

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANA CLAUDIA OLIVEIRA DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOBASTÕES DE ÓXIDO DE ZINCO SOBRE  
CLORÓFITAS DE ECOSSISTEMAS MARINHOS E DULCÍCOLAS.

Pontal do Paraná – PR

2018

ANA CLAUDIA OLIVEIRA DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOBASTÕES DE ÓXIDO DE ZINCO SOBRE  
CLOROFÍCEAS DE ECOSISTEMAS MARINHOS E DULCÍCOLAS.

Monografia apresentada como requisito  
parcial a graduação no curso de  
Oceanografia, Campus Pontal do Paraná,  
Universidade Federal do Paraná.

Orientação: Profa. <sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Silvia Pedroso  
Melegari

Pontal do Paraná – PR

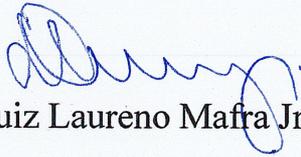
2018

## TERMO DE APROVAÇÃO

Ana Claudia Oliveira de Almeida

### “AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOBASTÕES DE ÓXIDO DE ZINCO SOBRE CLOROFÍCEAS DE ECOSISTEMAS MARINHOS E DULCÍCOLAS”

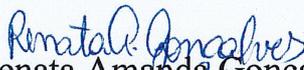
Monografia aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia, da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos membros:



Prof. Dr. Luiz Laurenô Mafra Jr. - CEM/UFPR



Profa. Dra. Renata Hanae Nagai - CEM/UFPR



Dra. Renata Amanda Gonçalves



Profa. Dra. Sílvia Pedroso Melegari  
Presidente

Pontal do Paraná, 06 de dezembro de 2018.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a minha avó Aparecida que faleceu no ano em que entrei na faculdade e que foi o meu porto seguro em vida e ainda é ... (meu eterno amor).

Agradeço sem conseguir explicar em palavras aos meus pais, por todo o suporte, apoio, carinho amor, por me acolherem e me abraçarem nas horas boas e nas mais difíceis.

Agradeço o meu namorado Marcelo, por ter sido tão especial nessa fase e ainda ser tão importante para que eu siga conquistando meus objetivos, Sempre me ajudando e me forçando a chegar no meu melhor. Agradeço muito a Família Soeth por terem me acolhido e me dado tanto amor.

Obrigada família Oliveira e Almeida por serem os melhores do mundo e serem pessoas que eu admiro tanto, cada um com suas qualidades.

Agradeço aos amigos de Pontal, Joinville, Brasil e mundo, vocês são pessoas especiais que fizeram os meus dias na faculdade serem mais alegres, um agradecimento especial para Vanessa, Rafa, Júlia K, Júlia I, Taynara e Luisa. Quero agradecer a minha afilhada Alice que chegou de surpresa, quase como um susto e só trouxe alegria para todos. Agradeço ao GRR2013 pela parceira e ao GRR21014 por terem me acolhido. Agradeço as amigas Berenice e Claudine por todo o apoio e pelos sushis de quarta a noite.

Agradeço a Tchuka ao Preto e ao Bituca por serem os companheiros de faculdade mais queridos desse mundo.

Agradeço a minha orientadora, Dra. Silvia Pedroso Melegari, pela oportunidade de realizar um trabalho que eu acho tão gostoso, importante e que me apaixonei, por confiar em mim, apoiar e pelas conversas descontraídas que faziam a diferença para dar uma relaxada nos momentos difíceis. Agradeço aos professores Paulo Lana, Mafra e Leonardo Sandrini por me cederem espaço nos laboratórios. Agradeço também a Liciane, Ana Carolina, Laís e Renata por me ajudarem no laboratório.

Agradeço ao Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em especial ao professor Dr. William Gerson Matias pela síntese, fornecimento e caracterização do nanomaterial utilizado neste estudo, e

também ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC pelas imagens de microscopia eletrônica de transmissão.

Agradeço ao Laboratório de Meio Ambiente do Departamento de Engenharia Ambiental da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) por ter cedido as cepas de microalgas e terem colaborado com produção dos meios de cultura. Um especial agradecimento à professora Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira por ser uma inspiração como profissional e minha referência bibliográfica.

Agradeço a fundação Araucária pela oportunidade de bolsa e ao professor César Martins. Agradeço ao CNPq por também me proporcionar bolsa durante a graduação e um último agradecimento ao professor Henry que foi um paizão e me apoiou muito durante o curso com o seu discurso radical, mas sempre de coração aberto.

Todas as pessoas grandes foram um dia crianças, mas poucas se lembram disso.

**O pequeno príncipe**

## RESUMO

Devido à grande produção de bens de consumo contendo nanopartículas (NPs) e a possibilidade de biodisponibilidade destas para o meio ambiente, o interesse em estudar a toxicidade destes nanomateriais (NMs) vem aumentando. Esse interesse é mundial, devido a sua importância enquanto matéria-prima, bem como pela necessidade de se prevenir que os ecossistemas sofram efeitos danosos por este poluente, em especial ao óxido de zinco (ZnO). Este material é amplamente utilizado na fabricação de tintas anticrustrantes parapinturas de casco das embarcações e assim, oferece possibilidade de risco aos ecossistemas aquáticos. Portanto este trabalho tem por objetivo avaliar a toxicidade de nanobastão (NB) de ZnO sobre microalgas verdes *Desmodesmus subspicatus* (dulcícola) e a *Tetraselmus chuii* (marinha). Para esta avaliação foram realizados testes de toxicidade crônica e a determinação da atividade enzimática da catalase (CAT) para ambas as algas. O teste crônico foi realizado usando três concentrações diferentes de NB ZnO (0,1, 1,0 e 10 mg/L, mais um tratamento controle). Esse teste apresentou concentração de efeito observado (CEO) de 10 mg/L (72 h) para a *D. subspicatus*, e de 1,0 mg/L (24 h) para a microalga marinha *T. chuii*. A concentração de efeito não observada (CENO) para a *D. subspicatus* foi determinada como 1,0 mg/L (72 h) e para a *T. chuii* mostrou < 0,1 mg/L (24 h). Foi observado ainda, que para a microalga *T. chuii* nos tempos de 48 e 72 h as uma recuperação da densidade celular, quando comparado ao teste controle. Nos testes de atividade enzimática foi possível observar que assim como o teste de toxicidade crônica para a *D. subspicatus* a enzima CAT mostrou um resultado significativamente diferente dos outros para a concentração em 10 mg/L, entretanto para a *T. chuii* não foi observada alteração significativa da atividade da CAT. Com base nesses resultados, é possível verificar que a microalga *D. subspicatus* demonstrou-se mais sensível aos efeitos do NB ZnO na concentração de 10 mg/L em 72h onde foi observado também uma elevação quanto ao estresse que essa alga estava sofrendo na mesma concentração. Para a microalga marinha *T. chuii* observou-se efeitos crônicos significativos na densidade celular apenas no tempo de 24h. Esse comportamento diferenciado pode indicar o comportamento resiliente deste organismo. Os resultados desse estudo evidenciam a importância de conhecermos melhor o potencial toxicológico dos NB ZnO sobre microalgas verdes de ambientes distintos e avaliar a resposta toxicológica dessas algas em seus meios de cultura.

## ABSTRACT

Due to the large production of consumer goods containing nanoparticles and the possibility of their bioavailability to the environment, the interest in studying the toxicity of these nanomaterials is increasing. This interest is worldwide because of its importance as a raw material, as well as the need to prevent ecosystems from suffering harmful effects from this pollutant, especially zinc oxide (ZnO), widely used in the manufacture of anti-fouling paints that are used in the painting of vessel hulls and thus offering possibility of risk to the aquatic ecosystems. Therefore, this study aims to evaluate the nanorod's (NR) toxicity of ZnO on green microalgae *Desmodesmus subspicatus* (freshwater) and *Tetraselmus chuii* (marine). For this evaluation, chronic toxicity tests and the evaluation of catalase enzymatic activity (CAT) were performed for both algae. The chronic test was performed using three different concentrations of NR ZnO (0.1, 1.0 and 10 mg/L, and one control treatment). This test had a concentration of observed effect (COE) of 10 mg/L (72 hours) for *D. subspicatus*, and 1.0 mg/L (24 hours) for the marine microalgae *T. chuii*. The concentration of unobserved effect (CUE) for *D. subspicatus* was determined as 1.0 mg/L (72 hours) and for *T. chuii* it showed <0.1 mg/L (24 hours). It was also observed that for the microalgae *T. chuii*, there is a cell density recovery at 48 and 72 hours, when compared to the control test. In the enzymatic activity tests it was possible to observe that correspondingly to the chronic toxicity test for *D. subspicatus*, the CAT enzyme showed a significantly different result for the concentration at 10 mg/L, for *T. chuii* however, no change was observed of CAT activity. Based on these results, it is possible to verify that the *D. subspicatus* microalgae was shown to be more sensitive to the effects of NR ZnO at the concentration of 10 mg/L in 72 hours where a stress elevation was also observed that this algae was suffering in the same concentration. For the marine microalgae *T. chuii* it was observed significant chronic effects in the cell density in the 24 hour period of time only. This differentiated behavior may indicate the resilient behavior of this organism. The results of this study show the importance of further exploring the toxicological potential of NR ZnO on green microalgae from distinct environments and to evaluate the toxicological response of these algae in their culture media.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	3
1.2 OBJETIVOS .....	3
1.2.1 Objetivo geral .....	3
1.2.2 Objetivos específicos .....	3
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>4</b>
2.1 NANOTECNOLOGIA (NT) .....	4
2.1.1 Nanomateriais (NMs) .....	6
2.1.2. ZnO em Escala Nanométrica .....	6
2.2 ECOTOXICOLOGIA.....	8
2.2.1 Testes de toxicidade clássicos.....	9
2.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO PELA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .	10
2.3.1 Respostas às ERO.....	11
2.3.2 Catalase (CAT) .....	11
2.5 ORGANISMOS-TESTE.....	13
<b>3. METODOLOGIA</b> .....	<b>14</b>
3.1 OBTENÇÃO DO NB ZNO .....	14
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO NANOMATERIAL .....	15
3.3 MANUTENÇÃO DO CULTIVO DA MICROALGA <i>Desmodesmus subspicatus</i>	15
3.4 MANUTENÇÃO DO CULTIVO DA MICROALGA <i>Tetraselmus chuii</i> .....	16
3.5 PROCEDIMENTOS DO ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA .....	17
3.5.1 Procedimentos para a quantificação da densidade celular da microalga <i>D. subspicatus</i> e <i>T. chuii</i> .....	18
3.6 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO PELA ATIVIDADE ENZIMÁTICA .	19
3.6.1 Quantificação de proteína das microalgas .....	19
3.6.2 Cinética da atividade enzimática da CAT .....	20
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>21</b>
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO NB ZnO.....	21
4.2 CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DA <i>Desmodesmus subspicatus</i> E <i>Tetraselmus chuii</i> .....	23
4.3 TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA.....	24
4.3.1. Teste de toxicidade com a <i>D. subspicatus</i> .....	25
4.3.2 Teste de toxicidade com <i>T. chuii</i> .....	26
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PELA EXPOSIÇÃO AO NB ZnO	30

<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>33</b>
<b>6. RECOMENDAÇÕES.....</b>	<b>34</b>
<b>7. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>35</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A privilegiada situação geográfica e a diversidade de recursos naturais que a zona costeira oferece, são fundamentais para as atividades que o homem vem exercendo, como alimentação, energia, recreação e transporte, que influenciaram para que a população se concentrasse nessas regiões. Segundo Bird (1985), aproximadamente 60% da população mundial vive a uma distância inferior a 60 km da linha de costa. No Brasil este cenário não é diferente, sendo a maioria das regiões metropolitanas localizadas em áreas costeiras onde estão instalados grandes polos industriais e sistemas portuários (SOUZA *et al.*, 2007).

Nas últimas décadas, a atividade antrópica vem causando grandes impactos aos ambientes aquáticos, gerando danos muitas vezes irreversíveis a esses ecossistemas (MOURA *et al.*, 2011; SOUSA, 2002).

Devido ao avanço rápido da nanotecnologia (NT), os NM estão sendo cada vez mais usados na indústria, em setores como o cosmético e de saúde (NEL *et al.*, 2006). Estes NM podem ser aplicados tanto em sua forma pura como após a modificação e/ou funcionalização da superfície com NPs, polímeros, surfactantes ou ligantes, que modificam as propriedades e melhoraram o desempenho do material (KANGO *et al.*, 2013). A modificação da superfície do NM também pode alterar suas propriedades toxicológicas, resultando em um aumento da toxicidade (Perreault *et al.*, 2012; VICENTINI *et al.*, 2017), redução da toxicidade (BOŽIČ *et al.*, 2017) ou, ainda no efeito da toxicidade do NM (WALLIN *et al.*, 2017).

Esse avanço da NT, ao mesmo tempo em que potencializou a produção, trazendo uma fase industrial e inovadora mais eficiente, também trouxe impactos em relação à degradação do meio ambiente, devido tanto à carência histórica de legislação específica de controle ambiental quanto ao desconhecimento do potencial poluidor de grande parte das substâncias desenvolvidas durante este processo histórico (ROSSETTO, 2012).

A NT tem aberto muitas e variadas perspectivas para a indústria, e segundo Paschoalino *et al.* (2010), já em 2010 era uma das vertentes da ciência que mais se desenvolvia, despertando interesse devido a sua aplicabilidade e multidisciplinaridade. Exemplos de alguns setores que utilizam a NT em seus produtos é a biotecnologia, indústria farmacêutica e cosmética, eletrônica, alimentícia, medicina, agrícola, entre outros (NGÔ; VAN DE VOORDE, 2014).

Com o progresso da NT e o aumento da produção de NM, aumenta também a sua aplicabilidade em diversos produtos, trazendo questões preocupantes, em especial quanto ao seu potencial risco toxicológico, (SEATON; DONALDSON, 2005). Sabe-se pouco ainda sobre seus potenciais efeitos, o que desperta um interesse mundial em estudos de toxicologia dos NMs, principalmente pela necessidade de se prevenir que os ecossistemas possam sofrer efeitos danosos oriundos do uso de produtos que se utilizem destes materiais (MIDANDER *et al*, 2009).

Ao descartar esses produtos que contenham os NM em sua composição, esse material pode se tornar disponível no ambiente, dessa forma, tornam-se potenciais poluidores, a medida que estejam biodisponíveis (LOVERN *et al.*, 2007). A incorporação desses NM através da pele, mucosas e membranas celulares se torna mais fácil devido ao seu tamanho reduzido (SERVICE, 2004). Dentro da célula, os NM podem desencadear diversos mecanismos de toxicidade, entre eles o estresse oxidativo de determinadas organelas, resultando num desequilíbrio redox, levando então a disfunção e morte celular (XIA *et al.*, 2006; LONG *et al.*, 2006). O ambiente aquático, pode sofrer impactos quanto ao uso dos NM, uma vez que esse ambiente é o receptor final de toda a poluição antropogênica.

Grande extensão do nosso planeta é coberto de águas, doces ou marinhas. Nesta imensa “solução” destaca-se a diversidade de organismos, entre eles as algas (VIDOTTI E.C; ROLLEMBERG. M.C E, 2004). As algas são consideradas as reguladoras de muitos ecossistemas por existirem em grande escala e serem a principal produtora primária em muitos ambientes (KNIE; LOPES, 2004). Porém, nesses diferentes ambientes, existem diferentes espécies de algas que estão expostas a diferentes fatores bióticos e abióticos, fazendo que com o passar dos anos as algas buscassem meios de se adaptar, visto que organismos sensíveis a mudanças tanto, físicas, químicas, biológicas, geológicas ou até mesmo sociais. (VIDOTTI E.C; ROLLEMBERG.M.C E, 2004).

No último século, as algas têm sido utilizadas como indicadores de poluição aquática de qualidade hídrica, de periculosidade de substâncias químicas (KNIE; LOPES, 2004). As clorofíceas mais especificamente são utilizadas como bioindicadores da qualidade da água e de seu estado trófico, pois possuem uma resposta previsível às alterações ambientais diversas (KORHONEN; KÖNGAS; SOININEN, 2013). Portanto, são amplamente utilizadas em estudos de toxicologia ambiental.

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Neste contexto, este trabalho vem contribuir para o desenvolvimento da nanotoxicologia preventiva na medida em que se propõe a investigar a toxicidade de NB ZnO sobre microalgas verdes de ecossistemas dulcícolas e marinhos, fazendo a comparação desses ecossistemas distintos, para entender melhor como que o NBZnO se comporta em cada ambiente, facilitando então uma melhor avaliação quanto ao potenciais riscos que esses NM podem causar para toda uma cadeia trófica que pode terminar no consumo de organismos pelo homem. Este estudo também prevê contribuir para a elaboração mais precisa de uma avaliação quanto ao potencial risco toxicológico, uma vez que existe pouca regulamentação quando ao potencial risco dos NM para os ambientes aquáticos.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade de NB ZnO sobre microalgas verdes de ecossistemas dulcícolas e marinhos.

### 1.2.2 Objetivos específicos

Para atingir ao objetivo geral, alguns objetivos específicos foram delineados conforme descritos a seguir:

- Caracterizar o NB ZnO nos meios de cultivo F2 e LC-Oligo.
- Avaliar a toxicidade crônica do NB ZnO sobre a microalga verdes dulcícola *Desmodesmus subspicatus*;
- Avaliar a toxicidade crônica do NB ZnO sobre a microalga verde marinha *Tetraselmis chuii*;
- Avaliar a atividade enzimática da catalase na presença do NB ZnO para microalgas verdes *D. subspicatus* e *T. chuii*.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 NANOTECNOLOGIA (NT)

A utilização de compostos desenvolvidos como base na NT cresceu nos últimos anos (MIDANDER *et al.*, 2009). O prefixo “nano” está relacionado a uma escala de tamanho em que um nanômetro é igual a um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro. Dessa forma, para a classificação em escala nano, é preciso que o material apresente pelo menos uma dimensão na escala nanométrica (LISBOA-FILHO; MONTEIRO, 2013; NNI, 2013).

Os NMs são empregados para fins comerciais em produtos como tintas, plásticos, lubrificantes industriais (MIDANDER *et al.*, 2009), revestimentos anti-incrustantes (ISAZA *et al.*, 2011), revestimentos metálicos, cosméticos que possuam a função de proteção UV (KLEINE *et al.*, 2008), em pesticidas e solventes organoclorados (PETOSA *et al.*, 2010). Esses NMs ainda podem ser bastante utilizados na área da saúde como uma forma de contraste de imagem biomédica e terapias contra o câncer (GRIFFITT *et al.*, 2008; STUDER *et al.*, 2010).

De acordo com o *The Project on Emerging Nanotechnologies* (2014), o número de produtos que contenha NMs passou de 54 em 2005 para 1628 em 2013. Já as estimativas de produção mundial de NMs de óxidos metálicos atingiram no ano de 2012 mais de 270.041 toneladas, podendo atingir de 1.663.168 toneladas em 2020 (RESEARCH; MARKETS, 2013).

A crescente e ampla utilização dos NM, está relacionada ao fato deles, possuírem características que favorecem a fabricação de produtos melhorados, devido ao menor tamanho da partícula, forma variada e da maior área superficial (JIANG *et al.*, 2008). Contudo, com o desenvolvimento da NT e a inserção de novos NMs e produtos em quase todos os setores, vê-se a necessidade de uma criteriosa avaliação da segurança e dos riscos de exposição a estes novos NMs. Esses métodos de avaliação devem prever com segurança e avaliar o espectro de possibilidade dos efeitos, a partir dos possíveis riscos à saúde e riscos associados à exposição aos NMs (JONES; GRAINGER, 2009).

A NANOReg foi o primeiro projeto da União Européia (UE) que combina as questões e necessidades das autoridades reguladoras e legislativas com a comunidade científica relacionados à segurança dos NMs, fornecendo assim o conhecimento necessário para encontrar respostas inequívocas. Dessa forma,

estudos vêm sendo realizados quanto a NT e seus riscos (ROSSETTO, 2012; MELEGARI *et al.*, 2012). ). Atualmente, somente a União Europeia e a Suíça possuem legislações específicas quanto à regulamentação de nanomateriais (AMENTA *et al.*, 2015).

No Brasil, o desenvolvimento da produção em NT cresceu nos últimos 10 anos atingindo em 2015 inúmeras empresas. A expectativa era de um mercado de US\$ 15 bilhões (CONFAP, 2015). Com políticas de incentivo ao setor desde 2001, as pesquisas se concentraram nos laboratórios SisNANO, que contaram com investimentos da ordem de R\$ 309,5 milhões no período de 2004 a 2014, e já desenvolvem estudos em NT numa interface entre universidades e empresas (SISNANO, 2015). Mesmo com o esforço de vários países, principalmente os europeus (e inclusive o Brasil), para criar uma regulamentação quando ao uso dessa nova tecnologia, não existe uma política pública específica que controle e monitore os efeitos que os NM podem causar para o meio ambiente e para a saúde pública (ROSSETT, 2012). Entretanto, já existem alguns exemplos de normas e regulamentações mundiais que são usadas como as normas ISO: ISO/TR 16197:2014; ISO/TR 13014:2014, ISO/TS 12901-2:2014. Assim, na UE existe um esforço para criar regulamentações fortes e com embasamento, principalmente quando se trate de segurança relacionada à NT. No Brasil, a FUNDACENTRO esta incentivando a pesquisa na área de segurança em NT.

Segundo a NANOReg, o potencial inovador e econômico dos NM manufaturados está ameaçado pela compreensão limitada dos aspectos de segurança destes NMs. No entanto, o conhecimento de hoje não é abrangente o suficiente para fins de regulamentação, respondendo perguntas abertas é urgentemente necessário. Por isso a NANOReg fornece as respostas à sociedade industrial e às autoridades nacionais de regulamentação e legislação. Os principais objetivos da NANOReg são: (1) fornecer aos legisladores um conjunto de ferramentas para avaliação de risco e instrumentos de tomada de decisão a curto e médio prazo, coletando dados e realizando avaliações de risco piloto, incluindo monitoramento e controle de exposição, para um número selecionado de nanomateriais usados em produtos; (2) desenvolver, em longo prazo, novas estratégias de teste adaptadas a um elevado número de NMs, onde muitos fatores podem afetar seu impacto ambiental e de saúde. É importante estabelecer uma estreita colaboração entre as autoridades e a indústria no que diz respeito ao conhecimento necessário para uma adequada gestão de riscos dos NMs, e criar a

base para abordagens comuns, conjuntos de dados mutuamente aceitáveis e práticas de gestão de risco.

É primordial que esses possíveis riscos das NPs sejam avaliados, de modo a se criar uma legislação internacional que regule a produção e o descarte de materiais que utilizam NPs (SEATON, 2009)

### 2.1.1 Nanomateriais (NMs)

Na escala nanométrica, os materiais apresentam propriedades distintas dos seus equivalentes em escalas maiores, como por exemplo, elevada área superficial e reatividade (GONÇALVES *et al.*, 2018). Tais propriedades vão interferir também na interação NM-meio e NM-compartimentos biológicos, alterando seu tempo de persistência no meio ambiente, biocompatibilidade e toxicidade (ROSSETTO, 2016; LOPES *et al.*, 2014; SANTO *et al.*, 2014).

Os NMs são materiais que variam na escala de 1 e 100 nm em pelo menos uma de suas dimensões (PASCHOALINO *et al.*, 2010). Conforme os aprimoramentos nas tecnologias vão surgindo, e que novos produtos são desenvolvidos, os riscos iminentes quanto ao uso de NPs poderão ser evidenciados.

Cattaneo *et al.*, (2009) afirmam que apenas 10% dos estudos toxicológicos com nanocompostos são realizados com organismos de água marinhas ou estuarina, utilizando meio natural ou artificial, contra mais de 60% de estudos realizados com organismos de água doce, desta forma, ressalta-se a importância da realização de pesquisas com organismos marinhos, especialmente aqueles representativos para o ecossistema e que possuam fácil aquisição e manutenção em laboratório, tenham estabilidade genética entre outras características. Dessa forma o objetivo deste estudo foi expor duas algas verdes de ambientes aquáticos diferentes, as mesmas concentrações de NPs de ZnO e avaliar o seu comportamento.

### 2.1.2. ZnO em Escala Nanométrica

Dentre os diversos NMs desenvolvidos, o ZnO se destaca dentre os óxidos metálicos pela grande versatilidade físico-química e por isso, vem, sendo utilizado para a formação de nanoestruturas com diferentes morfologias, tais como NPs

nanotubos, NBs, entre outras morfologias complexas (GONÇALVES *et al.*, 2018). Esse fato se deve a suas superfícies polares bastante estáveis, fácil cristalização e boas propriedades físico-químicas (SOUZA *et al.*, 2014). Sabe-se agora, que o tamanho das partículas e a morfologia das partículas de ZnO pode ser controlado convenientemente usando agentes estabilizadores de superfície adequados ou surfactantes (NAIR *et al.*, 2008).

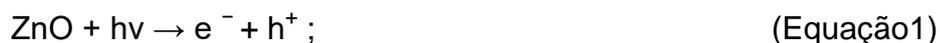
Dentre as diversas aplicações, o uso de NMs ZnO incorporado em membranas de ultra e nanofiltração, o tornou um dos materiais mais adequados para melhorar a compatibilidade de membranas compósitas com a água devido sua alta hidrofilicidade (BALTA *et al.*, 2012; CHUNG *et al.*, 2015; HONG, 2012). Além disso, sua natureza antibacteriana (BALTA *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2014; NG *et al.* 2013) e a capacidade de absorver e/ou dissipar a radiação ultravioleta, favorece seu desempenho como anti-incrustante e estende a vida útil de utilização das membranas, a um custo mais baixo quando comparado a NM, com propriedades semelhantes, tais como o TiO<sub>2</sub> e o Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (BALTA *et al.*, 2012; LIANG *et al.*, 2012).

Dentre as NPs comercializadas, as NPs ZnO, alvo deste estudo, são amplamente utilizadas na fabricação de tintas anti-incrustantes para revestimento de barcos, navios e estruturas submersas (GONÇALVES *et al.*, 2018). Portanto, considerando a quantidade de embarcações que navegam diariamente pelas águas do planeta e seu crescente aumento, estas tintas tornam-se uma potencial fonte de contaminação dos ecossistemas aquáticos, devido à liberação de íons e NPs advindos da sua decomposição (ALMEIDA *et al.*, 2007; SAISON, 2010).

Os NM ZnO também são cada vez mais frequentes na fabricação de protetores solares (SESHADRI., 2004). Pesquisadores italianos calcularam que pelo menos 25% do protetor solar aplicada sobre a pele é lavada durante o banho e natação (DANOVARO *et al.*, 2008) implicando que 250 toneladas desses NMs podem ser potencialmente descarregadas no meio marinho (WONG *et al.*, 2009). Outra utilidade para os NM ZnO é em processamento de cerâmica e borracha, em tratamento de águas residuais como fungicida (WANG *et al.*, 2008).

A geração de espécies reativas como OH<sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e O<sub>2</sub><sup>2-</sup> é explicado da seguinte forma. Como o ZnO pode ser ativado tanto por UV quanto luz visível, pares de elétrons-furos (e-h<sup>+</sup>) podem ser criado, dividindo moléculas de H<sub>2</sub>O (a partir da suspensão de ZnO) em OH e H<sup>+</sup>. As moléculas de oxigênio dissolvido são transformadas em ânions radicais superóxido (•O<sup>-2</sup>), que por sua vez reage com H<sup>+</sup> gerar (HO<sub>2</sub>•) radicais, que após colisão subsequente com elétrons produzem

ânions de peróxido de hidrogênio ( $\text{HO}_2^-$ ) (PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN ., 2008)



Com isso, faz-se necessário ampliar os estudos na área de toxicologia deste NM para organismos aquáticos, em especial as algas que possuem grande importância para a manutenção e regulação dos ecossistemas aquáticos e terrestres, além de serem produtoras primárias, importantíssimas para a cadeia trófica e absorverem metais traços da água (KNIE; LOPES, 2004).

## 2.2 ECOTOXICOLOGIA

O estudo científico sobre os efeitos adversos causados aos organismos vivos por substâncias químicas é chamado de toxicologia. Assim, a toxicologia tem como objetivos principais a identificação dos riscos associados a exposição de determinada substância e a verificação das condições de exposição a que estes efeitos são induzidos (HODGSON, 2004).

De acordo com Ramade (1997), a ecotoxicologia é uma ciência que tem por objetivo estudar as modalidades de contaminação do ambiente pelos poluentes naturais ou sintéticos, produzidos por atividades humanas, seus mecanismos de ação e seus efeitos sobre o conjunto de seres vivos que habitam a biosfera. Assim, a ecotoxicologia, é um dos ramos da toxicologia, que nasceu como uma ferramenta do monitoramento ambiental (MAGALHÃES; FERRÃO, 2008). Seus estudos exploram os efeitos de estressores químicos sobre os sistemas biológicos, onde testes são aplicados a fim de avaliar o potencial risco ambiental dos contaminantes e, grande parte dos seus resultados é interpretada com relação à degradação do ambiente, dos organismos e os riscos associados a eles.

A toxicologia ambiental visa a avaliação de agentes tóxicos, seus metabolismos e produtos da degradação no ambiente e nas cadeias alimentares, e seus efeitos prejudiciais sobre os organismos e as populações, a fim de estudar os riscos associados a estes agentes (COSTA *et al.*, 2008). De acordo com Hodgson

(2004), a toxicologia ambiental considera que a sobrevivência humana é dependente do bem-estar de outras espécies e da disponibilidade de ar, água, solo e alimentos limpos.

### 2.2.1 Testes de toxicidade clássicos

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 sobre organismos vivos (ROSSETTO, 2012). A partir de 1975 foram desenvolvidos e adaptados vários métodos de ensaios de toxicidade, utilizando alguns grupos e espécies de organismos, entre os quais se destacam as algas, microcrustáceo e peixes (MAGALHÃES; FERRÃO, 2008

Vários ensaios de toxicidade estão bem estabelecidos, sendo alguns padronizados nacional e internacionalmente por associações ou organizações de normalização, como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), *Association Française de Normalisation* (AFNOR), *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), *American Society for Testing and Materials* (ASTM), *American Water Works Association* (AWWA), *International Organization for Standardization* (ISO) e *United States Environmental Protection Agency* (USEPA) (ARAGÃO; ARAÚJO, 2006). Os testes de toxicidade podem medir os efeitos agudos, subagudos ou crônicos causados por determinada substância aos organismos, tais efeitos são avaliados com metodologia específica, sendo os testes agudos e crônicos os mais utilizados (PASCHOALINO *et al.*, 2010).

Os estudos de toxicidade aguda visam demonstrar a ocorrência de efeito adverso num curto período, de acordo com procedimentos protocolares (AZEVEDO E CHASIN, 2003). Trata-se da administração de uma única dose (ou concentração) e avaliar o seu efeito num curto período de tempo (concentração X tempo, nos estudos de toxicologia). Os resultados dos testes de toxicidade aguda em um determinado meio são expressos em concentração letal média (CL50) ou a concentração efetiva média (CE50), ou seja, concentração do agente tóxico que causa mortalidade ou imobilidade (respectivamente) a 50% dos organismos expostos depois de um determinado tempo de exposição (MAGALHÃES; FERRÃO-FILHO, 2008). Segundo ABNT (2004a) o teste de toxicidade aguda é definido como uma propriedade potencial que o agente tóxico possui de provocar um efeito adverso grave, ou mesmo a morte, em consequência de sua interação com o

organismo, após exposição a uma única dose elevada ou repetidas doses em um curto espaço de tempo.

Para a norma da ABNT 12648 (2011), os testes de toxicidade crônica são aqueles que avaliam os efeitos deletérios causados pelas amostras sobre os organismos-teste, que pode abranger a totalidade do seu ciclo de vida ou parte dele, no período de exposição do ensaio. Segundo Adam *et al.*, (2014) avaliar os efeitos crônicos das NPs é importante em termos de ambientes, uma vez que refletem cenários mais realistas do que os ensaios agudos. Os resultados dos testes crônicos são expressos em termos de concentração de efeito não observado (CENO) que a maior concentração do químico testado que não causa efeito significativo, e concentração de efeito observado (CEO) que é a menor concentração do químico testado que causa efeito significativo, sempre comparado a um controle negativo, aonde os organismos não são expostos ao contaminante.

### 2.3 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO PELA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

O estresse oxidativo é um processo natural que ocorre durante o metabolismo celular, que quando em condições normais, são responsáveis pela defesa celular. Porém, quando em condição desfavoráveis, onde há um aumento de espécies reativas de oxigênio (ERO) no meio, o sistema de defesa amplia seu arsenal enzimático e não enzimático para controlar os níveis intracelulares destas moléculas (VALKO *et al.* 2006). Dessa forma, o estresse oxidativo é uma alteração no balanço entre oxidantes e antioxidantes, favorecendo o oxidante e causando um distúrbio. (HALLIWELL, 1996).

O estresse oxidativo pode ter como consequência uma adaptação ou a lesão celular. No caso da adaptação, as células podem tolerar o estresse oxidativo, por meio da autorregulação da síntese de defesas antioxidantes, restabelecendo o equilíbrio, porém há um gasto metabólico envolvido. Já a lesão, é o resultado de estímulos químicos ou fisiológicos, que alteram a homeostase da célula (*apud* GUARIENTI, 2009, p 20). O principal alvo, ou seja, a região da célula, a organela que será afetada pelo estresse oxidativo varia de acordo com cada célula, o tipo de exposição e a severidade do estresse (FRIDOVICH, 1998). O funcionamento das células pode mudar devido a esse distúrbio, podendo resultar até na morte celular, uma vez que essas alterações podem levar a uma produção excessiva de ERO, acarretando na peroxidação das membranas celulares (SAGARA *et al.*, 1998).

### 2.3.1 Respostas às ERO

As enzimas antioxidantes contribuem na resposta de organismos ao estresse para proteger suas células dos efeitos citotóxicos das ERO. Algumas dessas enzimas antioxidantes são superóxido dismutase (SOD), ascorbato peroxidase (APX), glutathiona redutase (GSH), peroxiredoxina (Prx), catalase (CAT), polifenol oxidase (PPO), e além de seus metabólitos, como a glutathiona, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol e carotenóides (SCANDALIOS, 1993; INZÉ ; MONTAGU, 1995 ; MITTLER, 2002).

As respostas adequadas às mudanças ambientais são cruciais para o crescimento e sobrevivência dos organismos. Apesar disso, os mecanismos moleculares e bioquímicos que regem estas respostas ainda são pouco compreendidos. As ERO podem agir causando danos ou como moléculas sinalizadoras que ativam múltiplas respostas de defesa ( ROSSETTO, 2012). Essas funções podem ser obtidas quando os níveis celulares de ERO são bem controlados tanto na produção quanto no consumo, (BREUSEGEM *et al.*, 2001; NETO *et al.*, 2005, GADJEV *et al.*, 2006). O nível e o tipo das ERO são fatores determinantes para o tipo de resposta.

Os radicais livres são átomos, grupos de átomos ou moléculas que possuem elétrons livres não pareados em sua camada orbital externa e por isso apresentam instabilidade e elevada reatividade (KIRKHAM; RAHMAN, 2006). Contudo, as EROs incluem as espécies radicais livres e outras que apesar de não possuírem elétrons desemparelhados, são altamente reativos devido sua instabilidade química (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

### 2.3.2 Catalase (CAT)

A CAT é uma heme proteína citoplasmática que catalisa a redução do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) a água ( $H_2O$ ) e oxigênio ( $O_2$ ) (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). A CAT é uma enzima que ajuda a diminuir a quantidade de energia necessária na reação química que ocorre durante o consumo de  $H_2O_2$  na célula. Então, essa enzima faz a quebra do  $H_2O_2$  produzida nas células. O princípio do ensaio da atividade da CAT baseia-se em avaliar o consumo do substrato  $H_2O_2$ ,

uma unidade de CAT decompõe 1,0  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em  $\text{O}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  por minuto em pH 7 e  $25^\circ\text{C}$  com uma concentração de substrato de 10 mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , de acordo com a Equação 1 a seguir:



#### 2.4 CARACTERIZAÇÃO DO NM

Para a caracterização do NB ZnO em suspensão, foram avaliados o tamanho hidrodinâmico e o Pz. O tamanho hidrodinâmico é uma característica utilizada para definir o tamanho das partículas em meio diluente, através do movimento Browniano das partículas (MALVERN, 2004). Esta técnica é muito conhecida e empregada na literatura científica da área (GRIFFITT *et al.*, 2008; MELEGARI *et al.*, 2013 e GONÇALVES *et al.*, 2018). Esses métodos são empregados para caracterizar o agente tóxico testado nos ensaios, de forma a avaliar a influencia que o meio de cultura pode interferir quanto ao tamanho do NM e da força iônica presente, uma vez que a força iônica pela presença de vários íons altera diâmetro hidrodinâmico do NM pela formação de aglomerados, como foi observado por Gonçalves *et al.*, (2018). Em estudo realizado por Gonçalves *et al.*, (2018), os NM de ZnO foram caracterizados nos meios ISO e M4 em comparação com a suspensão em água ultrapura (UP). Gonçalves *et al.*, (2018) verificou que o diâmetro hidrodinâmico do NM foi maior para os meios ISO e M4 do que quando dissolvido em água UP, devido a maior força iônica presente nos meios de cultura, resultando num maior efeito de aglomeração dos NM e num aumento no tamanho hidrodinâmico.

Outra maneira de caracterizar a suspensão-teste é utilizando as medidas do Pz das partículas. A medida do Pz é realizada através da técnica de mobilidade eletroforética, ou seja, através da medida das cargas superficiais de amostras submetidas a uma diferença de potencial (SCHAFFAZICK *et al.* 2003). O Pz é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento, ou seja, é o potencial existente entre a superfície das partículas e o líquido de dispersão. Ele determina se as partículas dentro de um líquido tendem a permanecerem juntas ou não, dando a estabilidade das suspensões coloidais (MALVERN, 2004). Quando o valor de Pz for elevado, tanto positiva quanto negativamente, as partículas em suspensão tendem a se repelir; tornando-se mais estável. Já valores de Pz próximos de zero, indicam que

as partículas tenderão a se unir e conseqüentemente decantar, tornando-se a suspensão mais instável. De modo geral, a divisão entre suspensões estáveis e instáveis é geralmente considerada em valores a partir de +30 mV ou -30mV. As partículas com Pz >+30 mV ou <-30 mV são normalmente consideradas estáveis (MALVERN, 2004). Essas considerações foram observadas em estudos realizados por Rosseto, (2012), Perreault *et al.*, (2012), Melegari *et al.*, (2013), Perreault *et al.*, (2014) e Gonçalves *et al.*, (2018).

## 2.5 ORGANISMOS-TESTE

Uma espécie pode ser utilizada em testes de toxicidade quando ela apresenta alta sensibilidade a uma diversidade de agentes químicos. Sua sensibilidade deve ser relativamente constante, de maneira que possibilite a obtenção de resultados precisos, garantindo, assim, boa repetibilidade e reprodutibilidade dos resultados (PALVIC *et al.*, 2005). Portanto, são necessários conhecimentos sobre a biologia da espécie, como aspectos reprodutivos, hábitos alimentares, fisiologia e comportamento, tanto para seu cultivo quanto para a realização dos testes (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Nesse estudo foram utilizadas duas algas que pertencem ao filo *Chlorophyta*, as *Chlorophytas* que são compostas pelas algas verdes, extremamente abundantes nos ambientes aquáticos, onde é um dos mais importantes componentes do fitoplâncton. As algas verdes são responsáveis pela maior parte da produção de oxigênio molecular disponível no planeta a partir da fotossíntese, habitando águas doces ou salgadas (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004). Essas algas são caracterizadas por cloroplastos com membrana dupla, reserva de amido, tilacóides empilhados e presença de clorofila *a* e *b*. Dessa forma para este trabalho foram escolhidas as microalgas verdes *S. subspicatus* e *T. chuii*.

A microalga *D. subspicatus*, pertence ao filo *Chlorophyta* à classe *Chlorophyceae*, ordem *Sphaeropleales* e família *Scenedesmoidea* (GODINHO *et al.*, 2010). Essa microalga é uma alga verde planctônica, que faz parte do grupo dos produtores primários nos ecossistemas de água doce (KNIE; LOPES, 2004). Quando na natureza, a *D. subspicatus* forma colônia de seres unicelulares de 5 ou 6 células, ao passo que no cultivo em laboratório ela se mostra, frequentemente, solitária (KNIE; LOPES, 2004). As respostas refletem-se tanto no número, quanto na composição e espécies, as quais funcionam como sensores confiáveis da

integridade biológica e das condições físico-químicas em rios e lagos (ROUND; CRAWFORD; MANN, 1990; STEVENSON, 1996; STOERMER; SMOL, 1999; POTAPOVA; CHARLES, 2007; STENGERKOVACS *et al.*, 2007).

A microalga *T. chuii* é uma alga unicelular, pertencente ao filo *Chlorophyta* à classe *Prasinophyceae*, ordem *Chlorodendrales* e família *Chlorodendracea* (HOEK *et al.*, 1995; TOMASELLI, 2004). Essa microalga habita ambientes marinhos, exibem altas taxas de crescimento e são usadas, normalmente, em cultivos como alimento para larvas de moluscos bivalves (LAING; AYALA, 1990). A *T. chuii* é conhecida pela alta mobilidade, e abundância em vários ecossistemas marinhos, onde suas populações são frequentemente um importante componente do fitoplâncton, e tem sido amplamente utilizada como representante de produtores primários (DAVARPANA; GUILHERMINO, 2015).

A escolha destas microalgas como foco deste estudo foi motivada devida pela posição na cadeia trófica, disponibilidade das cepas e devido às recomendações da ABNT. As microalgas são representantes significativos de ambientes aquáticos, onde são à base da cadeia trófica, servindo de alimentos para outros organismos, além de destacar-se na manutenção do equilíbrio do ambiente aquático, pois participam do ciclo biogeoquímico, especialmente nos ciclos do carbono, oxigênio, nitrogênio, fósforo e silício (KNIE; LOPES, 2004). Além disso, os primeiros sinais de impactos nos ecossistemas aquáticos podem ser observados nas microalgas em um curto espaço de tempo (horas), viabilizando desta maneira, que ações emergenciais possam ser tomadas (PAVLIC *et al.*, 2005). Os testes de toxicidade utilizando microalgas são geralmente mais sensíveis, rápido e econômico (WALSH, 1988; NALEWAJKO ; OLAVESON, 1998). Dessa forma, esses testes vêm sendo muito utilizados em estudos ambientais de forma mais eficaz e mais rápida.

### **3. METODOLOGIA**

#### **3.1 OBTENÇÃO DO NB ZNO**

O NB ZnO utilizado neste estudo foi fornecido pelo Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), parceiro neste projeto de pesquisa. O NB ZnO foi sintetizado conforme metodologia de Yang e Liu (2011), com algumas adaptações (GONÇALVES *et al.*, 2018).

### 3.2 CARACTERIZAÇÃO DO NANOMATERIAL

Para a caracterização de tamanho e morfologia do NB ZnO puro, uma suspensão-teste de NB ZnO (1 g/L) em água UP foi gotejada sobre um grid de carbono-Cu (300 mesh) e o grid foi armazenado em um dessecador à vácuo por 24 h para secagem. Após secagem, imagens do NB ZnO foram capturadas em um microscópio eletrônico de transmissão (TEM) (JEM 1011 MET-100 kV, JEOL, Japão) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

A caracterização da suspensão-teste de NB ZnO nos meios de cultivo LC-Oligo (meio de água doce) e F2 (meio de água marinha) foi realizada através da determinação do tamanho hidrodinâmico e potencial Zeta (Pz), utilizando o equipamento NanoBrook 90PlusPals (Brookhaven Instruments, EUA). A concentração de NB ZnO utilizada na caracterização foi de 500 mg/L. Essas análises foram realizadas com o objetivo de verificar o comportamento e estabilidade da suspensão de NB ZnO nos meios diluentes empregados nos testes de toxicidade. Estas caracterizações foram realizadas no LABTOX-UFSC.

### 3.3 MANUTENÇÃO DO CULTIVO DA MICROALGA *Desmodesmus subspicatus*

A cepa da microalga *D. subspicatus* foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Meio Ambiente da Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE). O cultivo desta microalga foi desenvolvido através das metodologias descritas pelas normas ABNT 12648 (2011) e OECD 201 (2002), com algumas adaptações. O meio de cultura empregado foi o LC-Oligo.

Esse meio foi preparado conforme a descrição da Tabela 1. Após preparo, o meio foi autoclavado em 121°C por 20 minutos. Depois de resfriado a microalga *S. subspicatus* foi incubada neste meio e mantida sob temperatura de 20±2 °C sob iluminação, aeração e agitação constante.

TABELA 1. Composição do meio de cultivo LC-Oligo empregado nos cultivos e nos testes de toxicidade da microalga *S. subspicatus*. \* V = volume necessário de cada solução para o preparo de 1 L do meio de cultura.

Solução	Reagente	Concentração (g/L)	V* (mL)
1	Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	40	1
2	KNO <sub>3</sub>	100	1
3	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	30	1
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	40	1
5	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,03	0,5
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,06	
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,06	
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,06	
	Mn(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0,06	
	C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0,06	
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,06	
6	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> FeO <sub>7</sub> ·5H <sub>2</sub> O	1,625	0,5
	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,625	
	FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,625	
7	NaHCO <sub>3</sub>	15	1

Fonte: Adaptado de ABNT 12648 (2011).

### 3.4 MANUTENÇÃO DO CULTIVO DA MICROALGA *Tetraselmus chuii*

O cultivo da microalga foi desenvolvido, e gentilmente cedido pelo Laboratório de Microbiologia (LABMIC) da UFPR. O meio de cultura utilizado foi o F/2 Guillard (1975) (Tabela 2) foi preparado com água do mar filtrada como água de diluição, apresentando uma salinidade de 29 (29‰). Durante a fase experimental, a temperatura da sala de cultivo foi mantida em 20±2 °C, e a cultura foi submetidas a iluminação, agitação e aeração constante.

TABELA 2: Composição do meio de cultivo F/2 Guillard (1978), empregado no cultivo e nos testes de toxicidade da microalga *T. chuii*. \*V = volume das soluções para o preparo de 1 L do meio de cultura.

Solução	Reagente	Concentração (g/L)	V* (mL)
Nitrato	NaNO <sub>3</sub>	75	1
Fosfato	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	5	1
Silicato	Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .9H <sub>2</sub> O	30	1
Metais-traço	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	9,8	1 mL de cada solução de metal-traço + 4,36 g de EDTA + 3,15 g de FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O
	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	22	
	CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	10	
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	180	
	NaMoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	6,3	
Vitaminas	Tiamina	0,10	1
	Cianocobalamina	5 x 10 <sup>-4</sup>	
	Biotina	5 x 10 <sup>-4</sup>	

Fonte: ABNT 16181 (2011).

### 3.5 PROCEDIMENTOS DO ENSAIO DE TOXICIDADE CRÔNICA

Os ensaios de toxicidade crônica deste estudo foram desenvolvidos de acordo com as recomendações das normas ABNT 12648 (2011) e OECD 201 (2002) com algumas adaptações.

Para a realização dos testes de toxicidade, preparou-se três concentrações diferentes de NB ZnO, mais um controle negativo apenas com o meio de cultura. Todas as concentrações de NB ZnO empregadas nos testes de toxicidade foram testadas em triplicata.

A suspensão estoque de NB ZnO foi preparada na concentração de 10.000mg/L nos respectivos meios de cultura. As massas necessárias de NB ZnO foram pesadas uma balança analítica (Shimadzu, mod. AG200) e suspensas nos respectivos meios para a obtenção da concentração desejada. A suspensão estoque de NB ZnO foi homogeneizada com auxílio de uma sonda ultrassônica (Labsonic U - B. Braun, Alemanha) por 5 min na potência de 80%.

A partir da suspensão estoque, foram realizadas diluições em cascata com os respectivos meios para as concentrações-teste que variaram de 0,1 a 1000 mg/L para exposição das algas ao NB ZnO (concentração final no frasco de exposição).

Os testes foram realizados entre os meses de janeiro de 2018 a outubro de 2018, sendo que para a realização dos testes, foi avaliado fatores como a concentração de alga do cultivo e a disponibilidade dos equipamentos. Foram realizadas leituras de densidade celular nos tempos de 24, 48 e 72 horas após a exposição ao NB ZnO.

### 3.5.1 Procedimentos para a quantificação da densidade celular da *microalga D. subspicatus* e *T. chuii*

Para a quantificação da densidade celular da microalga *D. subspicatus* e *T. chuii* foi utilizado o método espectrofotométrico indireto, utilizando um espectrofotômetro UV-visível (EEQ90111.UV-B – Edutec, Brasil). A escolha desse método se deu devido ao fato de que os métodos tradicionais que utilizam microscópios e realizam a contagem de células de forma visual estão sujeitos à erro humano e é um processo que necessita de técnicos bem treinados para a realização, além de do fato de que levaria um tempo muito maior para a quantificação dos resultados.

Para o desenvolvimento do método de quantificação espectrofotométrico, foi primeiramente estabelecido um padrão de equivalência, através do método tradicional de contagem visual em microscópio ótico, e em paralelo foi realizado a medida da absorvância destas suspensões de algas em comprimentos de ondas de absorvância máxima. A partir da amostra em questão foram realizadas diluições consecutivas que foram quantificadas pelo método de contagem visual e também pela absorvância nos respectivos comprimentos de onda. A partir dos dados obtidos nesta etapa, foi construída uma curva de calibração de densidade celular que serviu para a quantificação indireta da densidade celular das algas através da leitura da absorvância.

Assim, a partir de uma amostra de alga do cultivo foram realizadas as contagens pelo método tradicional em microscópio ótico, com o auxílio da câmara de Neubauer, segundo técnica descrita por (GUILLARD, 1978). Para a *D. subspicatus* foram preparadas diluições em meio LC-Oligo a partir de uma solução mãe ( $21,3 \times 10^6$  cel/mL, obtido pela contagem tradicional) nas concentrações de  $0,6 \times 10^6$ ,  $1,3 \times 10^6$ ,  $2,6 \times 10^6$ ,  $5,3 \times 10^6$  e  $10,6 \times 10^6$  cel/mL, e foram realizadas as leituras da absorvância destas diluições no comprimento de onda de 680nm. Para a *T. chuii*, foram preparadas diluições em meio F/2 a partir da suspensão-mãe, nas concentrações de  $0,5 \times 10^5$ ,  $1,2 \times 10^5$ ,  $2,1 \times 10^5$ ,  $4,9 \times 10^5$ ,  $12,6 \times 10^5$  cel/mL, e foram

realizadas as leituras da absorvância destas diluições no comprimento de onda 450 nm a medida da densidade celular. A partir dos valores de densidade celular e absorvância foram construídas as curvas de calibração para as medidas das densidades celular.

### 3.6 AVALIAÇÃO DO ESTRESSE OXIDATIVO PELA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

A atividade enzimática é medida através de suas atividades catalíticas e os resultados dessas determinações são expressos em termos de quantidade de atividade presente em determinado volume ou massa da amostra. A unidade de atividade é a medida da velocidade em que a reação se realiza, medindo-se ou o consumo do reagente, ou a formação do produto. A unidade empregada a uma enzima foi estabelecido pela Comissão de Enzimas (EC) da União Internacional de Bioquímica (IUB) como a Unidade Internacional (U) que é a quantidade de enzima que catalisa a transformação de 1 $\mu$ mol de substrato por minuto, nas condições padrão por ela recomendada. A equivalência dessa unidade é: 1U equivale à 1 $\mu$ M/min. A atividade específica neste experimento é apresentada como sendo a atividade por unidade de peso da proteína (U/mg de proteína).

Todas as suspensões de microalgas das exposições e do controle foram recuperadas após 72 h de teste por centrifugação a 6000xg por 15 minutos, à 10 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* celular de algas foi ressuspenso em 500  $\mu$ L de tampão PBS 0,1 M, pH 7. As microalgas recuperadas foram conservadas em freezer à -80 °C até a quantificação a atividade enzimática.

#### 3.6.1 Quantificação de proteína das microalgas

Para realizar os ensaios de atividade enzimática é necessário determinar a quantificação de proteína por mL para cada suspensão de microalgas, expostas ou não ao NB ZnO. Para a quantificação da concentração de proteínas, foi utilizado o método de Bradford (BRADFORD, 1976). Uma curva de calibração foi preparada utilizando como padrão a albumina bovina (BSA). Para a preparação dessa curva foi utilizado uma solução-mãe de BSA 100 mg/mL (50 mg de BSA em 500 mL de água ultra pura) e a partir desta solução mãe foram feitas as diluições sucessivas para compor a curva: 100 mg/L (P1), 50 mg/L (P2), 25 mg/L (P3), 12,5 mg/L (P4), 6,25 mg/L (P5), 3,125 mg/L (P6). 100  $\mu$ L de cada amostra da curva foi adicionado a 900  $\mu$ L de reagente de Bradford e todos os pontos da curva foram medidos sua

absorbância no comprimento de onda de 595 nm, no espectrofotômetro UV-visível (EEQ90111.UV-B – Edutec, Brasil) e a partir destes dados foi construída uma curva de calibração. Para a quantificação das amostras dos ensaios de toxicidade, 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra foi adicionado a 900  $\mu\text{L}$  de reagente de Bradford e todos os pontos da curva foram medidos sua absorbância no comprimento de onda de 595 nm, e os valores de mg proteína/L foi quantificado a partir da curva de calibração construída.

### 3.6.2 Cinética da atividade enzimática da CAT

A atividade enzimática da CAT para algas *S. subspicatus* e *T. Chuii* após 72h de exposição ao NB ZnO foram avaliados por espectrofotometria UV-visível utilizando o coeficiente de absorvidade molar da CAT (MELEGARI *et al.*, 2012).

Para determinação da atividade enzimática a metodologia utilizada seguiu as recomendações de Melegari *et al.* (2013) com algumas modificações. Para avaliação da CAT foi utilizado a reação apresentada na Eq. 01, onde a degradação do peróxido de hidrogênio foi monitorado no comprimento de onda de 240 nm, A CAT possui um coeficiente de absorvidade molar conhecido de  $0,0436 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ .

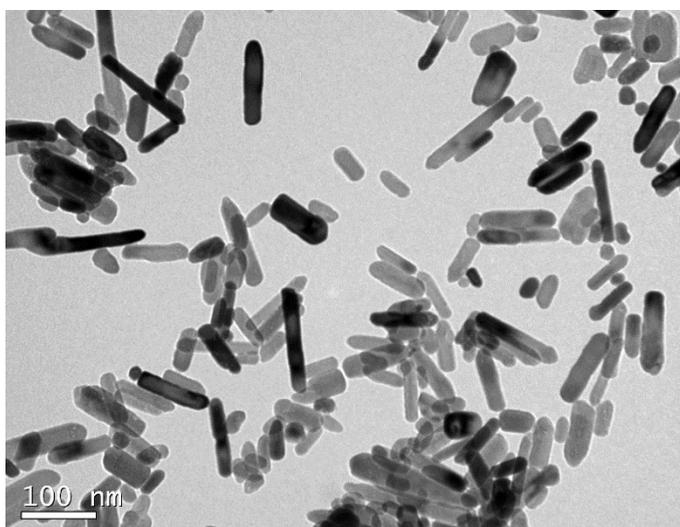
Para a quantificação da atividade enzimática da CAT, 1 $\mu\text{g}$  de proteína de cada amostra de microalga foi adicionado a 100  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 200 mM e o volume foi completado para 1 mL com tampão PBS 0,1M pH 7. A mistura foi colocada em uma cubeta de quartzo com um caminho ótico de 1 cm e a cubeta foi posicionada no equipamento. Após 30 segundos da mistura dos reagentes, iniciou-se a leitura da absorbância em 240 nm a cada 10 segundo por 60 segundos. A partir desses parâmetros foi possível determinar a atividade da CAT para cada amostra. A atividade da CAT para cada amostra é apresentada em termos de U/mg proteína, que equivale a conversão molar de 1  $\mu\text{M}$  de peróxido de hidrogênio por minutos por mg de proteína.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DO NB ZnO

Os NB ZnO empregado neste estudo foram caracterizados por técnica de imageamento de MET. A Figura 1 apresenta uma imagem do NM testado, com morfologia compatível com NB, e tamanhos médios que variaram entre 50 e 150 nm de comprimento e diâmetros que variaram entre 20 e 30 nm, confirmando as dimensões nanométricas do material testado.

FIGURA 1: Imagens de MET dos NB ZnO exibindo morfologia compatível com NB e escala nanométrica.



A Tabela 3 apresenta os resultados obtidos de tamanho hidrodinâmico e Pz do NB ZnO nos dois meios de cultura empregados neste estudo.

TABELA 3: Valores de pH, tamanho hidrodinâmico e pz para os meios F2 e LC-Oligo.

Meio	pH	Tamanho hidrodinâmico (nm) ± DP	Pz (mV) ± DP
F2	8,02	1834,93 ± 405,15	18,94 ± 3,61
LC-Oligo	7,42	840,98 ± 111,50	-7,54 ± 1,81

Fonte: Autor

Com base nesses resultados, é possível analisar que o meio F2, com salinidade 29, apresentou um pH normal para a água marinha de 8,02 (ABNT NBR 16181:2013). Neste meio, o NB ZnO apresentou elevado tamanho hidrodinâmico devido a maior força iônica presente no meio salino (GONÇALVES *et al.*, 2018). O

meio LC-Oligo apresentou pH recomendado pela norma de 7,42 (ABNT NBR 12648:2011), e o tamanho hidrodinâmico do NB ZnO foi menor em relação ao encontrado ao meio salino. Em ambos os casos é possível afirmar que a força iônica dos meios altera o tamanho original do NB ZnO, e promove uma aglomeração desse NM quando em suspensão (ROSSETTO, 2012).

Quanto a estabilidade do NB ZnO nos meios de cultivo em termos de Pz, foi possível verificar que, de modo geral, ambas as suspensões não podem ser consideradas estáveis pois os valores de Pz não estão próximo a +/- 30 mV. Quando comparamos as suspensões nos meios testados, o NB ZnO em meio F2 apresentou maior estabilidade ( $18,94 \pm 3,61$  mV) que no meio LC-Oligo o NB ( $-7,54 \pm 1,81$  mV). Esse comportamento também pode ser justificado pela maior força iônica do meio F2. Gonçalves *et al.*, (2018) observou que a suspensão de NM ZnO apresentam uma maior estabilidade quando dissolvidos em água UP, e que esses NM tendem a aglomerar e reduzir a estabilidade da suspensão quando em contato com íons dissolvidos do meio. Os resultados apresentados na Tabela 3 corroboram com essas observações.

Conforme foi observado na sessão 4.1, o NB ZnO quando caracterizados no meio LC-Oligo para a microalga de *D. subspicatus* (ambiente de água doce), que apresentou um tamanho hidrodinâmico menor que o observado no meio F2 empregado nos testes para a *T. chuii* (Tabela 3). Esse comportamento pode ter uma influência na resposta toxicológica dos NB ZnO, uma vez que esses NM formam aglomerados de maior tamanho hidrodinâmico em suspensão, e terão uma menor disponibilidade de área superficial deste NM para a liberação de íons de Zn para o meio aquoso. A presença de cátions bivalentes em meio aquoso como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$  leva a uma maior aglomeração do que os cátions monovalentes (BAALOUSHA *et al.*, 2013), e os meios utilizados possuem grande concentração desses íons em solução. Além disso, o principal mecanismo de toxicidade dos NMs de ZnO é explicado na literatura pela liberação de íons de Zn no meio, e a formação de ERO que irá induzir efeitos de estresse oxidativo (FRANKLIN *et al.*, 2007). A caracterização do NB ZnO nos meios nos ajuda a entender melhor como o comportamento toxicológico do NM é modificado.

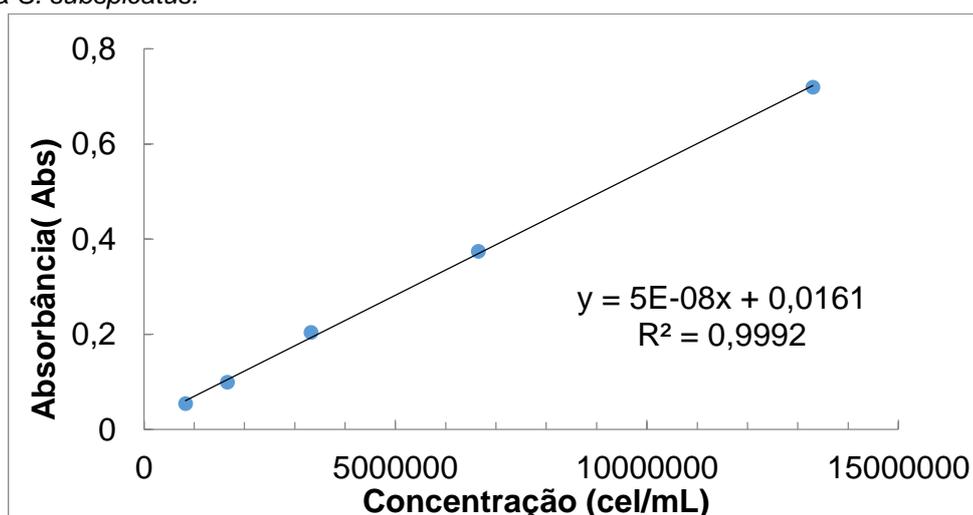
Um estudo realizado por Buffet *et al.* (2010) demonstrou que em água marinha, os diâmetros de NM aumentam significativamente em poucos dias e a suspensão tornou-se mais instável devido a diminuição do Pz em relação ao controle, ocorrendo uma maior interação das partículas com o meio. Possivelmente

o efeito observado de diminuição da densidade celular no tempo de 24 horas para a *T. chuii* reflete o comportamento de NB ZnO ainda em tamanhos hidrodinâmicos mais reduzidos quando comparados aos efeitos nos tempos de 48 e 72 horas. Segundo Rossetto *et al*, (2012), a aglomeração e a estabilidade de NPs de óxidos metálicos (CuO) estão diretamente ligadas aos resultados de toxicidade obtidos, pois com o aumento do diâmetro hidrodinâmico a reatividade associada à área superficial poderá ter um decaimento, ou seja, quanto maior do diâmetro, menor a toxicidade devido à menor liberação de íons em solução.

#### 4.2 CURVAS DE CALIBRAÇÃO DA DENSIDADE CELULAR DA *Desmodesmus subspicatus* E *Tetraselmus chuii*.

Para o estabelecimento do método de quantificação da densidade celular, foram feitas as leituras da absorbância das diferentes diluições da suspensão de algas preparadas a partir da solução mãe conforme descrito na seção 3.5. As curvas de calibração foram construídas a partir dos dados de absorbâncias obtidos para ambas as algas em função da densidade celular. A seguir são apresentados na Figura 2 a curva utilizada para quantificação da densidade celular da *D. subspicatus*, e na Figura 3 a curva utilizada para quantificação da densidade celular da *T.chuii*.

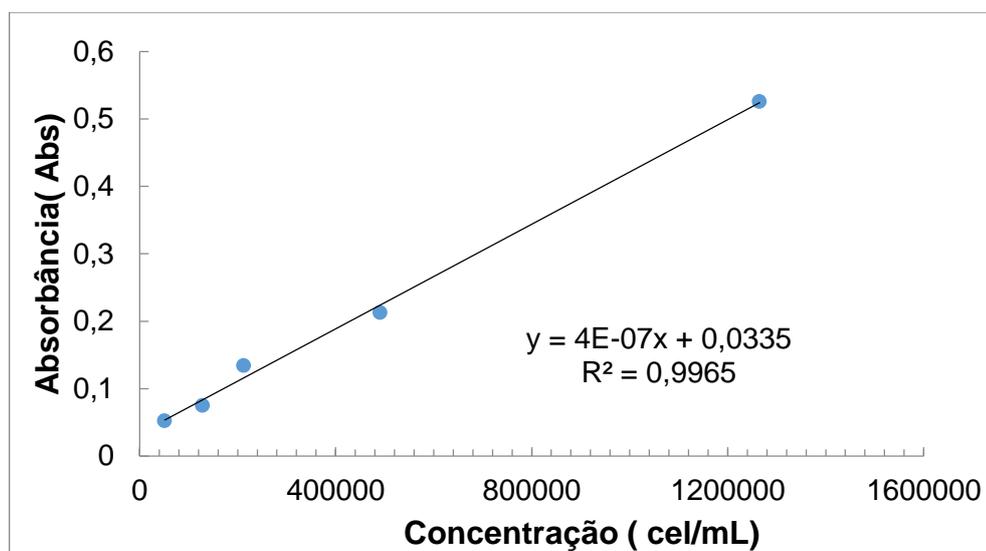
FIGURA 2: Correlação linear da absorbância em função da concentração celular (cel/mL) para a microalga *S. subspicatus*.



Fonte: Autor

Conforme Figura 2, a correlação linear testada apresentou um  $R^2$  de 0,9992 e pode ser considerada apropriada para a extrapolação da densidade celular num intervalo de concentração de  $0,83 \times 10^6$  –  $13,3 \times 10^6$  cel/mL.

FIGURA 3: Correlação linear da absorbância em função da concentração celular (cel/mL) para a microalga *T. chuii*.



Fonte: Autor

Conforme Figura 3, a correlação linear testada para a microalga *T. chuii* apresentou um  $R^2$  de 0,9965 e foi considerada apropriada para a extrapolação da densidade celular no intervalo de concentração é de  $0,5 \times 10^5$  –  $12,6 \times 10^5$  cel/mL.

Baseado nos resultados de regressão linear de densidade celular em função da absorbância para ambos os casos, o método desenvolvido neste estudo para leitura indireta da densidade celular se demonstrou adequado, além de confiável e rápido para utilização como medida de densidade celular para ambas as microalgas utilizadas.

#### 4.3 TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA

A partir do método de quantificação indireto para densidade celular estabelecido, foram iniciados os testes de toxicidade crônica pela exposição das microalgas *D. subspicatus* e *T. chuii* ao NB de ZnO. Os resultados aqui apresentados referem-se à quantificação da densidade celular de ambas as microalgas em resposta as exposições às concentrações de 0,1, 1,0, 10 mg/L de NB ZnO.

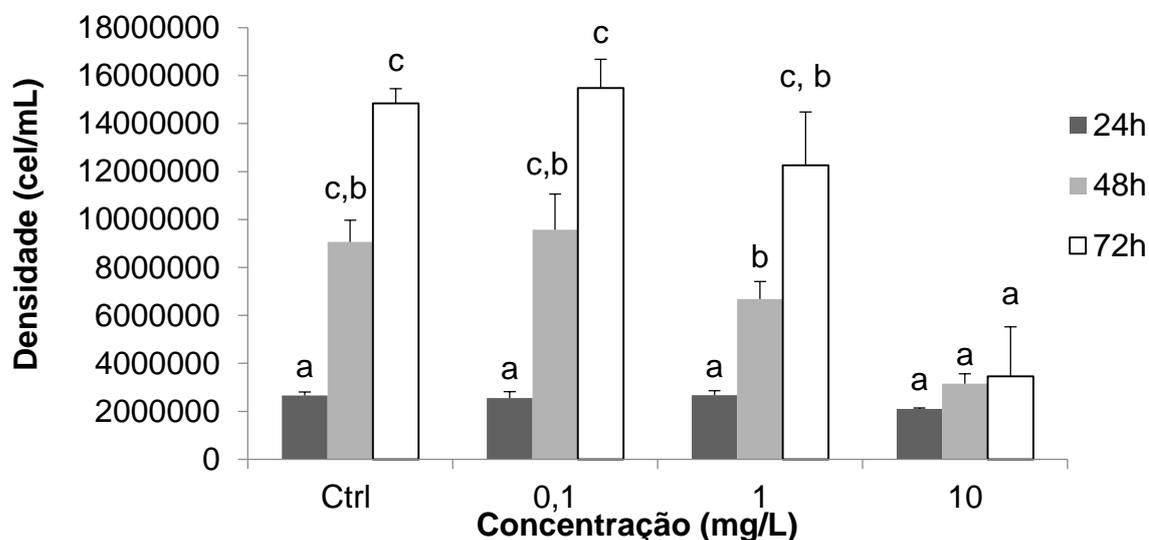
Para examinar as diferenças significativas entre as concentrações celulares médias foi aplicada uma análise de variância (ANOVA) bifatorial ortogonal. A fim de atender as premissas da ANOVA, com relação a homogeneidade de variância, e normalidade das distribuições, as concentrações celulares foram transformadas para

Log(x+1). Ao encontrar variações significativas ( $p < 0,05$ ), foi aplicado o teste Tukey para determinar a interação entre o controle e as concentrações de NB ZnO nos tratamentos.

#### 4.3.1. Teste de toxicidade com a *D. subspicatus*

Um total de 15 testes de toxicidade crônica foram realizados para a microalga *D. subspicatus* expostas a três concentrações distintas de NB ZnO mais o controle negativo (todos em triplicatas), em três tempos de exposição, afim de que a reprodução metodológica fosse satisfatória para encontrar respostas toxicológicas similares em testes distintos. A seguir, os resultados representativos de um dos ensaios são apresentados na Figura 4 e Tabela 4, a fim de avaliar a resposta toxicológica crônica da *D. subspicatus* pela exposição ao NB ZnO.

FIGURA 4: Ensaio de exposição crônica da microalga *D. subspicatus* ao NB ZnO. Resposta da densidade celular (cel/mL) em função da concentração (mg/L de NB ZnO) e tempo (24, 48 e 72h), onde letras diferentes indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Fonte: Autor

TABELA 4: ANOVA bifatorial para o efeito dos fatores concentração (Con) e tempo (Te) sobre a densidade de *D. subspicatus*. Valores significativos ( $p < 0,05$ ) são identificados em negrito. Onde G.L = graus de liberdade, Q.M = média da soma dos quadrados,  $F$  = valor calculado da variância da ANOVA  $P$  = valor de significância, e EMS (%) = estimativa dos componentes de variação em porcentagem.

Fatores	G.L	Q.M	$F$	$P$	EMS (%)
Con	3	0,3753	30,78	<b>&lt; 0,0001</b>	27
Te	2	1,0796	88,52	<b>&lt; 0,0001</b>	40
Con: Te	6	0,0699	5,73	0,000818	19
Residuo	24	0,0122			15
Total		1,537			100

Fonte: Autor

Nestes ensaios, apesar de existir uma interação significativa entre o tratamento e o tempo ( $P < 0,001$ ), o fator tempo explica 40% da variabilidade celular, sendo que a influência desse fator na densidade celular é diferente entre as concentrações (Tabela 4). Na concentração de 10 mg/L, não se verificou diferenças significativas na densidade celular em relação ao tempo (teste Tukey,  $P > 0,05$ ; Figura 4), indicando que a exposição ao NB ZnO nesta concentração inibe o aumento da densidade celular em todos os tempos testados. Contudo, para as demais concentrações (concentração  $\leq 1$  mg/L) incrementos significativos na densidade celular foram verificados após 48h (teste Tukey,  $P < 0,05$ ; Figura 4).

Com base na análise estatística dos resultados, é possível definir que para a *D. subspicatus* a resposta crônica em 48 e 72h foi uma CEO de 10 mg/L, e a CENO de 1 mg/L. Devido já em 48h esse efeito toxicológico já ser diferenciado, esse será o tempo de exposição considerado para os efeitos de CEO e CENO.

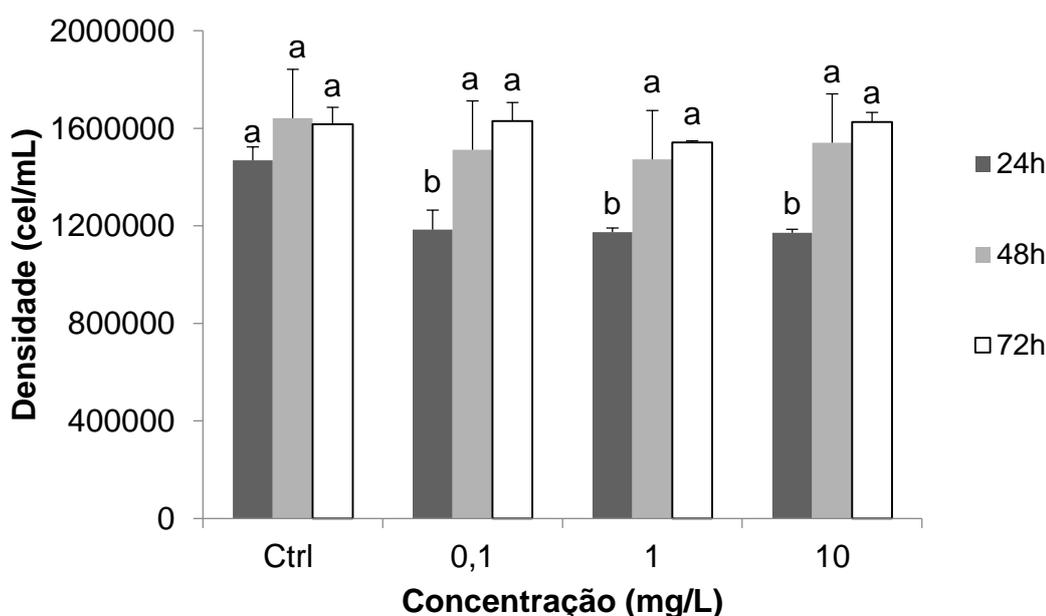
Melegari *et al.* (2013) avaliou a toxicidade de NP de CuO sobre a microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, e verificou que o microrganismo estudado é capaz de responder a presença de NP CuO, observando efeitos de inibição do crescimento celular no tempo de até 72h, resultado este que também foi observado nos resultados da *D. subspicatus*

#### 4.3.2 Teste de toxicidade com *T. chuii*

Um total de 7 testes de toxicidade crônica foram realizados para a microalga *T. chuii* expostas a três concentrações distintas de NB ZnO mais o controle negativo (todos em triplicatas), em três tempos de exposição, afim de que a reprodução metodológica fosse satisfatória para encontrar respostas toxicológicas similares em testes distintos. A seguir, os resultados representativos de um dos ensaios são

apresentados na Figura 5 e Tabela 5, afim de avaliar a resposta toxicológica crônica da *T. chuii* pela exposição ao NB ZnO.

FIGURA 5: Ensaio de exposição crônica da microalga *T.chuii* ao NB ZnO. Resposta da densidade celular (cel/mL) em função da concentração (mg/L de NB ZnO) e tempo (24, 48 e 72h), onde letras diferentes indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



Fonte: Autor

TABELA 5: ANOVA bifatorial para o efeito dos fatores concentração (Con) e tempo (Te) sobre a densidade de *T.chuii*. Valores significativos ( $P < 0,05$ ) são identificados em negrito. Onde G.L = graus de liberdade, Q.M = média da soma dos quadrados,  $F$  = valor calculado da variância da ANOVA  $P$  = valor de significância, e EMS (%) = estimativa dos componentes de variação em porcentagem.

Fatores	G.L	Q.M	$F$	$P$	EMS (%)
Con	3	0,0051	18,348	< 0,0001	19
Te	2	0,0422	153,25	< 0,0001	49
Con: Te	6	0,0017	6,268	0,000457	18
Residuo	24	0,0003			14
Total	35	0,0493			100

Fonte: Autor

Para estes ensaios, que foram realizados com a microalga *T. chuii*, as suspensões de NB ZnO foram preparadas em meio F2, que constitui na adição de sais e água do mar filtrada, a densidade celular variou significativamente (ANOVA,  $P < 0,001$ ) entre o controle e as concentrações com os tempos de exposição das algas, sem interação significativa entre os mesmos (Tabela 5). Enquanto o tempo explicou 49% da variabilidade da densidade celular, a concentração respondeu por

19% (Tabela 5). A densidade celular foi significativamente diferente entre o controle e as demais concentrações em 24h de exposição (Tukey,  $P < 0,05$ ). Em 48h e 72h as diferenças não foram significativas (Tukey,  $P < 0,05$ ; Figura 5).

Com base na análise estatística dos resultados, é possível definir que para a *T. chuii* a resposta crônica em 24h foi uma CEO de 0,1 mg/L e a CENO  $< 0,1$  mg/L.

A composição química desse meio faz com que ele possua uma elevada força iônica, que poderá influenciar na agregação dos NB ZnO (GONÇALVES *et al.*, 2018). A água do mar em comparação a água doce tem maior tendência de potencializar os efeitos dos NM nos organismos marinhos, isso porque na água marinha possui características de maior força iônica e pH alcalino que podem alterar as propriedades físico-químicas dos NM (KASHIWADA., 2006; KLAINÉ *et al.*, 2008).

Um resumo dos resultados toxicológicos de toxicidade crônica do NB ZnO encontrados nos testes de exposição do as microalgas *D. subspicatus* e *T. chuii* são apresentados na Tabela 6 a seguir.

TABELA 6: Resultados de toxicidade crônica para o NB ZnO pela CEO e CENO (mg/L) para as microalgas *D. subspicatus* e *T. chuii*.

Amostra	Organismo	Tempo (h)	Toxicidade (mg/L)
NB ZnO	<i>D. subspicatus</i>	48	CEO: 10mg/L CENO: 1mg/L
	<i>T. chuii</i>	24	CEO: 0,1 mg/L CENO: $< 0,1$ mg/L

Fonte: Autor

Avaliando os resultados compilados na Tabela 6, é possível verificar em um primeiro momento que em termos absolutos (sem considerar a variável tempo) que o NB ZnO se apresentou mais tóxico para a microalga *T. chuii* com valores de CEO de 0,1 mg/L. Contudo uma análise mais aprofundada precisa ser realizada para concluirmos quais os efeitos toxicológicos do NB ZnO sobre microalgas verdes.

O NB ZnO foi tóxico para a *S.subspicatus* na concentração de 10 mg/L para os tempos de 48 e 72h (Fig. 4), apresentando diferença entre o controle e os tratamentos, e evidenciando o comportamento concentração-dependente da inibição do crescimento das microalgas com o aumento da concentração de NB ZnO no meio. Em todos os testes de toxicidade realizados foi possível observar que o comportamento na menor concentração de NB ZnO apresentou efeitos similares ao

controle negativo, sendo possível observar um aumento da densidade celular nos tempos experimentais.

Os testes toxicológicos realizados com a *T. chuii* apresentaram um comportamento diferente do encontrado para a *D. subspicatus* (Fig. 5). Para a *T. chuii*, verificou-se efeitos significativos no tempo de exposição de 24 h, pela resposta de uma diminuição significativa na densidade celular para todas as concentrações de NB ZnO. Contudo, nos tempos de 48 e 72 h a diferença entre as densidades celulares do controle negativo e o tratamento não se apresentou mais significativa. Esse comportamento pode evidenciar o mecanismo de resposta desta microalga, que deve ser afetada pelo NM em curtos períodos de exposição (efeito agudo) e consegue se recuperar dos efeitos deletérios após passado esse período (SCHWAN-ESTRADA *et al.*, 2008). Em termos gerais, pode-se concluir que a alta capacidade resiliente da *T. chuii*, quando comparada a *D. subspicatus*, refletiu nos resultados de toxicidade ao mesmo agente tóxico (Fig 4 e 5). Estudos similares foram reportados na literatura por Rosseto. *et al*, (2012) e Melegari. *et al* (2012) com a NP CuO, onde a recuperação da densidade celular de microalgas foi observada em períodos de exposição de 72 h. Contudo, a resiliência do organismo não pode ser considerada isoladamente, pois conforme discutido anteriormente, mecanismos físico-químicos afetam o comportamento toxicológico do NB ZnO nos ecossistemas avaliados. Os mecanismos de aglomeração podem ter afetado o estado de aglomeração desses NMs em suspensão, reduzindo a área superficial do NM e a biodisponibilidade de íons de Zn em solução, e refletindo na resposta toxicológica do organismo.

NM de óxidos metálicos apresentam mecanismos de toxicidade bem reportados na literatura, pela liberação de íons metálicos no meio aquoso. Esses íons metálicos uma vez liberados no meio, por possuírem excesso de elétrons na camada de valência, são espécies altamente reativas e podem atuar como espécies promotoras de EROs. Embora nenhuma metodologia para a quantificação de íons de Zn foi realizada neste estudo, o principal mecanismo para a indução ao estresse oxidativo às microalgas ocorre pela liberação de íons de Zn no meio.

Diante do exposto, os resultados do presente estudo permitem estabelecer que não apenas a natureza química no NM influenciará na sua toxicidade, mas também fatores físico-químicos como a composição do meio aquoso onde ele está suspenso, e também natureza de origem e fisiologia dos microrganismos testados.

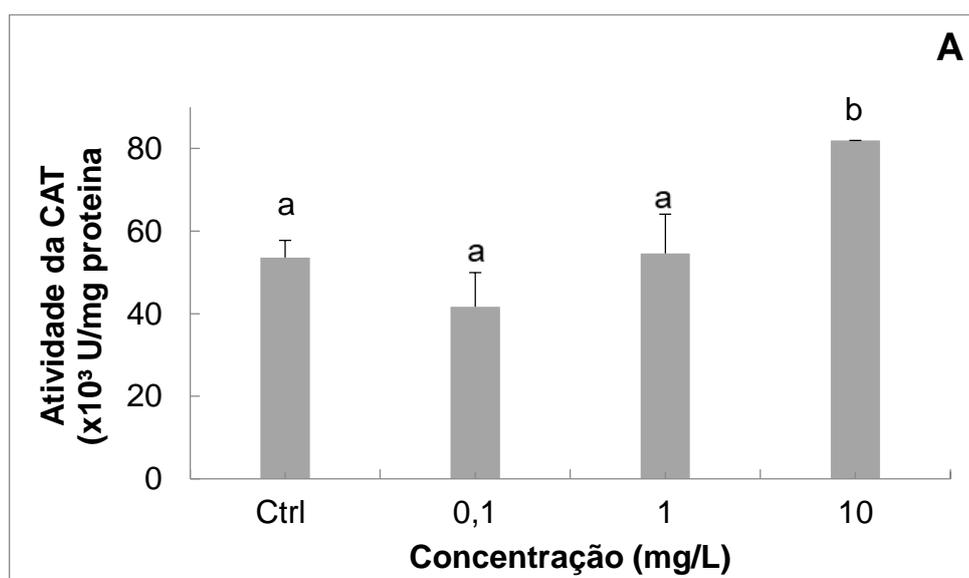
#### 4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA PELA EXPOSIÇÃO AO NB ZnO

Para a avaliação da atividade enzimática, as microalgas expostas ao NB ZnO no tempo de 72h foram preparadas para a avaliação do efeito da atividade da CAT. Os resultados dos ensaios de atividade enzimática, bem como a análise estatística dos resultados, são apresentados nas Figura 6 e Tabela 7. A atividade da CAT mostrou um comportamento diferente para as microalgas testadas (Tabela 7).

Para a *D. subspicatus* a concentração de 10 mg/L, foi a única que apresentou um comportamento diferente das demais concentrações, o que ficou comprovado com o teste de variancia ANOVA Oneway. Este teste demonstrou que a concentração de 10mg/L foi a única que apresentou um valor significativamente ( $p < 0,05$ ) diferente das demais tratamentos, indicando que na concentração de 10 mg/L de NB ZnO, uma maior atividade da enzima da CAT foi verificada.

Para a microalga *T.chuii* não se verificou alteração da atividade enzimática de CAT em todas as concentrações testadas de NB ZnO no tempo de 72 horas. Os resultados deste ensaio indicam que o NB ZnO induz à efeitos distintos de estresse oxidativo para as microalgas de ecossistemas dulcícolas e marinhos.

FIGURA 6: Avaliação da atividade enzimática da CAT para as algas *D. subspicatus* (a) e *T.chuii* (b) expostas a diferentes concentrações de NB ZnO, comparadas ao controle negativo no tempo de exposição de 72 horas. Letras diferentes indicam valores significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).



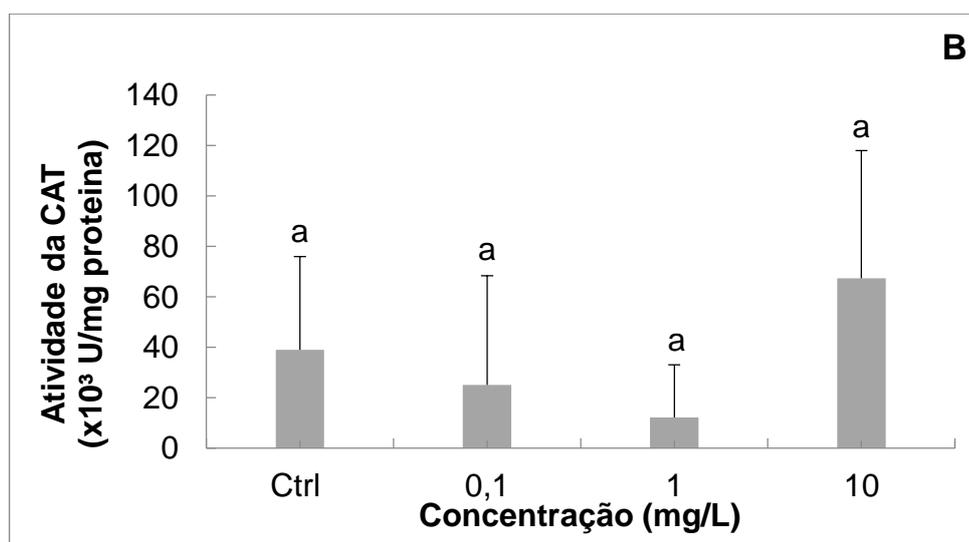


TABELA 7: Análise de variância (anova) oneway para o efeito dos fatores concentração sobre a atividade enzimática da *D. subspicatus* e *T. chuii*. valores significativos ( $p < 0,05$ ) são identificados em negrito. onde g.l = graus de liberdade, q.m = média da soma dos quadrados,  $f$  = valor calculado da variância da anova  $p$  = valor de significância.

Microalga	Fatores	G.L	Q.M	F	P
<i>D. subspicatus</i>	Atividade catalítica	3	870,3	19,88	<b>0,0005</b>
	Resíduo	8	43,8		
<i>T. chuii</i>	Atividade catalítica	3	0,8686	1,051	0,422
	Resíduo	8	0,8263		

Fonte: Autor

Os resultados encontrados para a atividade da CAT corroboraram com os testes de toxicidade crônicos realizados em ambas as microalgas testadas, visto que a enzima testada CAT, é uma enzima que catalisa moléculas de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) produzidas no meio, e o aumento da atividade da CAT de uma microalga indicará que esse microrganismo está exposto a algum tipo de estresse oxidativo. Dessa forma, a *D. subspicatus* apresentou valores de atividade da CAT significativamente diferentes dos demais dos tratamentos, na concentração de 10 mg/L, de NB ZnO (Fig. 6A), resultado similar foi observado por Melegari.*et al.*, (2013) onde verificou-se uma redução na atividade de CAT sob estresse de Cu, o que sugere uma deficiência do microrganismo em decompor os radicais  $H_2O_2$  em excesso. Já a *T. chuii*, não apresentou diferenças significativas na atividade da CAT de microalgas dos tratamentos com NB ZnO e controle negativo, sugerindo que os mecanismos de defesa antioxidante desta microalga de origem marinhas age diferente das microalgas de ambientes de água doce. Esses resultados evidenciam

que organismos de ecossistemas dulcícolas apresentam maior susceptibilidade à efeitos de estresse oxidativo pelo NB ZnO. Geralmente, a produção de espécies reativas, leva ao aumento da produção de antioxidantes (DONALDSON; STONE, 2003; PINTO *et al.*, 2003). Melegari.*et al.*, (2013) verificou que as enzimas antioxidantes investigadas, mostraram mudança em sua atividade quando induzidas pela exposição de NP CuO.

## 5. CONCLUSÕES

Este trabalho avaliou e comparou os efeitos toxicológicos do NB ZnO, através das caracterizações das suspensões, dos testes de toxicidade crônica com as microalgas verde *D. subspicatus* e *T. chuii* e avaliação da atividade enzimática de ambas as algas para a CAT. Com os resultados obtidos neste estudo foi possível concluir que:

- A caracterização do NB ZnO nos meios testados evidenciou uma baixa estabilidade do NM em suspensão e uma tendência a formação de aglomerados para ambos os meios testados.
- O método indireto desenvolvido para a leitura da densidade celular nos ensaios de toxicidade demonstrou-se uma técnica adequado, com elevada de correlação linear, além de apresentar-se eficiente e rápido para aplicação neste e em futuros estudos.
- Os ensaios de toxicidade crônica com a *D. subspicatus* exposta ao NB ZnO apresentaram para CEO de 10 mg/L e CENO de 1 mg/L num tempo de exposição de 48h e 72 horas.
- Os ensaios de toxicidade crônica com a *T. chuii* exposta ao NB ZnO apresentaram para CEO de 0,1 mg/L e CENO de <0,1 mg/L num tempo de exposição de 24h. Nos tempos de 48 e 72 horas esse efeito não foi significativo.
- A atividade da CAT apresentou um comportamento diferente para as algas testadas, e corroborou com os resultados de toxicidade crônica. A *D. subspicatus* teve a concentração de 10 mg/L, como sendo a única que apresentou um comportamento diferente das demais concentrações, indicando uma alteração na atividade enzimática da CAT. Já para a *T. chuii*, não verificou-se alteração da atividade enzimática de CAT.

## 6. RECOMENDAÇÕES

Com base nos ensaios realizados, nos resultados obtidos e nas dificuldades encontradas, a fim de complementar a pesquisa, recomenda-se:

- Realizar mais testes crônicos utilizando as algas verdes *D. subspicatus* e *T. chuii*, e outras cepas para tornar os dados mais robustos;
- Realizar uma caracterização mais completa do NB ZnO, monitorando inclusive a liberação de íons de Zn nos meios testados;
- Investigar a toxicidade do NB ZnO em organismos de diferentes níveis tróficos através de ensaios de bioacumulação;
- Investigar a toxicidade dos NB de ZnO em nível celular para compreender os mecanismos de ação dos NM;
- Realizar avaliação de atividade enzimática utilizando outras enzimas para identificar o mecanismo de estresse oxidativo induzido pelo NB ZnO.

## 7. REFERÊNCIAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16181:2013 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com microalgas marinhas**. Disponível em: <<https://www.target.com.br/produtos/normas-tecnicas/39365/nbr12648-ecotoxicologia-aquatica-toxicidade-cronica-metodo-de-ensaio-com-algas-chlorophyceae>>. Acesso em: 9 mar. 2017.

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648:2011 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica: Método de ensaio com algas**. Disponível em: <<https://www.target.com.br/produtos/normas-tecnicas/39365/nbr12648-ecotoxicologia-aquatica-toxicidade-cronica-metodo-de-ensaio-com-algas-chlorophyceae>>. Acesso em: 9 mar. 2017.

ADAM, N; SCHMITT, C; GALCERAN, J; COMPANYS, E; VAKUROV, A; WALLACE, R; KNAPEN, D; BLUST, R. The chronic toxicity of ZnO nanoparticles and ZnCl<sub>2</sub> to *Daphnia magna* and the use of different methods to assess nanoparticle aggregation and dissolution. *Nanotoxicology* 8, 709–717. <http://dx.doi.org/10.3109/17435390.2013.822594>. 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR 10004: Classificação de Resíduos. Rio de Janeiro: 2004a. p. 71.

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

AMENTA, V.; ASCHBERGER, K., ARENA, M.; BOUWMEESTER, H.; MONIZ, F. B.; BRANDHOFF, P. *et al.* Regulatory aspects of nanotechnology in the agri/feed/food sector in EU and non-EU countries. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 73, 463e476. 2015.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. A. Métodos de Ensaio de Toxicidade com Organismos Aquáticos, p. 117-152. *In*: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. [Eds]. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. São Carlos: Editora Rima, 2006.

AZEVEDO, FA D; CHASIN, AA da M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. **São Carlos, SP: RiMa**, v. 2004, 2003.

BAALOUSHA, M., NUR, Y., RÖMER, I., TEJAMAYA, M., LEAD, J.R., 2013. Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles. **Science of the Total Environment**. 454–455, 119–131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.093>.

BALTA, S.; SOTTO, A., LUIS, P.; BENEÀ, L.; VAN DER BRUGGEN, B.; & KIM, J. . A new outlook on membrane enhancement with nanoparticles: The alternative of ZnO. **Journal of Membrane Science**, v. 389, p. 155–161, 2012.

BIRD, E.C.F., A Global Review. John Wiley and Sons, **Coastline Changes** Chichester, 219 pp. 1985.

BONDARENKO, O.; JUGANSON K.; IVASK A.; KASEMETS K.; MORTIMER M.; . KAHRU A. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. **Archives of toxicology**, v. 87, n. 7, p. 1181–200, jul. 2013.

BOCK, C., T. PRÖSCHOLD & L. KRIENITZ. Updating the genus *Dictyosphaerium* and description of *Mucidosphaerium* gen. nov. (Trebouxiophyceae) based on morphological and molecular data. **Journal of Phycology** 47(3):638-652. 2011.

BRADFORD, Marion M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, n. 1-2, p. 248-254, 1976.

BREUSEGEM, F. V.; VRANOVÁ, E.; DAT, J.F.; INZÉ, D. The role of active oxygen species in plant signal transduction. **Plant Science**, v. 161, p. 405-414, 2001.

BUFFET, P. E.; TANKOUA, O. F.; BERHANU, D., HERRENKNECHT, C.; POIRIER, L.; AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, JC.; BÉARD, JB.; 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.

CARVALHO, P.; SAMPAIO, P.; AZEVEDO, S.; VAZ, C.; ESPINÓS, J. P.; TEIXEIRA, V., & CARNEIRO, J. O. Influence of thickness and coatings morphology in the antimicrobial performance of zinc oxide coatings. **Applied Surface Science**, v. 307, p. 548–557, 2014

CATTANEO, A. G.; GORNATI, R.; CHIRIVA-INTERNATI, M.; BERNARDINI, G. **Ecotoxicology of nanomaterials: the role of invertebrate testing**. ISJ, n. 6, p. 78-97, ISSN 1824-307X, 2009.

CETESB. Campanha Ambiental do Estado de São Paulo. **Métodos de Avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos**. Orientações para a

manutenção, cultivo e realização de testes de toxicidade com organismos aquáticos. Volume 1. São Paulo, 2005.

CHAMPMAM R.L.; BUCHHEIM M.A, DELWICH C.F.; FRIEDL T.; HUSS VAR.; KAROL K.G.; LEWIS L.A.; MANHART J.; MCCOURT R.M.; OLSEN J.L.; WATERS D.A., Molecular systematics of the green algae. In Soltis DE Soltis PS, Doyle JJ (eds) Molecular systematics of plants II DNA sequencing Kluwer, Dordrecht, pp 508-540. 1998.

CHUNG, Y. T.; BA-ABBAD, M. M.; MOHAMMAD, A. W.; BENAMOR, A. Functionalization of zinc oxide (ZnO) nanoparticles and its effects on polysulfone-ZnO membranes. **Desalination and Water Treatment**, p. 1–11, 2015. Taylor & Francis.

CONFAP. Site do Conselho Nacional das Fundações de Amparo a Pesquisa. <http://confap.org.br>. Acesso em maio de 2017.

COSTA, C. R., OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G., **Toxicity in aquatic environments**: discussion and evaluation methods. *Quim. Nova*, 31, 1820–1830. 2008.

DONALDSON, K., STONE, V. Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann. Ist. Super. Sanità* 39, 405–410. 2003.

DANOVARO R; BONGIORNI L; CORINALDESI C; GIOVANNELLI D; DAMIANI E, ASTOLFI P; GRECI L; PUSCEDDU. A Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections. **Environ Health Perspect** 116:441–447. 2008.

DAVARPANAHA.; GUILHERMINO, L., **Single and combined effects of microplastics and copper on the population growth of the marine microalgae *Tetraselmis chuii***, *Estuarine, Coastal and Shelf Science* (2015), doi: 10.1016/j.ecss.2015.07.023.

DIMKPA, C. O.; LATTA, D. E.; MCLEAN, J. E.; BRITT, D. W.; BOYANOV, M. I., & ANDERSON, A. J. Fate of CuO and ZnO nano- and microparticles in the plant environment. **Environmental science & technology**, v. 47 n.9, p 4734-4742. 2013.

FUNDACENTRO - Fundação Jorge Duprat Figueiredo de Segurança e Medicina do Trabalho. 2018. Disponível em <[www.fundacentro.gov.br](http://www.fundacentro.gov.br)> acessado em novembro 2018.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v. 43, n. 1, p. 61-68, Mar. 1997.

FRANKLIN, N. M.; ROGERS, N. J.; APTE, S. C.; BATLEY, G. E.; GADD, G. E., & CASEY, P. S. Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 24, p. 8484–8490, dez. 2007.

FRIEDL T. The evolution of the green algae. In Bhattacharya D (ed) Origin of algae and their plastids. **Springer, Vienna**, pp 87-101. 1997.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **Journal of Experimental Biology**. 201: 1203-1209. 1998.

FUGAZZA , J. **Estudo da toxicidade aguda e crônica de nanopartículas de óxido de cromo iii sobre o microcrustáceo marinho mysidopsis juniae (Silva, 1979).**

Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Saúde e Meio Ambiente – Univille. Joinville, 2015

GODINHO, L.R; COMAS, A; BICUDO, C.E.M. **Criptógamos do Parque Estadual das Fontes do Ipiranga, São Paulo, SP. Algas**, 30: Chlorophyceae (família Scenedesmaceae). Hoehnea 37: 513-553. 2010.

GADJEV, I; VANDERAUWERA, S; GECHEV, T.S; LALOI, C; MINKOV, I.N; SHULAEV, V; APEL, K; INZE, D; MITTLER, R; BREUSEGEM, F.V. Transcriptomic Footprints Disclose Specificity of Reactive Oxygen Species Signaling in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 141, p. 436–445, 2006.

GONÇALVES, R. A; ROSSETO, A. L. O. F; NOGUEIRA, D. J; VICENTINI, D. S; MATIAS, W.G. Comparative assessment of toxicity of ZnO and amine-functionalized ZnO nanorods toward *Daphnia magna* in acute and chronic multigenerational tests. **Aquatic Toxicology**, v. 197, p. 32–40, 2018.

GUARIENTI, C. **Potencial antioxidante da microalga spirulina frente a condições de estresse oxidativo.** Dissertação de mestrado em em engenharia e ciência de alimentos- Universidade Federal do Rio Grande, 2009.

GUILLARD, R. R. L. Counting slides. In Sournia, A. (ed.), **Phytoplankton Manual**. UNESCO, Paris, pp. 182–190. 1978

GRIFFITT, R. J; LUO, J; GAO, J; BONZONGO, J.-C; BARBER, D. S. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**. n. 9, v.27, p.1972-1978, 2008.

HALLIWELL, B.; Free radicals, proteins and DNA: oxidative damage versus redox regulation. **Biochem. Soc. Transactions**. 24, 1023-1027. 1996.

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

HOEK, V. D; MANN, D. G; JAHNS, H. M. **Algae: an introduction to phycology**. Cambridge University Press, Cambridge, UK, 623pp, 1995.

HONG, J; HE, Y. Effects of nano sized zinc oxide on the performance of PVDF microfiltration membranes. **Desalination**, v. 302, p. 71–79, 2012.

INZÉ, D.; MONTAGU, M.V. Oxidative stress in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 6, p. 153-158, 1995.

ISAZA, F. J; CASTAÑO, J. G; ECHEVERRÍA, F. E. **Field study of experimental antifouling paint formulations**. Dyna. n. 170, p. 135-143, 2011.

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. n. 25, p. 77-89, 2008.

JO, H. J; CHOI, J. W; LEE, S. H; HONG, S. W. Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticles suspensions against *Daphnia magna*: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. **Journal of hazardous materials**. p. 301-308, 2012.

JONES, C. F; GRAINGER, D. W. In vitro assessments of nanomaterial toxicity. **Advanced drug delivery reviews**, v. 61, n. 6, p. 438–56, 2009.

KASHIWADA S. Distribution of nanoparticles in the seethrough medaka (*Oryzias latipes*). **Environ Health Perspect** 114:1697–1702.2006

KAY, L; SHAPIRA, F. Developing nanotechnology in Latin America. **Journal of Nanoparticles Research**, 11, 259–278. 2009.

KORHONEN, J.J.; KÖNGAS, P.; SOININEN, J. Temporal variation of diatom assemblages in oligotrophic and eutrophic streams. **European Journal of Phycology**, v. 48, n. 2, p. 141-151, 2013.

KLEINE, S. J; ALVAREZ, P. J. J; BATLEY, G. E; FERNANDES, T. F; HANDY, R. D; LYON, D. Y; MAHENDRA, S; McLAUGHLIN, M. J; LEAD, J. R. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and effects. **Environmental toxicologyandchemistry**. n. 9, v. 27, p. 1825-1851. 2008.

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

KRIENITZ, L; BOCK, C; LUO, W; PRÖSCHOLD, T. Polyphyletic origin of the Dictyosphaerium morphotype within Chlorellaceae (Trebouxiophyceae). **Journal. Phycol.** 46: 559- 563. . 2010.

LI, M; LIN, D; ZHU, L. Effects of water chemistry on the dissolution of ZnO nanoparticles and their toxicity to Escherichia coli. **Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)**, v. 173, p. 97–102, fev. 2013.

LAING, I; AYALA, F. **Commercial mass culture techniques for producing microalgae**. In: Akatsuka, I. (ed.). Introduction to applied Phycology. SPB, The Hague, The Hague, Netherlands, p.447-477. 1990.

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

LIANG, S; XIAO, K; MO, Y; HUANG, X. A novel ZnO nanoparticle blended polyvinylidene fluoride membrane for anti-irreversible fouling. **Journal of Membrane Science**, v. 394-395, p. 184–192, 2012.

LISBOA-FILHO, P.N; MONTEIRO, M.A. Análises da nanociência e nanotecnologia na Perspectiva de ciência, tecnologia e sociedade – CTS, **Revista de Física**, n. 46E, 2013.

LOVERN, S. B; STRICKLER, J. R. KLAPER, R. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx). **Environmental Science and Technology**. n. 15, v. 12, p. 4465-70, 2007.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Australis**, v. 12, n. 3, p. 355-381, 2009.

MALVERN. Zeta size nano series: User manual. **Malvern Instruments** Ltd. 2004.

MELEGARI, S. P; FRANÇOIS, P; COSTA, R. H. R; POPOVIC, R. MATIAS, W. G. Evaluation of toxicity and oxidative stress induce by copper oxide nanoparticles in the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**. p. 431-440, 2013.

MELEGARI, S. P; PERREAULT, F; MOUKHA, S; POPOVIC, R; CREPPY, E. E; MATIAS, W. G. Induction to oxidative stress by saxitoxin investigated through lipid peroxidation in Neuro 2A cells and *Chlamydomonas reinhardtii* alga. **Chemosphere**, v. 89, n. 1, p. 38-43, 2012.

MIDANDER, K; CRONHOLM, P; KARLSSON, H. L; ELIHN, K; MÖLLER, L., LEYGRAF, C; WALLINDER, I. O. Surface Characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-Sized copper and copper (II) oxide particles: **A Cross-Disciplinary Study**. *Small*. n. 3, v. 5, p. 389–399, 2009.

MITTLER, R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. Trends in **Plant in Science**, v. 9, p. 405-410, 2002.

MOURA, J. F. D; CARDOZO, M; BELO, M. S. D. S. P; HACON, S; SICILIANO, S. A interface da saúde pública com a saúde dos oceanos: produção de doenças, impactos socioeconômicos e relações benéficas. **Ciência & Saúde Coletiva**. v.16, p.3469-3480, 2011.

NALEWAJKO, C; OLAVESON, M.M. Ecophysiological considerations in microalgal toxicity tests. In: Wells, P.G., Lee, K., Blaise, Ch. (Eds.), *Microscale Testing in Aquatic Toxicology*. **CRC Press LLC, Boca Raton, FL**, pp. 289–309. 1998.

NETO, A.D.A; PRISCO, J.T; FILHO, J.E; MEDEIROS, J.V.R; FILHO, E.G. Hydrogen peroxide pre-treatment induces salt-stress acclimation in maize plants. **Journal of Plant Physiology**, v. 162, p. 1114-1122, 2005.

NANOREG - Uma abordagem europeia comum para os testes regulamentares dos nanomateriais manufacturados. Disponível em: <http://www.nanoreg.eu/>. Acesso em: 17 novembro 2018

NG, L. Y; MOHAMMAD, A. W; LEO, C. P; HILAL, N. Polymeric membranes incorporated with metal/metal oxide nanoparticles: **A comprehensive review**. *Desalination*, v. 308, p. 15–33, 2013.

NGÔ C; VAN DE VOORDE M.H. Nanotechnology in a Nutshell: From Simple to Complex Systems. Paris: **Atlantis Press**; 2014.

NNI – National Nanotechnology Initiative. **What is nanotechnology?** United States National Nanotechnology Initiative, 2013. Disponível em: <<http://.nano.gov/nanotechnology-facts>> Acesso em 18.11.18

OECD. **Test no. 201: freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test.**

[s.l.] OECD, 2011.

PADMAVATHY N; VIJAYARAGHAVAN R. Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles an antimicrobial study. **Science and Technology of Advanced Materials** 2008;9, 035004/1-7.

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

PAVLIC', Z'; VIDA KOVIC'-CIFREK, Z'; PUNTARIC', D. Toxicity of surfactants to green microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Scenedesmus subspicatus* and to marine diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum*. **Chemosphere** 61, 1061–1068. 2005.

PERREAULT, F; MELEGARI, S. P; COSTA, C. H; ROSSETTO; A. L. O. F; POPOVIC, R; MATIAS, W. G. Genotoxic effects of copper oxide nanoparticles in Neuro 2A cell cultures. **Science of the Total Environment.** n. 441, p. 117–124, 2012.

PERREAULT, F; POPOVIC, R; DEWEZ, D. Different toxicity mechanisms between bare and polymer-coated copper oxide nanoparticles in *Lemna gibba*. **Environmental Pollution**. v.185, p. 219-227, 2014.

POTAPOVA, M.G; CHARLES, D.F. Diatom metrics for monitoring eutrophizations in Rivers of the United States. **Ecological Indicators**, v. 7, p. 48-70, 2007.

PETOSA, A. R; JAISI, D. P; QUEVEDO, I. R; ELIMELECH, M; TUFENKJI, N. Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: Role of physicochemical Interactions. **Environmental Science and Technology**. n. 44, p. 6532–6549, 2010.

PINTO, E; SIGAUD-KUTNER, T.C.S; LEITAO, M.A.S; OKAMOTO, O.K; MORSE, D; COLEPICOLO, P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal of Phycology**. 39,1008–1018. 2003.

REIFFERSCHIED G, GRUMMT T, Genotoxicity in German surface waters—results of a collaborative study, **Water Air Soil Pollut**. 123 67–79.2002.

RAMADE, F. **Écotoxixologie**. Masson, Paris, France, 1977.

RESEARCH AND MARKETS. **The global market for metal oxide nanoparticles to 2020**. Disponível em:

<[http://www.researchandmarkets.com/reports/2488811/the\\_global\\_market\\_for\\_metal\\_oxiox\\_nanoparticles](http://www.researchandmarkets.com/reports/2488811/the_global_market_for_metal_oxiox_nanoparticles)> Acesso em: 15.Abril.18

ROSSETTO, A. L. O. F. **Estudo comparativo entre os efeitos tóxicos agudos e crônicos do óxido de cobre na forma de nanopartícula e micropartícula.**

Dissertação de mestrado. Florianópolis, SC, 2012.

ROUND, F.E; CRAWFORD, R.M; MANN, D.G. **The diatoms- biology e morphology of the genera.** Cambridge: Cambridge University Press, p.1- 747, 1990.

SAISON, C; PERREAU, F; DAIGLE, J. C; FORTIN, C; POPOVIC, R. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 96, p. 109–114, 2010.

SCHWAN-ESTRADA, K. R. F; STANGARLIN, J. R; PASCHOLATI, S. F. Mecanismos bioquímicos de defesa vegetal. In: PASCHOLATI, S.F.; LEITE, B.; STANGARLIN, J.R.; CIA, P. (Ed.). **Interação Planta Patógeno – fisiologia, Bioquímica e Biologia Molecular.** Piracicaba: FEALQ, p.227-248.2008.

SCANDALIOS, J.G. Oxygen stress and superoxide dismutase. **Plant Physiology**, v. 101, p. 7-12, 1993.

SEATON, A. **Nanoparticles, human health hazard and regulation.** J. R. Soc. Interface, 2009.

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

SERVICE, R. F. **Nanotechnology Grows Up. Science.** n. 5678, v. 304, p. 1732-1734, 2004.

SESHADRI, R. Oxide nanoparticles. In: Rao CNR, Müller A, Cheetham AK (eds) *The chemistry of nanoparticles: synthesis, properties and applications.* Wiley, Weinheim, pp 94–112. 2004.

SISNANO. Site do programa "Desenvolvimento da Nanociência e Nanotecnologia", <http://www.mct.gov.br/index.php/content/view/27136.html>, acesso em maio de 2017

SOUSA, E. C. P. MIn: I. A. Nascimento, E. C. P. M. Sousa, *et al* (Ed.). Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil. São Paulo: Artes Gráficas e Indústria Ltda., **Métodos em ecotoxicologia marinha: aplicações no Brasil.** aplicações no Brasil, p.262 .2002.

SOUZA, J. S; ALVES, W. A; BAVYKIN, D. Crescimento de nanobastões de ZnO sobre vidro através do método hidrotérmico In: **VIII Congresso de Microscopia do Materiais**, São Paulo. 2014.

SOUZA K, G. D; MARTINS, L. R. S; CAVALCANTI, V. M; PEREIRA, C. V; BORGES, L. Recursos minerais marinhos: fatos 224 portadores de futuro, prioridades de estudo no Brasil e projetos estruturantes. **Parcerias estratégicas.** Issue 24, V. 12, p 247-261.2007.

STEVENSON, R. J; BOTHWELL, M. L; LOWE, R. L; THORP, J. H. **Algal ecology: Freshwater benthic ecosystem**. San Diego, Academic Press, 1996.

STUDER, A. M; LIMBACH, L. K; VAN DUC, L; KRUMEICH, F; ATHANASSIOU, E. K; GERBER, L. C; MOCH, H; STARK, W. J. Nanoparticle cytotoxicity depends on intracellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles. **Toxicology Letters**. n. 3, v.197, p.169-174, 2010.

THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES. Analysis.

TOMASELLI, L. **The microalgal cell**. In: Richmond, A. (ed.). **Handbook of microalgal culture: Biotechnology and applied Phycology**. Blackwell Publishing, Oxford, USA, p. 3-19, 2004.

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

VAN DEN HOEK, C; MANN, D.G. AND JAHNS, H.M. **Algae: An Introduction to Phycology**. Cambridge, UK: Cambridge University Press.1995.

VANCE, M.E; KUIKEN, T; VEJERANO, E.P; MCGINNIS, S.P; HOHELLA JR; M.F., REJESKI, D; HULL, M.S. Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein Journal of Nanotechnology**. 6, 1769 e 1780. 2015.

VICENTINI, D.S; PUERARI, R.C; OLIVEIRA, K.G; ARL, M; MELEGARI, S.P; MATIAS, W.G., 2017. Toxicological impact of morphology and surface functionalization of amorphous SiO<sub>2</sub> nanomaterials. *NanoImpact* 5, 6–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.impact.2016.11.003>.

VIDOTTI, E. C; ROLLEMBERG, M. C. E; Algas: da economia nos ambientes aquáticos a bioremediação e a química analítica **Química Nova** 2004, 27, 139.2004.

XIA, T; KOVOCHICH, M; BRANT, J; HOTZE, M; SEMPFF, J; OBERLEY, T; SIOUTAS, C.; YEH, J. I.; WIESNER, M. R.; NEL, A. E. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. **Nano Letters**. n. 6. v. 8. p. 1794-807, 2006.

WALLIN, H; KYJOVSKA, Z.O; POULSEN, S.S; JACOBSEN, N.R; SABER, A.T; BENGTSON, S; JACKSON, P; VOGEL, U. Surface modification does not influence the genotoxic and inflammatory effects of TiO<sub>2</sub> nanoparticles after pulmonary exposure by instillation in mice. **Mutagenesis** 32, 47–57. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gew046>. 2017.

WALSH, G.E. Principles of toxicity testing with marine unicellular algae. **Environmental Toxicology and Chemistry**. 7, 979–987. 1988.

WANG. X; LU. J; XU. M; XING. B. Sorption of pyrene by regular and anoscaled metal oxide particles: influence of adsorbed organic matter. **Environmental Science and Technology** 42:7267–7272.2008.

WONG, S. W. Y., LEUNG, P. T. Y., DJURIŠIĆ, A. B., & LEUNG, K. M. Y. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 396(2), 609–618 .2009.

YANG, Y; LIU, T. Fabrication and characterization of graphene oxide/zinc oxidenanorods hybrid. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 21, p. 8950–8954, 2011.