

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

**TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE AO ORGANISMO
MARINHO *Mysidopsis juniae* (SILVA, 1979)**

RENATA AMANDA GONÇALVES

ORIENTADORA: Profa. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira

Coorientador: Prof. Dr. William Gerson Matias

Joinville (SC)

2014

RENATA AMANDA GONÇALVES

**TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE AO ORGANISMO
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.

Coorientador: Prof. Dr. William Gerson Matias.

Joinville (SC)

2014

Catálogo na publicação pela Biblioteca Universitária da Univille

G635t	<p>Gonçalves, Renata Amanda Toxidade de nanopartículas de óxido de cobre ao organismo marinho / Renata Amanda Gonçalves; orientadora Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira, coorientador Dr. William Gerson Matias – Joinville: UNIVILLE, 2014.</p> <p>90 f. : il. ; 30 cm</p> <p>Dissertação (Mestrado em Saúde e Meio Ambiente – Universidade da Região de Joinville)</p> <p>1. Nanopartículas. 2. Óxido de cobre. 3. <i>Mysidopsis juniae</i>. 4. Toxidade. 5. Água marinha. I. Oliveira, Therezinha Maria Novais de (orient.). II. Título.</p>
CDD 363.1791	

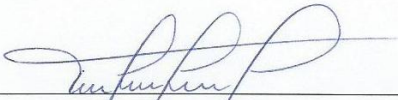
Termo de Aprovação

- “Toxicidade de Nanopartículas de Óxido de Cobre ao Organismo Marinho *Mysidopsis juniae* (SILVA, 1979)”

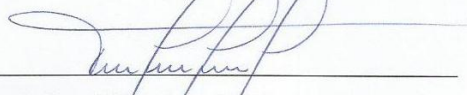
por

Renata Amanda Gonçalves

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

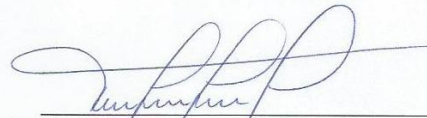


Prof. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
Orientadora (UNIVILLE)

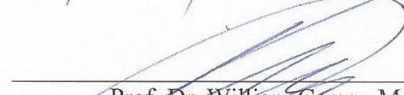


Prof. Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Meio Ambiente

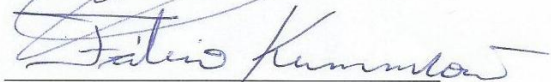
Banca Examinadora:



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



Prof. Dr. William Gerson Matias
Coorientador (UFSC)



Prof. Dr. Fábio Kummrow
(UNIFESP)



Prof. Dr. Cleiton Vaz
(UNIVILLE)

Joinville, 24 de fevereiro de 2014

Dedico à minha amada mãe,
Roseli Josefina Brach Gonçalves
(*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Antonio, por novamente possibilitar a realização de mais uma conquista e a minha mãe Roseli (*in memoriam*), por continuar sendo minha maior fonte de determinação, força e garra para continuar sempre. Não tenho palavras pra expressar o quanto sou grata.

À minha orientadora, prof.^a Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira, por novamente acreditar e confiar em mim e por todas as oportunidades novamente oferecidas permitindo meu crescimento profissional e pessoal. Para Sra. também não tenho palavras para expressar o quanto sou grata, a Sra. é admirável, um exemplo a ser seguido!

Ao meu coorientador prof. Dr. William Gerson Matias, por ter me dado a oportunidade de atuar em um projeto da importância da Rede NANOTOX permitindo ampliar meus horizontes científicos.

Ao prof. Dr. Cleiton Vaz, obrigada pela disposição em sempre ajudar, sanando dúvidas e dando conselhos que me auxiliaram no desenvolvimento desta pesquisa.

Aos que fazem ou já fizeram parte da equipe do Laboratório BABTOX (Eduardo, Mauro, Jonas, Cherol, Iasmyn, Tamila, Renata e Elaine), por me auxiliar e cuidar dos *Mysis* durante todo este tempo, a ajuda de todos foi fundamental. Deixo aqui meu agradecimento especial à Tamila, que dispôs e abdicou muito do seu tempo para me ajudar, sempre compartilhando refeições e sorrisos.

Aos colegas de turma MSMA XI, por tornarem esta caminhada mais divertida.

Aos professores do Programa de Mestrado em Saúde e Meio Ambiente.

Ao meu namorado Rafael, sou muitíssimo grata por seu companheirismo incondicional, por me ouvir, me aturar nos dias difíceis e por sempre me animar e mostrar que há uma luz no fim do túnel.

Ao FAP UNIVILLE.

À CAPES.

À Rede NANOTOX e ao CNPq

À toda equipe do Laboratório LABTOX-UFSC, pela disposição e auxílio em todos os momentos.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica e ao Laboratório de Catálises Biomiméticas da UFSC.

“A ciência exercita a capacidade, não o saber. O valor de praticar com rigor, por algum tempo, uma ciência rigorosa não está propriamente em seus resultados: pois eles sempre serão uma gota ínfima, ante o mar das coisas dignas de saber. Mas isso produz um aumento de energia, de capacidade dedutiva, de tenacidade; aprende-se a alcançar um fim de modo pertinente. Neste sentido é valioso, em vista de tudo o que se fará depois, ter sido homem de ciência.”

(NIETZSCHE, 1878 – 1886, *in* Humano, demasiado humano)

RESUMO

Nanopartículas são partículas que variam de 0 a 100 nm, estas vem sendo amplamente utilizados nos mais diversos setores industriais devido a suas excelentes características físicas e químicas. Nanopartículas de óxido de cobre (NP CuO) são utilizadas na composição de tintas anti-incrustantes para pintura de cascos de navios e pequenas embarcações, tubulações e plataformas *off-shore*. Poucos estudos foram elaborados acerca dos riscos destes compostos a saúde humana e ao meio ambiente. Portanto, este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda e crônica de nanopartículas de óxido de cobre ao organismo marinho *Mysidopsis juniae*. Para a realização dos testes utilizou-se uma solução-estoque de NP CuO com concentração de 2g.L^{-1} preparada em água marinha reconstituída com salinidade 32, que foi sonicada durante 10 minutos. A solução-estoque foi caracterizada através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), tamanho hidrodinâmico e potencial zeta (Pz). Os testes de toxicidade aguda foram realizados utilizando os organismos *M. juniae* provenientes do cultivo do Laboratório de Toxicologia Ambiental da UNIVILLE, unidade São Francisco do Sul, seguindo a norma NBR 15308/2011. Os ensaios crônicos foram realizados segundo Vaz *et al.*, (2012), tendo duração de 36 dias. Os resultados da caracterização da amostra por MET demonstraram que as NP CuO apresentaram aglomerados com tamanhos entre 40 e 250 nm, já em suspensão as partículas apresentaram tamanho médio dos aglomerados igual a 649 nm, o Pz foi de -16,9333 mV. Quanto a toxicidade aguda de NP CuO, obteve-se $CL_{50(96h)}$ igual a $29,777\text{ mg.L}^{-1}$ para o organismo estudado. Os testes de toxicidade crônica apresentaram um indicativo dos possíveis efeitos causados a longo termo para *M. juniae*, para os parâmetros natalidade e mortalidade nas concentrações $50\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ e $100\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$.

Palavras-chave: Nanopartículas, Óxido de cobre; *Mysidopsis juniae*; toxicidade, água marinha.

ABSTRACT

Nanoparticles are particles that varying in size from 0 to 100 nm and have been widely employed in many different industrial sectors due to their excellent physical and chemical characteristics. Copper oxide nanoparticles (NP CuO) are employed in the composition of anti-fouling paints, applied in ships and small vessels, tubings and offshore platforms. Few studies have been conducted on the risks offered by these compounds to human safety and the environment. Therefore, this paper aims to evaluate the acute and chronicle toxicity of copper oxide particles to the marine organism *Mysidopsis juniae*. In order to do so, a stock solution of NP CuO, with a 2g.L^{-1} concentration in marine water reconstituted with 32 salinity and having been sonicated for 10 minutes. The stock solution was characterized by transmission electron microscopy (TEM) as having a dynamic size and zeta potential (Pz). The acute toxicity tests were performed employing the organisms *M. Juniae* extracted from the cultivation of the Environmental Toxicology laboratory at UNIVILLE—São Francisco do Sul unit—, according to the NBR 15308/2011 rule. The chronicle tests were performed according to Vaz *et.al* (2012), lasting 36 days. The characterization of the sample by means of TEM show that the NP CuO varied in size from 40 to 250nm; whereas in suspension, sporting 649nm in size, Pz was -16,9333 mV. As for acute toxicity, the NP CuO results point to a $29,777\text{ mg.L}^{-1}$ value for $\text{CL}_{50(96h)}$ for the organism under study. The chronic toxicity tests showed an indication of possible effects in the long term for *M. juniae* for the parameters birth rate and mortality at concentrations $50\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$ e $100\text{ }\mu\text{g.L}^{-1}$.

Keywords: Nanoparticles; Copper oxide; *Mysidopsis juniae*; toxicity; marine water.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação da escala nanométrica.....	18
Figura 2. Natureza multidisciplinar da toxicologia.....	22
Figura 3. (A) exemplar de <i>M. juniae</i> (acima) e fêmea (abaixo), o círculo vermelho indica o marsúpio presente apenas nas fêmeas e (B) detalhe do télson visto em MEV.....	29
Figura 4. Desenho esquemático exemplificando o Pz.....	33
Figura 5. Procedimentos experimentais realizados para realização da pesquisa.....	35
Figura 6. Diagrama esquemático para a montagem do teste de toxicidade crônica com <i>M. juniae</i>	42
Figura 7. <i>M. juniae</i> observado em microscópio estereoscópico com angular com régua milimétrica em aumento de duas vezes.....	43
Figura 8. Imagens das NP CuO obtidas através de MET, utilizando o grid de 300 mesh. (A) NP CuO pouco aglomerada e (B) Formação de aglomerados.....	46
Figura 9. Resultado da determinação do tamanho hidrodinâmico das partículas (concentração 1 g.L ⁻¹).....	47
Figura 10. Carta controle da sensibilidade dos organismos <i>M. juniae</i> utilizando a substância de referência DSS.....	50
Figura 11. Teste de normalidade de Anderson-Darling a partir da CL _{50(96h)} calculada nos testes com CuSO ₄ .5H ₂ O A média representa a CL _{50(96h)} e o valor de p > 0,05 representa que não há diferença significativa nas populações testes, para um intervalo de confiança de 95%.....	51
Figura 12. Teste de normalidade de Anderson-Darling a partir da CL _{50(96h)} calculada nos testes com NP CuO A média representa a CL _{50(96h)} e o valor de p > 0,05 representa que não há diferença significativa nas populações testes, para um intervalo de confiança de 95%.....	52
Figura 13. (A) e (B) Acúmulo de material escurecido no fundo dos frascos-teste após 96h.....	53
Figura 14. Natalidade dos misidáceos expostos ao controle e a amostra de 50 µg.L ⁻¹ e 100 µg.L ⁻¹ de NP CuO.....	55
Figura 15. Mortalidade dos misidáceos expostos ao controle e a amostra de 50 µg.L ⁻¹ e 100 µg.L ⁻¹ de NP CuO.....	56
Figura 16. Biometria dos misidáceos expostos ao controle e a amostra de 50 µg.L ⁻¹ e 100 µg.L ⁻¹ de NP CuO.....	57

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1. Lista das espécies aquáticas mais utilizadas para realização de testes de toxicidade.....	28
Quadro 2. Principais técnicas utilizadas na caracterização de nanopartículas.....	31
Quadro 3. Frequência e métodos de quantificação dos parâmetros observados no teste de toxicidade crônica.....	44
Tabela 1. Condições de cultivo recomendadas para o <i>M. juniae</i>	38
Tabela 2. Resumo das concentrações utilizadas nos testes de toxicidade aguda.....	41
Tabela 3. Valores do Pz, concentração 1 g.L ⁻¹	49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

AMR – Água Marinha Reconstituída

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

CL₅₀ – Concentração letal mediana

CNPq – Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico

DSS – Dodecil sulfato de sódio

EPI – Equipamento de Proteção Individual

ISO – *International Organization for Standardization*

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

LACBIO – Laboratório de Catálise Biomimética

LCME – Laboratório Central de Microscopia Eletrônica

MET – Microscopia de Transmissão Eletrônica

NP – Nanopartícula

NP CuO – Nanopartícula de Óxido de Cobre

Pz – Potencial Zeta

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

USEPA – *United States Environmental Protection Agency*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	14
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	18
3.1 NANOCOMPOSTOS.....	18
3.1.2 Aspectos conceituais e usos.....	18
3.1.3 Aspectos ambientais.....	20
3.2. TOXICOLOGIA AMBIENTAL.....	22
3.2.1 Aspectos conceituais.....	22
3.2.2 Testes de toxicidade com organismos aquáticos.....	26
3.2.3 Nanotoxicologia.....	29
4 METODOLOGIA.....	35
4.1 ABORDAGEM METODOLÓGICA E PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS.....	35
4.2 OBTENÇÃO E PREPARO SUSPENSÃO-TESTE.....	36
4.3 CARACTERIZAÇÃO SUSPENSÃO-TESTE.....	37
4.3.1 Caracterização por Microscopia de Transmissão Eletrônica.....	37
4.3.2 Potencial Zeta e tamanho hidrodinâmico.....	37
4.4 TESTES TOXICOLÓGICOS.....	38
4.4.1 Toxicidade aguda.....	39
4.4.1.1 Controle negativo e controle positivo (CuSO₄.5H₂O).....	40
4.4.1.2 Teste com NP CuO.....	40

4.4.2 Toxicidade crônica.....	41
4.4.2.1 Montagem e Acompanhamento do teste.....	41
4.5 FERRAMENTAS DE ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	45
4.6 QUESTÕES ÉTICAS DA PESQUISA.....	45
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO-TESTE	46
5.1.1 Tamanho das partículas: MET e tamanho hidrodinâmico.....	46
5.1.2 Estabilidade da suspensão: Potencial zeta.....	48
5.2 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA	50
5.2.1 Sensibilidade dos organismos.....	50
5.2.2 Controle negativo e controle positivo (CuSO₄.5H₂O).....	51
5.2.3 Toxicidade aguda de NP CuO.....	52
5.3 TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA DE NP CuO.....	55
6. CONCLUSÕES.....	59
7. RECOMENDAÇÕES.....	60
7. REFERÊNCIAS.....	61
8 APÊNDICES.....	75
A1 (A) SUSPENSÃO-ESTOQUE DE NP CuO ANTES DE SER SONICADA, (B) SUSPENSÃO-ESTOQUE DE NP SENDO SONICADA E (C) SUSPENSÃO DE NP CuO APÓS SER SONICADA DURANTE 10 MINUTOS.	75
A2 GRID (300 MESH) PRONTOS PARA SEREM ANALISAS PELO MET. LETRAS “E” E “F” REPRESENTAM AS GRADES COM A SUSPENSÃO-TESTE DE NP CuO COM CONCENTRAÇÃO DE 2 g.L ⁻¹	76
A3 CUBETA UTILIZADA PARA DETERMINAR O Pz.....	77
A4 CULTIVO DE <i>M. JUNIAE</i> DO LABORATÓRIO DE TOXICOLOGIA AMBIENTAL DA UNIVILLE UNIDADE SÃO FRANCISCO DO SUL.....	78
A5 ETIQUETA UTILIZADA PARA IDENTIFICAÇÃO DOS AQUÁRIOS.....	79

A6 DADOS PARA A ELABORAÇÃO DA CARTA CONTROLE DE SENSIBILIDADE DOS MISIDÁCEOS.....	80
A7 CL _{50(96H)} DOS DEZ TESTES REALIZADOS COM CuSO ₄	81
A8 CL _{50(96H)} DOS DEZ TESTES REALIZADOS COM NP CuO.....	82
A9 MÉDIA DOS PARÂMETROS pH E SALINIDADE INICIAL E FINAL NO TESTE AGUDO COM NP CuO.....	83
A10 DADOS DA NATALIDADE DO TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM NP CuO.....	84
A 11 DADOS DA MORTALIDADE DOS ORGANISMOS NO TESTE CRÔNICO COM NP CuO.....	85
A12 TAMANHO DOS ORGANISMOS MEDIDOS NO TESTE CRÔNICO COM NP CuO.....	86
A13 DADOS DE SALINIDADE DURANTE A REALIZAÇÃO DO TESTE CRÔNICO COM NP CuO.....	87
14 DADOS DA TEMPERATURA MÁXIMA E MÍNIMA DA ÁGUA DOS AQUÁRIOS NO TESTE E DO CONTROLE.....	88
9 ANEXOS.....	89
A1 LAUDO DA DETERMINAÇÃO DO Pz EM AMR.....	89
A2 LAUDO DA DETERMINAÇÃO DO TAMANHO HIDRODINÂMICO DAS NP CuO EM AMR.....	90

1 INTRODUÇÃO

O crescente uso e descarte de produtos que contêm nanopartículas, que segundo a *American Society for Testing and Materials* (2006) são materiais que possuem, pelo menos, duas dimensões que apresentam tamanho de 1 a 100 nm, podem oferecer riscos ainda pouco conhecidos a biota e a saúde humana (SEATON e DONALDSON, 2005).

Compostos que utilizam nanopartículas vem sendo produzidos nos últimos dez anos em larga escala para fins de comercialização, em diversos produtos já citados na literatura, tais como: aditivos em tintas, plásticos, lubrificantes industriais (MIDANDER *et al.*, 2009), revestimentos anti-incrustantes (ISAZA *et al.*, 2011), revestimentos metálicos, cosméticos que tenham função de proteção UV (KLEINE *et al.*, 2008), em pesticidas e solventes organoclorados (PETOSA *et al.*, 2010), em revestimentos antimicrobianos (GRIFFITT, *et al.*, 2008; MUELLER e NOWACK, 2008), fungicida (MUELLER e NOWACK, 2008), podendo ainda ser utilizados em diagnósticos e aplicações médicas como agente de contraste de imagem biomédica e terapias contra o câncer (GRIFFITT, *et al.*, 2008; STUDER *et al.*, 2010).

Segundo o *The Project on Emerging Nanotechnologies* (2014), o número de produtos que contenha algum tipo de nanopartícula passou de 54 no ano de 2005 para 1628 produtos em 2013. Já as estimativas de produção mundial de nanopartículas de óxidos metálicos atingiram no ano de 2012 mais de 270.041 toneladas, podendo aumentar para mais de 1663.168 toneladas em 2020 (RESEARCH AND MARKETS, 2013).

Esta ampla produção e utilização de nanopartículas e nanocompostos tem despertado uma grande discussão sobre os potenciais riscos toxicológicos destes materiais ao ambiente e à saúde humana. Para a maioria das nanopartículas sintetizadas e utilizadas nestes produtos, poucos dados, e muitas vezes dados conflitantes, sobre os valores de produção estão disponíveis, esta falta de informação representa um obstáculo para avaliar os eventuais riscos para o ambiente (HENDREN *et al.* 2011). Segundo Zucolotto (2010), este é um tema de grande interesse mundial principalmente pela carência de estudos conclusivos que forneçam informações sobre os mecanismos de interação destas nanopartículas com os sistemas biológicos, as dosagens críticas e o tempo de exposição.

As características que tornam as nanopartículas e nanocompostos úteis para a fabricação de diversos produtos, tais como diminuto tamanho de partícula, forma variada e alta área superficial, podem também ser responsáveis por causar efeitos nocivos aos organismos vivos, conforme referenciado em estudos toxicológicos realizados com microcrustáceos (GRIFFITT *et al.*, 2008; BLINOVA *et al.*, 2010; JO *et al.*, 2012), moluscos (PANG *et al.*, 2012), algas (MELEGARI *et al.*, 2013; PERREAULT *et al.*, 2014), plantas (PERREAULT *et al.*, 2010), peixes (ISANI *et al.*, 2013), ratos (MENG *et al.*, 2007) e células (AHAMED *et al.*, 2010; PERREAULT *et al.*, 2012).

Quando descartados ou mesmo disponibilizados no ambiente por meio de seus produtos, as nanopartículas e/ou nanocompostos tornam-se potenciais poluidores dos diversos compartimentos ambientais (atmosfera, água e solo), pois podem tornar-se biodisponíveis (LOVERN, *et al.*, 2007). Ao tornarem-se biodisponíveis no ambiente, tais compostos podem ser absorvidos através da pele, mucosas e membranas celulares (SERVICE, 2004). Dentro da célula, as nanopartículas podem provocar o stress oxidativo de determinadas organelas, resultando num desequilíbrio redox, levando então a uma grave disfunção celular (XIA *et al.*, 2006; LONG *et al.*, 2006).

Um dos principais modos de exposição e absorção de nanopartículas pode ocorrer no meio aquático, devido a muitos organismos estarem em contato com as nanopartículas presentes no meio e se alimentarem pelo processo de filtração; no processo de filtração realizado pelos organismos aquáticos as nanopartículas podem ficar aderidas nos apêndices alimentares dos organismos, podendo causar a deficiência da sua capacidade de se alimentar e até mesmo a morte do organismo (LOVERN e KLAPER, 2006; USEPA, 2008). Desta forma, o meio aquático torna-se o ambiente mais suscetível à contaminação, por ser o destino final de todo subproduto gerado pelas atividades antrópicas.

Dentre as nanopartículas comercializadas, as nanopartículas de óxido de cobre, alvo deste estudo, são amplamente utilizadas na fabricação de tintas anti-incrustantes para revestimento de barcos, navios e estruturas submersas. Portanto, considerando a quantidade de embarcações que navegam diariamente pelas águas do planeta e seu crescente aumento, estas tintas tornam-se uma potencial fonte de contaminação dos ecossistemas aquáticos e em especial os marinhos, devido à liberação de íons cobre e nanopartículas advindos da sua decomposição (ALMEIDA *et al.*, 2007; SAISON, 2010), demandando estudos sobre estes potenciais riscos aliados a questão da disponibilidade. Cattaneo *et al.*, (2009) afirmam que apenas 10% dos estudos toxicológicos com

nanocompostos são realizados com organismos de água marinhas ou estuarina, utilizando meio natural ou artificial, contra mais de 60% de estudos realizados com organismos de água doce, desta forma, ressalta-se a importância da realização de pesquisas com organismos marinhos, especialmente aqueles representativos para o ecossistema e que possuam fácil aquisição e manutenção em laboratório, tenham estabilidade genética entre outras características.

Assim sendo, este estudo realizado no âmbito do projeto 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) teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos tóxicos agudos e crônicos das NP CuO sobre o microcrustáceo marinho *Mysidopsis juniae*, como contribuição na construção de estratégias de prevenção, políticas e diretrizes de regulamentação de emissão de tais compostos no meio ambiente de modo a contribuir para a sustentabilidade ambiental do planeta.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre em água marinha reconstituída utilizando o microcrustáceo *Mysidopsis juniae*.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar a suspensão de nanopartículas de óxido de cobre em água marinha reconstituída.
- Determinar a $CL_{50(96h)}$ das nanopartículas de óxido de cobre ao microcrustáceo *Mysidopsis juniae*.
- Verificar se as nanopartículas de óxido de cobre causam efeito crônico ao microcrustáceo *Mysidopsis juniae*.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 NANOCOMPOSTOS

3.1.1 Aspectos conceituais e usos

O prefixo “*nano-*” é derivado do grego, que significa *anão*. Quando empregado em unidades de medida, este prefixo significa *um bilionésimo*, ou seja, um nanômetro corresponde a bilionésima parte de um metro ou um milionésimo do milímetro (ROYAL SOCIETY, 2004).

Desta forma, nanopartículas são definidas como materiais que possuem, pelo menos, duas dimensões e que apresentam tamanho de 1 a 100 nm, representando um tamanho intermediário entre um átomo e a micropartículas (ASTM, 2006). Uma comparação esquemática da escala nanométrica com materiais conhecidos pode ser observada na Figura 1.

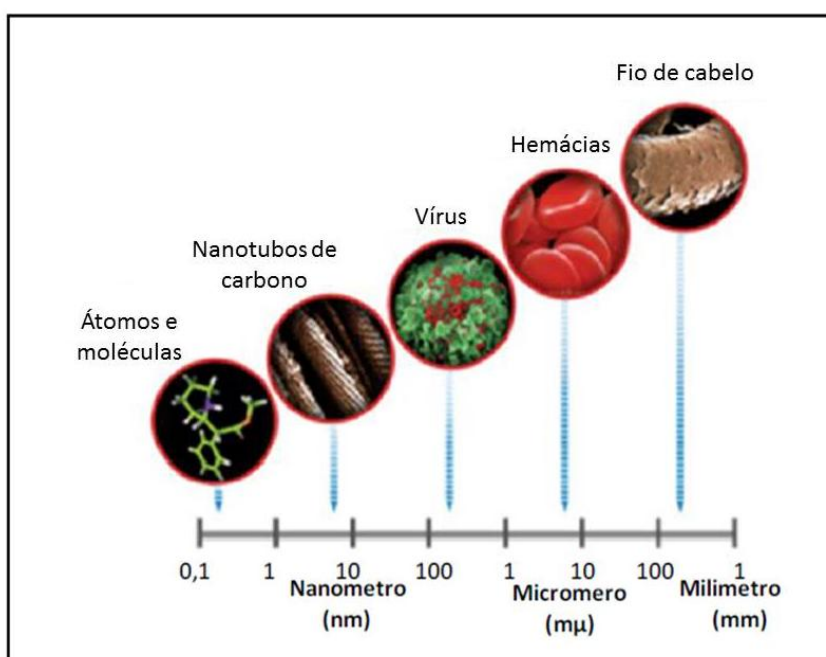


Figura 1. Representação da escala nanométrica.

Fonte: THOMA (2004).

O aporte de nanopartículas no meio ambiente pode ser proveniente de duas fontes distintas, sendo elas, fontes naturais e/ou fontes antrópicas. Pode-se citar como exemplo de nanopartículas naturais o sal marinho e a poeira vulcânica

(OBERDÖRSTER, 2005) e de nanopartículas advindas de fontes antropogênicas as atividades industriais onde ocorre a queima de combustíveis fósseis, que geram enorme quantidade de material particulado (MOORE, 2006; USEPA, 2008).

Segundo MOORE (2006) e a USEPA (2008) é necessário distinguir as nanopartículas advindas das fontes antrópicas em dois tipos: (a) nanopartículas engenheiradas, que são comumente utilizadas para produção de nanocompósitos e nanomateriais, de maneira geral, e (b) nanopartículas não-engenheiradas, que são o resultado principalmente da queima de combustíveis fósseis.

As nanopartículas engenheiradas podem ser desenvolvidas a partir de uma vasta quantidade de elementos químicos, sendo que os mais comuns são os metais, óxidos metálicos, silicatos, óxidos não-cerâmicos, polímeros, compostos orgânicos, carbono e biomoléculas (DROBNE, 2007).

Christian *et al.*, (2008), afirmam que as nanopartículas podem ser classificadas em orgânicas, como por exemplo, nanotubos de carbono e fulerenos (C_{50} e C_{70}), e inorgânicas, como por exemplo, nanopartículas metálicas (nano-cobre, nano-prata, etc.) e nanopartículas de óxidos metálicos (óxido de prata, dióxido de titânio, etc.).

Nesta escala, os materiais assumem propriedades físico-químicas específicas, as quais não são observadas nos mesmos elementos com escalas maiores, tais como tamanho, grande área superficial, forma e capacidade de agregação/dispersão, solubilidade, grau de pureza, cristalinidade, propriedades elétricas, entre outros (ROYAL SOCIETY, 2004; SERVICE, 2004), as quais as tornam muito úteis no desenvolvimento de diversos produtos. Devido a estas características, as nanopartículas são geralmente projetadas e sintetizadas com modificações superficiais específicas, atendendo as necessidades de aplicação (JIANG *et al.*, 2008).

As nanopartículas mais utilizadas são os nanotubos de carbono, fulerenos, nanopartículas metálicas de ouro, prata, cobre e zinco e nanopartículas de óxidos metálicos, como ZnO, TiO_2 e CuO. Dentre as diversas finalidades, as nanopartículas de óxido de cobre são utilizadas na fabricação de tintas anti-incrustantes. Estas tintas consistem em um filme polimérico composto principalmente de monômeros acrílicos e estirênicos recobertos com NP CuO e são utilizadas para revestir cascos de embarcações fluviais e marítimas, plataformas petrolíferas *offshore*, tubulações submarinhas, comportas de represas e tanques aquáticos (FARIA *et al.*, 2006). Sua aplicação tem como finalidade minimizar o crescimento e colonização de organismos

marinhos incrustantes, o chamado *fouling*; nas embarcações o *fouling* é responsável pela diminuição na velocidade dos barcos e conseqüentemente um aumento no consumo de combustível (ALMEIDA *et al.*, 2007).

Almeida *et al.*, (2007), explicam que atualmente existem diversas tipos tintas anti-incrustantes e muitas delas contém em sua formulação nanopartículas de óxido de cobre; a quantidade de cobre presente nestas tintas variam entre 25 a 75% de cobre em peso, embora haja tintas que possuam menos de 5% de cobre por peso em sua formulação (USEPA, 2011).

3.1.2 Aspectos ambientais

A produção de nanomateriais vem aumentando, assim como sua aplicabilidade em diversos produtos, isto tem provocado uma ampla discussão sobre os potenciais riscos toxicológicos que estão associados à sua exposição, mediante a dificuldade de avaliar os possíveis efeitos tóxicos (SEATON e DONALDSON, 2005).

À medida que diversos tipos de nanomateriais são sintetizados, manipulados e descartados no meio ambiente sem que se tenha controle ou regulamentação adequada para descarte destes produtos (ZUCOLOTTO, 2010) o risco de contaminação do ambiente por nanopartículas sintéticas vem aumentando.

O risco de estes produtos alcançarem os diferentes compartimentos ambientais (atmosfera, águas e solo) e se tornarem biodisponíveis são enormes, sendo o ambiente aquático o mais suscetível à contaminação, por ser o receptor final de todo subproduto gerado pelas atividades antrópicas (LOVERN, *et al.*, 2007; PEREIRA e SOARES-GOMES, 2009).

Segundo Colvin (2002), Lecoanet, *et al.*, (2004) e Kleiner e Hogan (2003) assim como outros compostos químicos, as nanopartículas quando entram contato com os lençóis freáticos e o solo dispersam-se facilmente, visto que estes compartimentos ambientais agem como veículos para o transporte rápido e de longa distância de produtos químicos, dispersando-os amplamente em todo o meio. Isto representa um grande problema segundo Ludwig *et al.*, (2008), devido a falta de informações acerca do que ocorre quando nanomateriais inorgânicos são jogados em estações de tratamento de esgoto doméstico e industrial ou dispersos no ambiente.

O uso de tintas anti-incrustantes torna-se uma potencial fonte de contaminação dos ecossistemas aquáticos, pois diferentemente das tintas convencionais, a cura destas tintas não estabiliza quimicamente as nanopartículas de óxido de cobre, e devido a isto, seu processo de decomposição pode liberar cobre sob formas iônicas insolúveis ou nanopartículas (SAISON, 2010; ROSSETO, 2012).

Estudos realizados por Meng *et al.*, (2007); Griffit *et al.*, (2008); Blinova *et al.*, (2010); Perreault *et al.*, (2010); Ahamed *et al.*, (2010) Vaz, (2012); Melegari *et al.*, (2013) demonstram que tais substâncias são responsáveis por causar efeitos nocivos aos organismos vivos, tais como, microcrustáceos, algas, peixes, ratos e células humanas.

Quando comparados com partículas micrométricas, as nanopartículas podem interagir com os sistemas biológicos de forma mais eficiente, devido principalmente ao seu pequeno tamanho, sua grande área superficial e sua forma (FARRÉ, 2009), desta maneira podem ser absorvidas através da pele, mucosas e membranas celulares, por inalação e ingestão (SERVICE, 2004; USEPA, 2008). Dentro da célula, as nanopartículas podem provocar o stress oxidativo de determinadas organelas, resultando num desequilíbrio redox, levando então a uma grave disfunção celular (XIA *et al.*, 2006; LONG *et al.*, 2006)

A respeito de leis e regulamentações, em 2006, a *European Chemicals Regulation* (REACH) aprovou uma nova regulamentação dos produtos químicos utilizados na Europa (DROBNE, 2007), porém os regulamentos não estão focados para lidar com as especificidades de nanomateriais (SEATON, 2009). Desta forma, um movimento aprovado pelo Parlamento Europeu criticou esta situação, solicitando a REACH que revisse toda a legislação pertinente, a fim de assegurar que as disposições legislativas e instrumentos de implementação reflitam as características particulares dos nanomateriais aos quais trabalhadores, consumidores e meio ambiente podem ser expostos (SEATON, 2009).

Atualmente o Brasil não possui legislação para regulamentar o uso e/ou a forma de descarte de nanomateriais, apenas existem leis que estabelecem as condições e padrões de lançamento de efluentes nos corpos hídricos, conforme a classificação da água, exigindo que sejam feitos testes toxicológicos para o descarte de tais efluentes, como é o caso das resoluções do CONAMA 357/05 (BRASIL, 2005) e 430/2011 (BRASIL, 2011).

3.2 TOXICOLOGIA AMBIENTAL

3.2.1 Aspectos conceituais

A toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com os organismos vivos, órgãos, células, entre outros, realizando avaliações qualitativas e quantitativas para identificação dos riscos associados (JAMES *et al.*, 2000; CHASIN e PEDROSO, 2003).

Esta não é uma ciência pura nem descritiva, mas sim uma ciência aplicada (MATIAS e PINTO, 2006) que engloba uma multiplicidade de enfoques e integra uma série de conhecimentos dando-lhe caráter interdisciplinar (Figura 2), desta forma há a necessidade que ocorra um aporte de capacitações e tecnologias que integram a construção de seu conhecimento (CHASIN e PEDROSO, 2003).

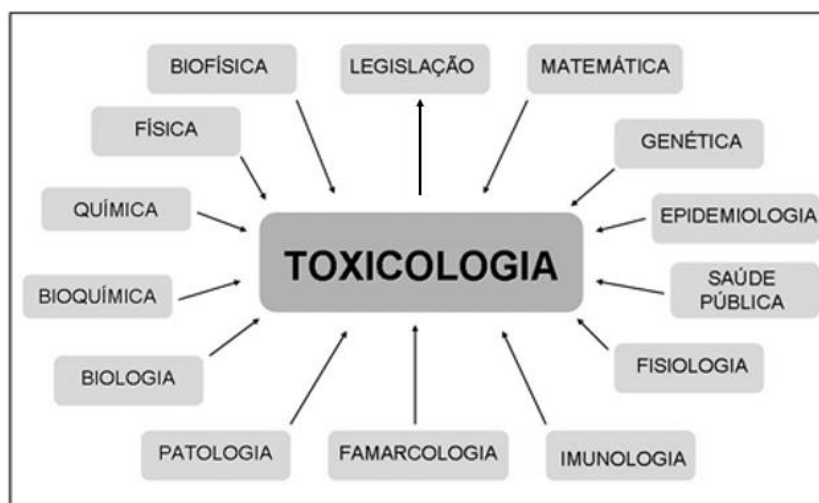


Figura 2. Natureza multidisciplinar da toxicologia.

Fonte: Adaptado de Loomis (1996).

A toxicologia pode ser dividida de acordo com os diferentes campos de trabalho em: (a) Toxicologia Analítica, que trata da detecção do agente químico ou de algum parâmetro relacionado à exposição ao agente tóxico em substratos, objetivando prevenir e diagnosticar as intoxicações; (b) Toxicologia Clínica, que previne ou diagnostica a intoxicação dando-lhe um tratamento específico, e (c) Toxicologia Experimental, que desenvolve estudos para o conhecimento dos mecanismos de ação dos agentes tóxicos sobre os sistemas biológicos e para avaliação dos efeitos decorrentes dessa ação (OGA, 2003).

Ainda segundo Oga (2003), pode-se subdividir estas áreas da toxicologia conforme a área de atuação dos pesquisadores, de acordo com a natureza do agente ou a maneira como este atinge os sistemas biológicos, mais comumente subdivida em: Toxicologia Ambiental, Toxicologia Ocupacional, Toxicologia de Medicamentos e Cosméticos e Toxicologia Social e Toxicologia de Alimentos.

A toxicologia ambiental estuda os efeitos adversos causados aos organismos vivos pelas substâncias químicas (naturais ou sintéticas) presentes no ambiente (HODGSON, 2004; YU, 2005). Hodgson (2004) ressalta que a toxicologia ambiental contribui com a afirmação de que o bem estar do ser humano depende da sobrevivência das outras espécies e da disponibilidade e qualidade do ar, água, solo e alimentos e considera, portanto que as substâncias químicas antropogênicas podem causar efeitos nocivos aos organismos vivos e aos processos biológicos. Desta forma a toxicologia ambiental tem como finalidade verificar a probabilidade de uma substância produzir dano sob determinadas condições de exposição e possibilita proporcionar medidas preventivas, tais como o monitoramento ambiental e biológico e o controle das fontes emissoras de poluição, para que tais danos não ocorram (PASSARELLI, 2003).

Para que estes monitoramentos sejam eficazes é necessário conhecer as fontes de poluição, as interações entre os poluentes, as interações com os organismos, os mecanismos naturais de remoção dos poluentes, bem como fatores climatológicos e geográficos que poderiam aumentar ou diminuir a probabilidade de dano (risco) (PASSARELLI, 2003).

A ecotoxicologia é uma área especializada da toxicologia ambiental que estuda impacto de substâncias tóxicas na dinâmica de populações integradas num ecossistema (KLASSEN e WATKINS, 2001), considerando a interação dos poluentes com o meio ambiente (mobilidade, degradabilidade, bioacumulação e bioamplificação) (MATIAS e CREPPY, 1996).

Também como uma subdivisão da toxicologia ambiental, há a toxicologia aquática. De acordo com Rand *et al.*, (1985), a toxicologia aquática estuda os efeitos deletérios causados por substâncias químicas, tanto de origem natural quanto antropogênica, sobre os organismos aquáticos, sendo que os efeitos tóxicos podem manifestar-se em diferentes níveis, desde células até indivíduos, populações e comunidades.

Segundo Zagatto e Bertoletti (2006), a toxicidade é a propriedade intrínseca da substância capaz de causar efeitos adversos nos organismos vivos. Quando a

substância causa algum efeito ao organismo em estudo, este efeito pode ser classificado numa escala de toxicidade sugerida por Blaise *et al.*, (2006), estes autores desenvolveram uma escala de toxicidade para distintos compostos químicos classificando-os como: extremamente tóxicos, quando causam efeitos em concentrações menores que $0,1 \text{ mg.L}^{-1}$; muito tóxicos, quando causam efeitos em concentrações entre $0,1$ a 1 mg.L^{-1} ; tóxicos, quando causam efeitos em concentrações entre 1 a 10 mg.L^{-1} ; nocivos, quando causam efeitos em concentrações ente 10 a 100 mg.L^{-1} e não tóxicos, quando causam efeitos em concentrações maiores que 100 mg.L^{-1} .

Os testes de toxicidade podem medir os efeitos agudos, subagudos ou crônicos causados por determinada substância aos organismos, tais efeitos são avaliados com metodologia específica, sendo os testes agudos e crônicos os mais utilizados (PASCHOALINO *et al.*, 2010).

Costa *et al.*, (2008), explicam que os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais realizados sob condições específicas e controladas, contudo Zagatto e Bertoletti (2006) citam que é possível realizar ensaios toxicológicos em campo, havendo uma ampla discussão sobre as vantagens e desvantagens de testes realizados em laboratório ou em campo.

Os testes toxicológicos e as análises físico-químicas complementam-se, visto que as análises químicas quantificam as concentrações das substâncias tóxicas e os testes de toxicidade avaliam os efeitos dessas substâncias sobre os sistemas biológicos (GHERARDI *et al.*, 1990). Existem diversos testes de toxicidade considerando tipo de amostra, local e contaminação, estabelecidos e padronizados por instituições nacionais e internacionais de normatização, tais como a Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT), a Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo (CETESB), a *International Organization for Standardization* (ISO) (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006) e a *United States Environmental Protection* (USEPA, 1993).

De maneira geral qualquer espécie pode ser utilizada para realização de testes de toxicidade, porém para maior confiabilidade dos resultados e modo de padronização dos organismos-teste, as espécies utilizadas devem exibir as seguintes características: disponibilidade e abundância, características genéticas uniformes e estáveis, grande potencial reprodutivo, fácil aquisição e manutenção em laboratório, além pertencer a certos grupos taxonômicos representativos dos ecossistemas aquáticos e possuir sensibilidade à exposição de agentes químicos

(GHERARDI *et al.*,1990; ABNT, 2011; DOMINGUES e BERTOLETTI, 2006). A determinação da duração do tempo dos testes de toxicidade depende do tipo de ensaio e a espécie que está sendo utilizada, pois os organismos possuem diferentes ciclos de vida e longevidade, interferindo assim na duração dos ensaios (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006), não sendo possível estabelecer um tempo padrão de duração para todos os testes existentes.

Os testes de toxicidade aguda são caracterizados por avaliarem os efeitos tóxicos que proporcionam respostas rápidas dos organismos a um estímulo que se manifesta, geralmente num intervalo de 0 a 96 horas; esta variação ocorre conforme a espécie utilizada (RAND e PETROCELLI, 1985), ou seja, são ensaios que verificam a manifestação de um efeito em um curto espaço de tempo após administração de uma dose única ou repetida de um agente tóxico (OGA, 2003). De maneira geral, são os primeiros testes a serem realizados quando não se tem informações toxicológicas básicas sobre determinada substância (AZEVEDO e CHASIN, 2003).

Os critérios avaliados em ensaios de toxicidade aguda são: mortalidade e/ou comportamento adverso dos espécimes, apesar da aparente simplicidade na detecção dos efeitos tóxicos de um toxicante, visto que são facilmente determinados, esses critérios são utilizados, pois possuem elevado significado biológico e ecológico para o ambiente (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006).

Os testes de toxicidade aguda permitem estabelecer uma relação entre a dose/concentração administrada e a intensidade de efeitos adversos observados; estabelecer uma comparação da toxicidade de uma substância com outras substâncias na qual a toxicidade é conhecida e determinar a CL₅₀ ou CE₅₀. A determinação da CE₅₀ e CL₅₀ pode ser realizada por meio de diversos métodos estatísticos computacionais. Geralmente os valores de concentrações efetivas e letais são expressas a 50% dos organismos expostos ao agente intoxicante porque estas respostas são mais reprodutíveis; podem ser estimadas com maior grau de confiabilidade e são mais significativas para serem extrapoladas para uma população (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). Desta forma, os testes de toxicidade aguda fornecem informações básicas para estudos mais criteriosos como os testes de toxicidade crônica e avaliação de risco ecotoxicológico (COSTA *et al.*, 2008; LOMBARDI, 2011).

Os testes de toxicidade crônica são caracterizados por submeterem os organismos-teste a baixas concentrações de determinadas substâncias químicas por um longo período de tempo, que pode corresponder a todo o seu ciclo de vida ou no mínimo 10% dele. Este tipo de teste permite avaliar os possíveis efeitos tóxicos das substâncias em concentrações que permitam a sobrevivência dos organismos, mas que podem afetar suas funções fisiológicas e/ou comportamentais em função do longo tempo de exposição, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, entre outras (GHERARDI *et al.*, 1990; ARAGÃO e ARAÚJO, 2006).

Os resultados obtidos nestes testes são geralmente expressos como Concentração de Efeito Não Observável (CENO) ou Concentração de Efeito Observável (CEO) (COSTA *et al.*, 2008), permitindo estabelecer as concentrações máximas e mínimas das substâncias necessárias para que ocorra toxicidade crônica.

3.2.2 Testes de toxicidade com organismos aquáticos

Os testes de toxicidade com organismos aquáticos são amplamente utilizados devido os ecossistemas aquáticos serem os receptores finais de todos os contaminantes gerados pelas atividades antrópicas, sejam estes lançados diretamente nos corpos d'água por meio de descargas de poluentes (fontes pontuais de poluição), emitidos no ar ou depositados no solo (fontes difusas de poluição) (BERTOLETTI, 2013).

No meio aquático os organismos estão expostos de maneira geral, a concentrações subletais dos poluentes devido a fatores de diluição, e a menos que estejam em locais cujas suas concentrações possam causar efeitos agudos aos organismos, os possíveis efeitos tóxicos das substâncias descartadas nos corpos hídricos não serão detectadas em curto prazo. A exposição prolongada aos contaminantes podem desencadear distúrbios morfológicos, fisiológicos e/ou comportamentais, e conseqüentemente levar a morte dos organismos (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006).

Uma vez que a maioria dos testes com organismos aquáticos são realizados em laboratório, os resultados obtidos nestes testes são extrapolações da realidade, visto que tais testes são realizados em circunstâncias controladas; no entanto acabam por

fornecer informações e indicações sobre possíveis riscos e alterações prejudiciais ao meio ambiente, servindo como um sistema de alerta e proteção ambiental (KNIE e LOPES, 2004).

Os testes toxicológicos aquáticos são utilizados para diversos fins, tais como, determinar a toxicidade de agentes químicos, efluentes líquidos, lixiviados de resíduos sólidos; avaliar a qualidade da água; avaliar a toxicidade relativa de diferentes substâncias; entre outros, uma vez que apenas análises físico-químicas dos toxicantes não são suficientes para avaliar o seu potencial toxicológico e possível risco ambiental (ZAGATTO e BERTOLLETTI, 2006).

Desta forma, há uma série de organismos aquáticos, tanto de água doce, como de água marinha e estuarina, igualmente padronizados nacional e internacionalmente para a realização de testes de toxicidade. Os organismos padronizados mais utilizados para a realização de testes de toxicidade estão listados no Quadro 1.

De acordo com Baun *et al.* (2009) os invertebrados aquáticos são os receptores finais da maioria dos contaminantes liberados no meio ambiente pois, muitos possuem hábitos de vida bentônicos e/ou alimentam-se por filtração, ou seja habitam locais com possíveis altas quantidades de nanopartículas (sedimentadas no fundo marinho) e alimentam-se de forma que podem consumi-las diretamente. Visto que a maioria dos invertebrados marinhos são organismos da base da cadeia trófica (integrantes do 2º nível trófico, sendo consumidores primários) e possuem ciclo de vida relativamente curto, os danos causados a população destes organismos podem levar a contaminação dos demais níveis tróficos, ou ainda gerar desequilíbrio na cadeia trófica; devido a estas características são considerados organismos apropriados para testes de toxicidade (BAUN *et al.*, 2009).

Dentre os invertebrados, os misidáceos são pequenos crustáceos marinhos parecidos com camarões (RUPPERT *et al.*, 2005), na forma adulta estes organismos apresentam dimorfismo sexual e diferentemente dos machos, as fêmeas quando maduras, apresentam um marsúpio, espécie de bolsa onde carregam seus ovos, sendo que os juvenis nascem com forma similar ao organismo adulto (MAUCHLINE, 1977); são omnívoros e em sua maioria são capazes de se alimentar de pequenas partículas aderidas a superfície do seu corpo, além de capturar organismos planctônicos significativamente grandes quando comparado ao seu tamanho (RUPPERT *et al.*, 2005).

Estes organismos são reconhecidos nacionalmente como organismo-padrão em testes de toxicidade, pois apresentam os seguintes critérios: os espécimes adultos têm grande potencial reprodutivo; são de fácil aquisição e manutenção no laboratório; os ensaios apresentam boa reprodutibilidade (ABNT, 2011).

No Brasil o organismo *M. juniae*, é padronizado para realização de ensaios de toxicidade aguda pela NBR 15308 (ABNT, 2011) e L.25.251 (CETESB, 1992), sendo indicado por Zagatto e Bertoletti (2006) para estudos que avaliem a água marinha e estuarina.

Quadro 1. Lista das espécies aquáticas mais utilizadas para realização de testes de toxicidade.

	GRUPO TAXONÔMICO	ESPÉCIE
Organismos de água doce	Algas	<i>Chlorella vulgaris</i> , <i>Scenedesmus quadriculata</i> , <i>Scenedesmus subspicatus</i>
	Microcrustáceos	<i>Daphnia magna</i> , <i>Daphnia similis</i> , <i>Ceriodaphnia dubia</i> , <i>Hyalella azteca</i> , <i>Hyalella meinerti</i>
	Peixes	<i>Pimephales promelas</i> , <i>Danio rerio</i> , <i>Poecilia reticulata</i> , <i>Onchorynchus mykiss</i> , <i>Lepomis macrochirus</i>
	Bactérias	<i>Spirillum volutans</i> , <i>Pseudomas fluorescens</i>
Organismos de água marinha	Algas	<i>Phaedactylum tricorutum</i> , <i>Asterionella japonica</i> , <i>Dunaliella tertiolecta</i> , <i>Champia parvula</i> , <i>Skeletonema costatum</i>
	Microcrustáceos	<i>Mysidopsis bahia</i> , <i>Mysidopsis juniae</i> , <i>Leptocheirus plumosus</i> , <i>Tiburonella viscana</i> , <i>Artemia salina</i>
	Peixes	<i>Menidia berellyna</i> , <i>Menidia menidia</i> , <i>Cypronodun variegatus</i>
	Bactérias	<i>Vibrio fischeri</i>
	Moluscos	<i>Mytilus edulis</i> , <i>Crassostrea rhizophorae</i>
	Equinodermos	<i>Arbacia lixula</i> , <i>Lytechinus variegatus</i> , <i>Arbacia punctulata</i>

Fonte: Adaptado de Zagatto e Bertoletti (2006).

A espécie *M. juniae* foi descrita por Silva em 1979, apresenta hábitos epibênticos e omnívoros. Estes organismos ocorrem na costa brasileira, tendo ocorrência

registrada no canal de São Sebastião, litoral norte do Estado de São Paulo e Rio de Janeiro (ABNT, 2011).

A principal característica morfológica a ser identificada para distinguir *M. juniae* das outras espécies é o formato do telson, este apresenta um turbéculo distal no ápice, (ABNT, 2011), como pode ser observado na Figura 3.

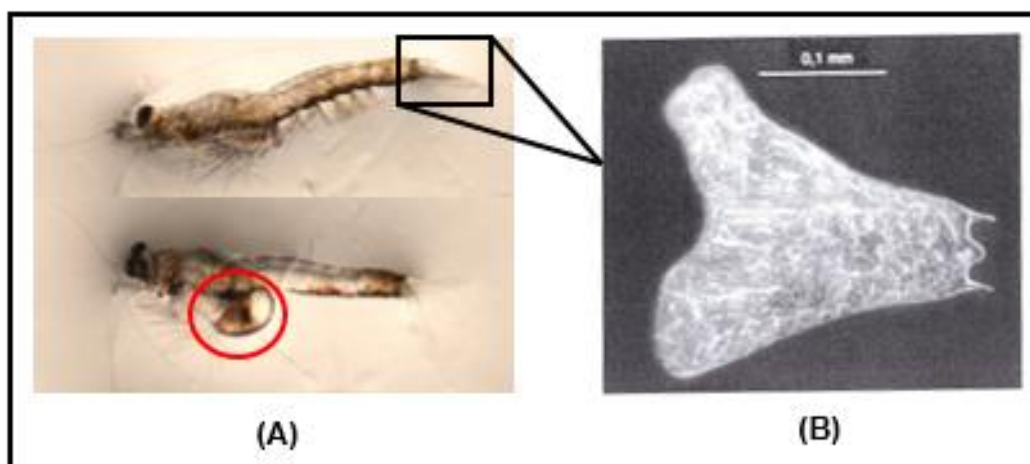


Figura 3. (A) exemplar de *M. juniae* macho (acima) e fêmea (abaixo), o círculo vermelho indica o marsúpio presente apenas nas fêmeas; (B) do telson visto em MEV. Fonte: (B) ANBT (2011).

A distribuição geográfica das espécies de misidáceos é ampla, podendo ser encontrados em todos os oceanos do planeta e em todas as latitudes, ocorrendo, assim, nas mais variadas condições de temperatura. Existem também espécies de água doce, onde, assim como nos ambientes marinhos atuam como importante parte da dieta de muitas espécies de peixe (MAUCHLINE, 1982).

3.2.3 Nanotoxicologia

Nanotoxicidade refere-se ao estudo da interação entre nanomateriais com sistemas biológicos, compreendendo células e tecidos (ZUCOLOTTO, 2010). Utiliza-se o termo nanoecotoxicologia para estudos que avaliam e/ou determinam os efeitos de nanomateriais ao ambiente, demonstrando os caminhos de transferência da substância tóxica, e suas rotas de exposição (PASCHOALINO *et al.*, 2010).

Devido a ampla gama de aplicações diversos estudos utilizando os mais variados bioindicadores estão sendo realizados para verificar o potencial toxicológico

destes materiais (ARAGÃO e ARAÚJO, 2006). Porém ainda não há métodos padronizados para ensaios com nanopartículas, os estudos realizados nesta área são adaptações dos métodos de ensaios de toxicidade já padronizados para outras substâncias, dificultando a comparação dos resultados dos estudos e o consenso sobre a toxicidade das nanopartículas e nanocompostos (PASCHOALINO *et al.*, 2010).

Nos estudos toxicológicos com nanomateriais é importante considerar as diversas formas como as nanopartículas irão apresentar-se após o contato com o meio diluente ou com os organismos. As partículas nanométricas podem estar presentes na forma livre, aglomeradas ou agregadas, devido aos diferentes grupos químicos presentes no meio (PASCHOALINO *et al.*, 2010).

Segundo Jiang *et al.* (2008), quando encontram-se na forma de aglomerados, as nanopartículas podem ser separadas, devido as forças existentes (forças de van der Waals) serem mais fracas, enquanto que os agregados de nanopartículas não podem ser separados pois são ligados por forças eletrostáticas. Ainda segundo Jiang *et al.* (2008) para a realização dos estudos é necessário romper as forças existentes nos aglomerados e isto pode ser feito através de processos físicos, tais como o cisalhamento (forças ultrassônicas), ou químicos, que envolvem adição de surfactantes ou funcionalização da superfície.

Devido a todas as considerações que precisam ser feitas ao realizar estudos nanotoxicológicos, há um consenso crescente na comunidade científica de que a caracterização das nanopartículas que serão utilizadas na realização dos testes faz-se necessária, sendo uma parte essencial da avaliação da toxicidade em sistemas biológicos, visto que as propriedades físico-químicas das nanopartículas afetam na sua toxicidade (HOOD, 2004).

Uma adequada caracterização das suspensões-teste é importante para garantir que os resultados sejam reprodutíveis, e também fornecer a base para a compreensão de como as propriedades das nanopartículas podem influenciar na determinação dos efeitos toxicológicos. Esta caracterização torna a interpretação dos resultados mais realística (HANDY *et al.*, 2008), além de permitir uma adequada comparação dos resultados interlaboratoriais, possibilitando uma melhor compreensão dos efeitos das NP sobre os organismos (POWER *et al.*, 2007).

Apesar de haver um consenso que a caracterização das suspensões-teste é necessária, ainda não há métodos específicos a serem utilizados para cada

nanocomposto, muitas são as técnicas que podem ser utilizadas, pois é preciso levar em consideração o meio diluente e as propriedades das NP, além dos recursos disponíveis para realização da pesquisa (PASCHOALINO *et al.*, 2010).

Klaine *et al.*, (2008) afirmam que no ano de 2004, muitas foram as discussões sobre as propriedades físico-químicas das NP em relação ao seu comportamento em ambientes aquosos, sendo essencial a caracterização das seguintes propriedades: composição química, massa, número de partículas e concentração, área superficial, tamanho, potencial zeta, estabilidade, solubilidade, cristalinidade, porosidade, superfície e rugosidade. Porém, a caracterização completa, incluindo todos os parâmetros mencionados pode se tornar cara e complexa, tornando-se inviável. Desta forma, Bucher *et al.*, (2004) sugeriram que, no mínimo, em estudos toxicológicos, devem ser levados em consideração a caracterização em relação ao tamanho, forma, estado de dispersão, propriedade físicas, químicas e área superficial.

Diferentes técnicas podem ser utilizadas para realizar estas caracterizações, sendo as principais técnicas utilizadas listadas no Quadro 2.

Quadro 2. Principais técnicas usadas na caracterização de NP.

TÉCNICA	APLICAÇÃO/CARACTERÍSTICAS
Difração de raios-X	Estrutura cristalina, tamanho da partícula
Espalhamento dinâmico de luz	Tamanho de partículas (suspensão), distribuição por tamanhos
Sedimentação por centrifugação	Distribuição dos tamanhos das partículas
Cromatografia de exaustão por tamanho	Pequeno volume de amostra
Microscopia de força atômica	Boa resolução imagens 3D, só analisa a superfície
Área superficial específica (BET)	Tamanho das partículas, área superficial
MEV	Morfologia da superfície, tamanho das partículas
MET	Morfologia e composição
Espectroscopia de energia dispersiva de raios-X (EDX)	Composição da superfície e mapeamento elementar
Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raio-X (XPS)	Análise química da superfície

Fonte: Adaptado de Paschoalino *et al.*, 2010.

A microscopia eletrônica de transmissão (MET) segundo Maliska (2011) é um instrumento versátil e utilizado rotineiramente para a análise microestrutural de materiais sólidos. Esta técnica é utilizada para verificar o tamanho e a forma das nanopartículas empregadas nos testes de toxicidade, como pode ser verificado nos estudos apresentados por Federici, *et al.* (2008), Blinova *et al.* (2010), Perreault *et al.* (2010), Perreault *et al.* (2012), Vaz (2012), Rosseto (2012) e Melegari *et al.* (2013).

O tamanho hidrodinâmico é utilizado para determinar o tamanho das partículas no meio diluente, através do movimento Browniano das partículas, ou seja, o tamanho de partícula é o diâmetro da esfera que se difunde na mesma velocidade da partícula a ser medida (Malvern, 2004). Esta técnica foi utilizada nos estudos de Griffitt *et al.*, (2008) e Melegari *et al.*, (2013).

Outra maneira de caracterizar a suspensão-teste é através da medição do potencial zeta (Pz) das partículas. Segundo Schaffazick *et al.*, (2003), a medida do Pz é realizada através da técnica de Mobilidade Eletroforética, ou seja, através da medida das cargas superficiais da amostra.

O potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento, ou seja, é o potencial existente entre a superfície das partículas e o líquido de dispersão (Figura 4), ele determina se as partículas dentro de um líquido tendem a permanecer juntas ou não, dando a estabilidade das suspensões coloidais (MALVERN, 2004). Se as partículas em suspensão tiverem um valor alto do Pz, tanto negativo quanto positivo, elas tenderão a repelir-se umas das outras, não havendo tendência para se manterem unidas (MALVERN, 2004). Porém, se os valores do Pz forem baixos, tanto positivo quanto negativamente, estas possuem tendência a unir-se; de modo geral a divisão entre suspensões estáveis e instáveis é geralmente tomada em +30 mV ou -30mV, as partículas com potenciais zeta mais positivas do que +30 mV ou mais negativas do que -30 mV são normalmente consideradas estáveis (MALVERN, 2004). Esta técnica também foi usada nos estudos com nanopartículas de Qiang *et al.*, (2007), Wang *et al.*, (2011) e Rosseto, (2012), Perreault *et al.*, (2012), Melegari *et al.*, (2013), Perreault *et al.*, (2014).

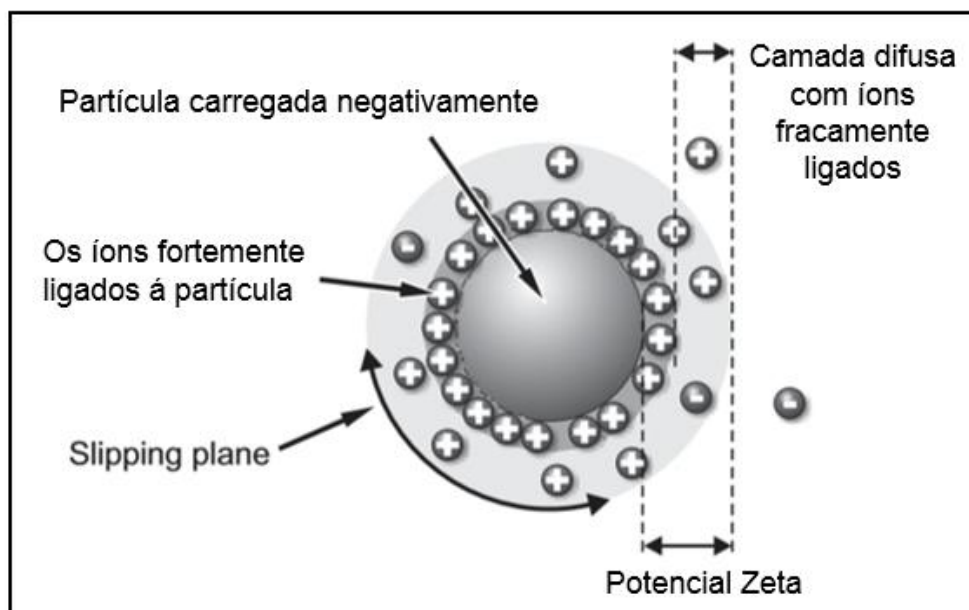


Figura 4. Desenho esquemático exemplificando o Pz.

Fonte: Adaptado de Malvern (2004).

Devido à expansão no uso de nanopartículas e nanocompostos, iniciaram-se pesquisas a respeito de tais materiais, sendo o final dos anos noventa e início dos anos dois mil marcados pelo lançamento de revistas científicas internacionais que abordam o tema nas diversas áreas do conhecimento, tais como o *Journal of Nanoparticles Research* (1999), a *Nano Letters* (2001), a *Nano Medicine* (2005), a *Nature Nanotechnology* (2006), a *Nanotoxicology* (2007) e mais recentemente a *Nano Today*, lançada em 2010.

No Brasil, em 2011, o CNPq lançou a chamada MCTI/CNPq N^o 17/2011 para apoio à criação de redes cooperativas de pesquisa e desenvolvimento em nanotoxicologia e nanoinstrumentação, onde foram criados diferentes grupos de pesquisa, dentre eles a 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 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), a Universidade da Região de Joinville (UNIVILLE) e a empresa POLINOVA, que vem contribuindo para a formação de recursos humanos em nível de mestrado, doutorado e pós-doutorado, e produção de conhecimento com a publicação de diversos artigos científicos em revistas da área com

renome internacional, tais como a *Chemosphere*, *Aquatic Toxicology*, *Journal of Botany*, *Science of Total Environment*, além da *Nanotoxicology*, abordando a toxicidade de NP CuO em algas verdes, plantas aquáticas e células. Com a produção de tal conhecimento, a Rede NANOTOX oferece subsídios para elaboração de estratégias de prevenção e controle de poluição nesta área.

4 METODOLOGIA

4.1 ABORDAGEM METODOLÓGICA E EXPERIMENTAL DA PESQUISA

A partir de parcerias já existentes com outras universidades (nacionais e internacionais), através da Rede de Nanotoxicologia (REDE NANOTOX), coordenada pelo LABTOX-UFSC, aprovada pela chamada MCTI/CNPq Nº 17/2011 do CNPq foi possível um intercâmbio de conhecimentos e o aprofundamento das técnicas de nanotoxicologia para melhor desenvolvimento da pesquisa.

Para o cumprimento dos objetivos propostos foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica com o organismo *Mysidopsis juniae* em água marinha reconstituída. Realizaram-se testes de sensibilidade (substâncias de referência: DSS), controle negativo e controle positivo ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) com intuito de validar os resultados obtidos nos teste com NP CuO. A amostra alvo do estudo foi caracterizada por diferentes técnicas com o intuito de verificar como se comportam as NP em meio salino e se interferem na toxicidade, permitindo a comparação com outros estudos.

A Figura 5 apresenta um esquema dos procedimentos experimentais utilizados na realização desta pesquisa.

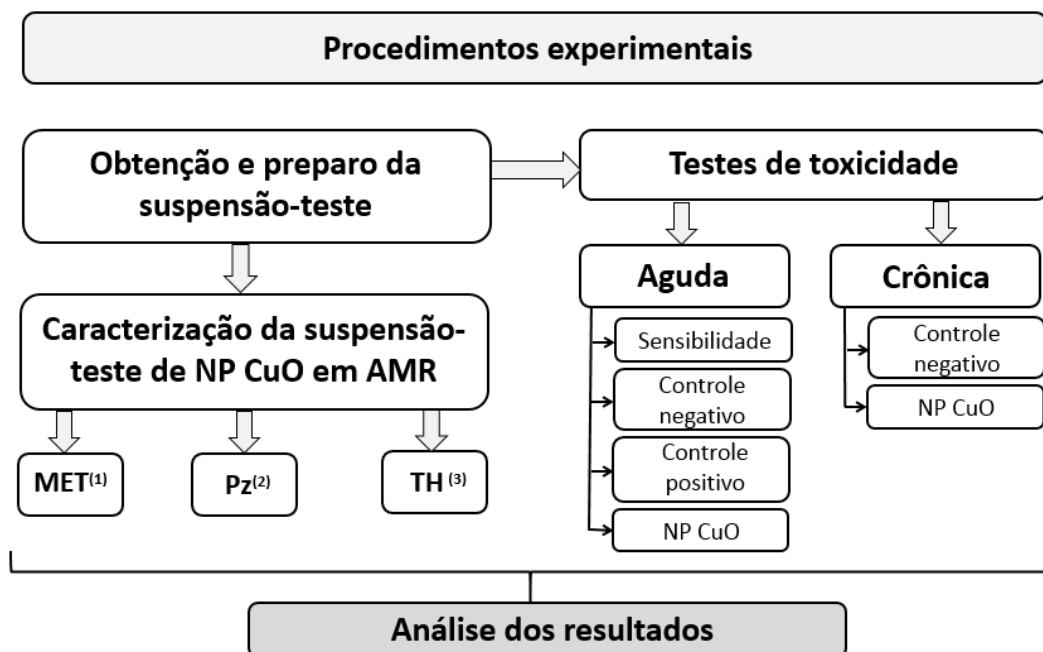


Figura 5. Procedimentos experimentais realizados para realização da pesquisa.

Legenda: ⁽¹⁾ Microscopia Eletrônica de Transmissão; ⁽²⁾ Potencial Zeta e ⁽³⁾ Tamanho Hidrodinâmico das NP CuO.

4.2 OBTENÇÃO E PREPARO DA SUSPENSÃO-TESTE

As NP CuO utilizadas nos testes foram obtidas através da parceria entre o Laboratório de Toxicologia Ambiental da UNIVILLE com o LABTOX – UFSC, sendo adquiridas pela MTI Corporation (Richmond, CA, USA) e fornecidas pelo *Département de Chimie - "Laboratoire de Toxicologie de L'Environnement" da Université du Québec à Montréal* (UQAM) através do projeto de cooperação internacional denominado REDE NANOTOX. As NP CuO são da marca Sigma-Aldrich e apresentam pureza de 99,9% e diâmetro entre 30-40 nm e apresentam área superficial de 5,380 m²/g, conforme já estabelecido no estudo de Rosseto (2012) que também utilizou em seu estudo o mesmo lote de NP CuO (MKBH9047V).

Ainda não há um procedimento padronizado para o preparo da suspensão de NP, sendo a metodologia mais utilizada o processo de ultrassonicação, que tem como objetivo desagregar as nanopartículas mantendo-as em suspensão. A metodologia utilizada para a preparação e caracterização da suspensão das NP CuO foi a proposta por Blinova *et al.*, (2009) e Heinlaan *et al.*, (2010), com algumas adaptações descritas a seguir.

O preparo da suspensão foi realizado na unidade de preparação e manipulação de amostra do LABTOX. A suspensão foi preparada numa concentração de 2g.L⁻¹. Pesou-se 0,15 g da amostra e diluiu-se em 75 mL de água marinha reconstituída (água deionizada acrescida de sal marinho da marca Red Sea Salt[®]) (AMR) com salinidade 32. Após este procedimento, a solução foi colocada em banho de gelo e colocada para sonicar num ultrassom de ponteira (QSONICA 500W), e sonicada com potência de 300W, ou seja 60% da capacidade do equipamento, durante 10 minutos (Apêndice 1). A AMR é o meio específico para cultivo e testes com o organismo *M. juniae*.

Para realizar este procedimento de preparo da amostra foram utilizadas luvas de nitrila (luvas especiais para procedimentos com produtos químicos) recobertas por um par de luvas de látex (luvas de procedimentos), segundo recomendações de Lee *et al.*, (2005), máscara de proteção PFF3 (máscara específica proteção contra partículas ultrafinas) e óculos de segurança.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA SUSPENSÃO-TESTE

Para verificar se as NP estavam na escala nanométrica, faz-se necessário sua caracterização, sendo neste estudo utilizado análises por Microscopia de Transmissão Eletrônica (MET), análise do Potencial Zeta (Pz) e tamanho hidrodinâmico.

4.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Com o objetivo de verificar a forma e o tamanho das NP ou seus aglomerados, a suspensão-teste foi analisada por Microscopia Transmissão de Eletrônica (JEM-1011 MET – 100KV) no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

Imediatamente após o preparar e sonicar a suspensão-teste, foi realizado o preparo da grade amostral para ser analisada no MET. Dentro de uma Placa de Petry forrada com papel macio a suspensão-estoque foi gotejada numa grade de carbono revestida com cobre (grid 300 mesh) (Apêndice 2) e armazenada em um dessecador à vácuo por um período de 24 horas para secagem. Não foi utilizado contraste na preparação da grade.

4.3.2 Potencial zeta (Pz) e tamanho hidrodinâmico

Com o objetivo de verificar o potencial de agregação e o tamanho das NP no meio estudado realizou-se a determinação do Pz e do tamanho hidrodinâmico.

Para medir o Pz, a suspensão-estoque já sonicada foi colocada em uma cubeta de poliestireno (cubeta com dois eletrodos) com o auxílio de uma seringa para que não houvesse a formação de bolhas em seu interior (Apêndice 3).

Para medir o tamanho hidrodinâmico das NP CuO utilizou-se a mesma suspensão-estoque, onde aproximadamente 1 mL da suspensão foi colocado em uma cubeta de poliestireno. As cubetas, uma de cada vez, foram colocadas no equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600), que realizou a análise da mesma amostra em triplicata. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Catalise Biomimética (LACBIO), Departamento de Química da UFSC.

4.4 TESTES TOXICOLÓGICOS

Os testes toxicológicos foram realizados com o microcrustáceo *Mysidopsis juniae* por ser um organismo marinho padronizado para avaliação da toxicidade aguda de amostras de efluentes líquidos, água do mar ou estuarina e substâncias químicas solúveis ou dispersas em água pela NBR 15308/2011.

Os organismos *M. juniae* utilizados na realização deste estudo foram provenientes do cultivo (Apêndice 4) realizado no Laboratório de Toxicologia Ambiental da Universidade da Região de Joinville, unidade São Francisco do Sul, que opera segundo a Norma NBR 15308 (ABNT, 2011) com algumas adaptações sugeridas por Kleine, (2010) e conta com uma carta controle que é atualizada semanalmente. A tabela 1 apresenta as condições utilizadas no cultivo dos organismos.

Tabela 1. Condições de cultivo recomendadas para *M. juniae*.

Condições do cultivo	Recomendado
Troca de água marinha reconstituída (água deionizada + sal marinho)	1 vez por semana
Salinidade	32
Temperatura	25 ±1 °C
Fotoperíodo	12 horas luz/12 horas escuro
Alimentação	<i>Artemia sp.</i> enriquecida com óleo de peixe e óleo de fígado de bacalhau
Aeração	Branda e contínua
Sistema	Semi-estático
Densidade populacional	50 mL/indivíduo
Proporção sexual	4 fêmeas para 1 macho

Fonte: Adaptado de ABNT (2011).

A carta controle do laboratório é realizada para que se tenha confiabilidade e dos resultados, atestando a sensibilidade dos organismos; para sua elaboração utiliza-se como substância de referência o Dodecil Sulfato de Sódio (C₁₂H₂₅NaO₄S) (DSS) com grau analítico de 99% de pureza da marca Veitec Produtos Químicos. Esta substância apresenta ação rápida e não seletiva, baixa toxicidade para o homem além de agir dentro de uma faixa mais estreita de concentrações (ENVIRONMENT CANADA, 1990).

Para construção da carta-controle, semanalmente os dados são tabulados utilizando-se a $CL_{50(96h)}$ dos 25 últimos bioensaios, calculando a média e o desvio-padrão, sendo que o intervalo de confiança, que comprova a repetibilidade dos resultados, não pode ser superior a dois desvios-padrão. As concentrações utilizadas para realização dos testes de sensibilidade podem ser verificadas na Tabela 2.

4.4.1 Toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda realizados nesta pesquisa seguiram a metodologia descrita na norma NBR 15308 (ABNT, 2011). Para tanto, 10 organismos *M. juniae*, com 3 a 5 dias de vida, foram expostos a diferentes concentrações de amostra a partir da solução-estoque. Os testes foram realizados em frascos higienizados e devidamente identificados, sendo que a quantidade de amostra + AMR totalizou de 200 mL em cada frasco. O teste foi realizado em triplicata. Após a montagem dos testes, estes foram acondicionados numa incubadora configurada com fotoperíodo de 12 horas luz, 12 horas escuro e temperatura controlada de 25 °C. Os organismos foram alimentados uma vez ao dia com náuplios de *Artemia* sp. enriquecidos com óleo de peixe e óleo de fígado de bacalhau. Ao final das 96 horas de teste, foi observada a mortalidade e a imobilidade parcial dos organismos.

Os parâmetros pH e salinidade foram analisados ao início e ao final do teste para verificar se ocorreram alterações nos valores destes parâmetros. O pH foi mensurado através do equipamento pHmetro portátil (marca GEHAKA, modelo 2100), sendo devidamente calibrado antes de ser utilizado e a salinidade foi medida através de um salinômetro (marca Byosystems, modelo 211).

O teste com controle negativo, controle positivo e com NP CuO são caracterizados por serem testes de toxicidade aguda e visam a determinação da $CL_{50(96h)}$, desta forma, o método de realização dos ensaios seguem a mesma metodologia, mudando apenas o agente intoxicante adicionado ao meio e suas concentrações, sendo assim, optou-se por descrever a metodologia do ensaio apenas uma vez.

4.4.1.1 Controle negativo e controle positivo (CuSO₄.5H₂O)

O controle negativo é utilizado para verificar se as condições de teste estão adequadas a manutenção do organismo, para tanto, não pode apresentar toxicidade. Todos os testes realizados nesta pesquisa contaram com controle negativo, em que os organismos são mantidos apenas em água marinha reconstituída (AMR), não sendo expostos a nenhum contaminante.

O controle positivo foi realizado utilizando-se uma substância que possui efeito tóxico conhecido para assegurar que o organismo responde apropriadamente ao ensaio (MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008). Nesta pesquisa, utilizou-se como controle positivo o sulfato de cobre pentahidratado (CuSO₄.5H₂O) com grau de pureza analítica de no mínimo 98% da marca LAFAN Química Fina LTDA, sendo preparada uma solução estoque numa concentração de 2g.L⁻¹ de CuSO₄.5H₂O.

Para determinação da CL_{50(96H)} do CuSO₄.5H₂O foram realizados testes preliminares utilizando concentrações determinadas na literatura específica que então foram refinadas até determinação da CL_{50(96H)} para o organismo utilizado. A partir desta determinação foram realizados mais nove testes nas concentrações em que se encontrou a CL₅₀, a fim de se fazer um adequado tratamento estatístico dos dados. Estas concentrações encontram-se na Tabela 2.

4.4.1.2 Teste com NP CuO

Para avaliação da toxicidade aguda de NP CuO foi realizado ensaio com diferentes concentrações a partir de uma solução-estoque com concentração de 2g.L⁻¹ de NP CuO. Para determinação da CL_{50(96H)} das NP CuO foram realizados testes preliminares, tendo como base o estudo realizado por Gonçalves *et al.*, (2011). A partir da determinação da CL_{50(96H)} foram realizados mais nove testes para um adequado tratamento estatístico dos dados. As concentrações de NP CuO utilizadas na realização dos testes são mostradas na Tabela 2.

Tabela 2. Resumo das concentrações utilizadas nos testes de toxicidade aguda.

Amostra	[Solução estoque] em mg.L ⁻¹	[Testes] em mg.L ⁻¹
DSS	100	2 4 6 8 12
CuSO ₄ .5H ₂ O	2000	0,20 0,25 0,30 0,35 0,40
NP CuO	2000	8 12 20 22 25 28 30 33 35 40

4.4.2 Toxicidade crônica

O ensaio de toxicidade crônica foi realizado utilizando concentrações de NP CuO abaixo da CL_{50(96h)} encontrada para *M. juniae*, foram realizados dois testes em paralelo, utilizando as concentrações 50 µg.L⁻¹ e 100 µg.L⁻¹.

4.4.2.1 Montagem e acompanhamento do teste

Os testes de toxicidade crônica seguiram a metodologia desenvolvida por Vaz, (2012) com algumas adaptações descritas a seguir.

Em aquários de vidro com capacidade de 2 L foram preparados o ensaio controle (contendo apenas AMR) e a amostra (contendo AMR + NP CuO) em duplicata, totalizando 4 aquários (2 de controles e 2 de amostras). Para garantir a quantidade correta de AMR em cada aquário usou-se balão volumétrico, sendo a amostra adicionada utilizando micropipeta automática.

Em cada aquário foram colocados 60 organismos tendo de 0 a 3 dias de vida. Após 14 dias, tempo necessário para ocorrer a maturação sexual, foram formadas as famílias com proporção de 4 fêmeas para 1 macho, as famílias-teste foram montadas

em duplicata dentro de Erlenmeyers com capacidade de 1 L, mantendo as concentrações estudadas. Dos organismos excedentes, 60 indivíduos foram colocados em novos aquários de 2 L, tanto para controle quanto para a amostra, estes organismos foram utilizados para o acompanhamento da biometria. Um esquema deste sistema pode ser observado na Figura 6.

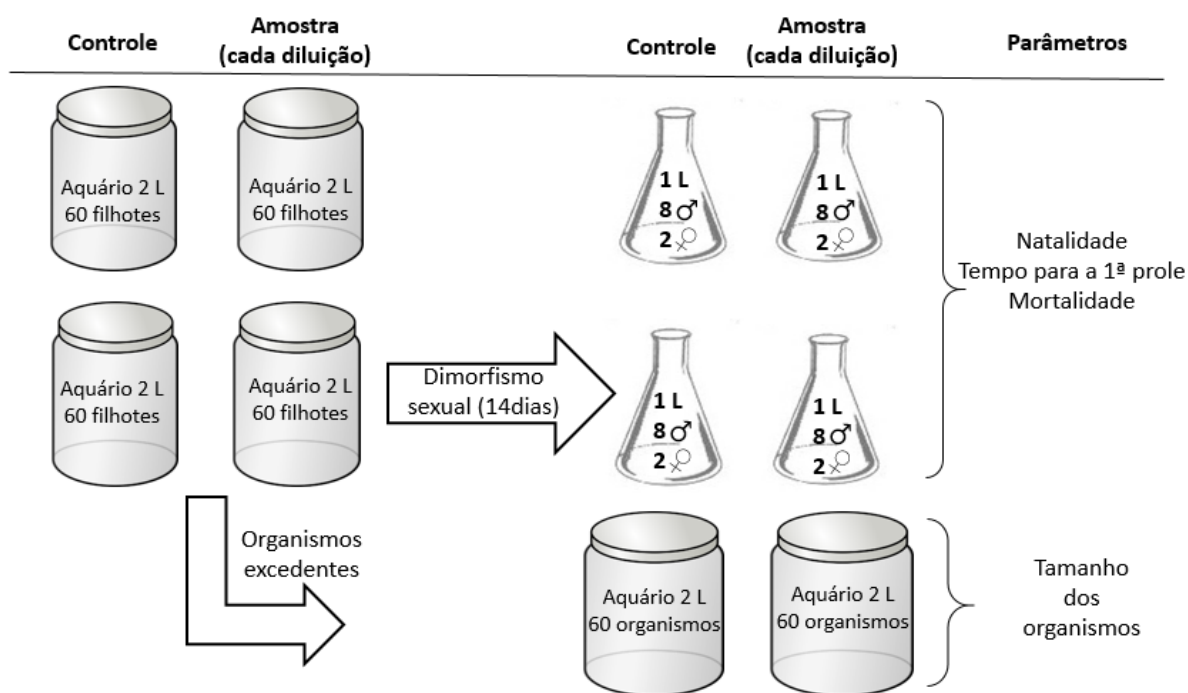


Figura 6. Diagrama esquemático para a montagem do teste de toxicidade crônica com *M. juniae*.
Fonte: Adaptado de Vaz (2012).

As condições em que foram realizados os testes foram análogas às do cultivo, sendo os principais parâmetros de controle a temperatura de $25 \pm 1^\circ \text{C}$, salinidade 32, fotoperíodo (12 horas luz - 12 horas escuro) e alimentação diária com náuplios de *Artemia sp.* enriquecidos com óleo de peixe e óleo de fígado de bacalhau.

Os recipientes-teste foram identificados através do sistema proposto por Gonçalves *et al.*, (2011). Este sistema possibilita o acompanhamento adequado do desenvolvimento do teste, pois baseia-se na identificação dos aquários por meio de uma ficha de identificação (Apêndice 5) onde constam as informações: data de nascimento do organismo, data da limpeza (higienização dos aquários e renovação da água), data de descarte dos organismos, número de fêmeas, número de machos, número de filhotes, número de organismos mortos e o nome do responsável pela manutenção do aquário.

As fichas foram substituídas e atualizadas semanalmente na data de limpeza dos aquários.

Segundo Vaz (2012), a duração total do teste crônico com *M. juniae* é de 60 dias, este tempo é necessário para analisar os efeitos transgeracionais do toxicante estudado, sendo possível analisar os efeitos para a 2ª geração de organismos.

Ao longo deste período foram observados os parâmetros (a) tempo para a primeira prole, onde após a maturação sexual e formação das famílias visualizou-se os aquários diariamente para verificar quando ocorreu a presença neonatos; (b) natalidade, sendo realizada uma contagem simples dos neonatos a cada 3 dias; (c) mortalidade, acompanhada semanalmente paralelamente a limpeza dos aquários e (d) tamanho dos organismos (biometria), medidos semanalmente retirando-se três organismos aleatoriamente dos aquários de excedentes de controle e amostra, por meio de microscópio estereoscópico que contém ocular com régua calibrada (aumento 2x), a medida adotada foi o comprimento padrão dos organismos (CP) (Figura 7), foram medidos ainda (e) temperatura e (f) salinidade do meio.

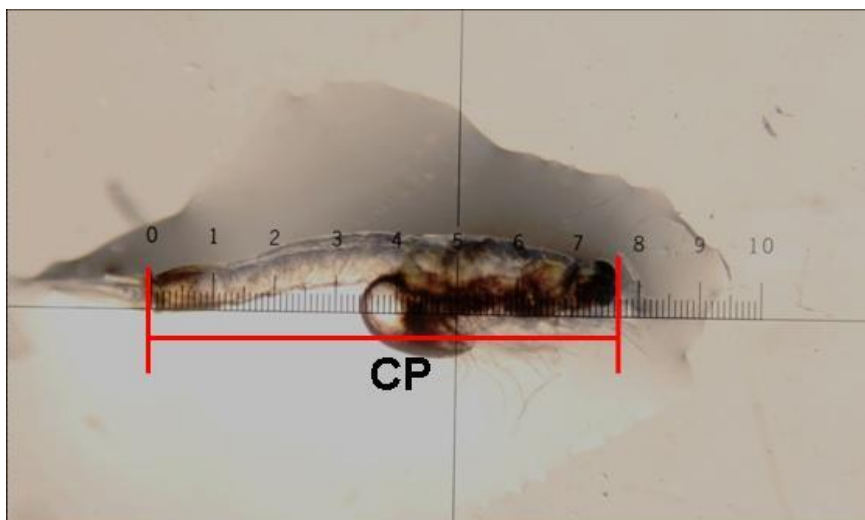


Figura 7. *M. juniae* observado em microscópio estereoscópico com angular com régua milimétrica em aumento de duas vezes.

Legenda: A linha vermelha (CP) indica os pontos de medição (último segmento distal antes do telson até a base ocular).

Um resumo da frequência e métodos utilizados para a quantificação dos parâmetros observados ao longo do teste crônico podem ser observados no Quadro 3.

Os parâmetros escolhidos para esta pesquisa seguiram as recomendações dos estudos de VAZ *et al.*, (2011) que desenvolveram uma matriz multicritérios para a seleção de características a serem analisadas em testes de toxicidade crônica com *M. junie*, segundo os autores estas são as características mais relevantes para a avaliação durante o teste de toxicidade crônico, sendo também as características mais citadas na literatura específica (CHÈVRE *et al.*, 2005; THORPE *et al.*, 2007; LESUTIENÉ *et al.*, 2008; FOCKEDEY *et al.*, 2005)

Quadro 3. Frequência e métodos de quantificação dos parâmetros observados no teste de toxicidade crônica.

Parâmetro	Tipo de avaliação	Período	Unidade de medida	Instrumentos utilizados
Natalidade da 1ª e 2ª geração	Não letal	Semanal	Quantidade de neonatos	Contador mecânico manual
Mortalidade da 1ª e 2ª geração	Letal	Primeira medição após 96 h de teste e depois semanal	Quantidade de organismos mortos	
Tempo para 1ª reprodução na 1ª e 2ª geração	Não letal	Diário	Número de dias para a ocorrência da primeira prole	Calendário de teste
Tamanho total dos organismos da 1ª e 2ª geração	Letal	Semanal	Milímetros	Microscópio estereoscópico com escala milimétrica adaptada à lente ocular
Temperatura	Não letal	Diário	°C	Termômetro
Salinidade	Não letal	Diário	-	Salinômetro

Observa-se que o teste crônico realizado neste trabalho teve seu tempo reduzido para 36 dias, devido a ocorrência no dia 25/09/2013 de um incêndio químico

em um galpão que armazenava fertilizantes (contendo em sua maioria nitrato de amônio e cloreto de potássio) na cidade de São Francisco do Sul, onde se localiza o Laboratório de Toxicologia Ambiental. A fumaça tóxica tomou conta de parte da cidade, sendo o bairro aonde localiza-se o laboratório uma das regiões mais afetadas. Devido a este fato, parte da cidade foi evacuada, desta forma todas as atividades realizadas no laboratório foram interrompidas, sendo retomadas novamente apenas no dia 30/09/2013. Neste período todo o cultivo e o teste permaneceram em condições inadequadas, ou seja, sem controle adequado de temperatura, aeração e alimentação. Além disto, os parâmetros do teste não puderam ser mensurados, bem como a renovação da água que era pra ocorrer naquela data não foi realizada. Desta forma o teste crônico foi interrompido após 36 dias, por não haver condições de continuação do mesmo.

4.5 FERRAMENTAS DE ANÁLISE DOS RESULTADOS

Os dados resultantes dos testes de toxicidade aguda foram submetidos aos testes estatísticos utilizando a Análise de Probitos, que utiliza a porcentagem de letalidade dos organismos relacionados com as concentrações das amostras e as transformam em unidades de probabilidade fornecendo a $CL_{50(96h)}$, a normalidade dos resultados dos testes agudos foram calculadas através do teste de normalidade de Anderson-Darling. Ambos os procedimentos foram realizados no programa MINITAB 16 da Minitab Inc.[®].

Para o teste de toxicidade crônica, os dados obtidos no controle e na amostra foram calculados para cada parâmetro por meio do software MASCoTE – Metodologia para Análise Simplificada e Coordenada da Toxicidade Estudada, desenvolvido por Vaz (2012) e auxílio do programa Excel da Microsoft Corporation.

4.6 QUESTÕES ÉTICAS DA PESQUISA

O organismo, *Mysidopsis juniae*, utilizados na realização deste estudo trata-se de um crustáceo, portanto pertencente ao filo Arthropoda. Desta maneira, a Lei Federal N° 11.794/08, na qual o CEP (Comitê de Ética em Pesquisa da UNIVILLE) se baseia para conduzir as pesquisas e garantir os bons tratos aos animais, não se aplica a este estudo, pois o organismo não pertence ao filo Chordata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÕES DA SUSPENSÃO-TESTE

5.1.1. Tamanho das partículas: MET e tamanho hidrodinâmico

A Figura 8 apresenta as imagens fornecidas pelo MET das NP CuO em AMR. Nas imagens foi possível verificar a existência de algumas partículas mais dispersas no meio, conforme pode ser visto da Figura 8 (A) que apresenta diâmetro médio de 41,02 nm, porém a maioria das partículas encontra-se na forma de aglomerados conforme pode ser visto na Figura 8 (B) que possui tamanho médio do aglomerado de 252 nm.

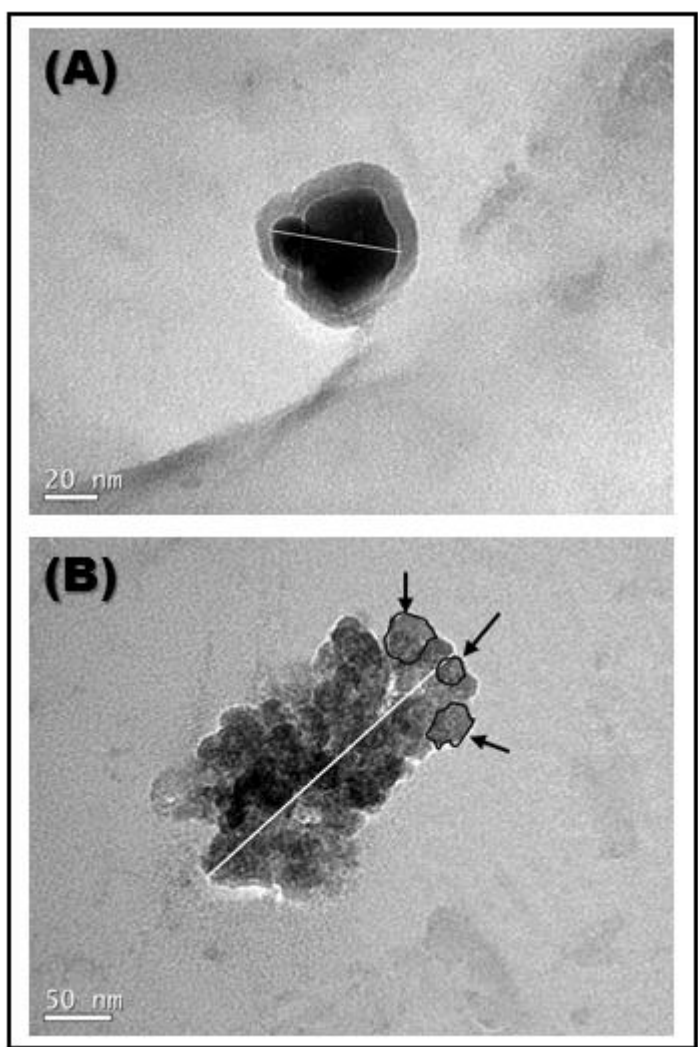


Figura 8. Imagens das NP CuO obtidas através de MET, utilizando o grid de 300 mesh. (A) NP CuO pouco aglomerada e (B) Formação de aglomerados.

Legenda: Na figura (B) as setas indicam NP individuais.

Fonte: LCME – UFSC.

A Figura 9 apresenta o resultado da determinação do tamanho hidrodinâmico das NP CuO em suspensão. O laudo completo pode ser visto no Anexo 2.

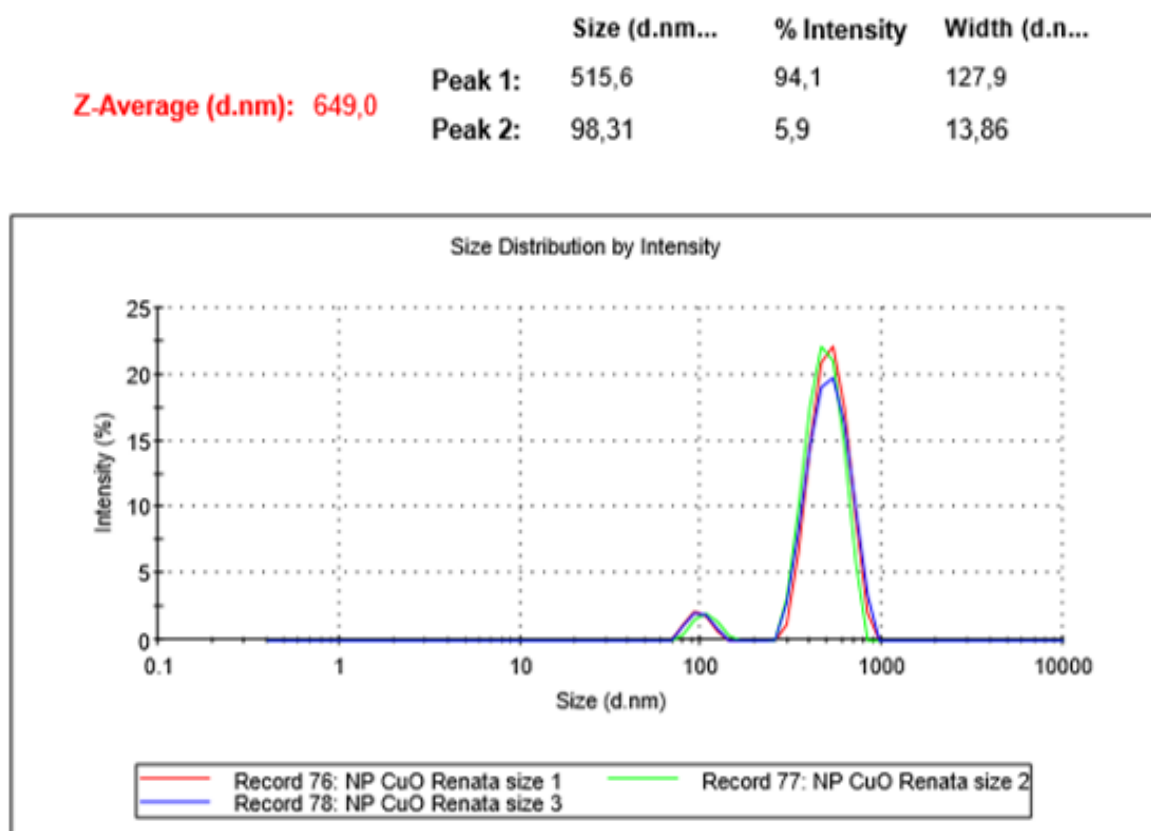


Figura 9. Resultado da determinação do tamanho hidrodinâmico das partículas (concentração 1 g.L⁻¹).
 Fonte: LACBIO – UFSC.

O tamanho médio (Z-Average) das NP CuO em AMR foi de 649,0 nm e apresentou dois picos de tamanho, com predominância das partículas com tamanhos maiores, 515,6 nm (94,1%) enquanto que as partículas de tamanhos menores (98,31 nm) representaram apenas 5,9% do total de nanopartículas em suspensão.

Perreault *et al.*, (2012) puderam observar que no meio HSM, utilizado para cultivar e realizar testes com a alga verde *C. reinhardtii*, o tamanho médio das NP CuO (concentração de 0,04 mg.L⁻¹) foi de 148 nm. Melegari *et al.*, (2013) utilizando o mesmo meio de cultura, verificaram tamanho médio das NP CuO (concentração de 1 g.L⁻¹) igual a 172,96 nm, valores médios abaixo do encontrado neste estudo.

Valores próximos aos obtidos neste estudo, foram encontrados por Perreault *et al.*, (2014) que demonstrou o comportamento aglomeração das NP CuO no meio de cultura da planta de água doce *Lemna gibba* (concentração de 1 g.L⁻¹), onde as NP CuO

dispersas no meio passaram de 109 nm, no tempo zero (imediatamente após o meio ter sido sonicado), para mais de 523 nm após 48h de teste, corroborando com os valores aqui encontrados.

Na água marinha, o comportamento das NP CuO foi observado no estudo de Buffet *et al.*, (2011) (neste estudo a solução estoque foi preparada com concentração de 25 mg.L⁻¹, da onde 5 µ.L⁻¹ foram retirados e adicionados em água marinha natural) os autores observaram que as nanopartículas agregam-se ligeiramente aumentando o diâmetro da partícula de 400 nm, no tempo zero (imediatamente após o meio ter sido sonicado) para mais de 1000 nm após 48h. Já Gomes *et al.*, (2013) verificaram a formação de agregados de NP CuO em água marinha natural com salinidade 32 (concentração de 10 µ.L⁻¹), em seus estudos puderam observar que as NP CuO passaram de 30 nm, no tempo zero (imediatamente após o meio ter sido sonicado), para 310 nm após 12h de teste. Estes valores corroboram com valores obtidos neste estudo demonstrando que tanto em AMR, quanto em água marinha natural, ocorre a aglomeração das NP CuO independentemente da concentração utilizada.

A variação de tamanho possivelmente ocorre, pois as NP, ao entrarem em contato com um líquido, adquirem uma carga elétrica em sua superfície afetando a distribuição de íons na sua vizinhança, e aumentando a concentração de contraíons junto à sua superfície, podendo facilitar a aglomeração destas partículas (ROSSETTO, 2012).

Melegari *et al.*, (2013) afirmam também que a diferença entre os tamanhos obtido na análise de MET e tamanho hidrodinâmico ocorre devido a metodologia utilizada, visto que a análise no MET é feita com uma amostra da suspensão-teste sobre uma grade amostral que é deixada secar a vácuo durante 24 horas, sendo esta a mesma metodologia utilizada neste trabalho.

5.1.2 Estabilidade da suspensão: Potencial zeta (Pz)

O Pz foi determinado a partir da média das três leituras realizadas em uma mesma amostra, tendo valor de -16,9333 mV, conforme pode ser visto na Tabela 3. O laudo da análise gerado pelo equipamento pode ser visualizado no Anexo 1.

Tabela 3. Valores do Pz, amostra com concentração 1g.L⁻¹.

Leitura	Pz (mV)	Média Pz (mV)	Desvio Padrão
1	-16,5	-16,9333	1,3051
2	-15,9		
3	-18,4		

Sabe-se que quanto mais elevado o valor absoluto do Pz, mais provável que a suspensão seja estável, pois as partículas carregadas repelem-se umas às outras e essa força supera a tendência natural à agregação (MALVERN, 2004), desta forma é possível afirmar que as NP CuO em AMR (salinidade 32) deste estudo, tendem a ser instáveis (Pz= -16,9333 mV), possuindo tendência a aglomeração. Esta tendência a aglomeração foi verificada também no estudo de Rosseto (2012) que analisou o Pz das NP CuO em água ultra pura e obteve valor médio de -14,13 mV, o que corrobora com os resultados do Pz das NP CuO em AMR.

Perreault *et al.*, (2012) realizaram estudos de toxicidade com NP CuO utilizando a alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* e realizou medições do Pz no meio de cultura da alga (Meio HSM) e obteve valores de Pz de -51,1 mV, em concentração de 0,4 mg.L⁻¹, já Melegari *et al.*, (2013) realizaram medições do Pz no meio de cultura da alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Meio HSM) e obtiveram valores de Pz, de -38,95 mV, em concentração de 0,1 mg.L⁻¹, e -34,67 mV na concentração 1 mg.L⁻¹. Estes valores de Pz, apesar de também serem negativos, demonstram que as NP CuO em HSM são mais estáveis do que as NP CuO dispersas em AMR,

Valores negativos de Pz também foram obtidos por Qiang *et al.*, (2007) que realizaram medições do Pz de NP CuO em diferentes concentrações e pH e obtiveram valores de -22 mV a -38 mV, corroborando com o resultado de Pz negativo encontrado nesse estudo.

Diferentes valores de Pz são encontrados para diversos meios devido a estabilidade da suspensão depende das características do meio diluente (QUIANG *et al.*, 2007). As NP são termodinamicamente instáveis e possuem tendência natural a aglomerar e aumentar de tamanho em meio líquido (ZARBIN, 2007). Segundo Chinnapone *et al.*, (2011), em água marinha as nanopartículas perdem a estabilidade eletrostática devido à perda de cargas resultante da elevada quantidade de NaCl

presente no meio. Neste mesmo contexto Baker *et al.*, (2013) afirmam que a elevada força iônica da água marinha leva a diminuição do Pz das nanopartículas, levando a instabilidade da suspensão e causando agregação e rápida sedimentação das mesmas, corroborando com os resultados obtidos neste estudo.

5.2. TOXICIDADE AGUDA

5.2.1. Sensibilidade dos organismos

A Figura 10 apresenta os resultados dos últimos 25 testes de sensibilidade com os organismos *M. juniae* utilizados neste estudo (Apêndice 6), sendo utilizados para formular a carta-controlre.

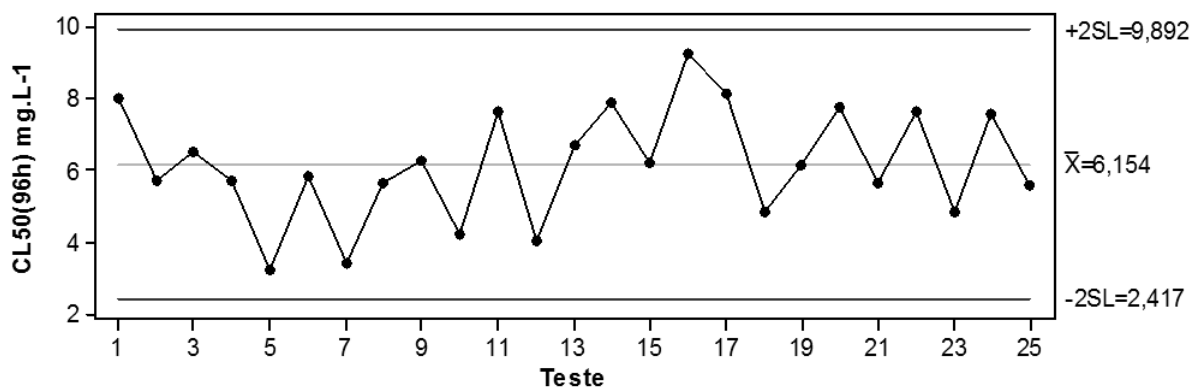


Figura 10. Carta controle da sensibilidade dos organismos *M. juniae* utilizando a substância de referência DSS.

A partir da formulação da carta-controlre (Figura 10), pode-se afirmar que os organismos, *M. juniae*, utilizados na realização deste estudo possuem sensibilidade adequada, pois os resultados obtidos permaneceram dentro do Intervalo de Confiança de 2 desvios-padrão e não houve a existência de 7 pontos consecutivos de um mesmo lado da linha da média, conforme o que estabelece a NBR 15308 (ABNT, 2011), validando a confiabilidade e a repetibilidade dos testes.

Segundo Zagatto e Bertolotti (2006) a realização dos testes com substâncias de referência para a frequente atualização da carta-controlre é necessário, pois esta tem como intuito estabelecer uma faixa de aceitação dos valores obtidos através do cálculo

estatístico da CL_{50} , apresentando a sensibilidade dos organismos à substância de referência, atestando a repetibilidade e reprodutividade dos ensaios.

5.2.2 Controle negativo e controle positivo ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$)

No controle negativo (apenas AMR), em todos os testes realizados, a mortalidade dos organismos-teste permaneceu dentro da porcentagem ideal estabelecida pela NBR 15308 (ABNT, 2011) sendo inferior ou igual a 10%, não apresentando toxicidade aguda.

O controle positivo com $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ apresentou toxicidade para o organismo *M. juniae*, sendo o valor da $CL_{50(96h)}$ igual a $0,31921 \text{ mg.L}^{-1}$. O cálculo foi realizado com os resultados obtidos em dez testes realizados com esta substância. Através do teste de normalidade de Anderson-Darling foi possível verificar que os resultados dos testes seguiram uma distribuição normal, não havendo diferenças significativas entre os dados ($p=0,800$) conforme pode ser verificado na Figura 11. Os dados utilizados podem ser verificados no Apêndice 7.

Juntamente com a carta-controlre, estes resultados validam todos os testes de toxicidades realizados no estudo.

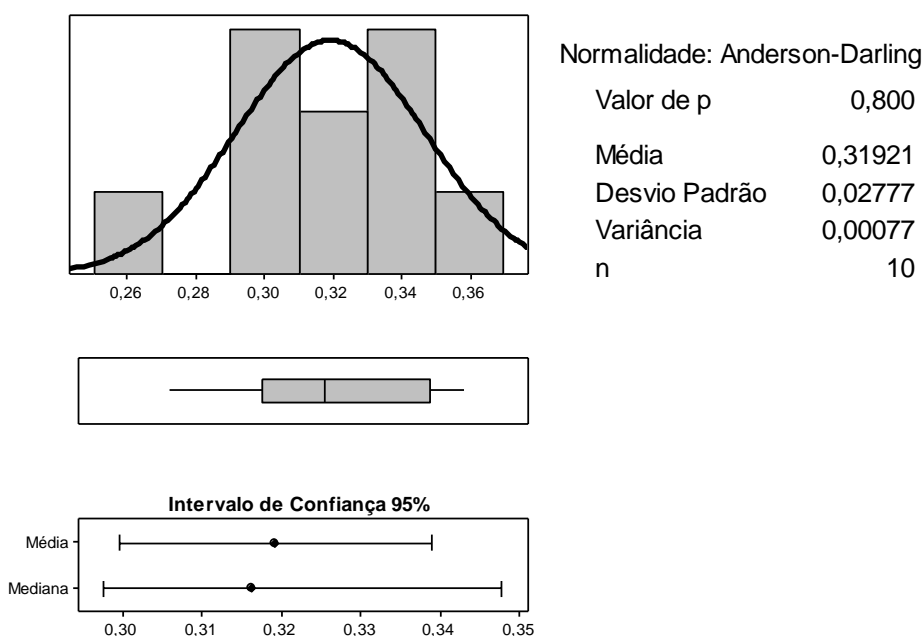


Figura 11. Teste de normalidade de Anderson-Darling a partir da $CL_{50(96h)}$ calculada nos testes com $CuSO_4 \cdot 5H_2O$. A média representa a $CL_{50(96h)}$ e o valor de $p > 0,05$ representa que não há diferença significativa nas populações testes, para um intervalo de confiança de 95%.

Estudos realizados por Ziyadah e Abdel-Baky (2000) utilizando o crustáceo marinho *Mysis sp* encontraram valor da $CL_{50(96h)}$ de $1,44 \text{ mg.L}^{-1}$ para CuSO_4 , já Chen e Lin (2001), encontraram $CL_{50(96h)}$ para o crustáceo marinho *Penaeus monodon* igual a $7,73 \text{ mg.L}^{-1}$ em salinidade 25. Estes valores encontram-se acima dos valores obtidos nesta pesquisa, sendo *M. juniae* mais sensível ao CuSO_4 quando comparado com estes estudos. Valores próximos a $CL_{50(96h)}$ para *M. juniae* foram encontrados por Lohdi *et al.*, (2006) que realizaram estudos utilizando crustáceos de água doce e obtiveram valores de $CL_{50(96h)}$ para *Macrobrachium lamarrei* de $0,300 \text{ mg.L}^{-1}$ e de $0,418 \text{ mg.L}^{-1}$ para *Macrobrachium dayanum*.

5.2.3. Toxicidade aguda de NP CuO

A Figura 12 apresenta o resultado do teste de normalidade de Anderson-Darling, com os valores de média ($CL_{50(96h)}$) e desvio padrão para os ensaios agudos com NP CuO.

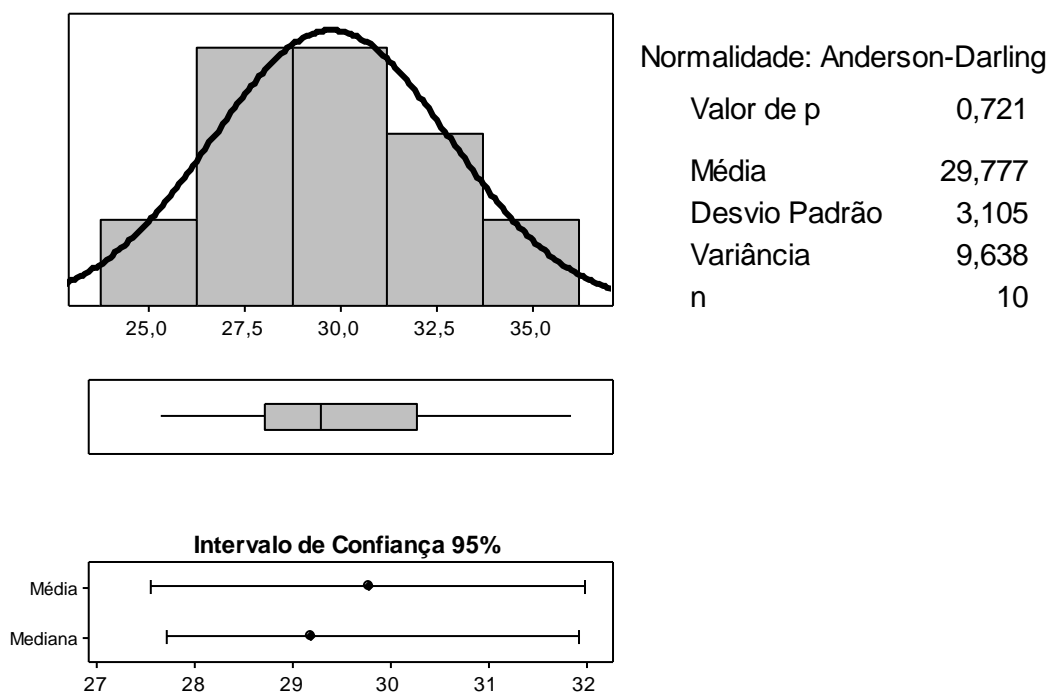


Figura 12. Teste de normalidade de Anderson-Darling a partir da $CL_{50(96h)}$ calculada nos testes com NP CuO. A média representa a $CL_{50(96h)}$ e o valor de $p > 0,05$ representa que não há diferença significativa nas populações testes, para um intervalo de confiança de 95%.

A $CL_{50(96h)}$ de NP CuO encontrada para o organismo em estudo foi de 29,777

mg.L⁻¹. Através do teste de normalidade de Anderson-Darling foi possível verificar que os resultados dos testes seguiram uma distribuição normal, não havendo diferenças significativas entre os dados, pois $p=0,721$. Os dados utilizados podem ser verificados no Apêndice 8. A concentração que não apresentou toxicidade para *M. juniae* foi de 12 mg.L⁻¹ e a concentração em que ocorreu 100% de mortalidade foi de 40 mg.L⁻¹.

O pH teve média de 8,16 (Desvio-Padrão = 0,02) no início do teste e média de 8,041 (Desvio-Padrão = 0,06) ao fim do teste, permanecendo dentro da faixa ideal preconizada pela NBR 15308 (valores de pH entre 7,8 e 8,3) para teste com misídeos. A salinidade não apresentou variação em nenhuma das concentrações testadas após 96h de teste, permanecendo em 32 (os dados podem ser verificados no Apêndice 9). Desta forma, as condições de pH e salinidade não foram considerados interferentes e causadores de toxicidade na realização dos testes.

Ao final das 96 horas de teste foi possível observar a ocorrência de um acúmulo de material escurecido no fundo dos frascos em todos os testes e concentrações utilizadas, conforme pode ser visto na Figura 13.

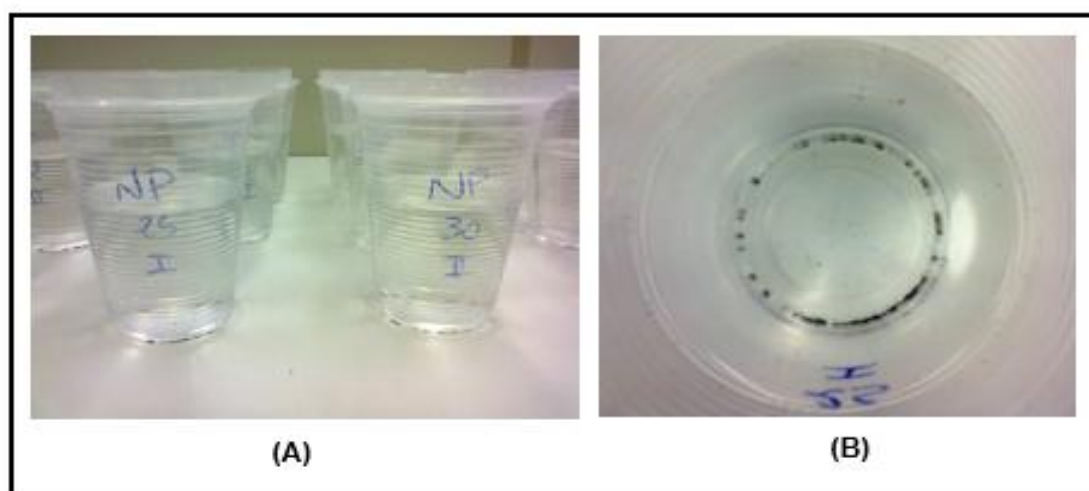


Figura 13. (A) e (B) Acúmulo de material escurecido no fundo do frasco-teste após 96h.

Segundo a classificação sugerida por Blaise *et al.*, (2006), as NP CuO, são classificadas como nocivas (10 a 100 mg.L⁻¹) para o organismo marinho *M. juniae*.

Estudos realizados por Griffitt *et al.*, (2008) expondo os microcrustáceos de água doce adultos *Daphnia pulex* e o peixe *Danio rerio* a NP CuO, obtiveram os valores da CL₅₀ igual a 0,06 mg.L⁻¹ e 0,94 mg.L⁻¹ para *Daphnia pulex* e *Danio rerio*, respectivamente. Já a CL₅₀ obtida para *Ceriodaphnia dubia*, também um microcrustáceo

de água doce, apresentou valores entre 0,00214 mg.L⁻¹ a 0,048 mg.L⁻¹, segundo estudos de Gao *et al.*, (2009), valores estes, inferiores aos encontrados nesta pesquisa.

Rosseto (2012), realizou estudos das NP CuO utilizando o microcrustáceo de água doce *D. magna* que apresentou CE_{50(48h)} 22 mg.L⁻¹ e a bactéria marinha *Aliivibrio fischeri* CE_{50(15min)} igual a 304,4 mg.L⁻¹, resultado próximo foi observado por Jo *et al.*, (2012) que também realizaram estudos com o microcrustáceo *D. magna* e obtiveram valores de CE_{50(24h)} igual a 32,08 mg.L⁻¹, valores mais próximos ao encontrados para o *M. juniae*.

O aparecimento do material escurecido no fundo dos frascos-teste (Figura 13) e a baixa toxicidade possivelmente podem ser explicados pelo fato de que o meio marinho é mais alcalino e tem uma maior força iônica, (PERALTA-VIDEA *et al.*, 2011) e esta elevada força iônica tende a provocar a aglomeração, agregação e sedimentação das nanopartículas (BUFFET *et al.*,2011; MACKEN *et al.*, 2012; BAKER *et al.*, 2013; GOMES *et al.*,2013). Neste estudo foi encontrado também um baixo valor do Pz (-16,9333 mV), evidenciando a instabilidade das NP CuO em AMR, corroborando com os estudos de Baker *et al.*, (2013) que afirmam que o baixo valor do Pz, decorrente da elevada força iônica do meio causa aglomeração das nanopartículas e sua rápida sedimentação. Uma vez que o teste agudo tem duração total de 96h, este tempo pode ser suficiente para ocorrer a sedimentação das nanopartículas, diminuindo a toxicidade da amostra visto que o processo de aglomeração/agregação pode resultar em partículas de tamanho micrométrico e o comportamento do bloco pode ser diferenciado das partículas não agregadas, podendo as tornar indisponíveis aos organismos (PERALTA-VIDEA *et al.*, 2011,). Kleine *et al.*, (2008) também afirma que em água marinha e estuarina as concentrações de NP são baixas devido a estes processo.

A menor toxicidade é explicada por Gao *et al.*, (2009), que afirmam que altas concentrações de carbono orgânico dissolvido no meio resultam numa menor toxicidade, causado pela complexação do metal cobre com o carbono orgânico dissolvido. O mecanismo de complexação pode explicar a menor toxicidade encontrada para os misidáceos, já que a AMR possui altos índices de íon cloreto, um forte agente complexante, podendo ocasionar a formação de complexos de tetraclorocuprato (CuCl₄³⁻), resultando na menor toxicidade (BERG *et al.*, 1979). Neste mesmo contexto, Macken *et al.*, (2012) afirmam que devido a elevada força iônica presente no meio marinho a especiação dos metais é dominada pela formação complexos de cloro.

5.3 TOXICIDADE CRÔNICA DE NP CuO

A Figura 14 apresenta os resultados de natalidade obtidos nos testes de toxicidades crônica com NP CuO nas concentrações 0 (controle), 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ após 36 dias de teste. Os dados brutos encontram-se no Apêndice 10.

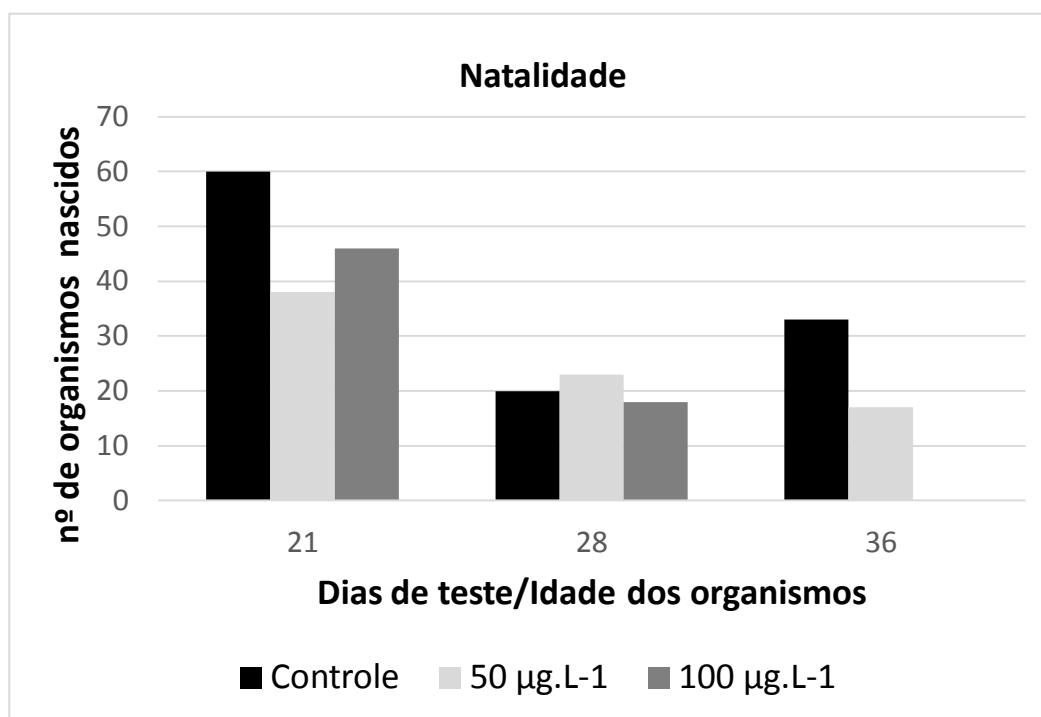


Figura 14. Natalidade dos misidáceos expostos ao controle e a amostra de 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de NP CuO.

Para ambas as concentrações testadas, inclusive no controle, observou-se que a data para primeira prole ocorreu no 18º dia de vida, ou seja, quatro dias após a maturação sexual e a formação das famílias, corroborando com especificação descrita na ABNT NBR 15308/2011.

Observa-se na Figura 14, que houve maior natalidade em todas as concentrações testadas, inclusive no controle, no 21º dia de vida. Destaca-se ainda que no 21º dia a natalidade nas concentrações 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ foi inferior ao controle em 36,67% e 23,33% respectivamente, podendo ser um indicativo de efeito crônico. No 28º dia, ocorreu uma redução de 66,6% no controle, 39,48% na concentração 50 $\mu\text{g.L}^{-1}$ e 60,87% na concentração 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ comparadas ao 21º dia.

Já no 36º dia houve natalidade apenas no controle e na concentração 50 µg.L⁻¹, sendo que a concentração 50 µg.L⁻¹ apresentou natalidade inferior ao controle.

Somando-se os dados de natalidade durante os 36 dias de teste, houve um total de 113 organismos nascidos no controle, 78 organismos nascidos na concentração 50 µg.L⁻¹ e 64 organismos nascidos na concentração 100 µg.L⁻¹, dando um indicativo de efeito tóxico no parâmetro natalidade para a NP CuO, especialmente na concentração 100 µg.L⁻¹.

A Figura 15 apresenta os resultados de mortalidade obtidos nos testes de toxicidades crônicas com NP CuO (controle, 50 µg.L⁻¹ e 100 µg.L⁻¹). Os dados brutos encontram-se no Apêndice 11.

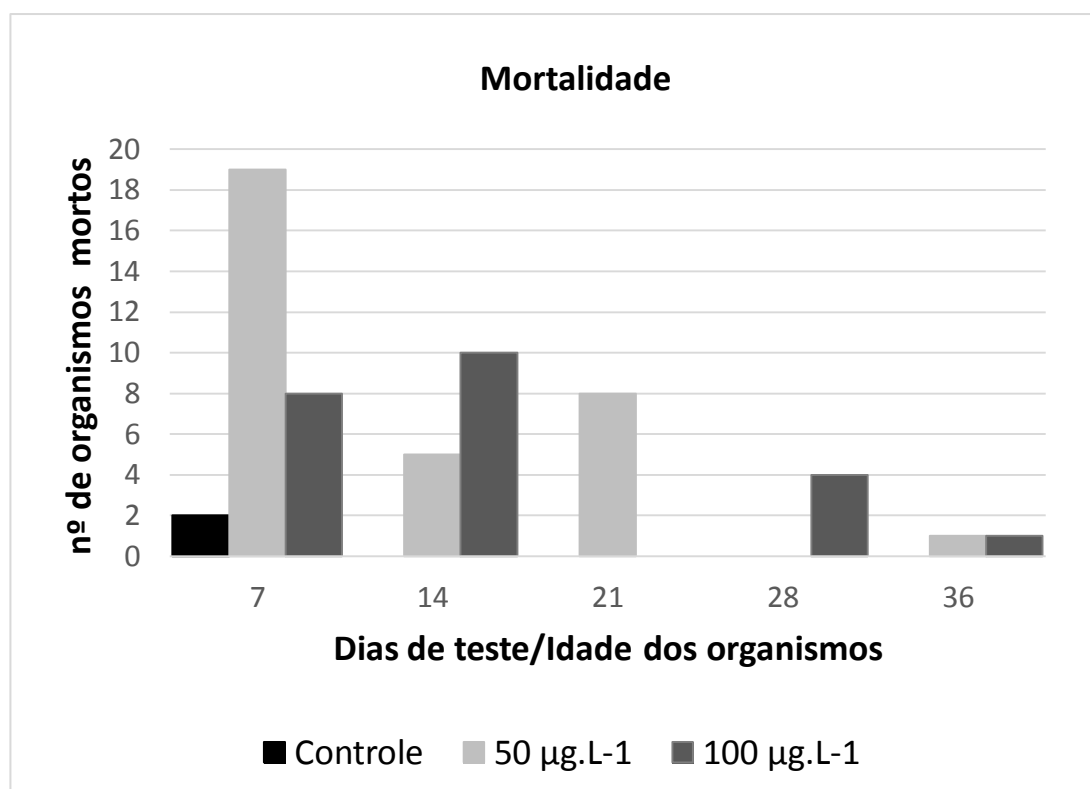


Figura 15. Mortalidade dos misidáceos expostos ao controle e a amostra de 50 µg.L⁻¹ e 100 µg.L⁻¹ de NP CuO.

Observa-se na Figura 15 que ocorreu mortalidade nos primeiros sete dias em todas as concentrações testadas, tendendo a diminuir com o aumento da idade do organismo, mostrando que os organismos sem maturação sexual, ou seja, os filhotes, são mais sensíveis para ambas as concentrações de NP CuO testadas.

Em virtude da não continuidade do teste, não havendo a análise da 2ª geração de organismos, não é possível afirmar se este comportamento manteria-se até o final do teste.

Vaz (2012) pode verificar em seu estudo que as NP CuO começaram a apresentar efeito tóxico apenas a partir do 39º dia de exposição, onde foram detectadas diferenças significativas na natalidade dos organismos, afetando também a 2ª geração de organismos.

A Figura 16 apresenta os dados da biometria dos organismos obtidos nos testes de toxicidades crônica com NP CuO nas concentrações 0 (controle), 50 µg.L⁻¹ e 100 µg.L⁻¹ com NP CuO. Os dados brutos podem ser verificados no Apêndice 12.

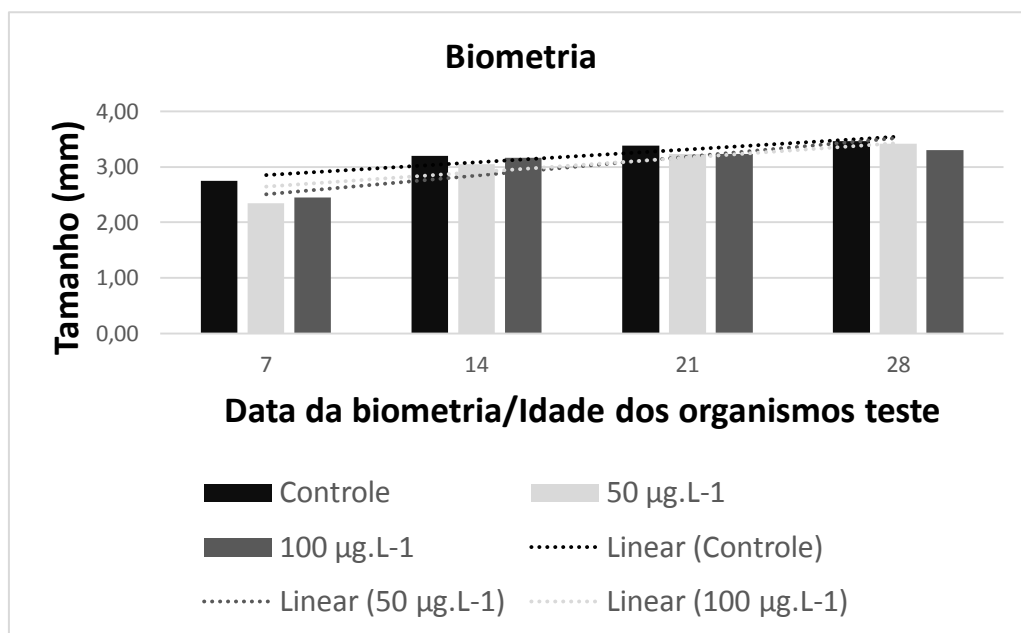


Figura 16. Biometria dos misidáceos expostos ao controle e a amostra de 50 µg.L⁻¹ e 100 µg.L⁻¹ de NP CuO.

Para a biometria não houve diferença significativa, quando comparado controle e amostra, sendo que a princípio este parâmetro não foi afetado pelas NP CuO. Na concentração 50 µg.L⁻¹ p = 0,15 e para a concentração 100 µg.L⁻¹ p = 0,49.

Os valores médios de salinidade e temperatura (Apêndices 13 e 14) para ambas as concentrações testadas permaneceram dentro da faixa ideal para o organismo preconizada pela NBR 15308/2011 que estipula valores de 32 a 36 para salinidade e 23°C a 27°C para temperatura. Desta forma, estes valores não foram considerados como causadores de toxicidade, considerado que para o controle obteve-se o mesmo comportamento.

Os efeitos tóxicos que as nanopartículas podem causar aos organismos ainda não são totalmente conhecidos (GRIFFIT *et al.*, 2008). De acordo com Kleine *et al.*, (2008) a toxicidade das NP pode resultar da aderência das partículas no corpo do organismo, absorção via respiração ou ingestão, podendo ainda, segundo Meng *et al.*, (2007) resultar da sua reatividade e acumulação excessiva no interior das células, levando a sobrecarga de concentrações intracelulares de cobre iônico. Midander *et al.*, (2009) também propõem que as NP, podem persistir e se acumular em maior grau em diferentes locais dos organismos.

6. CONCLUSÕES

- O organismo *M. juniae* mostrou-se adequado para estudos com NP CuO;
- As NP CuO são instáveis, tendendo à aglomeração em água marinha reconstituída, conforme verificado por meio da caracterização da solução-estoque através do MET, onde foi possível verificar que as NP CuO possuem tamanho médio dos aglomerados de 252 nm; tamanho hidrodinâmico médio de 649 nm, e Pz igual a -16,933 mV, influenciando na toxicidade;
- As NP CuO apresentam toxicidade aguda para *M. Juniae*, com $CL_{50(96h)}$ igual a 29,777 mg.L⁻¹ apesar da ocorrência de aglomeração em água marinha reconstituída, sendo classificadas como nocivas para o organismo estudado;
- O teste crônico com NP CuO, apesar de ter sido interrompido com 36 dias, apresentou um indicativo dos possíveis efeitos causados a longo termo para *M. juniae*, para os parâmetros natalidade e mortalidade;
- Diante das informações obtidas, o uso de NP CuO exige cautela, pois possuem a capacidade de causar efeitos tóxicos agudos e possivelmente crônicos nos organismos estudados, tornando-se uma preocupação ambiental dada a importância ecológica do organismo que é base da cadeia alimentar;
- Os dados obtidos neste estudo poderão auxiliar no encaminhamento de novos estudos a serem realizados pela Rede cooperativa de pesquisas em nanotoxicologia aplicada a nanopartículas de interesse da indústria petrolífera e de tintas (Rede NANOTOX) no intuito de compreender os efeitos biológicos dos nanomateriais na saúde humana e no meio ambiente, informações estas de grande importância para a sociedade, como por exemplo, na elaboração de tintas menos abrasivas ao ambiente.

7. RECOMENDAÇÕES

- A caracterização da solução estoque da NP em água marinha reconstituída por de Microscopia Eletrônica de Varredura;
- A quantificação do íon cobre total, inicial e final, nas diferentes concentrações utilizadas no teste agudo e crônico;
- Teste crônico com duração total de 60 dias para avaliação da segunda geração dos organismos;
- Caracterização e testes de toxicidade aguda e crônica com micropartículas de óxido de cobre em água marinha reconstituída para fins de comparação da toxicidade.
- Avaliação dos organismos para verificar os órgãos-alvo das NP CuO no organismos *M. juniae*.
- Realização de estudos específicos que avaliem os mecanismos e rotas de intoxicação.

8. REFERÊNCIAS

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

AITKEN, R. J. *et al.* Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. **Occupational Medicine**. v. 56, p. 300–306, 2006.

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

AMERICAM SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS (ASTM). Standard terminology relating to nanotechnology. E 2456-06. West Conshohocken, PA, 2006.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS – ABNT. **NRB 15308**. Ecotoxicologia aquática – toxicidade aguda – Método de ensaio com misidáceos (Crustacea). Brasil: Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2005.

BACKER, T.J.; TYLER, C. R.; GALLOWAY, T. S. Impactos of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. **Environmental Pollution**, *in press*, 2013.

BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6 ed. Ed. Roca. 1996.

BAUN, A.; HARTMANN, N. B.; GRIEGER, K.; KUSK, K.O. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity test. **Ecotoxicology**. n. 17, p. 387-395, 2009.

BERG, C. M. G. V. D.; WONG, P. T. S.; CHAU, Y. K. Measurement of complexing materials excreted from algae and their ability to ameliorate copper toxicity. **Journal of the Fisheries Research Board of Canada**. n. 8, v.36, p. 901-905, 1979.

BERTOLETTI, E. Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos no estado de São Paulo. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB): São Paulo, 2013.

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**. n. 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**. n. 1. v. 158., p. 41–47, 2010.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA n. 357** de 17 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 18 de mar. 2005.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução CONAMA n. 430** de 13 de março de 2011. Dispõem sobre condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a Resolução n. 357, de 17 de março de 2005. Diário Oficial da União, Brasília, 16 mai. 2011.

BUFFET, P.-E.; TANKOUA, O. F.; PAN, J.-F.; BERHANU, D.; HERRENKNECHT, C.; POIRIER, L.; AMIARD-TRIQUET, C.; AMIARD, J.-C.; BÉRARD, J.-B.; RISSO, C.; GUIBBOLINI, M.; ROMÉO, M.; REIP, P.; VALSAMI-JONES, E.; MOUNEYRAC, C. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. **Chemosphere**. n. 1, v.84, p.166-174, 2011.

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

CETESB. Água do Mar – Teste de Toxicidade Aguda com *Mysidopsis juniae* SILVA, 1979. **Norma CETESB L25. 251**. São Paulo, 1992.

CHASIN, A. da M.; PEDROZO, M. D. F. M. O estudo da toxicologia. p. 1-25. *In*: AZEVEDO F. A.; CHASIN, A. da M. (coordenação). [eds] As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Paulo: Editora Rima, 2003.

CHEN, J.C.; LIN, C. H. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon*. **Aquaculture**. n.192, p. 55–65, 2001.

CHÈVRE, N.; BRAZZALE, A. R.; BECKER-VAN SLOOTEN, K.; BEHRA, R.; TARRADELLAS, J.; GUETTINGER, H. Modeling the concentration–response function of the herbicide dinoseb on *Daphnia magna* (survival time, reproduction) and *Pseudokirchneriella subcapitata* (growth rate). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. n. 1, v.62, p.17-25, 2005.

CHINNAPONSE, S. L.; MACCUSPIE, R. I.; HACKEY, V. A persistence of singly dispersed silver nanoparticles in natural freshwaters, synthetic water and simulated estuarine waters. **Science of Total Environment**. n. 409, p. 2443-2450.

CHRISTIAN, P.; Von der KAMMER, F.; BAALOUSHA, M.; HOFMANN, T. Nanoparticles: Structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. **Ecotoxicology**. v.17, n. 5, p. 326-343, 2008.

COLVIN, V. L. The potential environmental impact of nanomaterials. **Nature Biotechnology**. n. 21, v.10, p.1166–70, 2002.

COSTA, R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**. n. 7, v. 32. p. 1820-1830. São Paulo, 2008.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI E. Seleção, Manutenção e Cultivo de Organismos Aquáticos p. 153-184. *In*: ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. [Eds]. **Ecotoxicologia Aquática**: Princípios e Aplicações. São Carlos: Editora Rima, 2006.

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

ENVIRONMENT CANADA. **Guidance document on control of toxicity test precision using reference toxicants**. Reports EPS 1/RM12. 1990.

FARIA, E. A.; BRANCO, J.R.T.; CAMPOS, M de C.S.; OLIVEIRA, M.D; ROLLA, M.E. Estudo das características antiincrustantes de materiais. Revista Escola de Minas, Ouro Preto n. 2, v. 59, p.233-238, 2006.

FARRÉ, M. *et al.* Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. **Analytical Biochemistry**. n. 393, p. 81-95, 2009.

FEDERICI, G.; SHAN, B. J.; HANDY, R. D. **Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects**. **Aquatic Toxicology**, Plymouth, Uk, p. 415-430, 2008.

LESUTIENĖ, J.; GOROKHOVA, E.; GASIŪNAITĖ, Z. R.; RAZINKOVAS, A. Role of mysid seasonal migrations in the organic matter transfer in the Curonian Lagoon, south-eastern Baltic Sea. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. n. 2, v. 80, p.225-234, 2008.

GAO, J.; YOUN, S.; HOVSEPYAN, A.; LLANEZA, V. N. L.; WANG, Y.; BITTON, G.; BONZONGO, J.-C. J. Dispersion and Toxicity of Selected Manufactured Nanomaterials in Natural River Water Samples: Effects of Water Chemical Composition. **Environmental Science & Technology**. n. 9, v.43, p.3322-3328, 2009.

GHERARDI, G. *et al.* Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos. Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB): São Paulo, 1990.

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

GOMES, T.; ARAÚJO, O.; PEREIRA, R.; ALMEIDA, A. C.; CRAVO, A.; BEBIANNO, M. J. Genotoxicity of copper and silver nanoparticles in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Marine Environmental Research**. n. 84, p. 51-59, 2013.

GONÇALVES, R. A. **Estudo da toxicidade aguda de nanopartículas de óxido de cobre ao organismo marinho *Mysidopsis juniae***. (Trabalho de conclusão de curso), Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, 2011.

GONÇALVES R, A. ; KLEINE, T. ; BÖHM, R. F. S. ; TORTELLI, T. S. ; SPITZNER, E. C. ; OLIVEIRA, T. M. O. ; MATIAS, W. G. Padronização do método de controle de natalidade e mortalidade de *Mysidopsis juniae* em laboratório para bioensaios de toxicologia ambiental. *In: XIV Congresso Latino-Americano de Ciências do Mar – COLACMAR, Balneário Camboriú. XIV COLACMAR*, 2011.

HANDY, R. D.; KAMMER, F. V. D.; LEAD, J. R.; HASSELOV, M.; OWEN, R.; CRAME, M. The toxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. **Ecotoxicology**. n. 17, p. 287-314, 2008.

HEINLAAN, M.; KAHRU, A.; KASEMETS, K.; ARBEILLE, B.; PRENSIER, G.; DUBOURGUIER, H.-C. Changes in the *Daphnia magna* midgut upon ingestion of copper oxide nanoparticles: A transmission electron microscopy study. **Water Research**. n. 1, v. 45, p.179-190, 2011.

HENDREN, C. O; MESNARD, X.; DRO, G. E. J.; WIESNER M. R. Estimating production data for five engineered nanomaterials as a basis for exposure assessment. **Environmental Science Technology**. n. 45. p. 2562–2569, 2011.

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

HOOD, E. Nanotechnology: Looking As We Leap. **Environmental Health Perspective**, n. 13, v. 112., p. A740-A479, 2004.

ISANI, G.; FALCIONI, M. L.; BARUCCA, G.; SEKAR, G.; ANDREANI, G. CARPENÈ, E.; FALCONI, G. Comparative toxicity CuO nanoparticles and CuOSO₄ in rainbow trout. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. n. 47, p. 40-46, 2013.

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

JAMES, R. C.; ROBERTS, S. M.; WILLIAMS, P. L. General Principles of Toxicology. *In*: P. L. Williams, R. C. James, *et al.* [Eds.]. **Principles of Toxicology - Environmental and Industrial Applications**. United States of America: John Wiley & Sons, 2000.

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

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

KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. (Editor). **Toxicologia: a ciência básica dos tóxicos de Casarett e Doull's**. 5 ed. Lisboa: McGraw-Hill de Portugal, 864 p. 2001.

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

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.

KLEINER, K.; HOGAN, J. How safe is nanotech? **New Science Technology**. n.14, v. 5, 2003.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004.

LECOANET, H. F.; BOTTERO, J-Y. ; WIESNER, M. R. Laboratory assessment of the mobility of nanomaterials in porous media. **Environmental Science and Technology**. n. 38, v.19, p. 5164-9, 2004.

LEE, A. K.; TSAI, C.; MEAD, J.; ELLENBECKER, M. J. Use and efficacy of protective gloves in handling nanomaterials. 2005. Disponível em: <http://www.turi.org/content/download/3270/29768/.../glove%20presentation.pdf> Acesso em: 10 mar. 2013.

LESUTIENĖ, J.; GOROKHOVA, E.; GASIŪNAITĖ, Z. R.; RAZINKOVAS, A. Role of mysid seasonal migrations in the organic matter transfer in the Curonian Lagoon, south-eastern Baltic Sea. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**. n. 2, v.80, p.225-234, 2008.

LODHI, H. S. *et al.* Acute toxicity of copper sulphate to fresh water prawns. **Journal of Environmental Biology**. n. 27, v. 3, p. 585-588, 2006.

LOMBARDI, J. V. **Fundamentos de Toxicologia Aquática**. Instituto de Pesca – SP. 2011. Disponível em: <http://www.aquicultura.br/conceitos_fundamentais.htm> Acesso em: 24 mai. 2013.

LONG, T. C.; SALEH, N.; TILTON, R. D.; LOWRY, G. V.; VERONESI, B. Titanium dioxide (P25) produces reactive oxygen species in immortalized brain microglia (BV2): implications for nanoparticle neurotoxicity. **Journal Environmental Science and Technology**. v. 40, p. 4346-4352, 2006.

LOOMIS, T. A.; HAYES, A. W. **Essentials of Toxicology**. 4 ed. London: Academic Press. p. 17-30, 1996.

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

LOVERN S. B.; KLAPER, R. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles. **Environmental Toxicology and Chemistry**. n. 25, v.4, p. 1132-1137, 2006.

LUDWIG, K. *et al.* Removal of Oxide Nanoparticles in a model Wastewater Treatment Plant: Influence of Agglomeration and Surfactants on Clearing Efficiency. **Environmental Science and Technology**. v.42. p. 5828–5833, 2008.

MACKEN, A.; BYRNE, H. J.; THOMAS, V. Effects of salinity on the toxicity of ionic silver and Ag-PVP nanoparticles to *Tisbe battagliai* and *Ceramium tenuicorne*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. n. 86, p.101- 110, 2012.

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.

MALISKA, A. M. **Microscopia eletrônica de varredura**. 2011. Disponível em: http://www.materiais.ufsc.br/lcm/web-MEV/MEV_index.htm. Acesso em: 14 out. 2013.

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

MATIAS, W. G.; PINTO, C. R. S. D. C. **Apostila Ecotoxilogia Ambiental**. Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental. Joinville, 2006.

MATIAS, W. G.; CREPPY, E. E. Evidence for an enterohepatic circulation of okadaic acid in ice. **J. Toxic Substance Mechanisms**, v. 15, p. 405-414, 1996.

MAUCLINE, J., *et al.* **World list of Mysidacea, crustacea**. Tokio. Univ. fish. v. 64, p. 39-88, 1977.

MAUCLINE, J. The predation os mysids by fich os the Rockall Trough northeastern Atlantic Ocean. **Hydrobiology**, 1982.

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

MENG, H.; CHEN, Z.; XING, G.; YUAN, H.; CHEN, C.; ZHAO, F.; ZHANG, C.; ZHAO, Y. Ultrahigh reactivity provokes nanotoxicity: Explanation of oral toxicity of nano-copper particles. **Toxicology Letters**, n. 1-3, v.175, p. 102-110, 2007.

MIDANDER, K. *et al.* Surface Characteristics, copper release, and toxicity of nano- and micrometer-Sized copper and copper (II) oxide particles: A Cross-Disciplinary Study. **Small**. n. 3, v. 5, p. 389–399, 2009.

MOORE, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International**. v. 32, p. 967–976, 2006.

MUELLER, N. C.; NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. **Environmental Science and Technology**. v. 42, p. 4447–4453, 2008.

OBBERDÖRSTER, G.; OBBERDÖRSTER, E.; OBBERDÖRSTER, J., Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles, **Environmental Health and Perspective**, n. 7, v. 113, p. 823–839, 2005.

OGA, S. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2 ed. p. 101, 2003.

PANG, C.; SELK, H.; MISRA, K.; BERHANU, D.; DYBOWSKA, A.; VALSAMI-JONES, E.; FORBES, V. E. Effects of sediment-associated copper to the deposit-feeding snail, *Potamopyrgus antipodarum*: A comparison of Cu added in aqueous form or nano and micro-CuO particles. **Aquatic Toxicology**. p. 114-122, 2012.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os Nanomateriais e a Questão Ambiental. **Química Nova**. n. 2, v. 33, p. 421-430, 2010.

PASSARELLI, M. M. Toxicologia Ambiental. *In*: OGA, S. [Eds.]. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, 2 ed. p. 101, 2003.

PAULUHN, J. Multi-walled carbon nanotubes (Baytubes): approach for derivation of occupational exposure limit. *Rev. Toxicology and Applied Pharmacology*. n. 57, p. 78-79, 2010.

PERALTA-VIDEA, J. R.; ZHAO, L.; LOPEZ-MORENO, M. L.; DE LA ROSA, G.; HONG, J.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Nanomaterials and the environment: A review for the biennium 2008-2010. **Journal of Hazardous Materials**. v. 186, p.1-15, 2011.

PEREIRA, R. C.; SOARES-GOMES, A. (Org.). **Biologia Marinha**. Rio de Janeiro: Interciência, 2 ed. p. 382, 2009.

PÉREZ, M. ; BLUSTEIN, G. ; GARCIA, M. *et al.* **Cupric tannate**: A low copper content antifouling pigment. **Progress in Organic Coatings**. n. 55., p. 311–315, 2006.

PERREAULT, F.; OUKARROUM, A.; PIRASTRU, L.; SIROIS, L.; GERSON MATIAS, W.; POPOVIC, R. Evaluation of copper oxide nanoparticles toxicity using chlorophyll a fluorescence imaging in *Lemna gibba*. **Journal of Botany**. v. 10, 2010.

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

PERREAULT, F.; SAMADANI, M.; DEWEZ, D. Effect of soluble copper released from copper oxide nanoparticles solubilisation on growth and photosynthetic processes of *Lemna gibba*. **Nanotoxicology**. n. 4, v. 8, p. 374-382. 2014.

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

PETOSA, A. R., *et al.* Aggregation and deposition of engineered nanomaterials in aquatic environments: Role of physicochemical Interactions. **Environmental Science and Technology**. n. 44, p. 6532–6549, 2010.

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

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

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

RESEARCH AND MARKETS. **The global market for metal oxide nanoparticles to 2020**. Disponível em: <http://www.researchandmarkets.com/reports/2488811/the_global_market_for_metal_ox_ox_nanoparticles> Acesso em: 03 jan. 2014.

ROSSETO, A. L. O. F. **Estudo comparativo entre os efeitos tóxicos agudos e crônicos do óxido de cobre na forma de nanopartícula e micropartícula**. (Dissertação de mestrado) Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2012.

ROYAL SOCIETY. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. 2004. Disponível em:

<<http://www.nanotec.org.uk/report/Nano%20report%202004%20fin.pdf>> Acesso em: 20 mar. 2012.

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

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

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

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

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; FREITAS, L. L.; POHLMANN, A. R. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, n. 5, v. 26, p. 726-737, 2003.

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

STEVEN, J. B.; WALDOCK, M. Copper Biocides in the Marine Environment *In*: Arai, T.; Harino, H.; Ohji, M., Langston, W. J., 2009 [Eds]. **Ecotoxicology of Antifouling Biocides**. 2009.

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

THE PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES. Analysis. Disponível em: <<http://www.nanotechproject.org/cpi/about/analysis>> Acesso em: 04 jan. 2014.

THOMAS, K. V.; RAYMOND K.; CHADWICK, J. The effects of short-term changes in environmental parameters on the release of biocides from antifouling coatings: cuprous oxide and tributyltin. **Applied Organometallic Chemistry**. n. 13, p. 453–460, 1999.

THORPE, K. L.; BENSTEAD, R.; HUTCHINSON, T. H.; TYLER, C. R. An optimised experimental test procedure for measuring chemical effects on reproduction in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. **Aquatic Toxicology**. n. 1, v.81, p.90-98, 2007.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 42 ed. **EPA/600/4-91/003**. Washington, DC, p. 293, 1993.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). **Draft Nanomaterial Research Strategy (NRS)**. 2008. Disponível em: <http://epa.gov/ncer/nano/publications/nano_strategy_012408.pdf> Acesso em: 20 mar. 2012.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (USEPA). Safer alternatives to copper antifouling paint for marine vessels. Project NP0094-501-4: Final report, 2011.

VAZ, C.; MATIAS, W. G.; OLIVEIRA, T. M. N.; TORTELLI, T. S.; KLEINE, T.; BARROS, V. G.; GONÇALVES, R. A.; BOHM, R. F. S. **Selection of key characteristics for chronic testing with *Mysidopsis juniae* using a multi-criteria matrix**. Toxicology Letters/ Abstracts 205S. S180–S300, 2011.

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) Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, 2012.

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

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

YOKEL, R. A.; MACPHAIL, R. C. Engineered nanomaterials: exposure, hazards and risk prevention. **Jounarl of occupational medicine and toxicoly**. n. 6, v. 7, p. 1-27, 2011.

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

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática**: Princípios e Aplicações. São Carlos: Rima. p. 478, 2006.

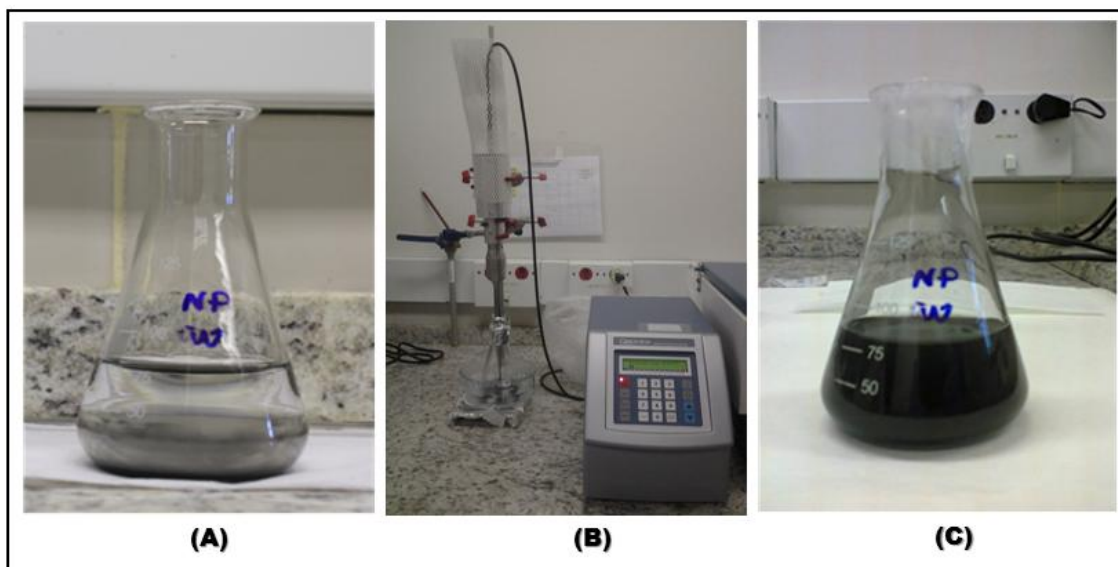
ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**. São Paulo. n. 6., v. 30, p. 1469-1479, 2007.

ZUCOLOTTO, V. **Nanotoxicidade**. Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia, Insituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2010. Disponível em: <<http://www.lnn.ifsc.usp.br>> Acesso em: 8 abr. 2013.

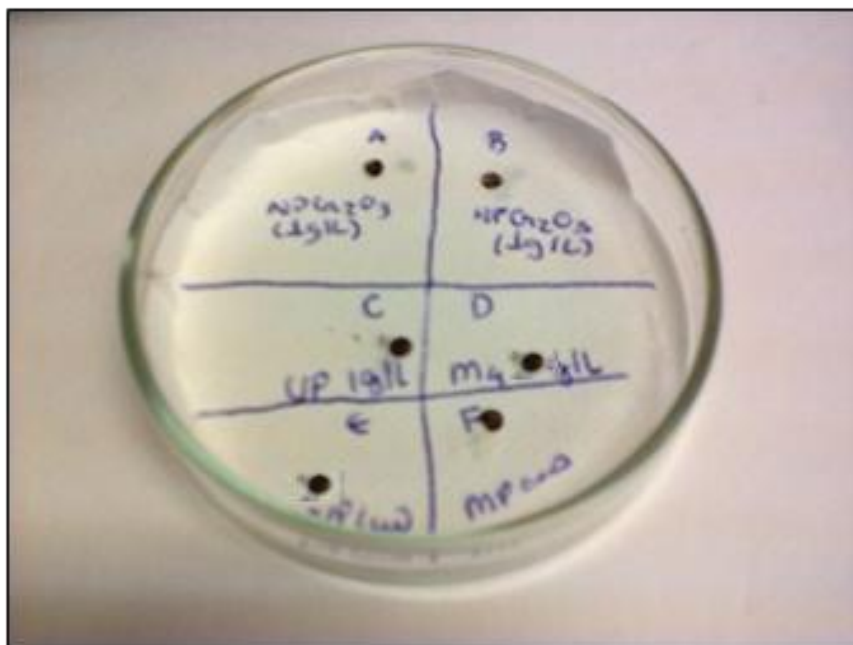
ZYADAH M. A.; ABDEL-BAKKY, T. C. Toxicity and bioaccumulation of copper, zinc and cadmium in some aquatic organisms. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**. n. 64, p. 740-747, 2000.

9 APÊNDICES

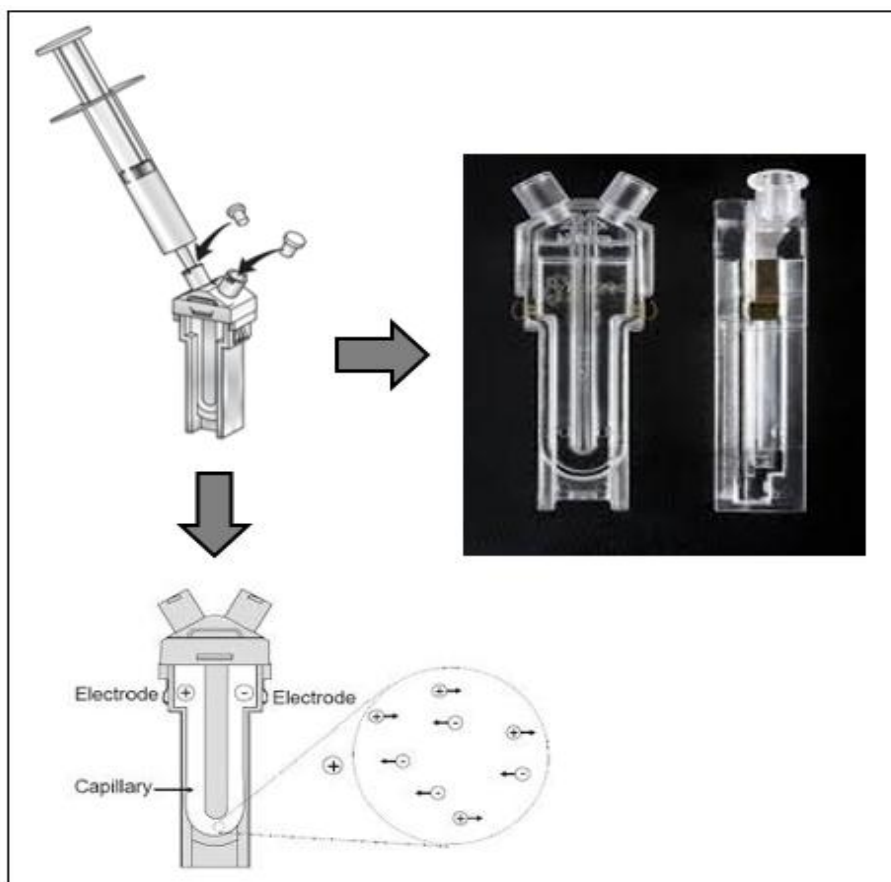
A1 (A) SUSPENSÃO-ESTOQUE DE NP CuO ANTES DE SER SONICADA, (B) SUSPENSÃO-ESTOQUE DE NP SENDO SONICADA E (C) SUSPENSÃO DE NP CuO APÓS SER SONICADA DURANTE 10 MINUTOS.



A2 GRID (300 MESH) PRONTOS PARA SEREM ANALISAS PELO MET. LETRAS E E F REPRESENTAM AS GRADES COM A SUSPENSÃO-TESTE DE NP CUO COM CONCENTRAÇÃO DE 2 g.L⁻¹.



A3 CUBETA UTILIZADA PARA DETERMINAR O Pz



A4 CULTIVO DE *M. JUNIAE* DO LABORATÓRIO DE TOXICOLOGIA AMBIENTAL DA UNIVILLE UNIDADE SÃO FRANCISCO DO SUL.



A5 ETIQUETA UTILIZADA PARA IDENTIFICAÇÃO DOS AQUÁRIOS

	
BABTOX	
Data de nascimento:	/ /
Data de Limpeza:	/ /
Data de Descarte:	/ /
Nº Fêmeas:	
Nº Machos:	
Nº filhotes:	
Mortos:	
Responsável pela limpeza:	
<small>Documento Controlado RD 004/v1 Revisado em 10/10</small>	

A6 DADOS PARA A ELABORAÇÃO DA CARTA CONTROLE DE SENSIBILIDADE DOS MISIDÁCEOS

CL_{50(96h)} (mg.L⁻¹ DSS)
7,96
5,7
6,13
6,49
5,7
3,19
5,79
3,39
5,65
6,22
4,18
6,17
4,02
6,69
7,87
6,16
9,2
8,1
7,6
6,1
7,72
7,2
5,65
7,61
4,84
7,58
5,59

A7 CL_{50(96h)} DOS DEZ TESTES AGUDOS REALIZADOS COM CuSO₄

CL _{50(96h)} mg.L ⁻¹
0,2699
0,3080
0,3485
0,3578
0,2955
0,3340
0,3176
0,3476
0,3147
0,2985

A8 CL_{50(96h)} DOS DEZ TESTES AGUDOS REALIZADOS COM NP CuO

CL _{50(96h)} mg.L ⁻¹
28,3300
28,8926
27,7308
24,8642
31,5808
29,4962
32,6350
30,5450
27,6712
36,0237

A9 MÉDIA DOS PARÂMETROS pH E SALINIDADE INICIAL E FINAL DO TESTE AGUDO COM NP CuO

Concentração (mg.L ⁻¹)	pH		Salinidade	
	Inicial	Final	Inicial	Final
0	8,12	8,03	32	32
12	8,14	7,90	32	32
20	8,15	8,09	32	32
25	8,17	8,10	32	32
28	8,16	8,04	32	32
30	8,18	8,06	32	32
35	8,17	8,04	32	32
40	8,15	8,07	32	32
Média	8,16	8,04		
Desvio Padrão	0,019	0,062		

A10 DADOS DA NATALIDADE DO TESTE DE TOXICIDADE CRÔNICA COM NP CuO

Dia	Controle	50 µg.L⁻¹	100 µg.L⁻¹
21	60	38	46
28	20	23	18
36	33	17	0
Total	113	78	64

A11 DADOS DA MORTALIDADE DOS ORGANISMOS NO TESTE CRÔNICO COM NP
CuO

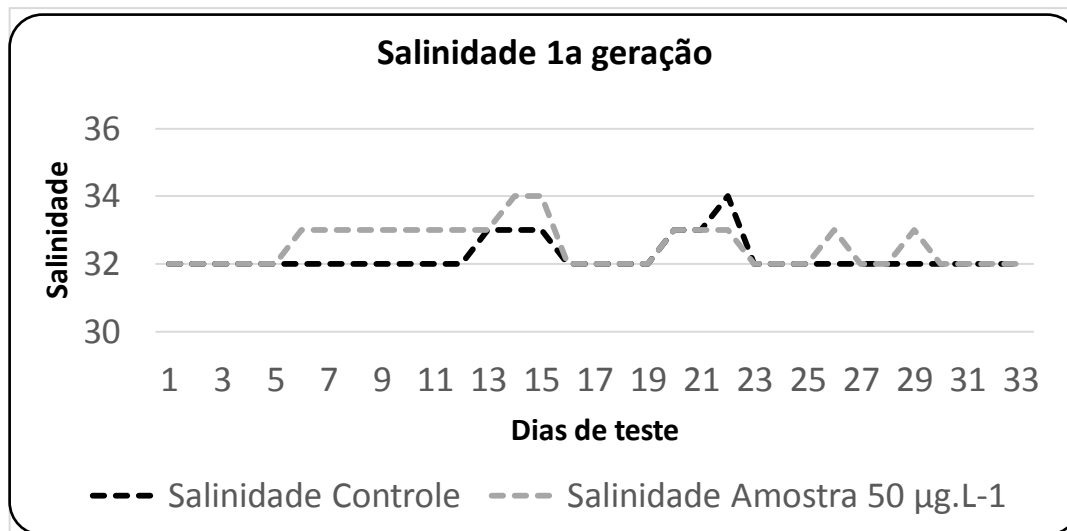
Dia	Controle	50 µg.L⁻¹	100 µg.L⁻¹
7	2	19	8
14	0	5	10
21	0	8	0
28	0	0	4
Total	2	33	23

A12 TAMANHO DOS ORGANISMOS MEDIDOS NO TESTE CRÔNICO COM NP CuO

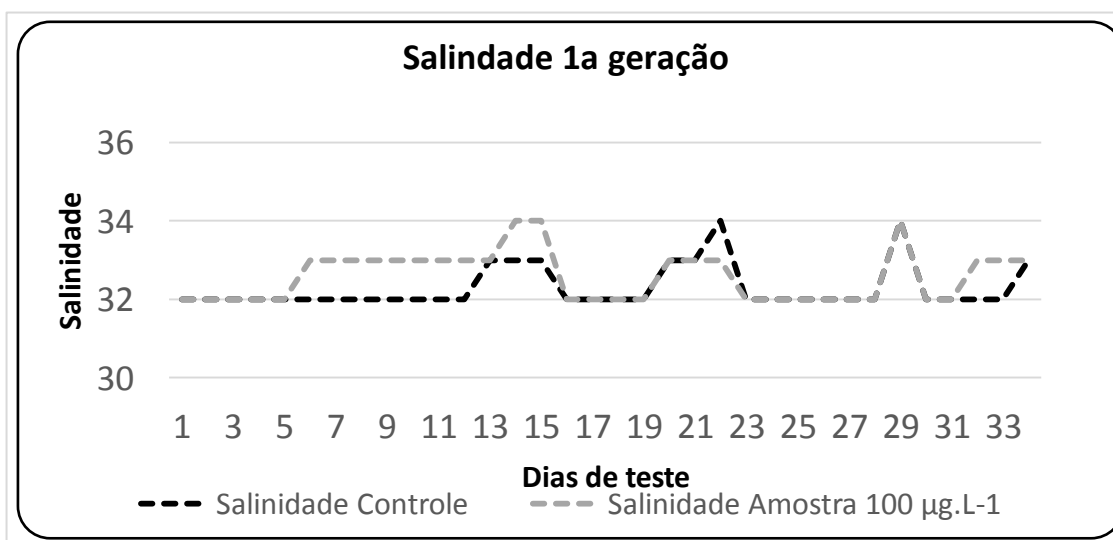
Dias	Controle	50 µg.L⁻¹	100 µg.L⁻¹
7	3,00	2,00	2,50
7	2,50	2,60	2,50
7	2,75	2,45	2,35
14	3,10	3,25	3,15
14	3,25	3,05	3,00
14	3,25	3,10	3,35
21	3,25	3,25	3,20
21	3,45	3,30	3,10
21	3,45	3,15	3,40
28	3,40	3,35	3,35
28	3,50	3,40	3,40
28	3,50	3,50	3,15
Média	3,20	3,03	3,04

*os dados são apresentados em milímetros.

A13 DADOS DE SALINIDADE DURANTE A REALIZAÇÃO DO TESTE CRÔNICO COM NP CuO



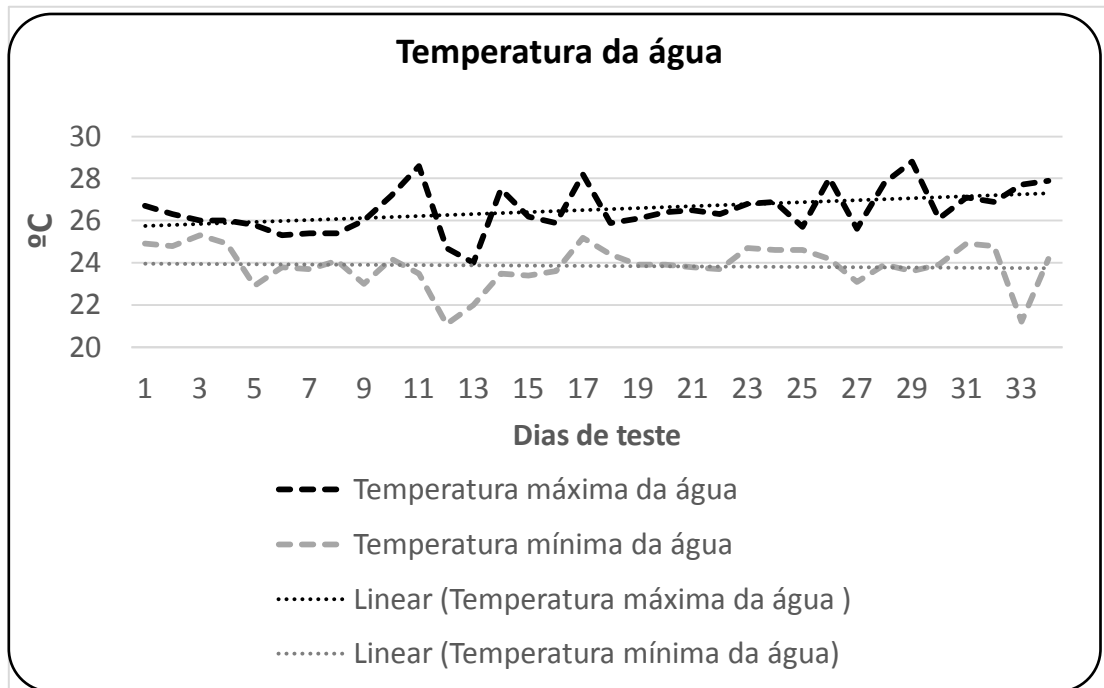
Salinidade média controle 1ª geração	32,29
Salinidade média amostra 50 µg.L ⁻¹ 1ª geração	32,53



Salinidade média controle 1ª geração	32,29
Salinidade média amostra 100 µg.L ⁻¹ 1ª geração	32,59

*gráficos gerados a partir do *software* MASCoTE, desenvolvido por Vaz (2012).

A14 DADOS DA TEMPERATURA MÁXIMA E MÍNIMA DA ÁGUA NOS AQUÁRIOS TESTE E CONTROLE



10 ANEXOS

A1 LAUDO DA DETERMINAÇÃO DO Pz EM AMR


Malvern Instruments

File name: willim matias.dts

Record	Type	Sample Name	Measurement Date and Time	T °C	ZP mV	Mob µmcm/Vs	Cond mS/cm	Zeta Potential Fit mV
73	Zeta	NP CuO Renata 1	quarta-feira, 27 de novembro de 2013 09:15:4	25,0	-16,5	-1,290	51,0	
74	Zeta	NP CuO Renata 2	quarta-feira, 27 de novembro de 2013 09:17:0	25,0	-15,9	-1,245	48,7	
75	Zeta	NP CuO Renata 3	quarta-feira, 27 de novembro de 2013 09:19:2	25,0	-18,4	-1,442	47,5	

Zeta Potential Report

v2.2



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

Sample Details

Sample Name: NP CuO Renata 3
 SOP Name: mansettings.nano
 General Notes:

File Name: willim matias.dts Dispersant Name: Water
 Record Number: 75 Dispersant RI: 1,330
 Date and Time: quarta-feira, 27 de novembro d... Viscosity (cP): 0,8872
 Dispersant Dielectric Constant: 78,5

System


Temperature (°C): 25,0 Zeta Runs: 74
 Count Rate (kcps): 27,5 Measurement Position (mm): 2,00
 Cell Description: Clear disposable zeta cell Attenuator: 6

Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -18,4	Peak 1: 0,00	0,0	0,00
Zeta Deviation (mV): 0,00	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 47,5	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality Good

Zeta Potential Distribution



Record 73: NP CuO Renata 1
Record 74: NP CuO Renata 2
Record 75: NP CuO Renata 3

Malvern Instruments Ltd
www.malvern.com

Detector Ver: 6.52
Serial Number: MAL1062710

File name: willim matias.dts
Record Number: 75
27 nov 2013 09:26:24

A2 LAUDO DA DETERMINAÇÃO DO TAMANHO HIDRODINÂMICO DAS NP CuO EM AMR

Size Distribution Report by Intensity

v2.1



Sample Details

Sample Name: NP CuO Renata size 3

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: willim matias.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 78	Dispersant RI: 1,330
Material RI: 1,59	Viscosity (cP): 0,8872
Material Absorbtion: 0,010	Measurement Date and Time: quarta-feira, 27 de novemb...

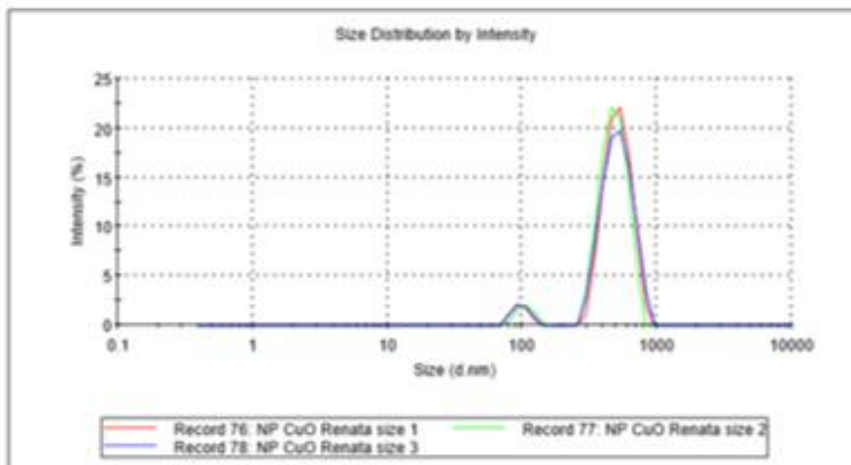
System

Temperature (°C): 25,0	Duration Used (s): 70
Count Rate (kcps): 91,6	Measurement Position (mm): 0,85
Cell Description: Disposable sizing cuvette	Attenuator: 6

Results

	Size (d.nm...)	% Intensity	Width (d.n...
Z-Average (d.nm): 649,0	Peak 1: 515,6	94,1	127,9
Pdl: 0,562	Peak 2: 98,31	5,9	13,86
Intercept: 0,879	Peak 3: 0,000	0,0	0,000

Result quality **Refer to quality report**



AUTORIZAÇÃO

Nome da autora: Renata Amanda Gonçalves

RG: 4594876

Título da Dissertação: **“Toxicidade de Nanopartículas de Óxido de Cobre ao Organismo 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, 05 de junho de 2014.


Renata Amanda Gonçalves