delivery.** *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.56, p. 1527-1528, 2004.

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. 2011

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. **Estude des mecanismes moleculaire d'action de l'acide okadaïque, une toxine marine diarrhéique, 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.

MELO, C. P. de PIMENTA, M. **Nanociências e nanotecnologias.** *Parcerias Estratégicas*, nº 18, p. 9-21, 2004.

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

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.

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

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.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AD DEVELOPMENT. OECD. **Daphnia sp., acute immobilization test and reproduction test – Part II:** Guidelines 202. Paris: OECD, 1984.

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, n° 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.

POOLE, C. P.; OWENS, F. J. **Introduction to Nanotechnology**. South Carolina: Wiley, John & Sons, 2003.

POPOV, A.P.; PRIEZZHEV, A.V.; LADEMANN, J.; MYLLYLÄ, R. **TiO₂ nanoparticles as an effective UV-B radiation skin-protective compound in sunscreens**. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 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.

QIANG, A.; ZHAO, L.; XU, C.; ZHOU, M. **Effect of Dispersant on the Colloidal Stability of Nano-sized CuO Suspension**. *Journal Of Dispersion Science And Technology*, Tianjin, China, p. 1004-1007, 2007.

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 2011.

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.; HORNBOOK, 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.

RUSSOM, C. L. **Mining environmental toxicology information: web resources**. *Toxicology*, Duluth, v. 173, p. 75-88, 2002.

SCIENTIFIC COMMITTEE ON EMERGING AND NEWLY IDENTIFIED HEALTH RISKS (SCEMIRH). **The appropriateness of existing methodologies to assess the potential risks associated with engineered and adventitious products of nanotechnologies**. 2006. Disponível em:
<http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_scenihhr/docs/scenihhr_o_003b.pdf>. Acesso em: 10 mar. 2011.

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, n° 5, p. 726-737, 2003.

SCHULTE, P. A.; SALAMANCA-BUENTELLO, F.; **Ethical and scientific issues of nanotechnology in the workplace.** *Ciência & Saúde Coletiva*. v.12, nº 5, p.1319-1332, 2006.

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

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

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.

STONE, V.; NOWACK, B., BAUN, A.; BRINK van den N.; KAMMER, F.; DUSINKA, M.; HANDY, R.; HANKIN, S.; HASSELLÖV, M.; JONER, E. e FERNANDES, T.F. **Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation.** *Sci. of the Total Environ.*, Edbinburgh, v. 408, nº 7, p. 1745–1754, 2010.

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

TERRA, N. R.; FEIDEN, I. R.; FACHEL, J. M. G. **Taquari River (Rio Grande do Sul, Brazil) Sediment ecotoxicology, using *Daphnia magna*, 1820, Straus as test organism.** *Acta Limnologica Brasiliensia*, v. 20, nº 2, p. 153-159, 2008.

TOMA, H.E. **O mundo nanométrico: a dimensão do novo século.** *Editores oficina de textos*, p. 102, 2004.

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.

ZARBIN, A. J. G. **Química de (nano)materiais**. *Química Nova*, v. 30, n° 6, p.1469-1479, São Paulo, 2007.

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.

ZHOU, C.M.; WANG, W-X. **Biokinetic uptake and efflux of silver nanoparticles in *Daphnia magna***. *Environmental Science and Technology*. 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.

YU, M-H. **Environmental toxicology**: biological and health effects of pollutants. 2^a ed. CRC Press LLC. Florida, 2005.

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.

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.

APÊNDICE A

LAUDO DO POTENCIAL ZETA NP E MP CUO

Tabela A1. 1: Laudo da análise do Potencial Zeta – Zetaplus para NP CuO

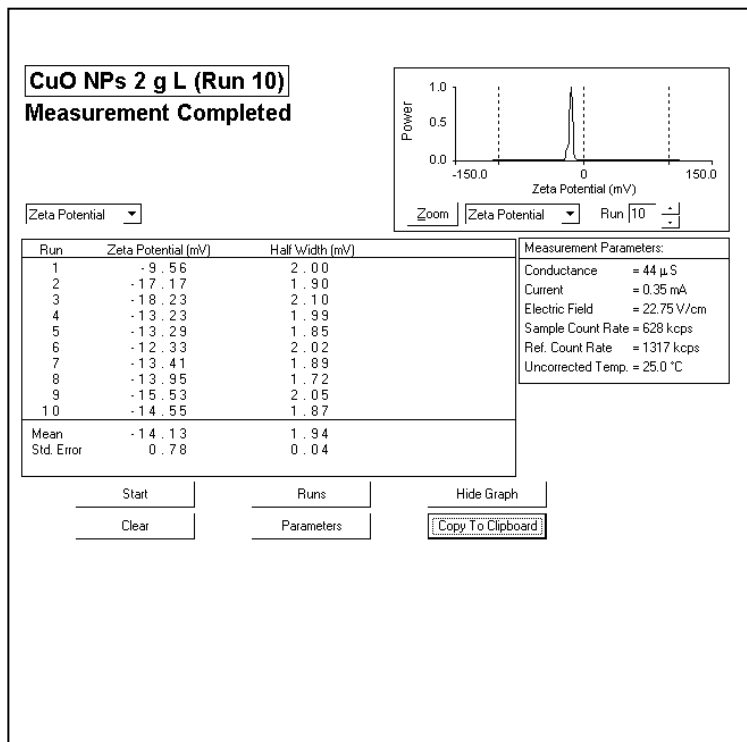
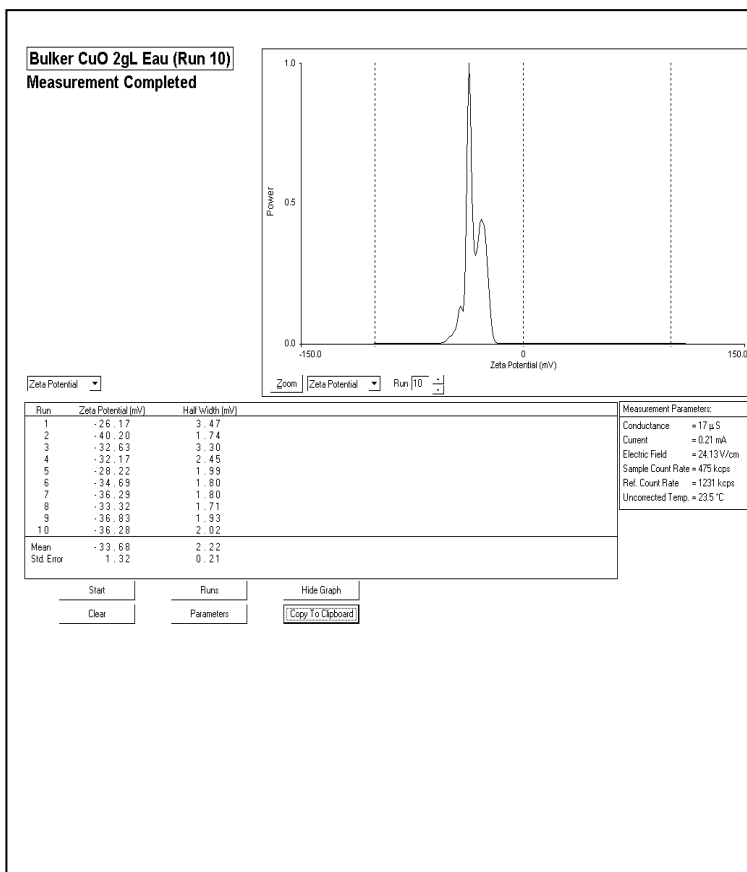


Tabela A1. 2: Laudo da análise do Potencial Zeta – Zetaplus para MP CuO



APÊNDICE B

LAUDO DA ÁREA SUPERFICIAL NP E MP CUO

Tabela B1. 1: Laudo da análise da Área Superficial – NP CuO

Analysis		Report	
Operator: Lamate	Date: 2011/12/08	Operator: Lamate	Date: 12/8/2011
Sample ID: Amostra_NP_CuO	Filename:	C:\QCdata\Physisorb\strn_A_20111208_4.qps	
Sample Desc: Amostra NPCuO	Comment:		
Sample weight: 0.239 g	Sample Volume: 0.239 cc	Sample Density: 1 g/cc	
Outgas Time: 0.0 hrs	Outgas Temp: 0.0 C		
Analysis gas: Nitrogen	Bath Temp: 77.3 K		
Press. Tolerance: 0.100/0.100 (ads/des)	Equil time: 60/60 sec (ads/des)	Equil timeout: 240/240 sec (ads/des)	
Analysis Time: 35.1 min	End of run: 2011/12/08 14:08:37	Instrument: Nova Station A	
Cell ID: 4			

Multi-Point BET

Data Reduction Parameters Data			
Adsorbate	Nitrogen	Temperature	77.35K
Molec. Wt.:	28.013 g	Cross Section:	16.200 Å ²
		Liquid Density:	0.808 g/cc

Multi-Point BET Data

Relative Pressure	Volume @ STP	1 / [W((Po/P) - 1)]	Relative Pressure	Volume @ STP	1 / [W((Po/P) - 1)]
[P/Po]	[cc/g]		[P/Po]	[cc/g]	
4.89310e-02	0.2916	1.4116e+02	3.45419e-01	1.3909	3.0355e+02
1.00311e-01	0.4868	1.8326e+02	2.94843e-01	1.2148	2.7540e+02
1.50664e-01	0.6648	2.1350e+02	2.44414e-01	1.0347	2.5013e+02
2.00705e-01	0.8452	2.3784e+02	1.94678e-01	0.8532	2.2669e+02
2.50573e-01	1.0269	2.6051e+02	1.44894e-01	0.6690	2.0265e+02
3.00954e-01	1.2131	2.8395e+02	9.50260e-02	0.4763	1.7640e+02
3.49768e-01	1.3957	3.0839e+02	4.51860e-02	0.2535	1.4539e+02

BET summary


Slope =	520.706
Intercept =	1.266e+02
Correlation coefficient, r =	0.995896
C constant =	5.113
Surface Area =	5.380 m ² /g

Quantachrome NovaWin - Data Acquisition and Reduction for NOVA instruments
©1994-2007, Quantachrome Instruments
version 10.01

Quantachrome
CORPORATION
Optimizing quality performance

Report id: {692558152:20111208 150728359} Page 1 of 1

Tabela B1. 2: Laudo da análise da Área Superficial – MP CuO

Quantachrome NovaWin - Data Acquisition and Reduction for NOVA instruments ©1994-2007, Quantachrome Instruments version 10.01				 <small>optimaquantachrome.com</small>	
Analysis		Date: 2011/12/09		Report	
Operator: Lamate		Filename: C:\QCdata\Physisorb\stln_A_20111209_1.qps		Operator: Lamate	
Sample ID: Amostra_CuO		Comment:		Date: 12/9/2011	
Sample Desc: Amostra CuO		Sample Volume: 0.19 cc		Sample Density: 1 g/cc	
Sample weight: 0.19 g		Outgas Temp: 0.0 C			
Outgas Time: 0.0 hrs		Bath Temp: 77.3 K			
Analysis gas: Nitrogen		Equil time: 60/60 sec (ads/des)		Equil timeout: 240/240 sec (ads/des)	
Press. Tolerance: 0.100/0.100 (ads/des)		End of run: 2011/12/09 10:52:32		Instrument: Nova Station A	
Analysis Time: 54.0 min					
Cell ID: 6					
Multi-Point BET					
Data Reduction Parameters Data					
Adsorbate	Nitrogen	Temperature	77.350k	Liquid Density:	0.808 g/cc
Molec. Wt.:	28.013 g	Cross Section:	16.200 Å ²		
Multi-Point BET Data					
Relative/Pressure	Volume @ STP	1 / [W((Po/P) - 1)]	Relative/Pressure	Volume @ STP	1 / [W((Po/P) - 1)]
[P/Po]	[cc/g]		[P/Po]	[cc/g]	
4.98410e-02	0.3020	1.3898e+02	3.47345e-01	1.1728	3.6307e+02
1.01639e-01	0.4649	1.9470e+02	2.95277e-01	0.9331	3.5926e+02
1.52042e-01	0.6167	2.3264e+02	2.43333e-01	0.6882	3.7798e+02
2.02125e-01	0.7663	2.6444e+02	1.98240e-01	0.4149	4.7050e+02
2.52147e-01	0.9217	2.9265e+02	1.46150e-01	0.1419	9.6491e+02
3.02147e-01	1.0746	3.2236e+02	9.64550e-02	-0.1651	-5.1732e+02
3.50671e-01	1.2336	3.5052e+02	4.66000e-02	-0.5130	-7.6237e+01
BET summary					
Slope = 1215.127					
Intercept = 2.490e+01					
Correlation coefficient, r = 0.39553					
C constant = 50.109					
Surface Area = 2.802 m ² /g					
<small>Quantachrome NovaWin - Data Acquisition and Reduction for NOVA instruments ©1994-2007, Quantachrome Instruments version 10.01</small>					
Report id:(1309779691:20111209 124216578) Page 1 of 1					

APÊNDICE C

RESUMO DOS RESULTADOS ESTATÍSTICOS PARA TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA

Tabela C1. 1: Resumo dos resultados estatísticos para toxicidade crônica para média e o desvio padrão para NP CuO

Parâmetro	(FD)	NPCuO
Reprodução	Controle	18,021 ± 1,98
	256 [*]	21,188 ± 2,62
	512	18,434 ± 7,04
	1024	18,451 ± 2,77
	2048	17,947 ± 2,19
Crescimento	Controle	5,02 ± 0,11
	256 [*]	4,39 ± 0,37
	512 [*]	4,00 ± 0,20
	1024 [*]	4,42 ± 0,34
	2048 [*]	4,49 ± 0,36
Longevidade	Controle	1 ± 0
	256	1 ± 0
	512	1 ± 0
	1024	1 ± 0
	2048	1 ± 0

Legenda: FD = Fator de diluição *) média que apresentou efeito estatisticamente significativo $p < 0,05$

Tabela C1. 2: Resumo dos resultados estatísticos para toxicidade crônica para média e o desvio padrão para MP CuO

Parâmetro	(FD)	MPCuO
Reprodução	Controle	18,021 ± 1,98
	32	19,92 ± 1,64
	64	20,97 ± 2,09
	128	18,75 ± 2,73
	256	19,02 ± 2,44
Crescimento	Controle	5,02 ± 0,11
	32	4,44 ± 0,46
	64	4,23 ± 0,41
	128	4,36 ± 0,39
	256	4,61 ± 0,44
Longevidade	Controle	1 ± 0
	32	1 ± 0
	64	0,9 ± 0,31
	128	1 ± 1
	256	0,9 ± 0,31

Legenda: FD = Fator de Diluição *) média que apresentou efeito estatisticamente significativo $p < 0,05$