

UNIVERSIDADE DA REGIÃO DE JOINVILLE – UNIVILLE
MESTRADO EM SAÚDE E MEIO AMBIENTE

ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DE NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE CROMO III SOBRE O MICROCRUSTÁCEO MARINHO *Mysidopsis*
juniae (SILVA, 1979)

JONAS FUGAZZA

ORIENTADORA:

Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. William Gerson Matias

Joinville (SC)

2015

JONAS FUGAZZA

ESTUDO DA TOXICIDADE AGUDA E CRÔNICA DE NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE CROMO III SOBRE O MICROCRUSTÁCEO MARINHO *Mysidopsis*
juniae (SILVA, 1979)

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Saúde e Meio Ambiente
da Universidade da Região de Joinville –
UNIVILLE como requisito para obtenção do
título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Therezinha Maria
Novais de Oliveira.

Co-orientador: Prof. Dr. William Gerson
Matias.

Joinville (SC)

2015

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

F957e Fugazza, Jonas
Estudo da toxicidade aguda e crônica de nanopartículas de óxido de cromo III sobre o microcrustáceo marinho *Mysidopsis juniae* (SILVA, 1979) / Jonas Fugazza ; orientadora Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira, coorientador Dr. William Gerson Matias – Joinville: UNIVILLE, 2015.

90 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente –
Universidade da Região de Joinville)

1. Toxicologia – Aspectos ambientais. 2. Nanotecnologia. 3. Poluição aquática. I. Oliveira, Therezinha Maria Novais (orient.). II. Matias, William Gerson (coorient.). III. Título.

CDD 763.7384

Termo de Aprovação

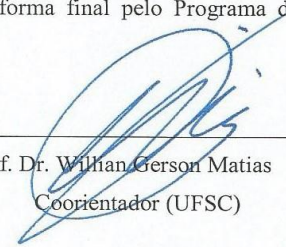
**“Estudo da Toxicidade Aguda e Crônica de Nanopartículas de Óxido de Cromo III
Sobre o Microcrustáceo Marinho *Mysidopsis juniae* (SILVA, 1979)”**

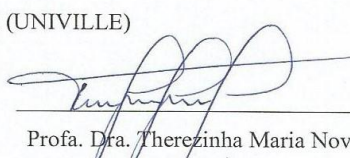
por

Jonas Fugazza

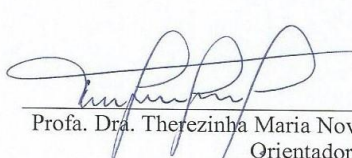
Dissertação julgada para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Meio Ambiente, área de concentração Saúde e Meio Ambiente e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente.

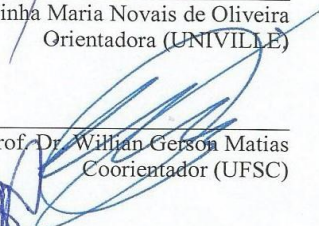

Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
Orientadora (UNIVILLE)

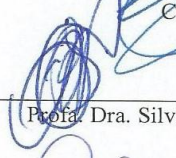

Prof. Dr. Willian Gerson Matias
Coorientador (UFSC)


Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

Banca Examinadora:


Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
Orientadora (UNIVILLE)


Prof. Dr. Willian Gerson Matias
Coorientador (UFSC)


Profa. Dra. Silvia Pedroso Melegari
(UFSC)


Prof. Dr. Cleiton Vaz
(UNIVILLE)

Joinville, 20 de maio de 2015

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Prof. Dra. Therezinha Maria Novais Oliveira que não poupou esforços para que esse trabalho se concretizasse.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. William Gerson Matias, pelas importantes contribuições.

Ao Prof. Dr. Cleiton Vaz, pelos direcionamentos desta pesquisa.

Aos membros das bancas de qualificação e defesa, pelos apontamentos, correções e contribuições.

A UNIVILLE pela bolsa ENADE fornecida e por dispor a infraestrutura necessária à realização deste estudo.

A rede NANOTOX e ao CNPQ.

Agradeço aos companheiros do Laboratório de Toxicologia Ambiental da Univille São Francisco do Sul: Eduardo, Tamila, Cherol, Pâmela, Mauro, Ana Paula e Renata, que também dedicou tempo para me ajudar nas análises realizadas na UFSC.

A UFSC por disponibilizar seus laboratórios para realização de determinadas análises.

Aos meus professores, que construíram a base de todo meu conhecimento.

Aos meus amigos do Mestrado em Saúde e Meio Ambiente, pelos momentos compartilhados.

Aos meus pais e demais familiares, pelo apoio e compreensão nesses dois anos. Deixo aqui, um agradecimento também a minha sobrinha Isabelle que nos momentos de dificuldade sempre conseguia me alegrar.

E um agradecimento muito especial a minha namorada Alessandra, pois sem sua ajuda, compreensão e empenho não seria possível concluir esta importante etapa de minha vida, te amo muito!

E a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

A satisfação está no esforço e não apenas na realização final.

Mahatma Gandhi

RESUMO

A nanotecnologia, ciência que estuda a criação de dispositivos e materiais, utilizando o controle da matéria na escala de nanômetros é considerada atualmente área inovadora de crescimento científico e econômico; desperta grande interesse de diversos setores e seu uso, devido as suas características, principalmente o seu tamanho (0-100 nm) já é disseminado em muitas áreas, que incluem, a farmacêutica, de equipamentos eletrônicos, indústria de tintas e manufaturas entre outras. No entanto, os estudos toxicológicos disponíveis são insuficientes para identificar com precisão os efeitos a saúde e ao meio ambiente resultantes do uso dos nanocompostos. Dentre as nanopartículas, as de óxido de cromo III (NP Cr₂O₃) possuem uma grande variedade de aplicações. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade da NP Cr₂O₃ em água marinha reconstituída (AMR) por meio de ensaios toxicológicos agudos e crônico utilizando o microcrustáceo marinho *Mysidopsis juniae*. Para tanto, foi realizada a caracterização das NP Cr₂O₃, por diferentes técnicas físico-químicas, em diferentes meios, avaliação toxicológica através de testes de toxicidade das NP Cr₂O₃, de exposição aguda com definição da CL_{50(96h)} e crônica e transgeracional avaliando: natalidade, mortalidade e biometria durante o período de 63 dias. Por fim, foi realizada análise da concentração dos íons de Cr (III) e (VI) e cromo total para as concentrações do teste agudo (25, 50, 75, 100 e 125 mg.L⁻¹) e crônico (5 mg.L⁻¹). Os resultados da caracterização da NP Cr₂O₃ por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Microscopia de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG) e Difractometria de raios-X mostraram que, o diâmetro da partícula encontra-se em escala nanométrica (21,8 nm), mostrando ainda, que há formação em suspensão de grandes aglomerados de NP, especialmente em meio salino, o que foi confirmado pela análise do diâmetro hidrodinâmico. Em relação a avaliação toxicológica aguda, observou-se que abaixo da concentração de 5 mg.L⁻¹ não ocorreu mortalidade e a partir da concentração de 25 mg.L⁻¹, sempre ocorreu mortalidade, sendo a concentração de 125 mg.L⁻¹ responsável pela mortalidade total dos organismos em 96 h de exposição. A CL_{50(96h)} encontrada para o organismo teste exposto as NP Cr₂O₃ foi de 58,86 mg.L⁻¹. O teste crônico e transgeracional mostrou que apenas o parâmetro mortalidade da 2ª geração exposta a concentração de 5 mg.L⁻¹ de NP Cr₂O₃ foi afetado pela substância estudada (p<0,05). Por fim, foi possível verificar nas análises dos íons cromo tanto para as concentrações do teste agudo quanto para a do teste crônico, a presença de Cr (VI), sendo que já na concentração 5 mg.L⁻¹ de NP Cr₂O₃ a concentração de Cr (VI) foi de 0,25 mg.L⁻¹, resultado este acima do limite padrão para lançamento de efluentes definido pela resolução CONAMA 430/2011, aumentando exponencialmente para as demais concentrações avaliadas. Assim, este estudo mostra que as NP Cr₂O₃ quando dispersas em meio salino e quando encontradas em diâmetro muito reduzido tendem a ter baixa estabilidade podendo contribuir para a aglomeração das NP, sendo uma possível causa de diminuição da toxicidade uma vez que dificultaria a absorção pelo organismo, no entanto, esta mesma instabilidade também contribui para a liberação de íons e neste estudo, verificou-se a presença de Cr (VI), que pode ser, neste caso, o maior responsável pela toxicidade encontrada.

Palavras-chave: Nanopartículas; Óxido de cromo; Toxicidade aguda; Toxicidade crônica; *Mysidopsis juniae*

ABSTRACT

Nanotechnology, the science of creating devices and materials, from the control of matter on the nanometer scale is currently considered an innovative area of scientific and economic growth; arouses great interest from various sectors and its use, due to its characteristics, especially its size (0-100 nm) is already widespread in many areas, including the pharmaceutical, electronics, paint industry and manufacturing, among others. However, toxicological studies are insufficient to accurately identify the effects to health and to the environment resulting from the use of nanocomposites. Among the extensive use of nanoparticles, the Chromium (III) Oxide nanoparticle (Cr_2O_3 NP) have a wide variety of applications. Therefore, the aim of this study was to evaluate the toxicity of Cr_2O_3 NP in reconstituted seawater (RSW) through acute and chronic toxicological tests using microcrustacean marine *Mysidopsis juniae*. Therefore, the characterization of Cr_2O_3 NP was carried out by different physicochemical techniques, in different means, through toxicological testing toxicity of Cr_2O_3 NP, acute exposure to defining the $\text{LC}_{50(96h)}$ and chronic and transgenerational test evaluating: birth, mortality and biometrics during the period of 63 days. Finally, it was conducted the analyzing of the concentration of Cr (III), Cr (VI) ions and total chromium to the concentrations of acute test (25, 50, 75, 100 and 125 mg L^{-1}) and chronic (5 mg L^{-1}). The results of the characterization of Cr_2O_3 NP by Transmission Electron Microscopy (TEM), Scanning with Field Emission (SEM-FEG) and X-ray Diffraction showed that the particle diameter is in nanometer scale (21,8 nm), showing further that there is formation of large agglomerates of suspension NP, especially in saline, which was confirmed by analysis of the hydrodynamic diameter. For acute toxicological evaluation, it was observed that concentration below 5 mg L^{-1} have no mortality and from the concentrations of 25 mg L^{-1} , always occurred mortality, being the concentration of 125 mg L^{-1} the responsible for overall mortality of organisms in 96 h of exposure. The $\text{LC}_{50(96h)}$ found for the test organism exposed to Cr_2O_3 NP was 58.86 mg L^{-1} . Chronic and transgenerational test showed that only the parameter mortality of 2nd generation exposed to concentration of 5 mg L^{-1} of Cr_2O_3 NP was affected by the studied substance ($p < 0.05$). Finally, it was possible verify on analysis of chromium ions for both concentrations of acute test as to the chronic test, the presence of Cr (VI), and already in the concentration of 5 mg L^{-1} of Cr_2O_3 NP the concentration of Cr (VI) was 0.25 mg L^{-1} , a result above the standard limit for discharge of effluents defined by Resolution CONAMA 430/2011, exponentially increasing for the other evaluated concentrations. Thus, this study shows that Cr_2O_3 NP when dispersed in saline and when found in very small diameters tend to have low stability and can contribute to the agglomeration of NP, being a possible cause of decrease toxicity which would hinder the absorption by the organism, however, this same instability also contributes to the release of ions and in this study, it was found the presence of Cr (VI), which can be, in this case, the most responsible for the toxicity found.

Keywords: *Nanoparticles; Chromium oxide; Acute toxicity; Chronic toxicity; Mysidopsis juniae*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação de algumas escalas de medidas.....	18
Figura 2: Imagens obtidas por MET de NP Cr ₂ O ₃ dispersas em água ultrapura.....	21
Figura 3: Exemplares de <i>Mysidopsis juniae</i>	29
Figura 4: Formato do télson de <i>Mysidopsis juniae</i>	31
Figura 5: Planejamento experimental do estudo.....	33
Figura 6: Síntese das NP Cr ₂ O ₃ realizada no LABTOX/UFSC.....	36
Figura 7: Medição do comprimento padrão dos organismos.....	41
Figura 8: Representação esquemática da realização do teste crônico e transgeracional.....	42
Figura 9: Imagens em MET de NP Cr ₂ O ₃ em água ultrapura e água marinha reconstituída.....	44
Figura 10: Imagens em MEV-FEG de NP Cr ₂ O ₃ em água marinha reconstituída.....	45
Figura 11: Difrátograma das NP Cr ₂ O ₃	46
Figura 12: Teste de normalidade de Anderson-Darling a partir das CL _{50(96h)} calculadas nos testes com o controle positivo (K ₂ Cr ₂ O ₇).....	47
Figura 13: Teste de normalidade de Anderson-Darling a partir das CL _{50(96h)} calculadas nos testes com NP Cr ₂ O ₃	49
Figura 14: Valores de comprimento padrão (CP) dos organismos da geração inicial (G0) mensurados semanalmente até o 63º dia de teste.....	51
Figura 15: Valores de comprimento padrão (CP) dos organismos da geração G1 e G2, mensurados semanalmente até o 21º dia de crescimento de cada geração.....	51
Figura 16: Mortalidade cumulativa dos organismos de G0 expostos e não expostos às NP Cr ₂ O ₃ 5 mg.L ⁻¹	52
Figura 17: Mortalidade cumulativa dos organismos G1 e G2 expostos e não expostos às NP Cr ₂ O ₃ 5 mg.L ⁻¹	53

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1: Condições de cultivo para <i>Mysidopsis juniae</i>	34
Tabela 2: Resultados das CL _{50(96h)} dos testes agudos com o dicromato de potássio (K ₂ Cr ₂ O ₇).....	47
Tabela 3: Resultados das CL _{50(96h)} dos testes agudos com NP Cr ₂ O ₃	48
Tabela 4: Natalidade das três gerações avaliadas no teste crônico.....	54
Tabela 5: Resultados da quantificação dos íons Cr (III) e Cr (VI) e do cromo total.....	55

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Cultivo <i>M. juniae</i> no Laboratório de toxicologia ambiental – Univille – SFS/SC.....	69
APÊNDICE B: Cartas controle geradas a partir dos resultados de $CL_{50(96h)}$ válidos obtidos nos testes agudos realizados com a substância de referência (DSS).....	70
APÊNDICE C - Resultados dos parâmetros de pH e OD da AMR e solução estoque realizados ao início de cada teste e ao final no controle negativo e nas cinco concentrações trabalhadas nos ensaios com controle positivo (Dicromato de potássio).....	71
APÊNDICE D - Resultados dos parâmetros de pH e OD da AMR e solução estoque realizados ao início de cada teste e ao final no controle negativo e nas cinco concentrações trabalhadas nos ensaios agudos com NP Cr_2O_3	72
APÊNDICE E: Comprimento padrão dos organismos (G0) em milímetros (mm) mensurados semanalmente até o 63º dia de teste crônico.....	73
APÊNDICE F: Comprimento padrão dos organismos (G1 e G2) em milímetros (mm) mensurados semanalmente até o 21º dia de teste com cada geração.....	74
APÊNDICE G – Mortalidade cumulativa e semanal da geração inicial (G0), no teste crônico, para organismos expostos às NP Cr_2O_3 e não expostos (controle).....	75
APÊNDICE H – Mortalidade cumulativa e semanal das gerações (G1 e G2), no teste crônico, para organismos expostos às NP Cr_2O_3 e não expostos (controle).....	76
APÊNDICE I - Parâmetros de pH e OD mensurados semanalmente e temperatura e salinidade mensurados diariamente nas duas réplicas do controle negativo e nas réplicas da amostra no ensaio de toxicidade crônica e transgeracional.....	77

LISTA DE ANEXOS

ANEXO A: Relatórios de ensaios de quantificação dos íons Cr (III) e Cr (VI) e cromo total, realizados em laboratório terceirizado – Acquaplant / Joinville – SC.....	85
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

AMR – Água marinha reconstituída – Salinidade 32

CL₅₀ – Concentração letal mediana

CL_{50(96h)} – Concentração letal mediana após 96 horas de ensaio

DSS – Dodecil Sulfato de Sódio

NP – Nanopartícula(s)

NP Cr₂O₃ – Nanopartícula(s) de Óxido de Cromo III

EPI – Equipamento de proteção individual

MET – Microscopia de Transmissão Eletrônica

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

Pz – Potencial Zeta

pH – Potencial Hidrogênico

OD – Oxigênio Dissolvido

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

LABTOX – Laboratório de toxicologia ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental

UNIVILLE – Universidade da Região de Joinville

Cr (III) – Cromo trivalente

Cr (VI) – Cromo hexavalente

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVOS.....	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 NANOTECNOLOGIA E NANOMATERIAIS.....	17
3.1.1 Cromo e nanopartículas de óxido de cromo.....	18
3.1.2 Caracterização de nanomateriais e nanopartículas para estudos de toxicidade	20
3.1.3 Poluição aquática por nanomateriais e nanopartículas	22
3.1.4 Impactos dos nanomateriais e nanopartículas na saúde humana	23
3.1.5 Nanomateriais e legislação específica.....	24
3.2 TOXICOLOGIA AMBIENTAL	26
3.2.1 Nanotoxicologia.....	27
3.2.2 Testes de toxicidade aguda e crônica	27
3.2.2.1 Organismos utilizados para testes.....	28
3.2.2.2 <i>Mysidopsis juniae</i>	30
4. METODOLOGIA	32
4.1 ORIGEM DA REDE COOPERATIVA DE PESQUISAS EM NANOTOXICOLOGIA E IMPORTÂNCIA DO PRESENTE ESTUDO.....	32
4.2 ABORDAGEM METODOLÓGICA E EXPERIMENTAL.....	33
4.3 CULTIVO DE <i>Mysidopsis juniae</i>	34
4.4 SÍNTESE E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS	35
4.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE	36
4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CROMO III E MEIOS DE DISPERSÃO	37
4.7 TESTES DE TOXICIDADE.....	38
4.7.1 Controle positivo dos organismos	38
4.7.2 Avaliação da toxicidade aguda e definição da CL _{50(96h)} para NP Cr ₂ O ₃	39
4.7.3 Ensaio crônico e transgeracional	40
4.8 QUANTIFICAÇÃO DOS ÍONS CROMO.....	42
4.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	43

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NP, SOLUÇÕES ESTOQUE E MEIOS DE DISPERSÃO	44
5.2 TESTES DE TOXICIDADE	47
5.2.1 Controle positivo dos organismos	47
5.2.2 Avaliação da toxicidade aguda e definição da CL _{50(96h)} para NP Cr ₂ O ₃	48
5.2.3 Ensaio crônico e transgeracional com NP Cr ₂ O ₃	50
5.3. QUANTIFICAÇÃO DOS ÍONS CROMO	54
6. CONCLUSÕES	58
7. RECOMENDAÇÕES	59
8. REFERÊNCIAS	60
9. APÊNDICES	69
10. ANEXOS	85

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é área inovadora de crescimento científico e econômico e que pode apresentar riscos para a saúde ambiental e humana, existindo, portanto, a necessidade de se abordar questões de segurança de uso, antes de sua utilização generalizada (MOORE, 2006; SUPPAN, 2013). Apresenta, ainda, grande interesse de diversos setores e seu uso já é disseminado em áreas que incluem medicina de diagnóstico, farmacêutica, eletrônica, de implantes e próteses (PERKEL, 2003; ROYAL SOCIETY AND ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004).

O prefixo “nano” está relacionado a uma escala de medida em que um nanômetro representa um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro. Portanto, para ser classificado em escala nano, é necessário que o material apresente pelo menos uma dimensão na escala de nanômetros (LISBOA-FILHO & MONTEIRO, 2013; NNI, 2013).

Estruturas nessa escala apresentam propriedades funcionais únicas, grande versatilidade e permitem novas aplicações, que muitas vezes, não são possíveis trabalhando com materiais na escala macro (CHAU *et al.*, 2007; NNI, 2013; KRUG, 2014).

As nanopartículas de óxidos metálicos fazem parte dos principais tipos de nanopartículas sintetizadas pelo homem e incluem os óxidos de cobre, zinco, níquel, ferro, dióxido de titânio, entre outros. A NP de óxido de cromo III (Cr_2O_3 NP), especificamente, pode ser utilizado para pigmentação verde (BROCK *et al.*, 2000; GIBOT e VIDAL, 2010) para aumentar a resistência ao desgaste (KITSUNAI *et al.*, 1991; LIU *et al.*, 2009) e para proteção térmica (BERDAHL, 1995) entre outros usos dependendo do tamanho das nanopartículas (KAWABATA *et al.*, 1995; MEDEIROS, 2007).

Por apresentarem tamanho muito reduzido, podem fornecer superfícies aptas para adsorverem e transportar tóxicos em água marinha, principalmente, pelo fato da salinidade poder alterar as características da superfície de nanomateriais, como por exemplo, a capacidade de aglomeração, além de propriamente gerar toxicidade (MOORE, 2006). Sendo assim é importante realizar uma maior investigação para avaliar o comportamento e as propriedades de ligação de nanopartículas em água marinha.

A ecotoxicologia é geradora de conhecimento básico e essencial que pode subsidiar a formulação de dispositivos legais, normas, programas e diretrizes para lidar com questões de risco ecotoxicológico, potencial ou real, determinado pelo uso e pelo lançamento de diversas substâncias no meio ambiente (FERNICOLA *et al.*, 2004). Aragão e Araújo (2006) descrevem testes com *Mysidopsis juniae* (Silva, 1979) para avaliação ecotoxicológica de águas marinhas. Resgalla Júnior e Laitano (2002) citam que, considerando a concentração letal mediana (CL₅₀), de forma geral, os misidáceos são organismos-teste sensíveis.

O interesse da ecotoxicologia sobre os nanomateriais vem aumentando devido à expansão na comercialização de produtos nanoestruturados de tal maneira que, conhecer e avaliar os riscos causados aos sistemas aquáticos é de fundamental importância. Neste contexto, os resultados em sistemas aquáticos, por sua vez, podem ser considerados para representar possíveis perigos que o meio ambiente e a humanidade de uma maneira geral está sendo exposta (PASCHOALINO *et al.*, 2010). Segundo Blinova *et al.*, (2010), os testes ecotoxicológicos são indispensáveis na avaliação dos riscos ao meio ambiente provocados por nanopartículas sintéticas.

Estudos de toxicidade e de ecotoxicidade de partículas cujos componentes são considerados atóxicos em escala macro ou microscópica, tornaram-se necessários pela mudança nas propriedades deste material quando em escala nano, tais como, a rápida mobilidade no ambiente e nos organismos, sendo que, as rotas de exposição de um nanomaterial no ambiente são através da atmosfera, do solo, sedimento e nos sistemas aquáticos (PASCHOALINO *et al.*, 2010). Alguns trabalhos, neste sentido, procuram contribuir para elucidar o comportamento toxicológico de nanopartículas, como por exemplo, o estudo de Perreault *et al.*, (2012), Vaz (2013), Melegari *et al.*, (2013), Lalau *et al.*, (2014), Rossetto *et al.*, (2014), Tavares *et al.*, (2014) entre outros.

Avaliar a toxicidade simulando o ambiente marinho e com organismos marinhos é importante, considerando que atualmente chegam ao mar, direta ou indiretamente, muitas substâncias possivelmente tóxicas e com potencial para prejudicar a cadeia trófica deste ambiente, dentre elas, mais recentemente, as nanopartículas.

Assim, o tema do presente estudo irá contribuir com o fornecimento de dados em relação à toxicologia da NP de óxido de cromo III, quando dispersas em

meio marinho reconstituído para auxiliar nas tomadas de decisão associadas à nanotecnologia, buscando ainda, respostas sobre o mecanismo de toxicidade envolvido na interação das NP Cr₂O₃ com um sistema biológico.

Além disso, o Programa Internacional de Segurança revelou que o Cr (VI) causou vários danos genéticos em testes de mutagenicidade de curto prazo (WHO, 1988), o que reforça a importância da realização deste estudo devido ao possível envolvimento destes íons no mecanismo de toxicidade das NP Cr₂O₃.

Neste contexto, e parte integrante do projeto de financiamento do CNPq número 17/2011 através da Rede Cooperativa de Pesquisas em Nanotoxicologia Aplicada a Nanopartículas de interesse da indústria petrolífera e de tintas (Rede NANOTOX), coordenada pelo Professor Dr. William Gerson Matias, junto ao Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) da Universidade Federal da Santa Catarina, em parceria com a *Université de Bordeaux* (França), a *L'Université du Québec à Montréal* (Canadá), a *Rice University* (Estados Unidos), a Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) e a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE), o presente trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade da NP Cr₂O₃ em AMR através de ensaios toxicológicos agudos e crônico utilizando o microcrustáceo marinho *Mysidopsis juniae*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade da NP Cr₂O₃ em AMR através de ensaios toxicológicos agudos e crônico utilizando o microcrustáceo marinho *Mysidopsis juniae*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as NP Cr₂O₃ em diferentes meios;
- Avaliar a toxicidade aguda de NP Cr₂O₃ sobre o organismo teste;
- Avaliar os efeitos tóxicos da NP Cr₂O₃ sobre a biometria, mortalidade e natalidade em teste crônico e transgeracional utilizando o microcrustáceo *Mysidopsis juniae*;
- Quantificar os íons Cr (III), Cr (VI) e o cromo total nas concentrações de NP Cr₂O₃ utilizadas nos testes agudos e no crônico.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 NANOTECNOLOGIA E NANOMATERIAIS

A nanotecnologia tem aberto inúmeras oportunidades para o desenvolvimento de novos produtos com características específicas, muitas vezes, consideradas superiores aos materiais convencionais, pois envolve a criação e manipulação de materiais em níveis de nanoescala (HUSSAIN *et al.*, 2005; FERREIRA & RANGEL, 2009; SILVA, 2010), sendo focada em caracterização, fabricação, manipulação e aplicação de estruturas biológicas e não biológicas na escala nanométrica (SAHOO *et al.*, 2007).

O mundo está vivenciando uma extraordinária expansão da nanotecnologia através de disciplinas tão diversas como os nanomateriais, nanoeletrônica, nanobiotecnologia entre outros, assim como tem surgido um grande número de produtos comerciais e aplicações em nanoescala. A inovação em nanotecnologia tem sido alimentada pelo grande investimento em pesquisa pelos setores públicos e privado (RASHBA & GAMOTA, 2003).

Entre 2000 e 2007, o governo brasileiro já fez investimentos de 160 milhões de reais em pesquisas sobre nanotecnologia e que podem ultrapassar os 320 milhões de reais quando somados aos do setor privado. Esses investimentos se devem principalmente aos interesses que o país tem nas áreas de produtos farmacêuticos, químicos e de cosméticos (ABDI, 2010).

Os nanomateriais podem ser definidos como materiais cujos tamanhos das partículas que os constituem encontram-se na faixa dos nanômetros e dentre os muitos nanomateriais pode-se citar os nanotubos de carbono, as nanopartículas metálicas, nanopartículas de óxido de metais de transição, nanoemulsões e os mais diferentes tipos de nanocompósitos (ZARBIN, 2007).

As nanopartículas estão presentes em uma variedade de produtos que incluem equipamentos esportivos, protetores solares, cosméticos, entre outros (ROBERTSON *et al.*, 2010), suas aplicações são amplas e vão desde a fabricação de produtos eletrônicos a tratamentos médicos (BAROLI, 2010), são também utilizados em revestimentos anti-incrustantes (ISAZA *et al.*, 2011; PERREAULT *et*

al., 2012), processos de tratamento da água por adsorção (NOWACK & BUCHELI, 2007) entre outros. São vistas como materiais com grande potencial de aplicação em diversas áreas e atraem rapidamente grandes investimentos do setor privado e governamental (ROYAL SOCIETY AND ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; PISCOPO *et al.*, 2014). A Figura 1, ilustra diferentes elementos e suas escalas de tamanho, dentre eles, os nanotubos de carbono.

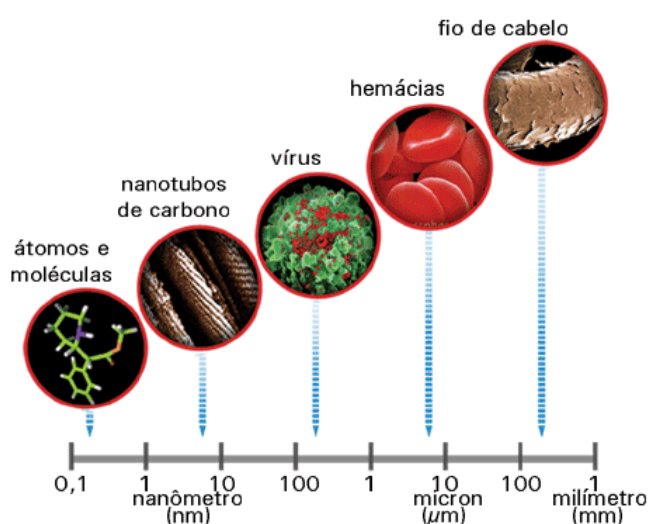


Figura 1. Representação de algumas escalas de medidas.
Fonte: TOMA (2004).

O comportamento das partículas é influenciado pelo tamanho da partícula, forma, carga de superfície e a presença de outros materiais no meio. As nanopartículas tendem a agregar em água do mar e são muito influenciadas pelo tipo específico de material orgânico ou outras partículas naturais (coloides) presentes na água doce (HANDY *et al.*, 2008).

3.1.1 Cromo e nanopartículas de óxido de cromo

O cromo é o sétimo metal e o 21º elemento mais abundante no planeta e foi descoberto no ano de 1765 na Rússia, pelo zoólogo Peter Simon Pallas, entretanto, o elemento só foi isolado em 1797 pelo químico francês Louis Nicolas Vauquelin,

enquanto realizava ensaios com o mineral crocoita (PbCrO_4), facilmente encontrado na Rússia (SILVA, 2001).

O nome cromo deriva da palavra grega *chroma*, que significa aquilo que apresenta cor, fazendo referência as distintas colorações em que são empregadas o metal, sendo estas verdes, azul, amarelo, laranja, dependendo do seu estado de oxidação (LEE, 1980; SILVA, 2001; VAITSMAN, 2001).

Em 1820, o dicromato de potássio já era utilizado como pigmento na indústria têxtil, e, desde, 1879, o minério cromita era rotineiramente utilizado na fabricação de refratários produzidos em altas temperaturas (ARFSTEN *et al.*, 1998).

Naturalmente, o cromo é encontrado em rochas, animais, plantas, solo, poeiras e névoas vulcânicas, geralmente no estado trivalente, já que a ocorrência do estado hexavalente pode ser praticamente atribuída as atividades humanas (emissões decorrentes da fabricação de cimento, construção civil, soldagem de ligas metálicas, fundições, manufaturas de aço e ligas, galvanoplastia, lâmpadas, minas, resíduos urbanos e industriais, curtumes, fertilizantes e outros) (ATSDR, 2000; WHO, 1988; SCHIRMER, 2009).

O cromo ocorre nos estados de oxidação -2 a +6, entretanto, somente o Cr (0), Cr (II), Cr (III) e Cr (VI) são os mais comuns. Com relação a toxicidade para os homens, somente as formas (III) e (VI) são importantes (WHO, 1988).

As funções bioquímicas e os efeitos do cromo são dependentes do seu estado de oxidação, pois enquanto o Cr (VI) é tóxico por ser um agente carcinogênico, o Cr (III) é considerado um nutriente essencial para os humanos ainda que podendo apresentar alguma toxicidade (MANZOORI, 2007). A toxicidade biológica do Cr (III) é estimada em 10 a 100 vezes inferior à dos compostos hexavalentes (FERGUSON, 2012).

O estudo de Milacic & Stupar (1995) demonstra que o Cr (III), se mantido com umidade natural pode ser oxidado a Cr (VI). A toxicidade está mais comumente associada aos compostos hexavalente, porém, foram observadas fatalidades após a ingestão de compostos de ambos os tipos, e a sensibilidade cutânea provavelmente está associada com a forma trivalente.

Quanto à toxicocinética dos compostos cromo é variável conforme seu estado de oxidação. O Cr (VI) penetra facilmente nas células humanas, enquanto o Cr (III) pode ser absorvido por difusão passiva ou fagocitose. Uma vez absorvido, o Cr é

transportado para vários órgãos e tecidos, sendo que o Cr (III) liga-se a proteínas séricas (SILVA, 2001; ATSDR, 2000).

As NP Cr_2O_3 , por sua vez, possuem uma grande variedade de aplicações, dependendo do seu tamanho (KAWABATA *et al.*, 1995; MEDEIROS, 2007; GUPTA *et al.*, 2014). São utilizadas na desidrogenação (reação química que elimina o hidrogênio) de parafinas leves (ZHU *et al.*, 2003) e em diversas áreas como catalisadores (ZHANG *et al.*, 2004). Além das aplicações mais conhecidas como resistência ao desgaste (KITSUNAI *et al.*, 1991) e proteção térmica (BERDAHL, 1995) partículas de óxido de cromo com tamanho menor que 50 nm podem ser usadas como corantes transparentes e partículas ainda menores são necessárias para melhorar as propriedades de sinterização (KAWABATA *et al.*, 1995; MEDEIROS, 2007).

3.1.2 Caracterização de nanomateriais e nanopartículas para estudos de toxicidade

A caracterização adequada do nanomaterial é fundamental, já que a sua influência sobre a atividade biológica pode ser alterada com a variação de algumas propriedades físico-químicas. Nesta caracterização, alguns parâmetros como o tamanho médio das partículas, a área e a composição química superficial, são fundamentais. Quanto ao tamanho, o principal problema é que raramente uma partícula será encontrada no ambiente em sua forma primária e isolada, mas sim formando aglomerados que podem variar de tamanho (> 100 nm), em meio aquático, por exemplo, pela mudança das condições ambientais como força iônica e pH (PASCHOALINO *et al.*, 2010). Algumas das principais metodologias para caracterização de nanopartículas que podem auxiliar na interpretação dos resultados toxicológicos são descritas a seguir.

A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) permite caracterizar de forma local e simultânea, a morfologia, cristalografia e composição química dos materiais em geral e é uma das principais ferramentas para realizar a caracterização de nanomateriais (WILLIAMS & CARTER, 2009). As imagens geradas permitem

também a visualização da dispersão das NP na matriz utilizada, sendo possível avaliar se existe a formação de aglomerados ou se as NP se mantêm isoladas.

A Figura 2 refere-se a NP Cr_2O_3 visualizadas em Microscópio Eletrônico de Transmissão.

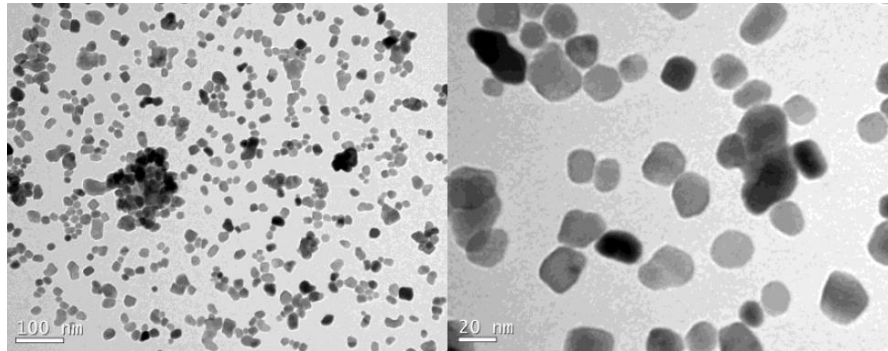


Figura 2: Imagens obtidas por MET de NP Cr_2O_3 dispersas em água ultrapura.
Fonte: Puerari, 2014.

O Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), por sua vez, se tornou um instrumento imprescindível nas mais diversas áreas devido ao desenvolvimento de novos materiais, por exemplo, nanomateriais, que têm exigido informações muito detalhadas das características microestruturais. Conhecendo as características da amostra, neste equipamento, é possível se trabalhar com melhores ajustes para obtenção de melhores imagens quando se tem disponíveis, por exemplo, diferentes filamentos para obtenção de maior brilho, como o canhão de emissão de campo, conhecido como MEV-FEG (MALISKA, 2011). Por meio do microscópio eletrônico de varredura é possível visualizar a superfície de amostras volumosas e obter imagens de superfícies polidas ou rugosas, com grande profundidade de campo e alta resolução, fácil interpretação das imagens com aparência tridimensional. Possui grande aceitação devido a sua ampla gama de utilização e um mínimo de preparação das amostras (MANNHEIMER, 2002).

O Potencial Eletrocinético em Sistemas Coloidais, mais conhecido como Potencial Zeta (Pz), é o potencial existente entre a superfície das partículas e do líquido de dispersão que varia de acordo com a distância a partir da superfície de cada partícula (MALVERN, 2004; BEDÊ, 2010). Os valores encontrados de Pz

indicam se as partículas em um líquido tendem a permanecer aglomeradas ou não e consequentemente fornecem informações sobre a estabilidade das partículas no meio onde estão, podendo variar bastante dependendo das características da matriz de dispersão (MALVERN, 2004). É um importante método de análise para nanopartículas devido a grande tendência de aglomeração das NP e de mudanças no seu comportamento, por exemplo, em meio salino.

Já o tamanho ou diâmetro hidrodinâmico é utilizado para determinar o tamanho das partículas agregadas ou não no meio de dispersão onde se encontram. É o diâmetro da esfera que se difunde na mesma velocidade da partícula a ser medida (MALVERN, 2004), parâmetro indispensável na análise do tamanho dos possíveis aglomerados de NP.

Outra metodologia que pode ser utilizada para elucidar o comportamento das NP e possivelmente facilitar o entendimento da resposta toxicológica é a espectrometria de absorção atômica. A espectroscopia atômica refere-se a fenômenos envolvendo os elétrons de valência, abrangendo a região do espectro Visível e Ultra Violeta, entre 800 e 180 nm, é uma técnica analítica bem estabelecida e que, quando comparada à colorimetria, por exemplo, apresenta melhor seletividade e robustez na análise elementar (GINÉ, 1998; COSTA & ARAUJO, 2001). É uma das técnicas mais utilizadas na quantificação de metais, possui bom limite de detecção e pode ser utilizada quase que na totalidade das matrizes ambientais (COSTA & ARAUJO, 2001), facilitando, assim, após preparação adequada da amostra a quantificação de íons metálicos que possam vir a se formar a partir de nanopartículas em determinada matriz de dispersão.

3.1.3 Poluição aquática por nanomateriais e nanopartículas

Ao longo da história da humanidade, a qualidade da água sempre foi um fator determinante do bem-estar, não somente do ser humano, mas como de todos os organismos. Uma das preocupações constantes sobre a segurança da água envolve a presença em potencial de poluentes químicos, incluindo compostos orgânicos, inorgânicos e metais, provenientes da indústria, centros urbanos e agricultura (MANAHAM, 2013).

Os compostos tóxicos que alcançam, direta ou indiretamente, os mares com consequente acúmulo no ambiente marinho têm causado desequilíbrios neste ecossistema, especialmente porque grandes centros urbanos estão localizados no litoral (VIEIRA, 2004). É limitado o conhecimento dos potenciais efeitos poluentes e logo, tóxicos dos nanomateriais, incluindo as suas consequências para o ambiente aquático (MANAHAN, 2013).

As mesmas características que tornam as nanopartículas interessantes do ponto de vista de aplicação tecnológica podem também ser indesejáveis quando estas são liberadas ao meio ambiente. O pequeno tamanho das nanopartículas facilita sua difusão e transporte na atmosfera, em águas e em solos, ao passo que dificulta sua remoção por técnicas usuais de filtração. Pode facilitar, também, a entrada e o acúmulo de nanopartículas em células vivas (QUINA, 2004). De modo geral, sabe-se muito pouco ou nada sobre a biodisponibilidade, biodegradabilidade e toxicidade de novos nanomateriais (PISCOPO *et al.*, 2014).

Pouco se sabe sobre o comportamento futuro das nanopartículas no ambiente aquático e vários são os questionamentos que devem ser respondidos, como por exemplo, o que acontece quando as nanopartículas se ligam em outros componentes? Existe sinergismo do efeito tóxico? Quais são as rotas de absorção das nanopartículas neste meio? No ambiente aquático, as mudanças nas características das nanopartículas são fatores decisivos em sua toxicidade aos organismos aquáticos? (MOORE, 2006). O risco toxicológico das nanopartículas no ambiente é, até o momento, difícil de avaliar devido à falta de conhecimento sobre os mecanismos de interação com sistemas biológicos (PERREAULT *et al.*, 2012).

3.1.4 Impactos dos nanomateriais e nanopartículas na saúde humana

A contaminação dos nanomateriais se dá por diversas vias, sendo as principais: absorção no nível celular, inalação, ingestão e assimilação através de superfícies epiteliais externas (PASCHOALINO *et al.*, 2010).

Além dos perigos ao meio ambiente, a exposição aos poluentes ambientais é reconhecida como um importante fator de risco para a ocorrência das internações hospitalares (NASCIMENTO *et al.*, 2006). As preocupações em vários grupos sociais

(governo, ativistas ambientais, cientistas, público em geral, etc.) sobre a segurança de nanopartículas vem aumentando consideravelmente (WIECHERS & MUSEE, 2010).

Há um número crescente de utilizações comerciais de nanopartículas e, conseqüentemente, um maior contato diário das nanopartículas com pessoas, aumentando o potencial de absorção através da pele. Recentes estudos em animais e humanos têm procurado documentar a segurança dos nanomateriais de consumo (ROBERTSON *et al.*, 2010).

As nanopartículas podem entrar no corpo através dos pulmões e dos intestinos, sendo a penetração através da pele menos evidente e dependente das propriedades como tamanho e superfície das partículas. Entretanto, deve-se dar importância a esta via de contaminação, principalmente, por ser a principal quando considerado o contato do ser humano com alguma matriz líquida contaminada (HOET *et al.*, 2004).

Os problemas ambientais podem ser extrapolados para problemas de saúde, uma vez que os seres humanos e as sociedades são afetados em várias dimensões (FREITAS, 2003).

Portanto, o enorme crescimento da nanotecnologia tem estimulado os temores de aumento das taxas de algumas doenças (BYRNE & BAUGH, 2008). A gravidade das consequências toxicológicas merece uma análise mais aprofundada dos efeitos das nanopartículas em seres humanos, possíveis tratamentos, mais rigor das normas de utilização e padrões de concentrações toxicológicas aceitáveis devem ser estabelecidos (BYRNE & BAUGH, 2008; MATHIAS *et al.*, 2014).

3.1.5 Nanomateriais e legislação específica

Esforços partem tanto do governo, como da iniciativa privada para avaliar riscos relacionados a manipulação de nanomateriais. Internacionalmente, a OCDE - Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento – busca apresentar soluções para riscos a saúde humana e as implicações de segurança ambientais associados com o uso de nanomateriais manufaturados (OECD, 2006).

No âmbito nacional, o Brasil conta com o CIN - Comitê Interministerial de Nanotecnologia, de responsabilidade do MCTI (Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação) tendo a finalidade de assessorar os ministérios na integração da gestão, na coordenação e no aprimoramento das políticas, diretrizes e ações voltadas ao desenvolvimento das nanotecnologias no Brasil (PORTAL BRASIL, 2014).

Em 2013, o MCTI lançou a IBN – Iniciativa Brasileira em Nanotecnologia, um conjunto de medidas para criar, integrar e fortalecer as atividades do setor, com foco na inovação. No lançamento, a IBN contou com investimento de R\$ 440 milhões para fortalecer as ações na área de nanotecnologia. Com a IBN, o governo busca aproximar a infraestrutura acadêmica e as empresas, fortalecendo as relações entre pesquisa, conhecimento e setor privado. Uma das ações propostas é a reestruturação do Sistema de Laboratórios em Nanotecnologia (SisNano), composto por unidades especializadas de laboratórios direcionados a pesquisa, desenvolvimento e inovação em nanociências e nanotecnologia (BRASIL, 2013).

Em agosto de 2014, o Brasil passou a integrar o Projeto europeu NanoReg, que visa dar suporte técnico e científico a todas as questões de regulação em nanotecnologia. O NanoReg é coordenado pelo ministério de Infraestrutura e Meio Ambiente da Holanda, envolvendo 64 instituições, em 16 países europeus, além da Austrália, Canadá, Coreia do Sul, Estados Unidos e Japão (PORTAL BRASIL, 2014).

Quanto a normatização em relação a escala nanométrica, destacam-se a ISO/TR 13014:2012 que fornece orientação para a caracterização físico-química de objetos em escala nanométrica produzidos para fins comerciais antes da avaliação toxicológica. Este relatório técnico busca ajudar cientistas, profissionais de saúde e especialistas de outras disciplinas para compreender, planejar, identificar e abordar a caracterização físico-química que é relevante, de tais materiais, antes de realizar ensaios toxicológicos sobre eles (ISO, 2012).

A ISO/TR 16197:2014 fornece uma compilação e descrição de métodos *in vitro* e *in vivo* que podem ser úteis para a toxicologia e ecotoxicologia, incluindo o rastreio de nanomateriais artificiais e manufaturados, fornecendo uma indicação dos potenciais resultados adversos e efeitos sobre a saúde humana ou para o ambiente (ISO, 2014).

Contudo, mesmo com todas as ações e esforços na área, infelizmente, apesar do rápido e intenso avanço de materiais em escala nanométrica, não há

ainda, em esfera nacional e mundial uma legislação específica que estabeleça limites de segurança das nanopartículas em relação ao meio ambiente e ao ser humano. Faz-se necessária uma atitude antecipadora a esses riscos através de práticas e políticas, como leis e mecanismos de controle (COSTA, 2014; ENGELMANN e PULZ, 2015).

3.2 TOXICOLOGIA AMBIENTAL

A toxicologia pode ser dividida didaticamente em cinco grandes áreas: Toxicologia Ambiental, de Alimentos, de Medicamentos e Cosméticos, Ocupacional e Social (CHASIN & PEDROZO, 2004).

Em comparação com outros campos de estudo, toxicologia ambiental é um ramo relativamente jovem da ciência. A toxicologia ambiental é uma ciência multidisciplinar que engloba diversas áreas de estudo que incluem biologia, química, anatomia, genética, fisiologia, epidemiologia, estatística e direito (YU, 2005).

Chasin & Pedrozo (2004) defendem que, a toxicologia ambiental e a ecotoxicologia são sinônimos utilizados para descrever o estudo dos efeitos adversos causados aos organismos vivos pelas substâncias químicas presentes no meio ambiente.

Entretanto, Matias (2005) define a toxicologia como a ciência responsável em estudar os efeitos tóxicos sobre os organismos de maneira individual; e a ecotoxicologia – uma subdivisão da toxicologia ambiental – o impacto sobre os ecossistemas ou populações de organismos.

A definição original de ecotoxicologia está, geralmente, atribuída a Truhaut (1977). Ele a definiu como o ramo da toxicologia que estuda os efeitos tóxicos causados por poluentes naturais ou sintéticos em ecossistemas animais constituintes de substâncias, incluindo os seres humanos, plantas e micro-organismos em um contexto integrado (FORBES & FORBES, 1997).

A ecotoxicologia é geradora de conhecimento básico e essencial para enfrentar questões de risco ambiental, potencial ou real (FERNICOLA *et al.*, 2004). Atualmente, os ensaios ecotoxicológicos também têm sido utilizados como uma importante ferramenta na avaliação da qualidade ambiental (IHARA *et al.*, 2010).

3.2.1 Nanotoxicologia

Com a crescente necessidade do conhecimento dos riscos potenciais dos compostos nanoestruturados diretamente relacionados à saúde humana, surgiu o termo nanotoxicologia, que tem como objetivo estudar e avaliar a toxicidade de nanomateriais e nanodispositivos diretamente em contato com o homem (PASCHOALINO *et al.*, 2010). É o estudo das interações das nanoestruturas com sistemas biológicos, com ênfase na elucidação da relação entre as propriedades físicas e químicas (por exemplo, tamanho, forma, composição e agregação) de nanoestruturas com a indução de respostas biológicas tóxicas (FISCHER & CHAN, 2007).

O termo nanoecotoxicologia, por sua vez, é utilizado para descrever estudos que avaliam e/ou determinam os efeitos de nanomateriais ao ambiente (SCHERINGER, 2008).

3.2.2 Testes de toxicidade aguda e crônica

Os testes de toxicidade consistem na determinação do potencial tóxico de um agente químico ou de uma mistura complexa, sendo os efeitos desses poluentes mensurados pela resposta dos organismos, ou partes específicas destes (CHASIN & PEDROZO, 2004; ROCHA *et al.*, 2004).

O uso da ecotoxicologia como ferramenta em análises de impacto ambiental vem sendo utilizado no Brasil desde a década de 70, primeiramente implantado pela CETESB utilizando organismos de água doce e somente 10 anos depois foram realizados os primeiros ensaios com espécies marinhas e estuarinas (RESGALLA JÚNIOR & LAITANO, 2002).

O princípio básico para todos os ensaios de toxicidade é semelhante e requer condições ambientais específicas, onde organismos-teste são expostos a várias concentrações da amostra a ser testada por um determinado período de tempo. Após o período de teste, verifica(m)-se o(s) efeito(s) da amostra sobre alguns parâmetros biológicos, como mortalidade, crescimento, reprodução, comportamento

dos organismos, dentre outros. Os efeitos observados são analisados estatisticamente e os resultados são expressos em unidades numéricas, tais como: concentração letal (CL_{50}), concentração efetiva (CE_{50}), concentração de efeito não observado (CENO), entre outros (ARAGÃO & ARAÚJO, 2006).

O ensaio de toxicidade aguda permite traçar uma relação direta entre a concentração de exposição de um agente e a intensidade de efeitos nocivos observados; calcular uma concentração letal (geralmente, expressa como qual a concentração necessária para provocar a morte de 50% dos organismos em um determinado tempo, CL_{50}) e estabelecer comparações de toxicidade entre substâncias e diferentes espécies (VIEIRA, 2004; MAGALHÃES & FERRÃO-FILHO, 2008). No Brasil, os testes de toxicidade aguda vêm sendo empregados, principalmente, no monitoramento de efluentes industriais com o intuito de minimizar o impacto ambiental e avaliar a eficiência de opções de tratamento (MAGALHÃES & FERRÃO-FILHO, 2008).

Os testes de toxicidade crônica são utilizados para medir os efeitos de substâncias tóxicas em espécies durante uma parte significativa do seu ciclo de vida. É possível avaliar os efeitos subletais de agentes tóxicos na reprodução, crescimento e comportamento dos organismos devido às perturbações fisiológicas e bioquímicas causadas por determinados agentes (ADAMS & ROWLAND, 2002).

3.2.2.1 *Organismos utilizados para testes*

A exposição aos contaminantes pode ocasionar a mortalidade de diversos organismos, causar alterações de comportamento, reprodução e inibições de crescimento. Estas alterações podem danificar a estrutura da população e resultar em potenciais impactos nas interações de diferentes cadeias alimentares (HOFFMANN *et al.*, 1995).

Os bioindicadores de poluição aquática são organismos que vivem, ou estão intimamente associados a ambientes hídricos e fornecem evidências de poluição (MANAHAM, 2013). A utilização de testes de toxicidade em animais permite entender o mal que a toxina pode causar ao organismo e deduzir o nível do impacto ambiental, dependendo da toxicidade e os mecanismos de toxicidade envolvidos. A

padronização dos animais e de testes varia entre os países, e há muitas espécies validadas. Geralmente, as espécies são abundantes, importante na cadeia alimentar e são sensíveis a mudanças no meio ambiente (RESGALLA JÚNIOR & LAITANO, 2002).

No Brasil, a ABNT e a CETESB validam os métodos com animais e testes toxicológicos. Utilizando estes protocolos padrões é possível comparar o efeito de diferentes compostos à mesma espécie ou analisar a sensibilidade das diferentes espécies expostas para um mesmo composto (RESGALLA JÚNIOR & LAITANO, 2002).

Dentre os vários organismos que podem ser utilizados em ensaios de toxicidade estão os misidáceos, que são organismos muito semelhantes a pequenos camarões. Apresentam corpo alongado, com tamanho que varia de 2 a 30 mm de comprimento e sua principal característica é a presença de um marsúpio ventral (RUPPERT & BARNES, 2005; ABNT, 2011). Possuem olhos pedunculados, carapaça incompleta, abdômen distinto do cefalotórax. Algumas espécies vivem em água doce, mas a maioria é marinha, são encontradas em todas as profundidades e podem estar em grandes grupos (RUPPERT & BARNES, 2005).

Apresentam manuseio em laboratório bem estabelecido, ciclo de vida curto, pequeno tamanho e sensibilidade a diversas substâncias tóxicas (NIMMO e HAMAKER, 1982). Os misidáceos são reconhecidos por serem organismos com grande potencial reprodutivo, de fácil aquisição e manutenção e com testes que apresentam boa reprodutibilidade (OLIVEIRA *et al.*, 2006), características estas que favorecem a sua utilização em testes de toxicidade. A Figura 3 apresenta exemplares de ambos os sexos de *Mysidopsis juniae* (Silva, 1979).

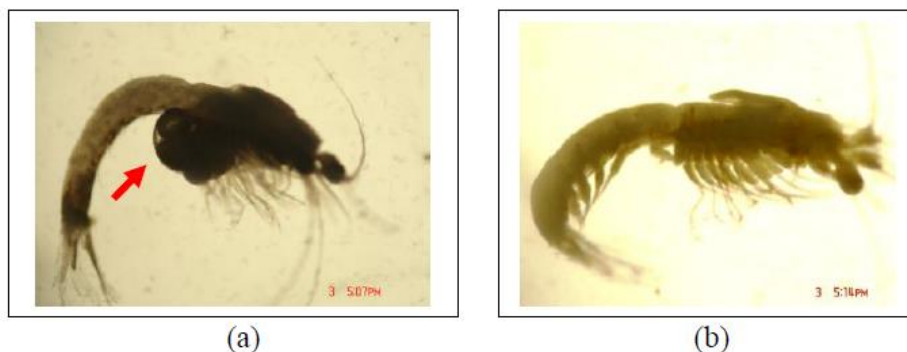


Figura 3: Exemplares de *Mysidopsis juniae*. (a) Fêmea com destaque para o formato do marsúpio (b) macho. Fonte: VAZ (2012).

Os misidáceos são omnívoros, capazes de se alimentar de pequenas partículas retiradas da superfície de seu próprio corpo, se necessário e de capturar organismos planctônicos (RUPPERT & BARNES, 2005).

Estudos ecotoxicológicos com misidáceos são relevantes, pois misidáceos constituem um dos componentes da dieta de várias espécies de peixes, por sua vez, utilizados para consumo humano. Qualquer contaminação dos misidáceos (consumidor primário) pode acarretar consequências para o ecossistema quando considerado sua importância na cadeia trófica (EVANS *et al.*, 1982).

3.2.2.2 *Mysidopsis juniae*

O organismo *Mysidopsis juniae*, organismo objeto de estudo deste trabalho possui a seguinte classificação filogenética (RUPPERT & BARNES, 2005):

Reino Animalia

Filo Arthropoda

Subfilo Crustacea

Classe Malacostraca

Subclasse Eumalacostraca

Superordem Peracarida

Ordem Mysidacea

Família Mysidae

Gênero *Mysidopsis*

Espécie *Mysidopsis juniae* (Silva, 1979).

A principal característica morfológica para a distinção da espécie é o formato do telson (Figura 4) – estrutura quitinosa presente na extremidade do último segmento do corpo – que apresenta um tubérculo distal no ápice (STORER, 2007; ABNT, 2011).

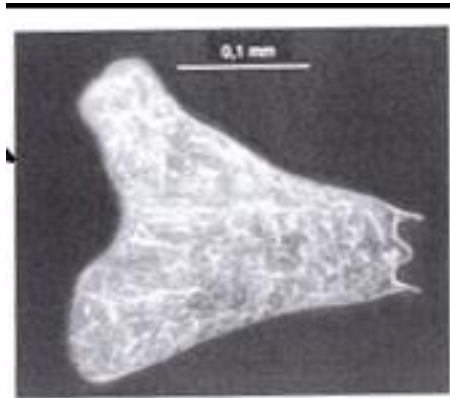


Figura 4: Formato do télson de *Mysidopsis juniae* (Silva7, 1979).
Fonte: BADARÓ-PEDROSO *et al.*, (2002).

São organismos de hábitos epibênticos, conhecido por ser predador de outros crustáceos, como os copépodos, e por ser filtrador de diatomáceas. Podem apresentar também comportamento de canibalismo, dependendo da situação ambiental, como as de estresse, ou na grande escassez de alimento. Sua reprodução é sexuada e seus ovos são armazenados em uma bolsa incubadora, onde emergem os organismos jovens (DOMINGUES & BERTOLETTI, 2006). *M. juniae* tem ocorrência registrada nos estados de São Paulo e Rio de Janeiro (ABNT, 2011).

A metodologia para sua utilização como organismo-teste em testes de toxicidade aguda foi padronizada pela CETESB (1992) e ABNT 15.308:2011 (ABNT, 2011).

4. METODOLOGIA

4.1 ORIGEM DA REDE COOPERATIVA DE PESQUISAS EM NANOTOXICOLOGIA E IMPORTÂNCIA DO PRESENTE ESTUDO

Atendendo a chamada MCTI/CNPq Nº 17/2011 – Apoio à criação de redes cooperativas de pesquisa e desenvolvimento em Nanotoxicologia e Nanoinstrumentação o professor Dr. William Gerson Matias – UFSC, submeteu e teve o projeto intitulado Rede cooperativa de pesquisas em nanotoxicologia aplicada a nanopartículas de interesse da indústria petrolífera e de tintas (Rede NANOTOX) aprovado.

A rede de pesquisa é coordenada pelo prof. William, que através da realização do doutorado na Université de Bourdeaux II pode desenvolver a área de Toxicologia ambiental na UFSC e desde então, firmar diversas parcerias com outras instituições, nacionais e internacionais, dentre estas a Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, cooperando inclusive na formação doutoral de professores da UNIVILLE.

Tal rede de cooperação já possibilitou a formação de mestres e doutores e resultou em diversos estudos em nanotoxicologia publicados, dentre eles, Tavares *et al.*, (2014), Rosseto *et al.*, (2014); Melegari *et al.*, (2013), Perreault *et al.*, (2012) e o artigo de Vaz, *et al.*, (2013) intitulado Assessment of chronic toxicity in water samples from the Babitonga Bay – south of Brazil – using transgenerational testing with *Mysidopsis juniae* resultante da tese de doutorado do prof. Cleiton Vaz da UNIVILLE.

Dentro deste contexto, e complementando outros trabalhos que foram, ou estão sendo realizados pela rede NANOTOX encontra-se o presente estudo, buscando assim auxiliar na elucidação da toxicidade de nanopartículas que são de interesse para a indústria petrolífera e de tintas.

4.2 ABORDAGEM METODOLÓGICA E EXPERIMENTAL

Para atender integralmente aos objetivos, foram realizados os procedimentos experimentais que podem ser visualizados na Figura 5. As NP Cr_2O_3 foram caracterizadas por diferentes técnicas com o intuito de conhecer algumas de suas propriedades, como por exemplo, o tamanho da partícula e verificar como se comportam em diferentes condições de dispersão.

Foram executados testes de toxicidade aguda com o organismo *Mysidopsis juniae* em AMR contendo NP Cr_2O_3 para definição da $\text{CL}_{50(96h)}$ e avaliação dos efeitos tóxicos agudos; e teste crônico e transgeracional de exposição repetida para identificar se há danos ao organismo, avaliando um grande período de exposição e/ou danos as suas gerações futuras, também expostas as NP Cr_2O_3 .

Foram realizados, também, testes de sensibilidade (substância de referência: DSS), controle negativo (apenas AMR) e controle positivo com dicromato de potássio, com intuito de validar os resultados obtidos nos testes com NP Cr_2O_3 .

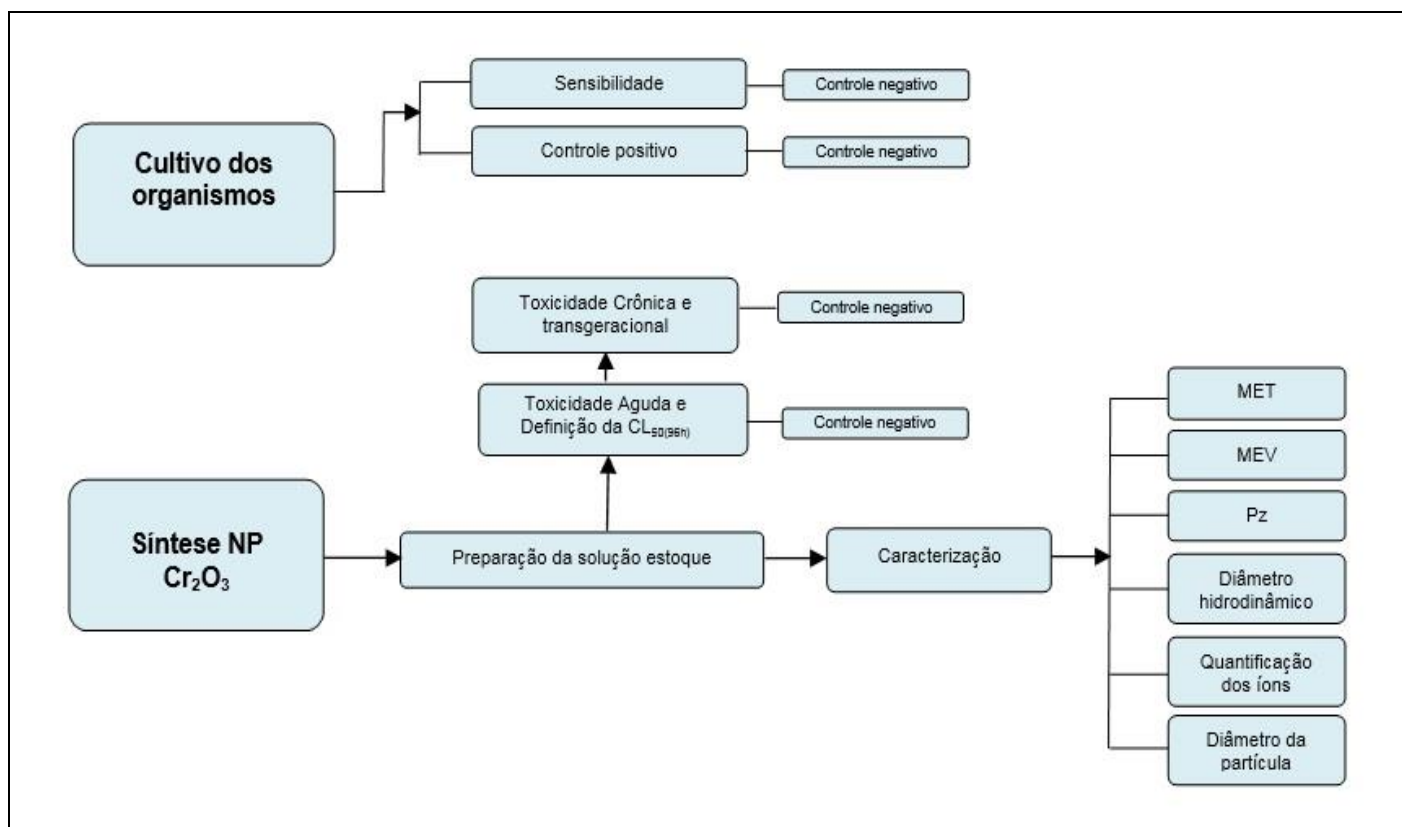


Figura 5: Planejamento experimental do estudo.

4.3 CULTIVO DE *Mysidopsis juniae*

Os *Mysidopsis juniae* utilizados neste estudo são provenientes do cultivo realizado no BABTOX (Apêndice A) e são mantidos seguindo a norma ABNT NBR 15.308 (ABNT, 2011), com adaptação sugerida por Kleine *et al.*, (2010).

As condições de cultivo são apresentadas na tabela 1:

Tabela 1. Condições de cultivo para *Mysidopsis juniae* no laboratório BABTOX.

Condição	Recomendação
Sistema	Semi-estático
Troca de água (água marinha reconstituída (AMR) - água deionizada + sal marinho).	Total e semanal
Densidade populacional	50 mL/indivíduo adulto
Aeração	Branda e contínua
Fotoperíodo	12 horas luz 12 horas escuro
Proporção sexual	4 Fêmeas para 1 macho
pH	7,8 a 8,3
Salinidade*	32
Temperatura	25 ±1 °C
Alimentação (1x dia)	Náuplios de <i>Artemia</i> sp. enriquecidos com óleo de peixe e óleo de fígado de bacalhau

Fonte: Adaptação ABNT 2011.

* Adaptação sugerida por Kleine *et al.*, 2010. A CETESB recomenda salinidade 35, porém para que as condições de cultivo sejam ideais no Laboratório de Toxicologia Ambiental da Univille – Unidade São Francisco do Sul, o valor utilizado é de 32.

O controle de sensibilidade dos organismos foi realizado com o uso da substância de referência Dodecil Sulfato de Sódio - DSS (C₁₂H₂₅NaO₄S), que é um detergente comumente utilizado no ambiente marinho na dispersão de óleos, com grau analítico de 99% de pureza da marca Vetec, lote 1005533, e as cartas-controle foram elaboradas no *software* Minitab 16®, a partir dos valores de CL₅₀(96h)

calculados pelo método dos Probitos, no mesmo *software*. O teste de sensibilidade segue o que é determinado na norma ABNT NBR 15.308 (ABNT, 2011).

As cartas-controle (Apêndice B) foram elaboradas e validadas, norteadas pela norma ABNT NBR 15.308 (ABNT, 2011) e mostram que os organismos encontram-se em uma faixa de sensibilidade adequada já que a $CL_{50(96h)}$ de nenhum dos ensaios ultrapassou o valor de dois desvios-padrão calculados a partir da média e não houve a ocorrência de sete resultados consecutivos de um mesmo lado da linha de tendência central, o que fornece a garantia de que os organismos utilizados encontram-se em uma condição adequada de sensibilidade.

O Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE (CEP) tem sua atuação baseada na Lei Federal N° 11.794/08, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais. O microcrustáceo *Mysidopsis juniae*, organismo utilizado no presente trabalho, pertence ao filo Arthropoda, não sendo, portanto, necessária autorização de utilização ao Comitê, pois não se trata de um organismo do Filo Chordata.

4.4 SÍNTESE E ARMAZENAMENTO DAS AMOSTRAS

Foram utilizadas NP Cr_2O_3 sintetizadas e fornecidas pelo LABTOX/UFSC, sob responsabilidade da Professora Dra. Denice S. Vicentini, conforme adaptação do método sol-gel proposto por Bañobre-López *et al.*, (2003) descrito a seguir e que pode ser visualizado na Figura 6 (TAVARES *et al.*, 2014).

Pesou-se em um béquer 20 g de nitrato de cromo (III) nonahidratado $Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ da marca Vetec, lote 1007491 em balança analítica, a este foi adicionado 200 mL de água ultrapura e levado para agitação rápida em agitador magnético durante 10 min, passado esse tempo, 8 g de hidróxido de sódio microperolado (NaOH) da marca Synth, lote 153993 foram lentamente adicionados e a agitação foi mantida por mais 10 min. Esta preparação foi distribuída em Falcons e levada para centrifugação em centrífuga Fanem Excelsa II Mod 206 BL durante 10 min a 3.400 rpm. O sobrenadante foi descartado, e adicionada água ultrapura, sendo os centrifugados "lavados" através de agitação vigorosa, e novamente colocados para centrifugação. Este processo foi repetido até que o sobrenadante apresentasse

pH de 9 ou 10. O centrifugado foi levado à estufa por 24 horas a 90 °C. Após este período, todo o centrifugado foi colocado em um almofariz de ágata e, com o auxílio de pistilo, triturado até a obtenção de um pó fino e homogêneo, sendo então levado para calcinação em forno mufla (Quimis Q318M) a 400 °C.

Todas as amostras de NP Cr₂O₃ foram armazenadas em temperatura ambiente, em frascos âmbar fechados e ao abrigo da luz.

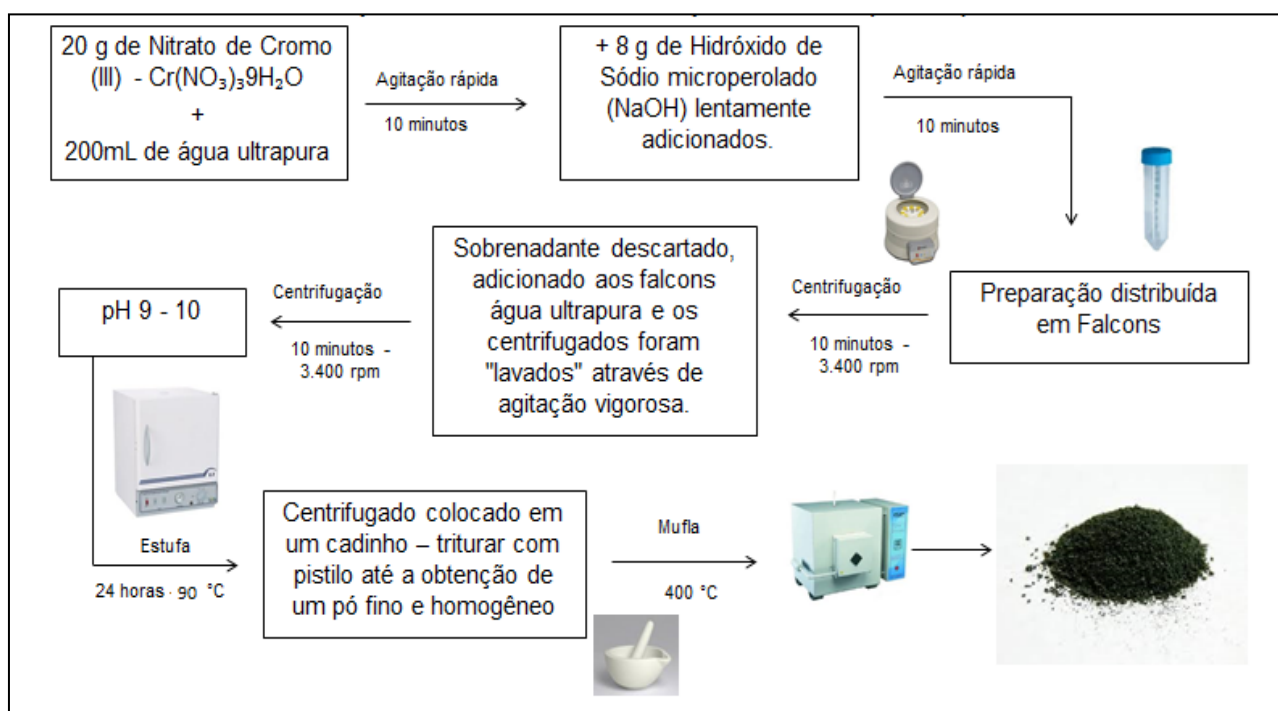


Figura 6: Síntese das NP Cr₂O₃ realizada no LABTOX/UFSC.

4.5 PREPARO DAS SOLUÇÕES ESTOQUE

Em um béquer, foi pesado 1 g de NP Cr₂O₃ em balança analítica, a este foi adicionado AMR (água deionizada + sal marinho da marca Red Sea Salt®) ajustado para salinidade 32, a fim de adequar as condições de teste com as condições de cultivo do *Mysidopsis juniae*. O conteúdo do béquer foi transferido para balão volumétrico de 1 L, sendo este processo repetido até que não houvesse mais vestígios de NP no béquer. Então, o volume de 1 L do balão foi completado também

com AMR 32. Após agitação manual vigorosa, a solução estoque foi transferida para um Erlenmeyer e levada para sonicação em ultrassonicador de ponteira Bandelin UW2200 utilizando ponteira mr 73 durante 10 min na potência da ponteira de 80%. A solução estoque foi armazenada (por no máximo 4 semanas) ao abrigo da luz sob refrigeração e, previamente a cada utilização desta solução estoque, o processo de sonicação descrito acima foi realizado. Sempre que necessário uma nova solução estoque foi preparada.

4.6 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE CROMO III E MEIOS DE DISPERSÃO

As NP Cr_2O_3 foram avaliadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), utilizando o microscópio modelo JEM 1011 (JEOL Ltd. Tokyo, Japan), localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, com o intuito de verificar a forma e o tamanho das NP, e se há formação de aglomerados após sonicação da solução estoque de 1 g.L^{-1} em AMR 32 e em água ultrapura. Para reforçar a elucidação do comportamento de dispersão das NP em água marinha, também foram realizadas análises em Microscopia Eletrônica de Varredura com Emissão de Campo (MEV-FEG), utilizando o microscópio modelo JSM 6101F (JEOL Ltd. Tokyo, Japan) localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC em solução estoque de 2 g.L^{-1} em AMR 32.

A avaliação da estrutura cristalina das NP Cr_2O_3 em AMR foi realizada no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) do departamento de Engenharia Mecânica da UFSC, através do Difratorômetro de Raios-X da marca *Phillips X'pert*. Utilizou-se radiação $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$). Com o difratograma obtido na análise calculou-se o diâmetro médio do cristalito através da equação de *Debye-Scherrer*:

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta}$$

Onde D é o tamanho médio da partícula, ou diâmetro médio do cristalito; K é uma constante que depende da forma das partículas; λ é o comprimento de onda da

radiação eletromagnética; β é a largura na metade da altura do pico de difração e θ é o ângulo de difração.

A estabilidade das NP suspensas em AMR na concentração de 25 mg.L⁻¹ após sonicação, foi avaliada no Laboratório de Bioenergética e Bioquímica de Macromoléculas, situado no departamento de Farmácia da UFSC, sendo os parâmetros avaliados o Potencial Zeta e o Diâmetro Hidrodinâmico no equipamento Zeta NanoSizer - Malvern.

4.7 TESTES DE TOXICIDADE

4.7.1 Controle positivo dos organismos

O dicromato de potássio foi a substância utilizada como controle positivo neste estudo por ter meia vida longa e estável, estar disponível na forma pura, apresentar uma boa curva de concentração-resposta para o organismo e ser estável em solução aquosa (RESGALLA JÚNIOR & LAITANO, 2002).

Após a realização de testes pilotos de sondagem da toxicidade baseado nas concentrações utilizadas no estudo com dicromato de potássio e *Artemia salina* de Resgalla Júnior & Laitano (2002), foram realizadas dez repetições de ensaios em triplicata utilizando o dicromato de potássio, K₂Cr₂O₇, (F. Maia, lote 28808 - substância conhecidamente nociva) como controle positivo, a fim de assegurar que o organismo utilizado neste estudo realmente possui sensibilidade a este composto, que tem em sua composição o elemento cromo.

Para preparação da solução estoque de dicromato de potássio, pesou-se em balança analítica (Shimadzu AY 220) 200 mg de K₂Cr₂O₇, que foi colocado em um balão volumétrico de 1 L e seu volume completado com AMR salinidade 32 (medido em refratômetro Biosynthesis 211 BP). A solução foi levada para agitação branda em agitador magnético durante 15 min.

Os testes seguiram o preconizado pela norma ABNT NBR 15.308 para testes agudos com *Mysidopsis juniae*. As concentrações utilizadas nestes testes foram: 0

(controle negativo), 7,5 mg.L⁻¹; 10 mg.L⁻¹; 12,5 mg.L⁻¹; 15 mg.L⁻¹ e 20 mg.L⁻¹. Em três recipientes plásticos com capacidade de 400 mL foram inseridos 10 organismos com 1 a 8 dias de vida em um volume total de 200 mL, para cada concentração, onde os organismos permaneceram de maneira estática, mantidos em incubadora por 96 h, a 25 °C, com fotoperíodo de 12 horas de luz. Os organismos foram alimentados diariamente com náuplios de *Artemia sp.* e o ensaio foi considerado válido quando a mortalidade no controle negativo não excedesse 10% do total de organismos expostos (ABNT, 2011).

A partir da média dos dez valores de CL_{50(96h)} calculados pelo método dos Probitos no *software* Minitab 16®, foi definida a CL_{50(96h)} para o controle positivo, sendo também realizado o teste de normalidade de Anderson-Darling para verificação da distribuição dos resultados obtidos.

Em cinco testes, foi efetuada a mensuração dos parâmetros pH em pHmetro (Gehaka PG 2000), Oxigênio Dissolvido (OD) em sonda multiparâmetros (Hanna HI 9146) na AMR e na solução estoque de dicromato de potássio e ao final do ensaio no controle negativo e nas cinco concentrações trabalhadas, para avaliação de como se comportam estes parâmetros.

4.7.2 Avaliação da toxicidade aguda e definição da CL_{50(96h)} para NP Cr₂O₃

Após a realização de testes pilotos, a fim de se verificar a concentração aproximada da CL_{50(96h)} para as NP Cr₂O₃, concentração onde não há mortalidade e a concentração onde sempre ocorre mortalidade total dos organismos após 96 horas de exposição as NP, fixou-se a faixa de trabalho em: 0 (controle negativo), 25 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹, 75 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹ e 125 mg.L⁻¹, preparadas a partir de solução estoque de 1 g.L⁻¹ imediatamente após sonicação, sendo que entre a preparação de cada concentração a solução estoque foi também brevemente sonicada. Foram realizadas dez repetições das triplicatas nesta faixa de trabalho para definição da CL_{50(96h)} para NP Cr₂O₃ durante a realização deste estudo. Todos os ensaios foram realizados nas mesmas condições de manutenção dos ensaios de sensibilidade e

controle positivo (conforme NBR 15.308) e os valores de $CL_{50(96h)}$ calculados pelo método dos Probitos no *software* Minitab 16®.

Ao início de cada teste foi efetuada a mensuração dos parâmetros pH e OD na AMR e na solução estoque de NP Cr_2O_3 e ao final do teste no controle negativo e nas concentrações trabalhadas.

4.7.3 Ensaio crônico e transgeracional

O teste crônico e transgeracional foi adaptado de Vaz (2012) e foi realizado na mesma condição do cultivo de *Mysidopsis juniae*, como se tratou de um ensaio semi-estático, a renovação total da água foi executada semanalmente nos aquários do controle e da amostra, mantendo a mesma concentração inicial de NP. O objetivo do teste crônico é avaliar ao longo de um grande período, possíveis efeitos tóxicos em um mesmo indivíduo que é exposto semanalmente às NP Cr_2O_3 e para o ensaio transgeracional avaliar se estes efeitos tóxicos aparecem nos organismos subsequentes (1ª e 2ª gerações originárias dos organismos iniciais), destes organismos que foram expostos às NP Cr_2O_3 .

Em aquários de vidro com capacidade de 2,5 L foram inseridos 80 filhotes (Geração G0), com 1 a 8 dias de vida, nas matrizes marinhas que foram preparadas em balão volumétrico com volume final de 2 L, sendo o controle negativo em duplicata (apenas AMR) e também em duplicata a concentração de 5 mg.L^{-1} (preparada em balão volumétrico a partir da solução estoque de 1 g.L^{-1}). Após sete dias os organismos foram contados (para verificação de mortalidade) previamente a renovação da água e 3 organismos de cada aquário foram coletados aleatoriamente para realizar a mensuração do comprimento dos organismos (biometria).

Após quatorze dias já ocorreu a maturação sexual e, portanto, são formadas as famílias (4 machos e 16 fêmeas) em erlenmeyers com capacidade de 1 L (Família G0), mantendo as concentrações estudadas a partir de cada aquário. Os organismos excedentes foram colocados no controle negativo e na amostra em novos aquários de 2,5 L nas mesmas condições iniciais de teste, estes organismos foram utilizados para o acompanhamento da biometria e mortalidade semanais até o final do teste crônico (63 dias com G0), enquanto que nos erlenmeyers foi

mensurado a natalidade, realizando a contagem dos filhotes ao 21º de teste, destes filhotes (G1), números igualitários de filhotes foram colocados em cada novo aquário nas condições iniciais do ensaio e o processo foi repetido por mais duas gerações, totalizando 63 dias de ensaio transgeracional, onde foi possível avaliar os parâmetros natalidade, biometria e mortalidade de 2 gerações (G1 e G2) além de avaliar a biometria, mortalidade e natalidade com G0.

Durante todo o ensaio crônico, diariamente foram mensurados a temperatura e salinidade da água (parâmetros mais críticos e passíveis de maior variação) e semanalmente pH e OD. O parâmetro de avaliação de possível efeito crônico biometria foi realizada por meio de lupa Nikon SMZ645 com régua calibrada em aumento de 2x, sendo a medida adotada o comprimento padrão dos organismos (CP) representado na Figura 7, mortalidade e natalidade foram realizados utilizando contador mecânico manual, sendo todos estes parâmetros mensurados semanalmente.

Todos os dados relativos aos parâmetros avaliados (biometria, mortalidade e natalidade) em todas as gerações foram agrupados e condensados de maneira a facilitar as comparações entre os organismos expostos e os não expostos às NP Cr₂O₃ tornando possível avaliar a presença ou ausência de efeitos tóxicos.

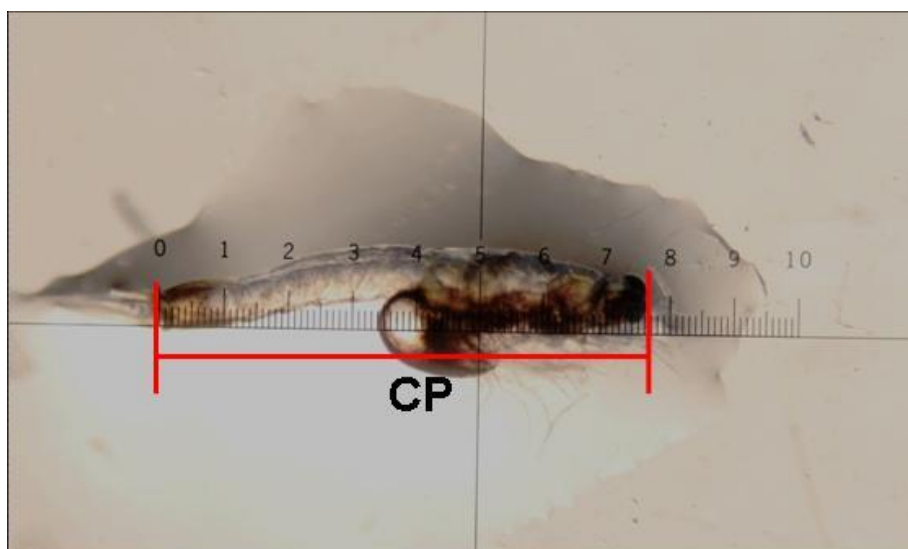


Figura 7: *M. juniae* observado em lupa com régua milimétrica em aumento de duas vezes. A linha vermelha (CP) indica os pontos de medição (último segmento distal antes do télson até a base ocular).

Fonte: GONÇALVES (2014).

A Figura 8, refere-se à representação esquemática de como foi realizado todo teste crônico e transgeracional.

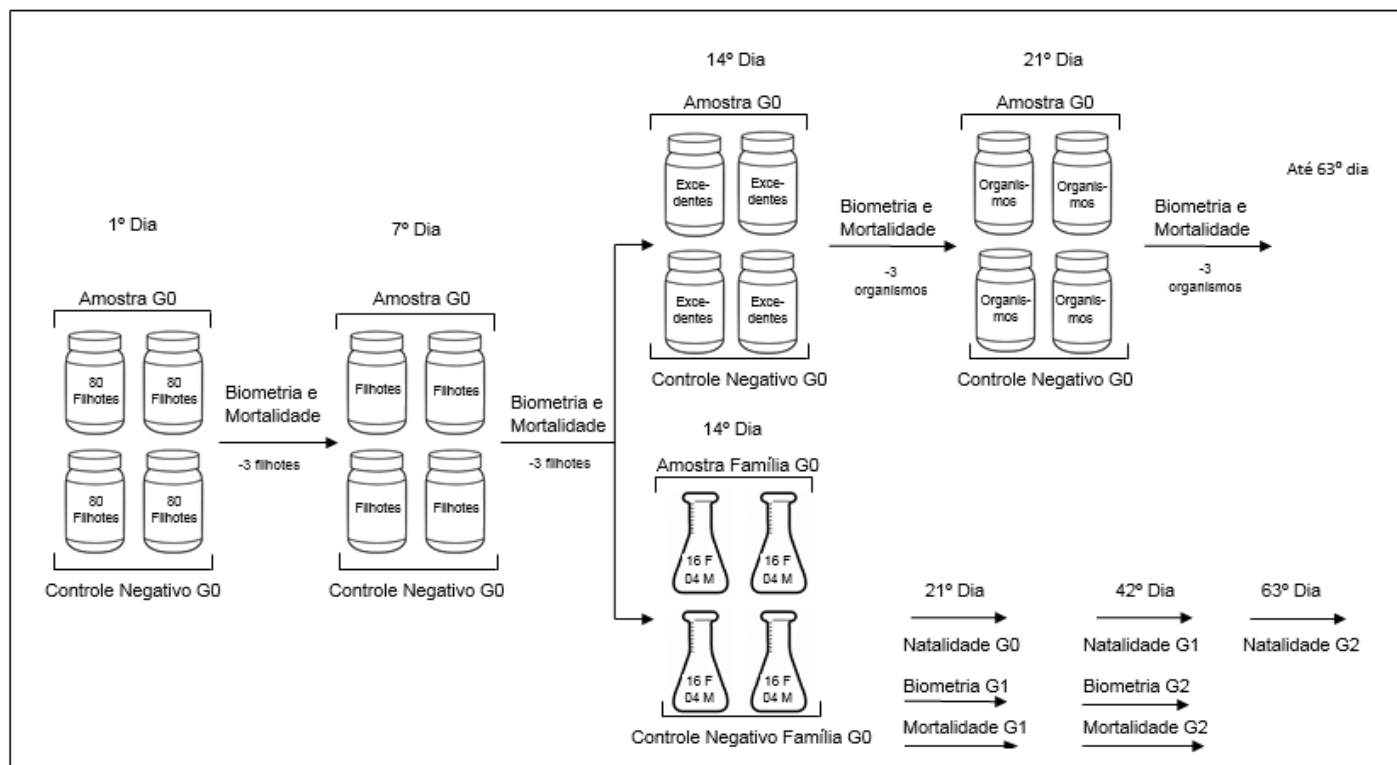


Figura 8: Representação esquemática da realização do teste crônico e transgeracional.

4.8 QUANTIFICAÇÃO DOS ÍONS CROMO

Foi realizada em laboratório terceirizado (Acquaplant – Joinville/SC) a quantificação de cromo total por Espectroscopia de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente modelo ICP-725 Agilent, após digestão ácida das amostras e do Cr (VI) utilizando Espectrofotômetro Pharo 719, nas soluções em AMR 32 nas concentrações de 25 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹, 75 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹ e 125 mg.L⁻¹, sendo estas as concentrações utilizadas no teste agudo e em 5 mg.L⁻¹ (concentração utilizada no teste crônico e transgeracional). O cromo (III) também foi calculado. Estas análises foram realizadas para avaliar se possivelmente a toxicidade nas concentrações citadas de NP pode estar relacionada a quantidade de íons dispersos

na matriz utilizada nos testes, portanto, assim como nos ensaios as amostras foram previamente sonicadas antes das quantificações.

4.9 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados da caracterização foram compilados e comparados com a literatura. Os dados dos ensaios de toxicidade aguda e o controle positivo e para NP Cr₂O₃ foram utilizados para o cálculo das suas respectivas CL_{50(96h)} pelo método dos Probitos no *software* Minitab 16[®]. A normalidade destes resultados também foi calculada no mesmo *software* através do teste de normalidade de Anderson-Darling.

Para análise dos parâmetros avaliados no teste crônico e transgeracional (biometria, natalidade e mortalidade), os dados foram agrupados e realizou-se testes T de Student, no *software* Minitab 16[®] com o intuito de verificar a existência de diferenças significativas, considerado um intervalo de confiança de 95%, em relação a estes parâmetros entre os organismos expostos e os não expostos às NP Cr₂O₃. Os resultados das análises dos íons foram comparados com as resoluções CONAMA 430/2011 e 357/2005 e por fim foi realizada uma avaliação conjunta de todos os resultados frente a literatura científica.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NP, SOLUÇÕES ESTOQUE E MEIOS DE DISPERSÃO

A Figura 9 apresenta as imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das NP Cr_2O_3 dispersas em água ultrapura 1 g.L^{-1} (A e B) e em AMR salinidade 32 1 g.L^{-1} (C e D), confirmando assim que as partículas, quando individualmente (A), se encontram dentro da escala nanométrica.

Com a análise em MET também foi possível verificar a presença de aglomerados de NP em ambos os meios de dispersão, porém em AMR essa tendência parece ser muito maior, sendo mais difícil encontrar partículas isoladas como em (A) - $\cong 32 \text{ nm}$, ou em aglomerados menores (B) - $\cong 250 \text{ nm}$. Em AMR pode-se observar grandes aglomerados, como os vistos em (D) - $\cong 15000 \text{ nm}$.

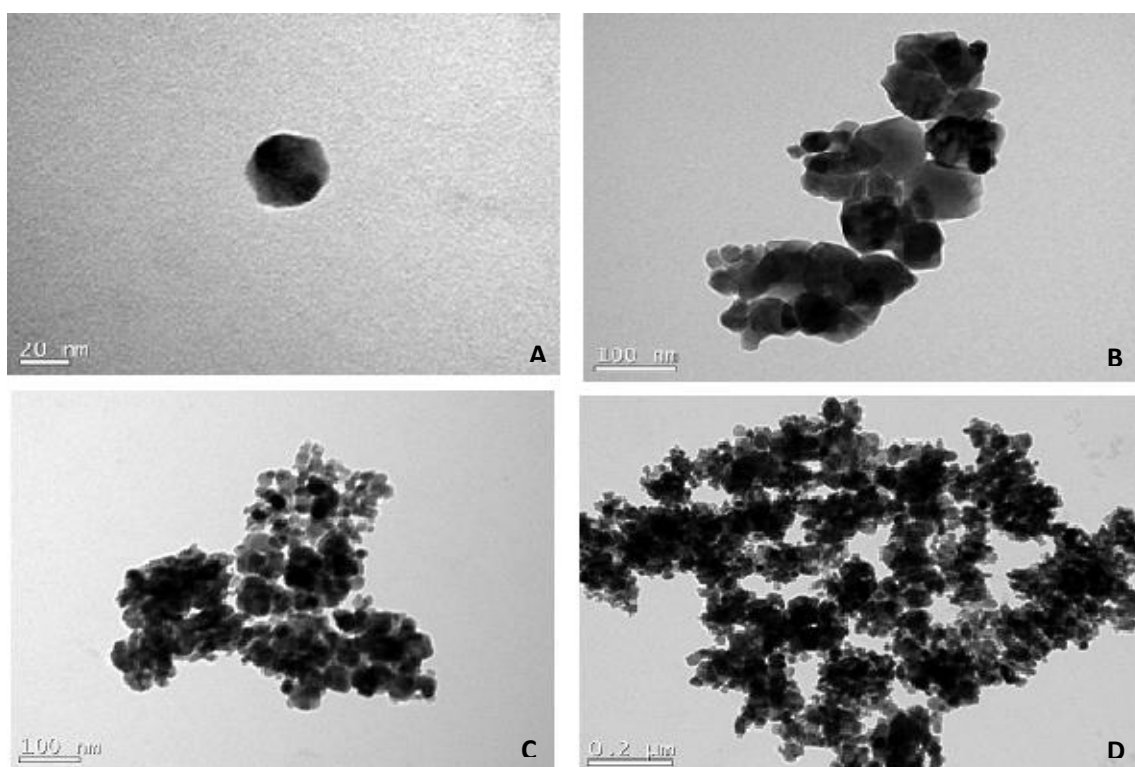


Figura 9: Imagens em MET de NP Cr_2O_3 1 g.L^{-1} em água ultrapura (A e B) e em AMR salinidade 32 (C e D).

Outros estudos também documentaram a alta tendência a formação de grandes aglomerados de NP em água marinha, como por exemplo, o estudo de Buffet *et al.*, (2011) com NP de Cobre e Clément *et al.*, (2013) com NP de Dióxido de titânio. No estudo de Costa (2014) houve a formação de aglomerados de NP de Cr_2O_3 de procedência comercial (tamanho de partícula de 66,8 nm) dispersas em água ultrapura, e aglomerados ainda maiores em meio salino 2%, porém estes, são menores que os encontrados no presente estudo (NP de síntese própria, tamanho médio da partícula: 21,8 nm) o que indica que tanto o meio de dispersão, quanto o tamanho e tipo da partícula parecem influenciar a aglomeração.

As análises em MEV-FEG das NP Cr_2O_3 que foram realizadas em AMR na concentração de 2 g.L^{-1} (Figura 10) confirmam o já encontrado nas imagens com MET de que é possível encontrar NP individuais (A), porém, já em processo de aproximação para aglomeração, mas que a grande maioria das NP de Cr_2O_3 encontra-se na forma de grandes aglomerados (B).

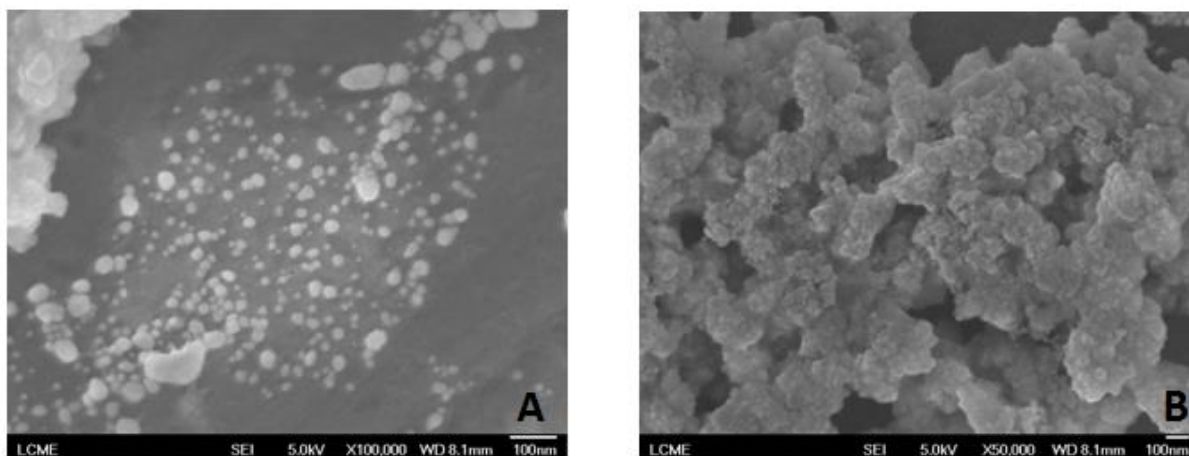


Figura 10: Imagens em MEV-FEG de NP Cr_2O_3 em AMR salinidade 32 na concentração de 2 g.L^{-1} mostrando a pré-formação de aglomerados (A) e formando grandes aglomerados (B).

O difratograma obtido do DRX (Figura 11) apresenta os mesmos picos encontrados na literatura (JCPDS card, nº 85-0869), identificando a amostra como óxido de cromo III e indicando sua pureza. O diâmetro médio do cristalito (menor unidade que contém o Cr_2O_3) obtido pela equação de Debye-Sherrer foi de 21,8 nm,

confirmando o visualizado nas imagens de MET referente a sua estrutura em escala nanométrica das partículas.

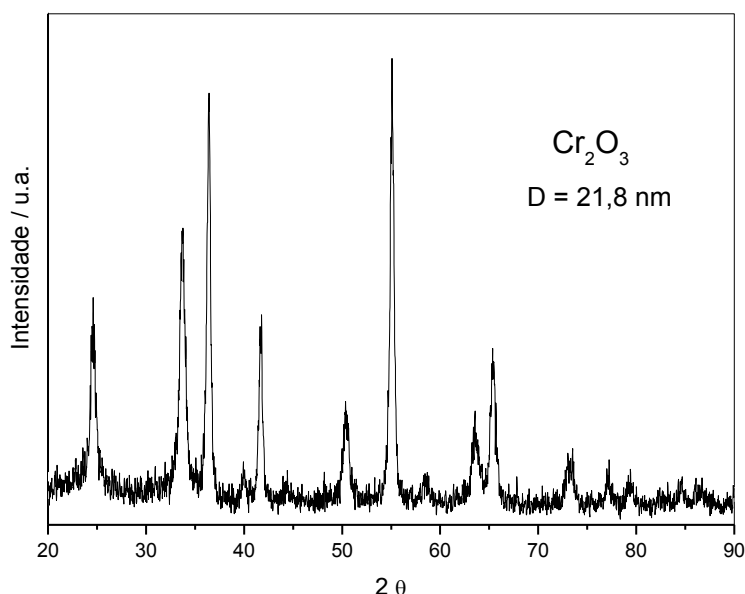


Figura 11: Difratoograma de NP Cr_2O_3 , onde “D” = diâmetro médio do cristalito.

Dispersas em AMR salinidade 32 na concentração de 25 mg.L^{-1} o Potencial zeta foi de $-7,68 \text{ mV}$ e o diâmetro hidrodinâmico médio de $2545,0 \text{ nm}$, o que confirma a instabilidade e a grande tendência à aglomeração das NP de Cr_2O_3 nestas condições de dispersão.

Para a solução ser considerada estável, o Pz deve estar acima de $+30 \text{ mV}$ ou abaixo de -30 mV , pois valores dentro desta faixa indicam soluções instáveis (MALVERN, 2004; OBERDÖRSTER *et al.*, 2013).

O estudo de Wiśniewska & Szewczuk-Karpisz (2013) mostrou que em pH mais próximo que o do presente trabalho (entre 6,5 e 8,5), o óxido de cromo III em NaCl $0,01 \text{ M}$ também apresentava instabilidade (Pz entre -5 e -20 mV), promovendo a aglomeração das partículas em suspensão, assim como no estudo de Costa (2014) que em NaCl 2% e pH $5,70$ o Pz encontrado para Cr_2O_3 foi de $-5,77 \text{ mV}$ (instável).

5.2 TESTES DE TOXICIDADE

5.2.1 Controle positivo dos organismos

A média dos dez valores de $CL_{50(96h)}$ para o controle positivo, $K_2Cr_2O_7$, e cujo controle negativo de cada teste não ultrapassou 10% foi de $10,43 \text{ mg.L}^{-1}$ e desvio padrão de $\pm 0,62 \text{ mg.L}^{-1}$. O teste de normalidade de Anderson-Darling (Figura 12) mostrou que os resultados seguiram uma distribuição normal, não havendo diferenças significativas entre os dados ($p=0,229$). Os valores dos dez testes são apresentados na Tabela 2.

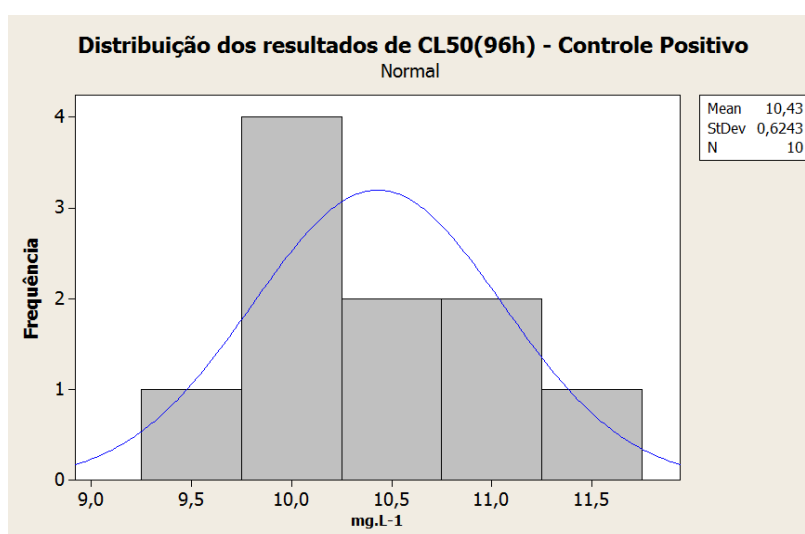


Figura 12: Teste de normalidade de Anderson-Darling a partir das $CL_{50(96h)}$ calculadas nos testes com o controle positivo ($K_2Cr_2O_7$).

Tabela 2: Resultados das $CL_{50(96h)}$ dos testes agudos com o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$).

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$CL_{50(96h)} \text{ mg.L}^{-1}$	11,17	11,25	10,6	10,05	9,25	10,15	10,34	10,2	11,14	10,15

Fonte: O autor.

O dicromato de potássio também foi utilizado como controle positivo no estudo de Puerari (2014) que avaliou a toxicidade de nanopartículas de óxido cromo III no microcrustáceo *Daphnia magna*. Para *D. magna* o valor de $CE_{50(48h)}$ encontrado por Puerari foi de $0,833 \text{ mg.L}^{-1}$.

Não houve grandes variações nos parâmetros pH e OD que foram mensurados no início e ao final dos testes. A média dos resultados dos parâmetros em AMR e na solução estoque do $K_2Cr_2O_7$, realizados ao início de cada teste, e ao final no controle negativo e nas cinco concentrações trabalhadas é apresentada no Apêndice C.

5.2.2 Avaliação da toxicidade aguda e definição da $CL_{50(96h)}$ para NP Cr_2O_3

A avaliação da toxicidade aguda, incluindo os ensaios pilotos realizados em larga faixa de concentração, mostrou que acima de 25 mg.L^{-1} a mortalidade sempre ocorre, abaixo desta concentração a mortalidade não é linear, podendo ocorrer ou não, e sempre abaixo de 5 mg.L^{-1} não houve mortalidade na exposição aguda. A concentração onde sempre há mortalidade total dos organismos após 96 h de exposição é de 125 mg.L^{-1} .

A média dos dez valores de $CL_{50(96h)}$ para NP Cr_2O_3 e cujo controle negativo de cada teste não ultrapassou 10%, foi de $58,863 \pm 7,789 \text{ mg.L}^{-1}$. Os valores dos dez testes realizados em triplicata são apresentados na Tabela 3.

O teste de normalidade de Anderson-Darling (Figura 13) mostrou que os resultados seguiram uma distribuição normal, não havendo diferenças significativas entre os dados ($p=0,355$).

Tabela 3: Resultados das $CL_{50(96h)}$ dos testes agudos com NP Cr_2O_3

Ensaio	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
$CL_{50(96h)} \text{ mg.L}^{-1}$	59,75	59,31	45,12	54,09	60,09	53,44	59,69	55,98	73,65	67,51

Fonte: O autor.

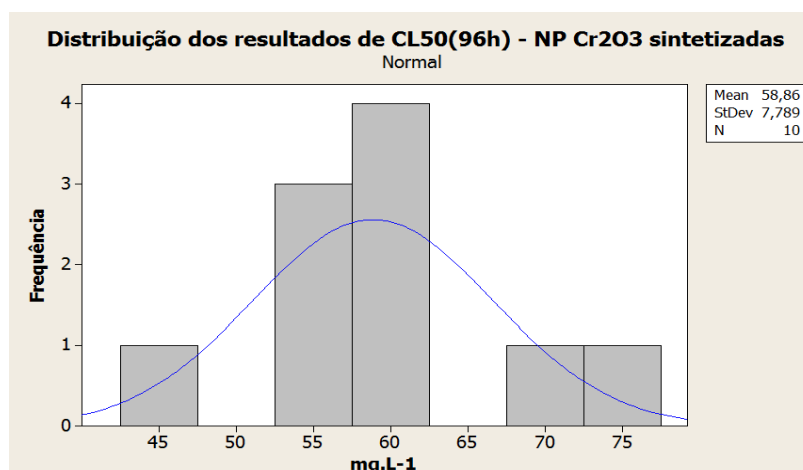


Figura 13: Teste de normalidade de Anderson-Darling a partir das CL₅₀(96h) calculadas nos testes com NP Cr₂O₃.

Tais valores de CL₅₀(96h) são considerados menos expressivos, visto que, em outros estudos como o de Puerari (2014) as NP de Cr₂O₃ no organismo de água doce *Daphnia magna* apresentaram valor de CE₅₀(48h) de 6,79 mg.L⁻¹. Resultados muito semelhantes ao de Puerari foram encontrados no estudo de Tavares *et al.*, (2014) que utilizou o organismo *Daphnia similis* e encontrou o valor de CE₅₀(48h) de 6,74 mg.L⁻¹ para a NP de Cr₂O₃.

A aparente menor toxicidade da NP de Cr₂O₃, encontrada no presente estudo pode ser explicada devido a características do organismo ou devido a características de dispersão das NP quando em meio marinho (maior aglomeração), o que poderia explicar a menor toxicidade devido a menor absorção de NP pelo organismo quando há formação de grandes aglomerados.

O método de síntese utilizado, e consequentemente, as características das NP obtidas, também parecem ser influentes sobre a toxicidade, pois Costa (2014) utilizando NP de Cr₂O₃ de procedência comercial encontrou valores de CE₅₀(48h) bem diferentes de Puerari (101,74 mg.L⁻¹) ainda que utilizando organismos da mesma espécie.

Considerando o estudo de Gonçalves (2014), que utilizou NP de óxido de Cobre também em ambiente marinho com o organismo *Mysidopsis juniae* e cujo valor de CL₅₀(96h) foi de 29,78 mg.L⁻¹ pode-se atribuir a menor toxicidade das NP de Cr₂O₃ a características específicas deste composto quando dispersos em meio salino. Assim como no estudo de Gonçalves, no presente estudo, foi possível

observar a ocorrência de precipitado nos recipientes das concentrações utilizadas no ensaio agudo.

Blaise *et al.*, (2006) desenvolveu uma escala de toxicidade para diferentes compostos químicos emergentes, em seu estudo com diversos grupos farmacêuticos, classificando-os como: extremamente tóxicos (concentrações $< 0,1 \text{ mg.L}^{-1}$), muito tóxicos ($0,1$ a 1 mg.L^{-1}), tóxicos (1 a 10 mg.L^{-1}), nocivos (10 a 100 mg.L^{-1}) e não tóxicos ($>100 \text{ mg.L}^{-1}$). Considerando a escala de Blaise e o valor de toxicidade encontrado, as NP de Cr_2O_3 podem ser consideradas nocivas.

Nos testes agudos foi possível verificar a possível influência da exposição as NP Cr_2O_3 sobre a mobilidade, principalmente próximo das 96h e nas concentrações mais altas nos organismos que não estavam mortos, movimentos circulares, rápidos e incessantes foram observados em alguns dos testes, por certos períodos de tempo.

Os resultados dos parâmetros de pH e OD da AMR e solução estoque realizados ao início de cada teste e ao final no controle negativo e nas cinco concentrações trabalhadas são apresentados no Apêndice D. O comportamento de redução do pH quando adicionamos NP à AMR manteve-se dentro do que era esperado.

Nenhum dos valores de pH ou OD mensurados nas concentrações trabalhadas ao final do teste agudo estava acima ou abaixo de valores que permitissem o cultivo do organismo teste corroborando com a hipótese de que a mortalidade dos organismos não está relacionada a tais parâmetros, mas sim a toxicidade gerada a partir da exposição às NP Cr_2O_3 .

5.2.3 Ensaio crônico e transgeracional com NP Cr_2O_3

Não foram encontradas diferenças significativas (teste t valor de $p>0,05$) nos comprimentos médios dos organismos da geração inicial (G0) mensurados semanalmente até o 63º dia de teste quando comparados os organismos não expostos e expostos semanalmente as NP Cr_2O_3 em concentração de 5 mg.L^{-1} . Os valores de comprimento dos organismos da geração inicial (G0) mensurados

semanalmente até o 63º dia de teste são apresentados no Apêndice E, e podem ser observados na Figura 14.

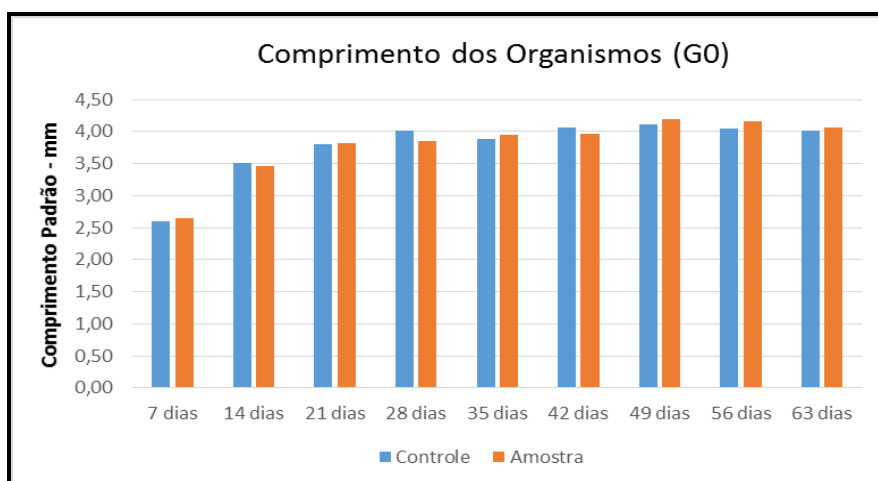


Figura 14: Valores de comprimento padrão (CP) dos organismos da geração inicial (G0) mensurados semanalmente até o 63º dia de teste. Controle = AMR; Amostra = NP Cr₂O₃ 5 mg.L⁻¹.

Também não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) na média dos comprimentos dos organismos da geração G1 e G2 quando comparados organismos expostos e não expostos nestas gerações. Os valores dos comprimentos dos organismos das gerações G1 e G2 mensurados semanalmente até o 21º dia de crescimento, para cada geração, são apresentados no Apêndice F e podem ser visualizados na Figura 15.

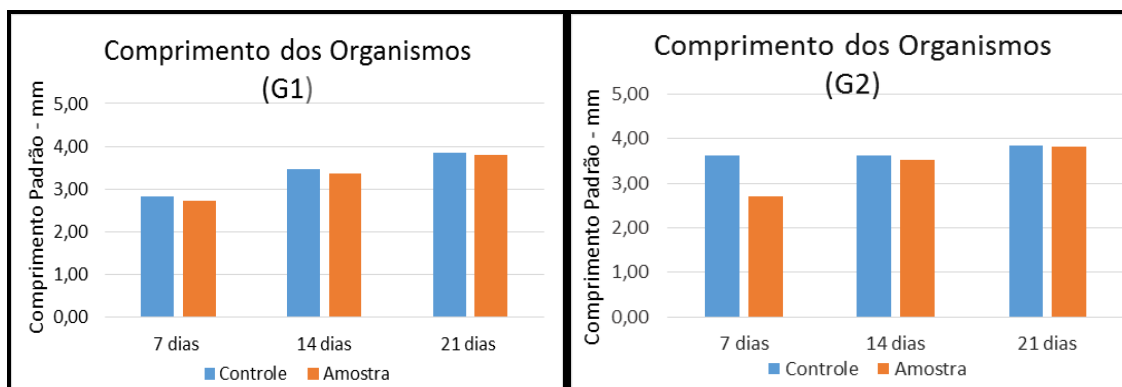


Figura 15: Valores de comprimento padrão (CP) dos organismos da geração G1 e G2 mensurados semanalmente até o 21º dia de crescimento de cada geração. Controle = AMR; Amostra = NP Cr₂O₃ 5 mg.L⁻¹.

Comparados os organismos expostos das gerações G0 com a média em G1 e G2 não foram encontradas diferenças significativas na média dos comprimentos das 3 gerações mensurados até o 21º dia de crescimento de cada geração ($p>0,05$), indicando que as NP não estariam prejudicando o crescimento das gerações subsequentemente expostas.

Portanto, os resultados mostram, que a exposição as NP Cr_2O_3 em concentração de 5 mg.L^{-1} não influenciou o crescimento dos organismos, assim como, o crescimento de duas gerações futuras, também expostas às NP.

Em relação ao parâmetro mortalidade de G0, comparados organismos expostos e não expostos, não houve diferenças significativas ($p>0,05$) para mortalidade cumulativa referente aos 63 dias de teste, sendo que a média da mortalidade cumulativa para os organismos do controle foi de 48,61% e para amostra 41,66%. Na Figura 16 é possível visualizar a tendência de mortalidade cumulativa dos organismos de G0 expostos e não expostos às NP Cr_2O_3 .

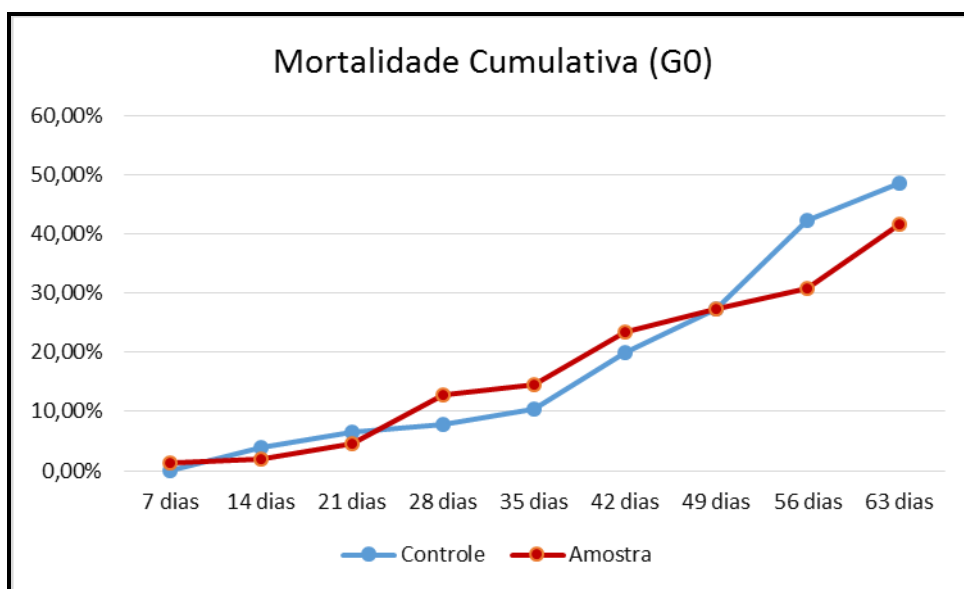


Figura 16: Mortalidade cumulativa dos organismos de G0 expostos (amostra) e não expostos (controle) às NP Cr_2O_3 5 mg.L^{-1} .

A mortalidade, quando calculada semanalmente também não apresentou comportamento significativamente diferente ($p> 0,05$) entre organismos de G0

expostos e não expostos às NP. Todos os dados referentes a mortalidade cumulativa e semanal de G0 encontram-se no Apêndice G.

Para mortalidade de G1, comparados organismos expostos e não expostos, não houve diferenças significativas ($p>0,05$) para mortalidade cumulativa e semanal ($p>0,05$) referente aos 21 dias de teste com esta geração. O mesmo não ocorreu para G2, onde para mortalidade cumulativa $p= 0,017$, o que pode indicar que em gerações futuras os organismos parecem ficar mais sensíveis a exposição levando a uma maior mortalidade. A Figura 17 mostra a tendência de mortalidade cumulativa dos organismos de G1 e G2 expostos e não expostos às NP Cr_2O_3 . Todos os dados referentes a mortalidade cumulativa e semanal de G1 e G2 encontram-se no Apêndice H.

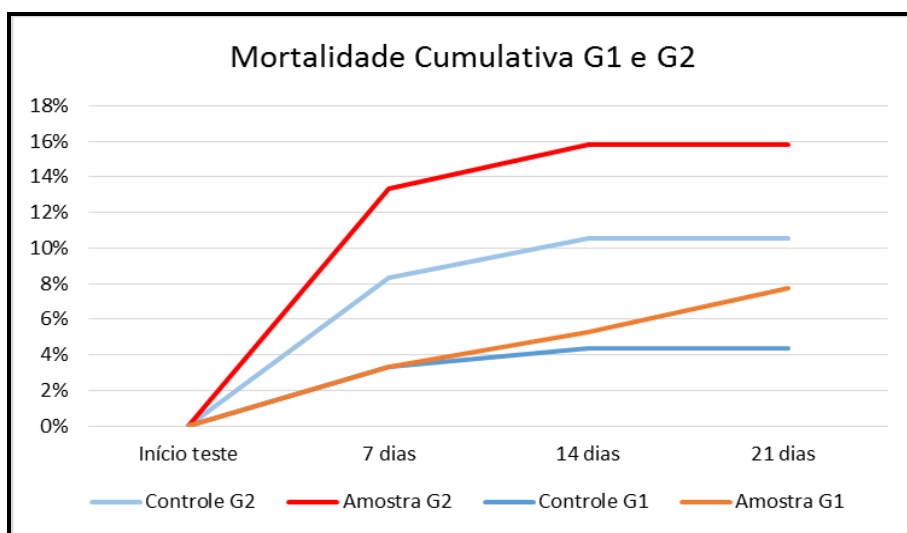


Figura 17: Mortalidade cumulativa dos organismos de G1 e G2 expostos (amostra) e não expostos (controle) às NP Cr_2O_3 5 mg.L^{-1} .

Em relação a natalidade, comparando a média das natalidades das três gerações avaliadas entre os organismos expostos e não expostos às NP, não foram encontradas diferenças significativas ($p>0,05$) neste parâmetro, indicando que não houve, para o período estudado influência das NP na natalidade do *Mysidopsis juniae*. Entretanto, é importante salientar que a natalidade de G2, (expostos as NP) apresentou uma taxa de nascimento 34% menor que no controle da mesma

geração. Os valores do número total dos nascidos podem ser visualizados na Tabela 4.

Tabela 4: Natalidade (número total dos nascidos) das três gerações avaliadas no teste crônico (G0, G1 e G2).

Dias de teste	Nascimentos			
	CI	CII	AI	AI
21 (G0)	112	61	104	130
42 (G1)	89	66	77	92
63 (G2)	138	126	91	83

Legenda: C: Controle (AMR); A: Exposição a NP Cr₂O₃ na concentração de 5 mg.L⁻¹ em AMR.

Os resultados encontrados no presente estudo sugerem que de forma crônica as NP Cr₂O₃, na concentração estudada, parecem ser pouco influentes sobre os parâmetros avaliados, resultados diferentes foram encontrados por Costa (2014) que verificou influência das NP de Cr₂O₃ (procedência comercial) sobre a longevidade de *D. magna* com altas taxas de mortalidade e influência significativa também sobre o comprimento e reprodução. Resultados também diferentes foram encontrados por Puerari (2014) utilizando NP de Cr₂O₃ sintetizadas de maneira semelhante ao do presente estudo, onde as NP influenciaram a longevidade de *D. magna* e apresentaram diferenças morfológicas quando expostas já a concentrações muito baixas (0,5 mg.L⁻¹).

Os valores dos parâmetros pH e OD mensurados semanalmente e temperatura e salinidade mensurados diariamente são apresentados no Apêndice I. Analisando esses resultados é possível inferir que estes parâmetros mantiveram-se dentro do aceitável para o cultivo de *Mysidopsis juniae*.

5.3 QUANTIFICAÇÃO DOS ÍONS CROMO

A quantificação dos íons mostrou que em AMR na mesma concentração utilizada no teste crônico (5 mg.L⁻¹) e nas concentrações utilizadas nos testes agudo

(25 mg.L⁻¹, 50 mg.L⁻¹, 75 mg.L⁻¹, 100 mg.L⁻¹ e 125 mg.L⁻¹) existe majoritariamente a liberação de íons Cr (VI), enquanto que para os íons (III) o resultado em todas as concentrações foi menor ou igual a 0,03 mg.L⁻¹. Os resultados da quantificação dos íons e do cromo total são mostrados na Tabela 5 e os laudos emitidos pelo laboratório onde foram realizadas as análises estão no ANEXO A.

Tabela 5: Resultados da quantificação dos íons (III) e (VI) e do cromo total nas concentrações e no mesmo meio de dispersão (AMR) utilizado nos testes toxicológicos.

Parâmetro	Concentração NP (mg.L ⁻¹)	5	25	50	75	100	125
Cromo Hexavalente*		0,25	0,90	1,94	2,90	3,39	4,46
Cromo Trivalente*		0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03	<0,03
Cromo Total*		0,282	0,900	1,939	2,895	3,388	4,460

Fonte: Laboratório terceirizado.

*Valores expressos em mg.L⁻¹.

Considerando a legislação nacional de padrões de lançamento de efluentes os valores de cromo hexavalente encontrados estão todos acima do limite permitido pela resolução CONAMA 430/2011, que é de 0,1 mg L⁻¹, pois já é conhecido o seu grande potencial carcinogênico e elevada toxicidade. A concentração de 25 mg L⁻¹ de NP, por sua vez, já quase corresponde ao máximo permitido como padrão de qualidade de águas salinas classe II para cromo total (1,1 mg L⁻¹) definido pela CONAMA 357/2005.

Para a quantificação realizada no laboratório de apoio, as amostras passam por uma preparação específica (digestão ácida), portanto a concentração de Cr (VI), de fato biodisponível, no momento dos testes agudos e do crônico, poderia ser diferente que os respectivos valores encontrados em cada concentração de NPs analisada no laboratório de apoio. Entretanto, o estudo de Lussier *et al.*, (1985) encontrou para *Mysidopsis bahia* uma CL_{50(96h)} de 2,03 mg L⁻¹ de Cr (VI), o que é indicativo da possível semelhança da quantificação realizada em laboratório terceirizado com a quantidade de íons disponível de fato, no momento dos testes,

considerando os valores de toxicidade aguda das NP encontrada no presente estudo.

Moura (1997) ainda cita que normalmente os íons de cromo encontram-se na forma trivalente, mas que podem ser convertidos a cromo hexavalente sob condições ácidas (como na preparação da amostra para quantificação) e na presença de matéria orgânica (como nas condições de exposição durante os testes, devido a presença dos organismos).

Jackson *et al.*, (2009) cita que a aglomeração das nanopartículas impediria a absorção e consequente distribuição para outros órgãos, devido ao grande tamanho do complexo, formado pela aglomeração o mesmo permanece no estômago, dos organismos, por exemplo, com *Daphnia magna*.

Complementando esta dedução está o fato de a quantificação mostrar que ocorre a liberação de íons (VI), que são considerados extremamente tóxicos, assim, pode-se atribuir possivelmente a totalidade da toxicidade encontrada nos testes agudos aos íons (VI), já disponíveis no meio de dispersão e não propriamente a ação das NP dentro dos organismos.

Os resultados da quantificação de Cr (VI) por Espectrofotometria – UV, no estudo de Costa (2014) evidenciaram que a redução de tamanho da partícula causa maior liberação de íons (VI). Sendo este, possivelmente, a principal causa da maior toxicidade das NP de Cr₂O₃ (tamanho de partícula de 66,8 nm) quando comparado com o mesmo composto em escala micrométrica (50 µm). No presente estudo a liberação de íons (VI) foi muito maior que no trabalho de Costa, confirmando que inclusive a diferença de tamanho dentro da escala nanométrica (tamanho da partícula no presente estudo, 21,8 nm) teria grande influência sobre a liberação de íons e consequentemente aumento da toxicidade.

A precipitação das NP (provável resultado da aglomeração) foi observada em todas as concentrações em todos os testes, agudos ou crônico, o que indica que a toxicidade do íon é que estaríamos avaliando e não mais da NP propriamente dita, porém é necessário considerar que estes íons são provenientes das NP, como consequência de suas características no meio de dispersão, então indiretamente qualquer toxicidade causada, ainda que somente pelo íon, faz parte da toxicologia das NP.

Para as NP Cr₂O₃ dispersas em meio marinho parece haver um balanço entre a aglomeração que tenderia a diminuir a toxicidade das NP e a instabilidade que

poderia favorecer a liberação de íons aumentando a toxicidade, obtendo assim, um valor de toxicidade não muito baixo e não muito alto, mas que devido a esta liberação de íons (principalmente (VI)) requer maior atenção.

A espécie hexavalente do cromo pode acumular-se no organismo. A Organização Mundial de Saúde (WHO) através do Programa Internacional de Segurança revelou que o Cr (VI) causou vários danos genéticos em testes de mutagenicidade de curto prazo (WHO, 1988). Portanto, reforça-se, principalmente devido aos íons (VI), a importância de controle no uso e descarte em níveis adequados no meio ambiente de NP Cr₂O₃.

O fato de haver a formação de Cr (VI) que é conhecidamente carcinogênico nos remete à importância de que embora tenha-se encontrado influência significativa apenas no parâmetro mortalidade na 2ª geração avaliada no teste crônico, não pode-se dizer que na concentração de 5 mg.L⁻¹ o cromo não é tóxico para as outras gerações estudadas ou para gerações subsequentes. Para tal, devendo assim, ser realizada a avaliação de outros parâmetros, por exemplo, alterações no DNA.

Assim, a NP Cr₂O₃ pode se acumular nos organismos, principalmente na forma íons de cromo hexavalentes, e não propriamente na forma de NP, bioacumulando, e possivelmente acarretando uma contaminação por biomagnificação nas cadeias tróficas, como por exemplo, a dos misidáceos, processo que resulta em altos níveis do contaminante nas espécies superiores, potencializando assim a toxicidade.

6. CONCLUSÕES

O microcrustáceo marinho *Mysidopsis juniae* mostrou-se um organismo adequado para avaliação da toxicidade de NP Cr₂O₃ em matriz marinha, pois mostrou resultados consistentes nos testes toxicológicos.

As partículas de óxido de cromo III sintetizadas de fato encontravam-se em escala nanométrica, apresentando diâmetro médio do cristalito de 21,8 nm.

As imagens de MET e MEV-FEG mostraram a formação de grandes aglomerados de NP, principalmente em AMR, o que foi confirmado pelo grande diâmetro hidrodinâmico (2545,0 nm) e pela instabilidade (Pz de -7,68 mV) sendo a elevada tendência a aglomeração, possivelmente estar relacionada a diminuição da toxicidade e o aumento na liberação de íons, possivelmente relacionado a elevação da toxicidade.

. A avaliação da toxicidade aguda da NP Cr₂O₃ mostrou que a partir de 25 mg.L⁻¹ a mortalidade sempre ocorre e abaixo de 5 mg.L⁻¹ não houve mortalidade em exposição aguda, já a concentração onde sempre ocorre mortalidade total dos organismos é de 125 mg.L⁻¹. A CL_{50(96h)} para NP Cr₂O₃ encontrada foi de 58,8 ± 7,8 mg.L⁻¹.

A avaliação da toxicidade crônica mostrou que para os parâmetros avaliados (biometria, natalidade e mortalidade) e pelo período estudado não houveram diferenças significativas entres os organismos que foram expostos a concentração de 5 mg.L⁻¹ de NP Cr₂O₃ e os organismos do controle negativo para todas as gerações estudadas, sendo a única exceção a mortalidade para a geração 2 de organismos expostos, o que pode indicar que em gerações futuras os organismos parecem ficar mais sensíveis a exposição levando a uma maior mortalidade.

A quantificação dos íons de cromo mostrou que existe majoritariamente a liberação de íons Cr (VI), por Espectrofotometria – UV, enquanto que para os íons Cr (III), após cálculo, o resultado em todas as concentrações foi menor ou igual o limite de detecção do ICP para cromo total que é de 0,03 mg.L⁻¹.

7. RECOMENDAÇÕES

- Verificar através de imagens ou quantificação *in vivo*, por exemplo, se de fato a alta aglomeração em meio marinho impediu que as NP Cr₂O₃ fossem absorvidas pelo *Mysidopsis juniae* com consequente acúmulo neste organismo.
- Realização de testes crônicos que avaliem uma maior parte do ciclo de vida das gerações subsequentes e por um maior número de gerações futuras, assim como em maiores concentrações de exposição às NP Cr₂O₃, o que justifica-se pelo achado de maior sensibilidade a exposição apenas após a 2ª geração de organismos expostos às NP Cr₂O₃.
- Devido a observações pontuais feitas no teste agudo sobre a mobilidade dos organismos, recomenda-se a avaliação deste parâmetro em testes crônicos com NP Cr₂O₃. Assim como o parâmetro mutagenicidade já que no presente estudo foram quantificadas quantidades expressivas de cromo hexavalente.
- Avaliação de toxicidade aguda e crônica com NP Cr₂O₃ também em outros níveis tróficos.
- Estudo de liberação de íons e toxicidade com o *Mysidopsis juniae* também com o óxido de cromo na escala micrométrica.

8. REFERÊNCIAS

- ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **Panorama da Nanotecnologia**. Brasília. 2010.
- ABNT – ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15.308: Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com misídeos (Crustacea)**. Rio de Janeiro, 2011.
- ADAMS, W. J.; ROWLAND, C. D. (2002) Aquatic toxicology test methods. *In Handbook of ecotoxicology*, Hoffmann, D. J.; Rattner, B. A.; Burton Jr., G. A.; Cairns Jr., J., Eds. CRC Press: Florida, 2002.
- ARAGÃO, A. M.; ARAÚJO, A. P. R. Métodos de ensaios de toxicidade com organismos aquáticos. *In ZAGATTO, P.A. & BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática – Princípios e Aplicações*. Editora Rima, São Carlos. p. 117-152. 2006.
- ARFSTEN, D.P.; AYLWARD, L. L.; KARCH, N. J. Chromium. *In: ZELIKOFF, J. T.; THOMAS, P. T. Immunotoxicology of environmental and occupation metals*. London: Taylor & Francis, 1998. p. 63-92.
- ATSDR – AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY. **Toxicological profile for chromium**. Syracuse: U.S. Department of Health & Human Services, 2000.
- BADARÓ-PEDROSO, C.; REYNIER, M. V.; PRÓSPERI, V. A. Testes de toxicidade aguda com misidáceos - Ênfase nas espécies *Mysidopsis juniae* E *Mysidium gracile* (Crustacea: Mysidacea). *In: I. A. Nascimento, E. C. P. M. Sousa, et al., (Ed.). Métodos em Ecotoxicologia Marinha - Aplicações no Brasil*. São Paulo: Artes Gráficas, 2002.
- BAÑOBRE-LÓPEZ, M.; VÁZQUEZ-VÁZQUEZ, J. R.; LÓPEZ-QUINTELA, M. A. Magnetic properties of Chromium (III) oxide nanoparticles. **Nanotechnology** 14, p318-322. 2003.
- BAROLI, B. M. Skin Absorption and Potential Toxicity of Nanoparticulate Nanomaterials. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, Valencia, v. 6, n. 5, p. 485-496(12) 2010.
- BEDÊ, P. M. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para utilização biomédica**. Dissertação (Mestrado) - Instituto Militar de Engenharia. 73 p. 2010.

BERDAHL, P. Pigments to Reflect the Infrared Radiation from Fire. **Journal Heat Transfer**, v. 117, n. 2, p. 355, 1995.

BLAISE, C.; CAGNÉ, F.; EULLAFFROY, P.; FÉRARD, J.-F. Ecotoxicity of selected pharmaceuticals of urban origin discharged to the Saint-Lawrence river (Québec, Canada): A review. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**. Issue 2, v.10, p.29-51, 2006.

BLINOVA, I.; IVASK, A; HEINLAAN, M.; MORTIMER, M.; KAHRU, A. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. **Environmental pollution** (Barking, Essex : 1987), England, v. 158, n. 1, p. 41–47, 2010.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. **Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia**. Disponível em: <<http://www.mct.gov.br/index.php.content/view/348956.html>>, acesso em: 13 Jan. 2015.

BROCK, T.; GROTEKLAES, M.; MISCHKE, P. **European Coating Handbook**. Hanover, Germany: Vincentz Verlag, 2000.

BUFFET, P. E.; TANKOUA O. F; PAN, J. F.; BERHANU, D.; HERRENKNECHT C. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. **Chemosphere** 84: 166–174.2011.

BYRNE, J. D.; BAUGH, J. A. The significance of nanoparticles in particle-induced pulmonary fibrosis. **McGill Journal of Medicine** n. 11, p. 43-50, 2008.

CHASIN, A. A. M.; PEDROZO, M. F. M. O Estudo da toxicologia. *In*: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (Org.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. Editora Rima, São Paulo, São Carlos. p. 01-25. 2004.

CHAU, C.F.; WU, S. H.; YEN, G. C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007.

CLÉMENT, L. HUREL, C. MARMIER, N. Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans algae, rotifers and plants – Effects of size and crystalline structure. **Chemosphere**. v90. pg. 1083–1090, 2013.

COMPANHIA AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO. CETESB L5.251: Água do Mar – Teste de Toxicidade Aguda com *Mysidopsis juniae* SILVA, 1979. São Paulo, 1992.

CONAMA - Conselho Nacional do Meio Ambiente. Resolução nº 357/05. Estabelece a classificação das águas doces, salobras e salinas do Território Nacional. Brasília, SEMA, 2005.

_____. Resolução nº 430/11. Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução nº 357, de 17 de março de 2005. Brasília, SEMA, 2011.

COSTA, C. H. **Avaliação toxicológica da nanopartícula de óxido de cromo III através de ensaios in vivo e in vitro.** Tese do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. UFSC, Florianópolis, 2014.

COSTA, R. C. C.; ARAUJO, A. N. Determinação de baixas concentrações de cobre em águas naturais por espectrofotometria de absorção atômica em chama usando um sistema SIA com uma coluna de poli (etilenimina). **Química Nova**, São Paulo, v. 24, n. 5, p. 588-591, 2001.

DOMINGUES, D. e BERTOLETTI, E. Seleção, Manutenção e Cultivo de Organismos Aquáticos. In: ZAGGATO, P., BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações.** Ed. Rima, São Paulo, 2006.

ENGELMANN, W. e PULZ, R. L. As nanotecnologias no panorama regulatório: entre a ausência de regulação estatal específica e a necessidade de harmonização regulatória não estatal. **Revista Iberoamericana de Filosofía, Política y Humanidades**, año 17, nº 33. Pg. 151-181. 2015

EVANS, M. S.; BATHELT, R. W.; RICE, C.P. PCBs and other toxicants in Mysis relicta. **Hydrobiologia**, v. 10, p. 205-21, 1982.

FERGUSON, T. J. Cromo. In: **Manual de Toxicologia Clínica.** OLSON, K. *et al.* LLC, New York, 2012.

FERNICOLA, N. A. G. G.; BOHRER-MOREL, M. B. C.; BAINY, A. C. D. Ecotoxicologia. In: AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. (Org.). **As bases toxicológicas da ecotoxicologia.** Editora Rima, São Paulo, São Carlos. p. 221-243. 2004.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: Aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 7, 1860-1870, 2009.

FISCHER, H. C.; CHAN, W. C. W. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study Chemical Biotechnology / **Pharmaceutical Biotechnology**, v. 18, n. 6, p. 565–571, 2007.

FORBES V.E., FORBES T.L., **Ecotoxicologie - théorie et applications (traduit en française).** Edition de l'Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1997.

FREITAS, C.M. Problemas ambientais, saúde coletiva e ciências sociais. **Ciência e Saúde Coletiva**. Rio de Janeiro, v.8, n.1, p.137-150, 2003.

GIBOT, P. e VIDAL, L. Original synthesis of chromium (III) oxide nanoparticles. **J. Eur. Ceram. Soc.**, 30(4): 911-915. 2010.

GINÉ, M. F. **Espectrometria de emissão atômica com plasma acoplado indutivamente.** Série didática, CENA, v.3. Piracicaba 1998.

GONÇALVES, R. A. **Toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre ao organismo marinho *Mysidopsis juniae* (SILVA, 1979)**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Saúde e Meio Ambiente - Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE, Joinville, 2014.

GUPTA, R.K.; MITCHELL, E.; CANDLER, J.; KAHOL, P.K.; GHOSH, K.; DONG, L. Facile synthesis and characterization of nanostructured chromium oxide, **Powder Technology**, v. 254, p.78–81, 2014.

HANDY, R. D.; KAMMER, F. V. D.; LEAD, J. R.; HASSELLO, M.; OWEN, R.; CRANE, M. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. **Ecotoxicology**. New York, v. 17, n. 4, p. 287-314, 2008.

HOET, P. H. M.; BRÜSKE-HOHLFEL, I.; SALATA, O. V. Nanoparticle – Known and unknown health risks. **Journal of Nanobiotechnology** 2:12. 2004.

HOFFMANN, D. J., RATTNER, B. A., BURTON, A. A. & CAIRNS Jr., F. **Handbook of ecotoxicology**. Boca Raton, Florida: LEE Lewis Publishers, 1995.

HUSSAIN, S. M.; HESS, K. L.; GEARHART, J. M.; GEISS, K. T.; SCHLAGER, J. J. In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells, **Toxicology In Vitro**, n. 19 p. 975–983, 2005.

IHARA, P. M.; G. L.; PINHO, G. L. L.; FILLMANN, G. Avaliação do Copépodo *Acartia tonsa* (Dana, 1849) como Organismo-Teste para Ensaio de Toxicidade Crônica. **Journal of the Brazilian Society of Ecotoxicology**, Itajaí, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2010.

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

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO/TR 13014. Nanotechnologies - Guidance on physicochemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment. 2012.

_____. ISO/TR 16197. Nanotechnologies - Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials. 2014.

JACKSON, P. B.; PACE, H. E.; LANZIROTTI, A.; SMITH, R.; RANVILLE, J. F. Synchrotron X-ray 2D and 3D elemental imaging of CdSe/ZnS quantum dot nanoparticles in *Daphnia magna*. **Anal Bioanal Chem**. 394:911–917. 2009.

KAWABATA, A.; YOSHINAKA, M.; HIROTA, K.; YAMAGUCHI, O. Hot Isostatic Pressing and Characterization of Sol-Gel-Derived Chromium (III) Oxide. **Journal American Ceramic Society**, v. 78, n. 8, p. 2271-2273, 1995.

KITSUNAI, H.; HOKKIRIGAWA, K.; TSUMAKI, N.; KATO, K. Transitions of microscopic wear mechanism for Cr₂O₃ ceramic coatings during repeated sliding observed in a scanning electron microscope tribosystem. **Wear**, v. 151, n. 2, p. 279-289, 1991.

KRUG, H. Nanosafety research – Are we on the right track? **Angew. Chem. Int. Ed.** 53, 12304-12319. 2014.

LALAU, C. M.; MOHEDANO, R. A.; SCHMIDT, E.; BOUZON, Z. L.; OURIQUES, L. C.; COSTA, C. H. ; VICENTINI, D. S.; MATIAS W. G . Toxicological effects of copper oxide nanoparticles on the growth rate, photosynthetic pigment content and cell morphology of the duckweed *Landoltia punctata*. **Protoplasma**, v. 1, p. 1, 2014.

LEE J. D. **Química inorgânica**, Edgard Blucher Ltda, São Paulo, São Paulo, 1980.

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.

LIU, H.; TAO, J.; XU, J.; CHEN, Z.; GAO, Q. Corrosion and tribological behaviors of chromium oxide coatings prepared by the glow-discharge plasma technique. **Surface and Coating Technology**, n. 204 p. 28–36, 2009.

LUSSIER, S.M.; GENTILI, J. H.; WALKER, J. Acute and chronic effects of heavy metals and cyanide on *Mysidopsis bahia* (crustacea:mysidacea). **Aquatic Toxicology**. V. 7, Pg. 25–35. October 1985.

KLEINE, T.; GONÇALVES, R. A.; BÖHM, R. F. S.; TORTELLI, T. S.; SPITZNER, E. C.; OLIVEIRA, T. M. N.; MATIAS, W. G. Otimização de parâmetros físico-químicos para o cultivo de *Mysidopsis juniae* (Silva, 1979) em laboratório *In: XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia*, Bombinhas, 2010.

MAGALHÃES, D. P. & FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**. n. 12, v. 3, p. 355-381, 2008.

MANZOORI, J. L, SOROURADDIN, M. H.; SHEMIRAN, F. **Anal. Lett**, 29(11) (1996) 2007.

MALISKA, A. M. **Microscopia eletrônica de varredura**. 2011. Disponível em: http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_index.htm. Acesso em: 13 fev. 2014.

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

MANAHAN, S. E. Poluição da água. *In: MANAHAN, S. E. Química ambiental*. Editora Bookman, Porto Alegre, p. 186-232. 2013.

MANNHEIMER, W. A. **Microscopia dos materiais – uma introdução**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Microscopia e Microanálise. 126 p. 2002.

MATHIAS, F. T.; ROMANO, M. A.; ROMANO, R. M. Avaliação dos Efeitos Toxicológicos e Ambientais de Nanopartículas de Sais de Prata. **Rev Ciênc Farm Básica Apl**.35(2):187-193. 2014

MATIAS, W. G. **Introdução a Toxicologia**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFSC, Florianópolis. 2005.

MEDEIROS, A. M. L. **Síntese e caracterização de nanopartículas de Cr₂O₃ através do método sol-gel proteico**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais. Fortaleza, 2007.

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

MILACIC, R.; STUPAR, J. Fractionation and oxidation of chromium in tannery waste- and sewage sludge-amended soils. **Environmental Science and Technology**, Easton, v.29, n.2, p.506-514, 1995.

MOORE, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment international**, v. 32, n. 8, p. 967–76, 2006.

MOURA, M. C. P. A. **Otimização do Processo de Recuperação do cromo de Efluentes e Curtumes por Microemulsões no Extrator Morris**. Dissertação de Mestrado, UFRN, Programa de Pós Graduação em Engenharia Química, Área de Concentração: Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias Regionais, Natal/RN, Brasil, 1997.

NASCIMENTO, L. F. C.; PEREIRA, L. A.; BRAGA, A. L. F.; MÓDOLO, M. C. C.; CARVALHO JUNIOR, J. Andrade. Efeitos da poluição atmosférica na saúde infantil em São José dos Campos, SP. **Rev. Saúde Pública**, São Paulo, v.40, n.1, p.77-82, 2006.

NIMMO, D. R. and HAMAKER, T. L. Mysids in toxicity testing - a review. **Hydrobiologia**, v. 93, n. 1-2, p. 171-178, 1982.

NNI – National Nanotechnology Initiative. **What is nanotechnology?** United States National Nanotechnology Initiative, 2013. Disponível em: <<http://www.nano.gov/nanotech-101/nanotechnology-facts>> Acesso em 23/02/2014.

NOWACK, B. & BUCHELI, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environ. Pollut.** n. 150, p. 5–22, 2007.

OBERDÖRSTER, G. K.; KANE, A.B.; KLAPER, R.D.; HURT, R.H. Nanotoxicology. In: Klaassen, C.D. (ed), Casarett and Doull's toxicology: **The basic science of poisons**. New York: McGraw-Hill, pp. 1189-1229. 2013.

OLIVEIRA, T. M. N. de.; TURECK, J. C.; BASSFELD, B. M. O.; TORRENS, J. M. Faria.; K. BRASIL. Integridade Ambiental da Baía da Babitonga: Características físico-químicas, microbiológicas e Ecotoxicidade. P 49-60. In: CREMER, M. J.; OLIVEIRA, T. M. N. de.; MORALES, P. R. D. [Eds]. **Diagnóstico ambiental da Baía da Babitonga**. Joinville, SC: UNIVILLE. 2006.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Working Party on Manufactured Nanomaterials**. 2006.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, São Paulo, v.33 n.2, 2010.

PERKEL, J. M. Nanoscience is out of the bottle. **The Scientist**, Midland, v. 17 n. 15, 2003.

PERREAULT, F.; OUKARROUM, A.; MELEGARI, S. P.; MATIAS, W. G.; POPOVIC, R. Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Chemosphere**, Los Angeles, v. 87, n. 11, p. 1388–1394, 2012.

PISCOPO, M. R.; KNISS, C. T.; BIANCOLINO, C. A.; TEIXEIRA, C. E. O setor brasileiro de nanotecnologia: Oportunidades e desafios. **Revista de Negócios**. vol. 19, n. 4, p. 43_63. 2014

PORTAL BRASIL. **Sítio de Notícias em Ciência e Tecnologia**. Disponível em:< <http://www.brasil.gov.br/ciencia-etecnologia/2014/08/comite-de-nanotecnologia-aprova-adesao-dobrasil-ao-nanoreg>>. Acesso em: 02 fev. 2015.

PUERARI, R. C. **Avaliação toxicológica de nanopartículas de óxido cromo III em microcrustáceo *Daphnia magna*, bactéria *Aliivibrio fischeri* e semente de *Lactuca sativa***. Monografia do Curso de Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental. UFSC, Florianópolis, 2014.

QUINA, F. Nanotecnologia e meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27 n. 6, p. 1028-1029, 2004.

RASHBA, Z; GAMOTA, D. Anticipatory standards and the commercialization of nanotechnology. **Journal of Nanoparticle Research**, Piscataway, v.5, n. 3-4, p. 401-407, 2003.

RESGALLA JÚNIOR, C.; LAITANO, K. S. Sensibilidade dos organismos marinhos utilizados em testes de toxicidade no Brasil. Notas técnicas FACIMAR – **Rev. Faculdade de Ciências do Mar**, Itajaí. v. 6, p. 153-163, 2002.

ROBERTSON, T. A.; SANCHEZ, W. Y.; ROBERTS, M. S. Are Commercially Available Nanoparticles Safe When Applied to the Skin? **Journal of Biomedical Nanotechnology**, Valencia, v. 6, n. 5, p. 452-468(17), 2010.

ROCHA, J. C.; ROSA, A. H.; CARDOSO, A. A. **Introdução à Química Ambiental**. 1. ed. Porto Alegre: Bookman, 2004.

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

ROYAL SOCIETY AND ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. RS policy document 19/04. London: The Royal Society; p. 113. 2004.

RUPPERT, E. B. & BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados**: Uma abordagem funcional evolutiva. 7. ed. São Paulo: ROCA. p. 759-761, 2005.

SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 20-31, 2007.

SCHERINGER, M. Environmental Risks of Nanomaterials. **Nat. Nanotechnol**, n. 3, p. 322-323, 2008.

SCHIRMER W. N. *et al.* **A Química Ambiental do Cromo e seus compostos**. [Resumo]. VII Semana de Engenharia Ambiental, 2009.

SILVA, C. S., PEDROSO, M. F. M. Ecotoxicologia do cromo e seus compostos, **Caderno de referência ambiental**, vol. 5, centro de Recursos Ambientais, Salvador, BA, 2001.

SILVA, G. L. **Nanotecnologia: a outra face da moeda**. São Paulo: USP, 2010.

STORER, T. I. **Zoologia geral**. 6. ed. São Paulo, SP: CEN, 2007.

SUPPAN, S. **Nanomaterials in soil. Our future food chain?** Institute for Agricultural and Trade Policy. 2013. Disponível em:< <http://www.iatp.org/documents/nanomaterials-in-soil-our-future-food-chain>>. Acesso em: 02 jul. 2015.

TOMA, H. E. **O mundo nanométrico: a dimensão do novo século**. Editora Oficina de Textos. 2004.

VAITSMAN, D. S.; AFONSO, J. C.; DUTRA, P. B. Para que servem os elementos químicos. **Interciência**, Rio de Janeiro, 2001.

VAZ, C.; BÖHM, R.F.S.; GONÇALVES, R.A.; OLIVEIRA, T.M.N.; MATIAS, W.G. Assessment of chronic toxicity in water samples from the Babitonga Bay – south of Brazil – using transgenerational testing with *Mysidopsis juniae*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v. 22, p. 1967-1976, 2013.

VAZ, C. **Desenvolvimento de metodologia para teste de toxicidade crônica com *Mysidopsis juniae* (silva, 1979) para aplicações em análises de ambientes marinhos**. Tese de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2012.

VIEIRA, F. C. S. **Toxicidade de Hidrocarbonetos Monoaromáticos do petróleo sobre *metamysidopsis elongata atlântica* (Crustácea: Mysidacea)**. Dissertação

de mestrado do Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental - Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, 2004.

WHO – World Health Organization. **Chromium**. Geneva, 1988.

WIECHERS, J. W.; MUSEE, N. Engineered Inorganic Nanoparticles and Cosmetics: Facts, Issues, Knowledge Gaps and Challenges. **Journal of Biomedical Nanotechnology**. v. 6, n. 5, p. 408-431, 2010.

WILLIAMS, D. B., CARTER C. B. Transmission Electron Microscopy. **A Text Book for Materials Science**, Springer. 2 ed. New York, 2009.

WIŚNIEWSKA, M. & SZEWCZUK-KARPISZ, K. Removal possibilities of colloidal chromium (III) oxide from water using polyacrylic acid. **Environ Sci Pollut Res Int**. 3657–3669. 2013.

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

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

ZHANG, Y. F.; LOU, Z. S.; CHEN, Q. W. A solvothermal-reduction approach to. Cr_2O_3 crystalline nanotubes synthesis. **Chinese Journal of Inorganic Chemistry**, n. 20, p. 971–974, 2004.

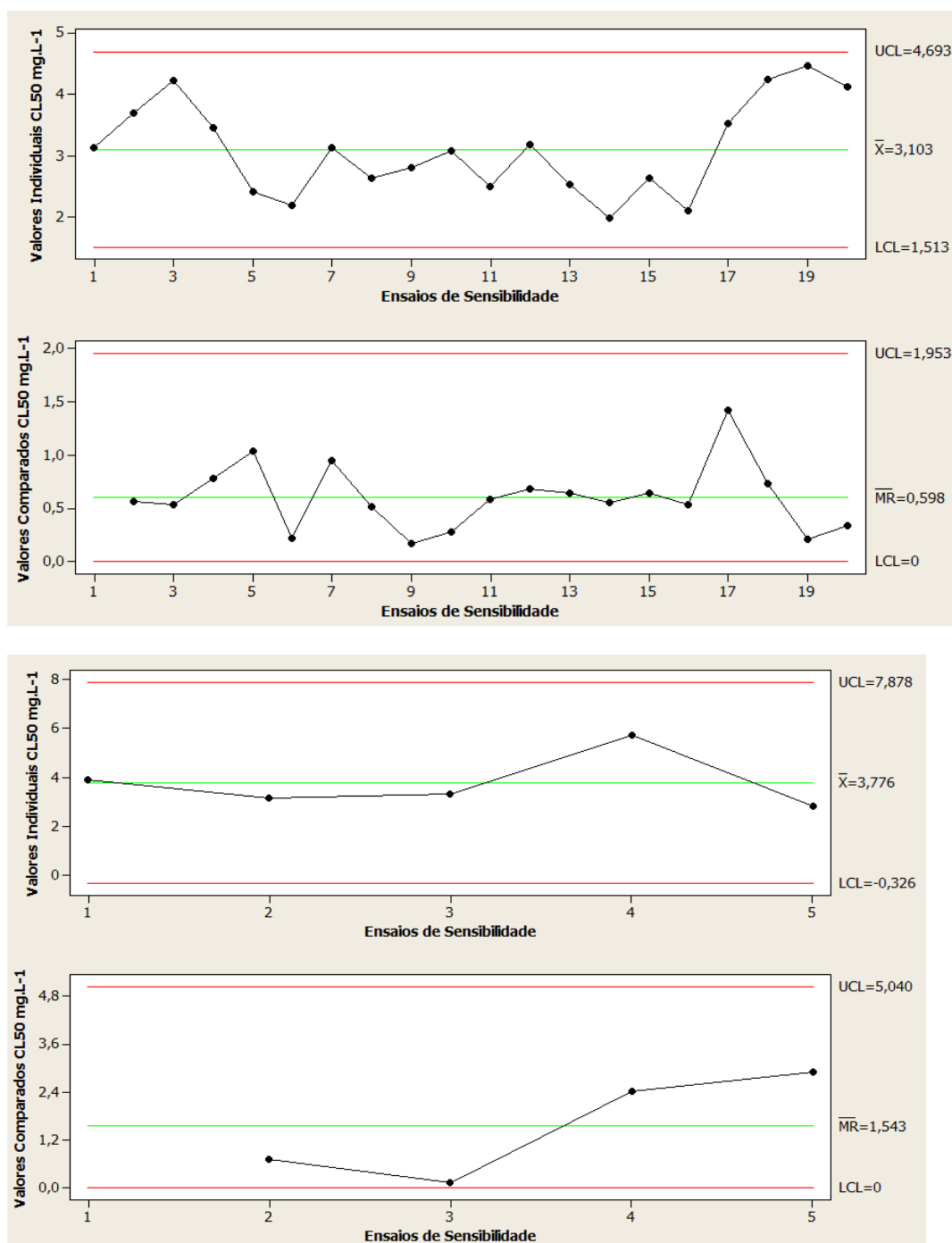
ZHU, K.; YUE, B.; ZHOU, W.; HE, H. Preparation of three-dimensional chromium oxide porous single crystals templated by SBA-15. **Chemical Communications**, n. 1, p. 98-99, 2003.

9. APÊNDICES

APÊNDICE A - Cultivo *M. juniae* – Laboratório de toxicologia ambiental – Univille – SFS/SC.



APÊNDICE B: Cartas controle geradas a partir dos resultados de CL_{50} válidos obtidos nos testes agudos realizados com a substância de referência (DSS), atestando a sensibilidade adequada dos organismos utilizados nos testes com amostras e controle positivo. A média da $CL_{50(96h)}$ referente ao período de desenvolvimento do presente trabalho para o DSS: foi de $3,37 \text{ mg.L}^{-1}$.



*Foram elaboradas duas cartas controle para verificar a sensibilidade dos organismos durante todo o período de realização de testes já que a NBR 15.308 define que cada carta controle tenha de 5 a 20 pontos.

APÊNDICE C - Resultados dos parâmetros de pH e OD da AMR e solução estoque realizados ao início de cada teste e ao final no controle negativo e nas cinco concentrações trabalhadas nos ensaios com controle positivo (Dicromato de potássio).

Parâmetro	Concentração (mg.L ⁻¹)						MÉDIA
pH	AMR (0)	8,11	8,11	8,02	8,02	8,10	8,07
OD	AMR (0)	8,17	8,17	8,10	8,10	8,08	8,12
pH	Estoque (200)	7,05	7,05	6,95	6,95	6,98	7,00
OD	Estoque (200)	8,25	8,25	8,01	8,01	8,22	8,15
pH	Controle Negativo (0)	8,02	8,05	7,94	8,02	7,99	8,00
	7,5	7,95	7,90	7,90	7,87	7,95	7,91
	10	7,92	7,94	7,92	7,91	7,97	7,93
	12,5	7,91	7,92	7,89	7,92	7,98	7,92
	15	7,85	7,85	7,98	7,87	8,01	7,91
	20	7,87	8,01	8,01	7,90	7,98	7,95
OD	Controle Negativo (0)	7,90	7,69	7,49	7,57	7,65	7,66
	7,5	7,63	7,55	7,35	7,63	7,47	7,53
	10	7,59	7,32	7,27	7,25	7,52	7,39
	12,5	7,42	7,81	7,32	7,39	7,56	7,50
	15	7,61	7,73	7,50	7,47	7,40	7,54
	20	7,25	7,69	7,21	7,56	7,55	7,45

APÊNDICE D - Resultados dos parâmetros de pH e OD da AMR e solução estoque realizados ao início de cada teste e ao final no controle negativo e nas cinco concentrações trabalhadas nos ensaios agudos com NP Cr₂O₃.

Parâmetro	Concentração (mg.L ⁻¹)	INÍCIO DO TESTE										MÉDIA
pH	AMR (0)	8,11	8,11	8,10	8,10	8,10	8,10	8,10	7,95	8,12	8,12	8,09
OD	AMR (0)	8,97	8,97	8,13	8,13	8,13	8,13	8,13	7,87	7,67	7,67	8,18
pH	Estoque (1000)	7,15	7,15	7,43	7,43	7,43	7,43	7,43	7,32	7,17	7,17	7,31
OD	Estoque (1000)	8,57	8,57	8,31	8,31	8,31	8,31	8,31	7,97	8,05	8,05	8,28
FINAL DO TESTE												
pH	Controle Negativo (0)	7,84	7,69	7,83	7,83	7,83	7,97	7,95	7,92	7,92	7,85	7,86
	25	7,89	7,73	7,97	7,93	7,91	7,82	7,92	7,86	7,85	7,87	7,88
	50	7,81	7,82	7,96	7,97	7,99	7,94	7,89	7,94	7,91	7,89	7,91
	75	7,83	7,80	7,88	7,94	7,97	7,83	7,91	7,80	7,98	7,86	7,88
	100	7,84	7,81	7,86	7,92	7,93	7,90	7,93	7,85	7,94	7,92	7,89
	125	7,82	7,84	7,77	7,87	7,91	7,89	7,94	7,79	7,92	7,94	7,87
FINAL DO TESTE												
OD	Controle Negativo (0)	6,97	7,15	7,04	7,04	7,04	7,13	6,75	7,05	6,75	6,97	6,99
	25	7,36	6,78	7,25	7,17	7,01	7,02	6,82	6,65	6,59	7,13	6,98
	50	7,16	7,52	7,20	7,18	7,12	6,87	7,01	6,67	6,71	6,72	7,02
	75	7,37	7,25	7,08	7,23	6,95	6,47	6,54	6,16	7,69	6,23	6,90
	100	7,14	7,25	7,13	7,31	7,26	6,87	6,72	6,16	6,59	6,57	6,90
	125	7,21	7,59	6,80	6,98	7,05	6,77	6,32	5,69	6,94	6,78	6,81

APÊNDICE E: Comprimento padrão dos organismos (G0) em milímetros (mm) mensurados semanalmente até o 63º dia de teste crônico.

	CI	CII	AI	AII
7 dias	2,65	2,7	2,55	2,65
	2,5	2,4	2,75	2,35
	2,75	2,6	3	2,6
14 dias	3,8	3,55	3,4	3,3
	3,45	3,45	3,25	3,75
	3,5	3,3	3,3	3,8
21 dias	3,95	3,45	3,85	3,65
	4,2	3,8	4	3,8
	3,85	3,55	3,75	3,85
28 dias	4,35	3,8	3,9	3,7
	3,9	4,05	3,8	3,85
	4,15	3,85	4	3,9
35 dias	4,05	4	4,2	3,8
	3,6	3,8	4,05	4,1
	3,75	4,1	3,65	3,85
42 dias	4,05	4,2	3,9	3,85
	4,1	4,25	4	3,9
	3,75	4	4,15	4
49 dias	3,95	4,25	4,2	4,25
	4,1	4,15	4,35	4,1
	4	4,25	4,1	4,2
56 dias	3,9	4,15	4,35	4,25
	3,5	4,3	4,15	4,3
	4,05	4,35	3,95	4
63 dias	3,7	3,9	4,2	4,15
	3,8	4,3	3,9	3,9
	4	4,35	3,95	4,25

Legenda: C = controle (apenas meio marinho de cultivo do organismo) A = meio marinho com NP Cr₂O₃ na concentração de 5 mg.L⁻¹.

Apêndice F: Comprimento padrão dos organismos (G1 e G2) em milímetros (mm) mensurados semanalmente até o 21º dia de teste com cada geração.

	CI	CII	AI	AII
1º geração 7 dias (28 dias teste)	2,8	2,5	2,75	2,95
	2,55	3	2,6	2,7
	3	3,2	2,55	2,8

1º geração 14 dias (35 dias teste)	3,5	3,4	3,35	3,65
	3,6	3,3	3,1	3,5
	3,4	3,65	3,2	3,4

1º geração 21 dias (42 dias teste)	3,75	3,9	4,1	3,7
	3,9	3,85	3,8	3,85
	4	3,7	3,9	3,55

2º geração 7 dias (49 dias teste)	2,5	2,6	3,15	2,75
	2,7	2,7	2,4	3,05
	2,55	2,75	2,5	2,4

2º geração 14 dias (56 dias teste)	3,75	3,8	3,2	3,6
	3,6	3,25	3,7	3,75
	3,8	3,6	3,4	3,45

2º geração 21 dias (63 dias teste)	3,85	3,9	3,8	3,6
	4	3,8	3,9	3,8
	3,6	3,95	4	3,85

Legenda: C = controle (apenas meio marinho de cultivo do organismo) A = meio marinho com NP Cr₂O₃ na concentração de 5 mg.L⁻¹.

APÊNDICE G – Mortalidade cumulativa e semanal da geração inicial (G0), no teste crônico, para organismos expostos às NP Cr₂O₃ e não expostos (controle).

Número de Organismos												
Dias de teste	C I	C II	A I	A II	Mortalidade cumulativa				Mortalidade Semanal			
7	80	80	80	78	0	0	0	2,50%	0	0	0	2,50%
14	73	75	76	75	5,19%	2,60%	1,30%	2,60%	5,19%	2,60%	1,30%	0,10%
21	50	51	51	52	7,40%	5,55%	5,55%	3,70%	2,21%	4,25%	4,25%	1,10%
28	47	47	44	45	7,84%	7,84%	13,70%	11,76%	0,44%	2,29%	8,15%	8,06%
35	43	43	41	41	10,41%	10,41%	14,58%	14,58%	2,57%	2,57%	0,88%	2,82%
42	36	36	33	36	20,00%	20,00%	26,66%	20,00%	9,59%	9,59%	12,08%	5,42%
49	30	31	29	32	28,57%	26,19%	30,95%	23,80%	8,57%	6,19%	4,29%	3,80%
56	23	22	26	28	41,02%	43,58%	33,33%	28,20%	12,45%	17,39%	2,38%	4,40%
63	18	19	21	21	50,00%	47,22%	41,66%	41,66%	8,98%	3,64%	8,33%	13,46%

Legenda: C = controle (apenas meio marinho de cultivo do organismo) A = meio marinho com NP Cr₂O₃ na concentração de 5 mg.L⁻¹.

*Todos os organismos retirados para realização da biometria não entraram no cálculo das mortalidades.

APÊNDICE H – Mortalidade cumulativa e semanal das gerações (G1 e G2), no teste crônico, para organismos expostos às NP Cr₂O₃ e não expostos (controle).

Dias de vida organismo		Número de Organismos											
		C I	C II	A I	A II	Mortalidade cumulativa				Mortalidade Semanal			
7 (28 dias de teste)	G1	59	57	60	56	1,66%	5,00%	0,00%	6,66%	1,66%	5,00%	0,00%	6,66%
14 (35 dias de teste)		56	53	56	52	1,75%	7,01%	1,75%	8,77%	0,00%	2,01%	1,75%	2,11%
21 (42 dias de teste)		20	20	20	19	1,75%	7,01%	1,75%	13,77%	0,00%	0,00%	0,00%	5,00%
7 (49 dias de teste)	G2	56	54	51	53	6,66%	10,00%	15,00%	11,66%	6,66%	10,00%	15,00%	11,66%
14 (56 dias de teste)		53	49	48	48	7,01%	14,03%	15,78%	15,78%	0,35%	4,03%	0,78%	4,12%
21 (63 dias de teste)		20	20	20	20	7,01%	14,03%	15,78%	15,78%	0,00%	0,00%	0,00%	0,00%

Legenda: C = controle (apenas meio marinho de cultivo do organismo) A = meio marinho com NP Cr₂O₃ na concentração de 5 mg.L⁻¹.

*Todos os organismos retirados para realização da biometria não entraram no cálculo das mortalidades.

APÊNDICE I - Parâmetros de pH e OD mensurados semanalmente e temperatura e salinidade mensurados diariamente nas duas réplicas do controle negativo e nas réplicas da amostra no ensaio de toxicidade crônica e transgeracional.

AQUÁRIOS G0				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
20/10/14				
Sal	32	32	32	32
°C	23,7	23,9	24,2	24,3
pH	8,17	8,16	8,23	8,27
OD	7,79	7,7	7,88	7,85
21/10/14				
Sal	32	32	32	32
°C	25,6	25,3	25,4	25,6
22/10/14				
Sal	33	33	32	32
°C	25	24,7	24,7	25
23/10/14				
Sal	33	33	32	32
°C	25,3	25	25	25,3
24/10/14				
Sal	33	33	32	31
°C	26,3	26	26	26,2
25/10/14				
Sal	33	33	32	32
°C	26,2	25,9	25,8	25,8
26/10/14				
Sal	33	32	32	32
°C	25,4	25,4	25,6	25,6
27/10/2014 Antes				
Sal	33	32	32	32
°C	25,4	25,3	25,3	25,3
pH	8	8,02	8,11	8,13
OD	7,47	7,52	7,59	7,62
27/10/2014 Depois				
Sal	32	32	31	32
°C	26,1	25,9	26,2	25,9
pH	8,19	8,18	8,2	8,21
OD	7,71	7,75	7,79	7,82

AQUÁRIOS G0				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
28/10/14				
Sal	31	31	31	30
°C	25,8	25,4	25,6	25,5
29/10/14				
Sal	33	33	32	32
°C	25,1	24,8	24,7	24,9
30/10/14				
Sal	31	31	30	30
°C	25	24,7	24,6	24,8
31/10/14				
Sal	33	34	33	33
°C	25	25	24,8	25
01/11/14				
Sal	33	33	33	33
°C	25	24,7	24,8	25
02/11/14				
Sal	34	34	34	34
°C	24,7	24,5	24,6	24,7
03/11/2014 Antes				
Sal	34	34	34	34
°C	24,7	24,9	24,9	25
pH	8,06	8,12	8,16	8,1
OD	7,57	7,62	7,68	7,52
03/11/2014 Depois				
Sal	32	32	32	32
°C	23,1	23,4	24,2	24,5
pH	8,23	8,22	8,16	8,18
OD	7,87	7,82	7,72	7,76

AQUÁRIOS G0				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
04/11/14				
Sal	32	32	31	30
°C	25,9	26	26,1	25,8
05/11/14				
Sal	30	30	30	30
°C	25,5	25,5	25,8	26,1
06/11/14				
Sal	30	30	30	29
°C	24,7	24,7	24,9	24,5
07/11/14				
Sal	30	30	30	30
°C	25,8	25,9	26,1	25,7
08/11/14				
Sal	31	30	30	30
°C	25	25	24,9	24,9
09/11/14				
Sal	30	30	30	30
°C	25,3	25,3	25,4	25,5
10/11/2014 Antes				
Sal	31	30	30	30
°C	24,9	24,9	24,8	24,5
pH	8,14	8,13	8,08	8,15
OD	7,69	7,72	7,87	7,98
10/11/2014 Depois				
Sal	32	32	32	32
°C	24,2	24,1	24,7	24,3
pH	8,32	8,35	8,37	8,35
OD	8,11	7,97	7,94	8,07

ERLEN (FAMÍLIAS G0)				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
03/11/14				
Sal	32	32	32	32
°C	24,1	24,4	24,2	24,2
pH	8,15	8,2	8,12	8,19
OD	7,93	7,82	7,89	7,72
04/11/14				
Sal	32	32	32	31
°C	25,7	26	25,9	26,4
05/11/14				
Sal	30	30	29	29
°C	25,6	25,6	25,6	26
06/11/14				
Sal	30	30	30	29
25,5	25,5	25,7	25,8	26,3
07/11/14				
Sal	30	30	30	30
°C	25,6	26	26	26,6
08/11/14				
Sal	31	30	30	29
°C	24,9	24,9	24,8	24,9
09/11/14				
Sal	31	30	30	30
°C	25,3	25,4	25,4	25,5
10/11/14				
Sal	31	30	30	30
°C	24,9	24,9	24,7	24,5
pH	8,14	8,12	8,08	8,13
OD	7,85	7,76	7,65	7,6

AQUÁRIOS G0				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
11/11/14				
Sal	32	32	32	32
°C	25,5	25,6	25,5	25,3
12/11/14				
Sal	30	30	29	29
°C	26,2	26,2	26,1	25,8
13/11/14				
Sal	32	32	31	31
°C	26,1	26,2	26,1	25,8
14/11/14				
Sal	32	32	31	31
°C	25,8	26	25,9	25,6
15/11/14				
Sal	32	32	31	31
°C	25,9	26,1	25,9	25,8
16/11/14				
Sal	32	32	31	31
°C	26	26,2	25,9	26
17/11/2014 Antes				
Sal	32	32	31	31
°C	25,4	25,4	25,4	25,4
pH	8,15	8,14	7,87	7,89
OD	7,78	7,63	7,81	7,72
17/11/2014 Depois				
Sal	32	32	32	32
°C	25	25	24,7	24,6
pH	8,32	8,35	8,3	8,32
OD	8,07	8,01	7,79	7,84

AQUÁRIOS 1º geração				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
10/11/14				
Sal	32	32	32	32
°C	24,4	24,2	24,6	24,7
pH	8,3	8,31	8,27	8,35
OD	8,1	8,03	7,87	7,94
11/11/14				
Sal	31	31	32	32
°C	25,5	25,6	25,6	25,6
12/11/14				
Sal	30	30	30	29
°C	25,8	25,9	26,1	26,1
13/11/14				
Sal	31	31	32	32
°C	25,9	25,9	26,1	26
14/11/14				
Sal	30	31	31	31
°C	25,7	25,7	25,9	25,9
15/11/14				
Sal	31	31	31	31
°C	25,7	25,7	25,9	25,9
16/11/14				
Sal	32	31	32	32
°C	25,7	25,8	26	26
17/11/2014 Antes				
Sal	32	32	32	32
°C	25,4	25,4	25,5	25,5
pH	8,12	8,1	7,91	7,87
OD	7,41	7,57	7,89	7,84
17/11/2014 Depois				
Sal	32	32	32	32
°C	24,7	24,6	24,3	24,5
pH	8,33	8,24	8,37	8,29
OD	7,81	7,94	7,61	7,72

AQUÁRIOS G0				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
18/11/14				
Sal	32	32	31	31
°C	25,8	26	25,8	25,2
19/11/14				
Sal	29	29	30	30
°C	25,7	25,9	25,6	25
20/11/14				
Sal	31	30	30	29
°C	25,6	25,9	25,6	25
21/11/14				
Sal	32	33	31	32
°C	25,1	25,4	25,1	25,6
22/11/14				
Sal	31	32	32	31
°C	25,2	25,6	25,8	25,7
23/11/14				
Sal	31	31	32	31
°C	25,1	25,5	25,7	25,6
24/11/2014 Antes				
Sal	32	32	32	31
°C	25,8	25,7	25,8	25,9
pH	8,12	8,15	7,98	8,05
OD	7,27	7,3	7,74	7,99
24/11/2014 Depois				
Sal	32	32	32	32
°C	24	24,2	24,2	24,1
pH	8,37	8,45	8,36	8,49
OD	7,98	8,04	7,99	8,03

AQUÁRIOS 1º geração				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
18/11/14				
Sal	32	32	32	32
°C	25,4	25,5	26,1	25,7
19/11/14				
Sal	30	30	29	30
°C	25,2	25,3	25,8	25,5
20/11/14				
Sal	31	31	31	31
°C	25,1	25,2	25,8	25,5
21/11/14				
Sal	32	33	30	32
°C	24,7	24,9	25,2	25
22/11/14				
Sal	31	31	30	31
°C	24,9	25,3	25,8	25,5
23/11/14				
Sal	32	31	31	30
°C	25,3	25,2	25,7	25,4
24/11/14				
Sal	32	32	31	31
°C	25,7	25,7	25,8	25,7
pH	8,15	8,1	7,98	8,02
OD	7,36	7,29	7,78	7,87

AQUÁRIOS G0				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
25/11/14				
Sal	28	27	27	27
°C	26	26,1	26	26,1
26/11/14				
Sal	31	30	28	30
°C	25,3	25,4	25,4	25,5
27/11/14				
Sal	29	28	28	27
°C	25,2	25,2	25,1	25,5
28/11/14				
Sal	32	30	30	31
°C	25,2	25,3	25,3	25,4
29/11/14				
Sal	31	31	31	31
°C	25,8	25,8	25,8	25
30/11/14				
Sal	32	31	31	32
°C	25,8	25,9	25,9	25,4
01/12/2014 Antes				
Sal	31	31	31	31
°C	26,1	26	25,7	25,9
pH	8,15	8,19	8,1	8,19
OD	759	7,52	7,77	7,56
01/12/2014 Depois				
Sal	32	32	32	32
°C	24,9	25	24,7	24,8
pH	8,42	8,37	8,39	8,34
OD	8,07	8,16	7,97	8,03

ERLENS 1º GER				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
24/11/14				
Sal	32	32	32	32
°C	24,2	24,3	24,1	24,2
pH	8,42	8,47	8,44	8,45
OD	8,15	8,02	7,94	7,81
25/11/14				
Sal	28	28	27	27
°C	25,7	25,8	25,7	26,2
26/11/14				
Sal	30	30	28	28
°C	24,7	24,9	25,8	25,2
27/11/14				
Sal	30	30	29	29
°C	24,7	24,9	25,7	25,1
28/11/14				
Sal	31	31	30	30
°C	24,7	24,9	25,8	25,2
29/11/14				
Sal	31	31	30	31
°C	25,1	25,1	26	25,7
30/11/14				
Sal	31	31	31	32
°C	25,3	25,3	26	25,9
01/12/14				
Sal	31	31	30	31
°C	25,8	25,9	25,7	25,9
pH	8,12	8,17	8,08	8,07
OD	7,74	7,6	7,83	7,7

AQUÁRIOS G0				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
02/12/14				
Sal	33	32	32	32
°C	24,9	25,1	25,2	24,4
03/12/14				
Sal	33	33	32	32
°C	24,4	24,9	25	24,3
04/12/14				
Sal	30	32	33	32
°C	25,1	25,3	25	24,2
05/12/14				
Sal	34	34	33	33
°C	25	25,3	25,3	24,2
06/12/14				
Sal	34	33	33	33
°C	26,5	26,5	26,4	25,3
07/12/14				
Sal	33	33	32	32
°C	25,1	25,7	25,7	24,7
08/12/2014 Antes				
Sal	33	33	32	32
°C	25,6	25,7	25,6	25
pH	8,22	8,19	8,2	8,23
OD	8,04	7,91	8,13	8,1
08/12/2014 Depois				
Sal	32	32	32	32
°C	24	24,1	24,2	24,2
pH	8,31	8,39	8,45	8,44
OD	7,56	7,69	7,66	7,67

AQUÁRIOS 2º geração				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
01/12/14				
Sal	32	32	32	32
°C	24,6	24,7	24,6	24,5
pH	8,35	8,42	8,45	8,46
OD	8,3	8,22	8,01	7,94
02/12/14				
Sal	33	33	33	33
°C	24,4	24,6	25,5	24,8
03/12/14				
Sal	29	34	32	32
°C	24,6	24,7	25,3	24,8
04/12/14				
Sal	30	30	34	33
°C	24,7	24,8	25	25,6
05/12/14				
Sal	34	34	34	34
°C	24,5	24,8	25,7	25,1
06/12/14				
Sal	33	34	34	33
°C	25,7	25,8	26	26,4
07/12/14				
Sal	33	33	33	32
°C	24,9	24,9	26,1	25,6
08/12/2014 Antes				
Sal	32	33	33	32
°C	25,4	25,5	25,7	25,7
pH	8,25	8,21	8,2	8,19
OD	7,79	7,83	8,16	8,02
08/12/2014 Depois				
Sal	32	32	32	32
°C	24,1	24,1	24,2	24,2
pH	8,48	8,48	8,43	8,47
OD	7,559	7,65	7,72	7,54

AQUÁRIOS G0				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
09/12/14				
Sal	33	33	32	32
°C	25	25,4	25,2	24,4
10/12/14				
Sal	32	32	31	31
°C	24,9	25,5	25,2	24,3
11/12/14				
Sal	32	32	32	31
°C	24,9	25,4	25,1	25,3
12/12/14				
Sal	30	30	29	30
°C	24,9	25,5	25,1	24,2
13/12/14				
Sal	31	31	31	32
°C	25,1	25,3	25,1	24,7
14/12/14				
Sal	31	31	31	31
°C	24,9	25	25	24,8
15/12/2014 Antes				
Sal	31	31	31	31
°C	25,6	25,5	25,5	25,4
pH	8,2	8,22	8,17	8,19
OD	7,52	7,4	7,31	7,09
15/12/2014 Depois				
Sal	32	32	32	32
°C	24,3	24,3	24,4	24,5
pH	8,43	8,41	8,47	8,47
OD	7,47	7,4	7,31	7,09

AQUÁRIOS 2º geração				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
09/12/14				
Sal	33	33	32	32
°C	24,8	25	25,7	25,1
10/12/14				
Sal	32	32	31	31
°C	24,6	24,9	25,6	25
11/12/14				
Sal	32	32	31	31
°C	24,9	25,1	25,7	25,3
12/12/14				
Sal	31	31	30	30
°C	24,6	24,8	25,4	24,9
13/12/14				
Sal	31	32	32	31
°C	25,2	25,1	25	25,1
14/12/14				
Sal	31	32	32	32
°C	24,8	25,1	24,7	25,1
15/12/14				
Sal	30	31	31	31
°C	24,7	24,8	24,7	24,6
pH	8,22	8,25	8,15	8,16
OD	7,57	7,69	7,42	7,43

AQUÁRIOS G0				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
16/12/14				
Sal	35	35	34	35
°C	24,6	24,6	24,5	24,5
17/12/14				
Sal	35	34	33	34
°C	24,9	24,9	24,8	24,8
18/12/14				
Sal	35	34	34	35
°C	24,3	24,4	24,3	24,3
19/12/14				
Sal	35	34	34	35
°C	24,6	24,7	24,5	24,4
20/12/14				
Sal	34	33	33	35
°C	24,2	24,4	24,3	24,3
21/12/14				
Sal	34	33	32	35
°C	24,4	24,5	24,4	24,3
22/12/14				
Sal	33	33	32	34
°C	24,8	24,8	24,9	24,9
pH	8,15	8,12	8,09	8,1
OD	7,35	7,47	7,58	7,49

ERLEN 2º geração				
	Controle I	Controle II	Amostra I	Amostra II
16/12/14				
Sal	35	35	36	36
°C	24,5	24,6	24,7	24,7
17/12/14				
Sal	34	35	36	36
°C	24,8	24,9	25	25,2
18/12/14				
Sal	34	34	35	36
°C	24,3	24,3	24,4	24,5
19/12/14				
Sal	35	35	35	36
°C	24,4	24,6	24,7	24,7
20/12/14				
Sal	33	33	34	34
°C	24,3	24,3	24,5	24,4
21/12/14				
Sal	33	33	34	34
°C	24,3	24,3	24,4	24,7
22/12/14				
Sal	33	33	33	33
°C	24,8	24,7	24,7	24,8
pH	8,15	8,14	8,1	8,11
OD	7,37	7,44	7,68	7,54

Legenda: “Antes” e “Depois” em determinadas datas referem-se às mensurações realizadas antes e depois da troca semanal do meio de cultivo e de exposição às NP.

10. ANEXOS

ANEXO A: Relatórios de ensaios de quantificação dos íons tri e hexavalente de cromo e cromo total, realizados em laboratório terceirizado – Acquaplant / Joinville – SC.



RELATÓRIO DE ENSAIO ACREDITADO Nº: 0963/2015 - A

Data de Emissão: 11/02/2015
Contratante: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE
Local de Amostragem: Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte - Joinville/SC
Solicitante: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE
Endereço: Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte - Joinville/SC
Descrição da Amostra: Água Superficial
Ponto de Coleta: Água Marinha 5 mL/L
Área de Atuação: Educação
Tipo de Amostragem: Simples
Data / Hora da Coleta: 26/01/2015 16:20
Condições Ambientais: Não Fornecido pelo Cliente
Plano de Amostragem: RQ 080 23/01/2015
Método de Amostragem: Não Aplicável
Aspecto da Amostra: Quase Translúcida
Responsável pela Coleta: O Cliente
Data de Recebimento no Laboratório: 28/01/2015 10:09

RESULTADO DAS ANÁLISES ACREDITADAS PELA ISO/IEC 17025

Análise	Nº do Equipamento	Resultado	Método	LQ	Valor Máximo Permitido	Data da Análise
Cromo Hexavalente	Espectrofotômetro Pharo - 719	0,25 mg/L	Standard Methods 22a Edição - 3500 D.	0,03mg/L	--	04/02/2015

RESULTADO DAS ANÁLISES NÃO ACREDITADAS PELA ISO/IEC 17025

Análise	Nº do Equipamento	Resultado	Método	LD	Valor Máximo Permitido	Data da Análise
Cromo total	ICP - 725	0,282 mg/L	Standard Methods 22a 3120 B	0,005 mg/L	--	05/02/2015
Cromo Trivalente	Não Aplicável	0,03 mg/L	Cálculo	0,03mg/L	--	04/02/2015

LD = Limite de Detecção

PI = Presença de Interferentes

As opiniões e interpretações expressas acima não fazem parte do escopo da acreditação deste laboratório.

Atenção: Os resultados destas análises têm significação restrita e se aplicam tão somente à amostra ensaiada.

Karina Zanella

Karina Zanella
CRO/SC 13.200.347
Técnica Laboratorista II



RELATÓRIO DE ENSAIO ACREDITADO Nº: 0964/2015 - A

Data de Emissão: 11/02/2015
Contratante: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE
Local de Amostragem: Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte - Joinville/SC
Solicitante: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE
Endereço: Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte - Joinville/SC
Descrição da Amostra: Água Superficial
Ponto de Coleta: Água Marinha 25 mL/L
Área de Atuação: Educação
Tipo de Amostragem: Simples
Data / Hora da Coleta: 26/01/2015 16:30
Condições Ambientais: Não Fornecido pelo Cliente
Plano de Amostragem: RQ 080 23/01/2015
Método de Amostragem: Não Aplicável
Aspecto da Amostra: Turvo Verde
Responsável pela Coleta: O Cliente
Data de Recebimento no Laboratório: 28/01/2015 10:10

RESULTADO DAS ANÁLISES ACREDITADAS PELA ISO/IEC 17025

Análise	Nº do Equipamento	Resultado	Método	LQ	Valor Máximo Permitido	Data da Análise
Cromo Hexavalente	Espectrofotometro Pharo - 719	0,90 mg/L	Standard Methods 22a Edição - 3500 D.	0,03mg/L	--	04/02/2015

RESULTADO DAS ANÁLISES NÃO ACREDITADAS PELA ISO/IEC 17025

Análise	Nº do Equipamento	Resultado	Método	LD	Valor Máximo Permitido	Data da Análise
Cromo total	ICP - 725	0,900 mg/L	Standard Methods 22a 3120 B	0,005 mg/L	--	05/02/2015
Cromo Trivalente	Não Aplicável	< 0,03 mg/L	Cálculo	0,03mg/L	--	04/01/2015

LD = Limite de Detecção

PI = Presença de Interferentes

As opiniões e interpretações expressas acima não fazem parte do escopo da acreditação deste laboratório.

Atenção: Os resultados destas análises têm significação restrita e se aplicam tão somente à amostra ensaiada.

Karina Zanella
 CRQ/SC 13.200.347
 Técnica Laboratorista II

Código de segurança: A3E1808EA666E0EA21ABB5DA808A9D6B



RELATÓRIO DE ENSAIO ACREDITADO Nº: 0965/2015 - A

Data de Emissão: 11/02/2015
Contratante: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE
Local de Amostragem: Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte - Joinville/SC
Solicitante: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE
Endereço: Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte - Joinville/SC
Descrição da Amostra: Água Superficial
Ponto de Coleta: Água Marinha 50 mL/L
Área de Atuação: Educação
Tipo de Amostragem: Simples
Data / Hora da Coleta: 26/01/2015 16:40
Condições Ambientais: Não Fornecido pelo Cliente
Plano de Amostragem: RQ 080 23/01/2015
Método de Amostragem: Não Aplicável
Aspecto da Amostra: Turvo Verde Escuro
Responsável pela Coleta: O Cliente
Data de Recebimento no Laboratório: 28/01/2015 10:11

RESULTADO DAS ANÁLISES ACREDITADAS PELA ISO/IEC 17025

Análise	Nº do Equipamento	Resultado	Método	LQ	Valor Máximo Permitido	Data da Análise
Cromo Hexavalente	Espectrofotômetro Pharo - 719	1,94 mg/L	Standard Methods 22a Edição - 3500 D.	0,03mg/L	--	04/02/2015

RESULTADO DAS ANÁLISES NÃO ACREDITADAS PELA ISO/IEC 17025

Análise	Nº do Equipamento	Resultado	Método	LD	Valor Máximo Permitido	Data da Análise
Cromo total	ICP - 725	1,939 mg/L	Standard Methods 22a 3120 B	0,005 mg/L	--	05/02/2015
Cromo Trivalente	Não Aplicável	< 0,03 mg/L	Cálculo	0,03mg/L	--	04/02/2015

LD = Limite de Detecção

PI = Presença de Interferentes

As opiniões e interpretações expressas acima não fazem parte do escopo da acreditação deste laboratório.

Atenção: Os resultados destas análises têm significação restrita e se aplicam tão somente à amostra ensaiada.

Karina Zanella

Karina Zanella
CRQ/SC 13.200.347
Técnica Laboratorista II

Código de segurança: 69A90B490A9FCCAE42DAD1EE16D1F516



RELATÓRIO DE ENSAIO ACREDITADO Nº: 0966/2015 - A

Data de Emissão: 11/02/2015
Contratante: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE
Local de Amostragem: Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte - Joinville/SC
Solicitante: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE
Endereço: Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte - Joinville/SC
Descrição da Amostra: Água Superficial
Ponto de Coleta: Água Marinha 75 mL/L
Área de Atuação: Educação
Tipo de Amostragem: Simples
Data / Hora da Coleta: 26/01/2015 16:50
Condições Ambientais: Não Fornecido pelo Cliente
Plano de Amostragem: RQ 080 23/01/2015
Método de Amostragem: Não Aplicável
Aspecto da Amostra: Turvo Verde Escuro
Responsável pela Coleta: O Cliente
Data de Recebimento no Laboratório: 28/01/2015 10:12

RESULTADO DAS ANÁLISES ACREDITADAS PELA ISO/IEC 17025

Análise	Nº do Equipamento	Resultado	Método	LQ	Valor Máximo Permitido	Data da Análise
Cromo Hexavalente	Espectrofotômetro Pharo - 719	2,90 mg/L	Standard Methods 22a Edição - 3500 D.	0,03mg/L	--	04/02/2015

RESULTADO DAS ANÁLISES NÃO ACREDITADAS PELA ISO/IEC 17025

Análise	Nº do Equipamento	Resultado	Método	LD	Valor Máximo Permitido	Data da Análise
Cromo total	ICP - 725	2,895 mg/L	Standard Methods 22a 3120 B	0,005 mg/L	--	05/02/2015
Cromo Trivalente	Não Aplicável	< 0,03 mg/L	Cálculo	0,03mg/L	--	04/01/2015

LD = Limite de Detecção

PI = Presença de Interferentes

As opiniões e interpretações expressas acima não fazem parte do escopo da acreditação deste laboratório.

Atenção: Os resultados destas análises têm significação restrita e se aplicam tão somente à amostra ensaiada.

Karina Zanella

Karina Zanella
CRQ/SC 13.200.347
Técnica Laboratorista II

Código de segurança: B55FC8FA4087F761650C126691786849



RELATÓRIO DE ENSAIO ACREDITADO Nº: 0967/2015 - A

Data de Emissão: 11/02/2015
Contratante: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE
Local de Amostragem: Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte - Joinville/SC
Solicitante: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE
Endereço: Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte - Joinville/SC
Descrição da Amostra: Água Superficial
Ponto de Coleta: Água Marinha 100 mL/L
Área de Atuação: Educação
Tipo de Amostragem: Simples
Data / Hora da Coleta: 26/01/2015 17:00
Condições Ambientais: Não Fornecido pelo Cliente
Plano de Amostragem: RQ 080 23/01/2015
Método de Amostragem: Não Aplicável
Aspecto da Amostra: Turvo Verde Escuro
Responsável pela Coleta: O Cliente
Data de Recebimento no Laboratório: 28/01/2015 10:13

RESULTADO DAS ANÁLISES ACREDITADAS PELA ISO/IEC 17025

Análise	Nº do Equipamento	Resultado	Método	LQ	Valor Máximo Permitido	Data da Análise
Cromo Hexavalente	Espectrofotômetro Pharo - 719	3,39 mg/L	Standard Methods 22a Edição - 3500 D.	0,03mg/L	--	04/02/2015

RESULTADO DAS ANÁLISES NÃO ACREDITADAS PELA ISO/IEC 17025

Análise	Nº do Equipamento	Resultado	Método	LD	Valor Máximo Permitido	Data da Análise
Cromo total	ICP - 725	3,388 mg/L	Standard Methods 22a 3120 B	0,005 mg/L	--	05/02/2015
Cromo Trivalente	Não Aplicável	< 0,03 mg/L	Cálculo	0,03mg/L	--	04/02/2015

LD = Limite de Detecção

PI = Presença de Interferentes

As opiniões e interpretações expressas acima não fazem parte do escopo da acreditação deste laboratório.

Atenção: Os resultados destas análises têm significação restrita e se aplicam tão somente à amostra ensaiada.

Karina Zanella

Karina Zanella
 CRQ/SC 13.200.347
 Técnica Laboratorista II

Código de segurança: CEF45746C04BAAAA472013271CC96D8C



RELATÓRIO DE ENSAIO ACREDITADO Nº: 0968/2015 - A

Data de Emissão: 11/02/2015
Contratante: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE
Local de Amostragem: Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte - Joinville/SC
Solicitante: FUNDAÇÃO EDUCACIONAL DA REGIÃO DE JOINVILLE
Endereço: Rua Paulo Malschitzki, 10 - Zona Industrial Norte - Joinville/SC
Descrição da Amostra: Água Superficial
Ponto de Coleta: Água Marinha 125 mL/L
Área de Atuação: Educação
Tipo de Amostragem: Simples
Data / Hora da Coleta: 26/01/2015 17:10
Condições Ambientais: Não Fornecido pelo Cliente
Plano de Amostragem: RQ 080 23/01/2015
Método de Amostragem: Não Aplicável
Aspecto da Amostra: Turvo Verde Escuro
Responsável pela Coleta: O Cliente
Data de Recebimento no Laboratório: 28/01/2015 10:14

RESULTADO DAS ANÁLISES ACREDITADAS PELA ISO/IEC 17025

Análise	Nº do Equipamento	Resultado	Método	LQ	Valor Máximo Permitido	Data da Análise
Cromo Hexavalente	Espectrofotômetro Pharo - 719	4,46 mg/L	Standard Methods 22a Edição - 3500 D.	0,03mg/L	--	04/02/2015

RESULTADO DAS ANÁLISES NÃO ACREDITADAS PELA ISO/IEC 17025

Análise	Nº do Equipamento	Resultado	Método	LD	Valor Máximo Permitido	Data da Análise
Cromo total	ICP - 725	4,460 mg/L	Standard Methods 22a 3120 B	0,005 mg/L	--	05/02/2015
Cromo Trivalente	Não Aplicável	< 0,03 mg/L	Cálculo	0,03mg/L	--	04/02/2015

LD = Limite de Detecção

PI = Presença de Interferentes

As opiniões e interpretações expressas acima não fazem parte do escopo da acreditação deste laboratório.

Atenção: Os resultados destas análises têm significação restrita e se aplicam tão somente à amostra ensaiada.

Karina Zanella

Karina Zanella
CRQ/SC 13.200.347
Técnica Laboratorista II

Código de segurança: 87B91F2B5C6EE900B476B9F0EB62997C

*As unidades de concentração descritas nos laudos como mL/L referem-se na verdade a concentrações expressas em mg.L⁻¹ de NP de Cr₂O₃.

AUTORIZAÇÃO

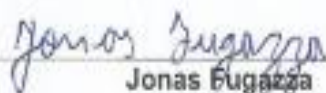
Nome do autor: **Jonas Fugazza**

RG: 52925870

Título da Dissertação: "Estudo da Toxicidade Aguda e Crônica de Nanopartículas de Óxido de Cromo III Sobre o Microcrustáceo Marinho *Mysidopsis juniae* (SILVA, 1979)".

Autorizo a Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, através da Biblioteca Universitária, disponibilizar cópias da dissertação de minha autoria.

Joinville, 21 de julho de 2015.


Jonas Fugazza