

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

HELENA DA SILVA VIANA DE SOUZA

Efeito de nanopartículas de óxido de zinco e do sulfato de zinco no cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*

São Carlos/SP

2018

Efeito de nanopartículas de óxido de zinco e do sulfato de zinco no cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

HELENA DA SILVA VIANA DE SOUZA

Efeitos de sulfato de zinco e de nanopartículas de óxido de zinco
no cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*

Orientadora:

Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Gama Melão

Co-orientadora:

Dr.^a Jaqueline Pérola de Souza

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

São Carlos/SP

2018



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Helena da Silva Viana de Souza, realizada em 09/03/2018:

M. Gama Melão

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão
UFSCar

Odete Rocha

Profa. Dra. Odete Rocha
UFSCar

Suzelei Rodigher

Profa. Dra. Suzelei Rodigher
UNESP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus e a Nossa Senhora, pela proteção diária e por me conceder tantas alegrias ao longo da caminhada da vida.

Agradeço aos meus pais Carmen e Nelson, pelo suporte, motivação, amor sem medidas, bênçãos e ensinamentos, os quais serão guardados e lembrados por mim para sempre.

Ao meu marido André, pelo apoio, ajuda, carinho e compreensão pelas inúmeras madrugadas de escrita.

À professora Dr.^a Maria da Graça Gama Melão pela orientação e dedicação fundamentais para o desenvolvimento pessoal e acadêmico.

À Dr.^a Jaqueline Pérola de Souza pela coorientação, correções e auxílios relacionados ao manejo e caracterização de nanopartículas.

À professora Dr.^a Odete Rocha, pela disponibilidade em fornecer informações, sugestões, explicações e fornecimento dos organismos utilizados ao longo do desenvolvimento do presente estudo.

Ao professor Dr. Valtencir Zucolotto (*Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia do Instituto de Física da Universidade de São Paulo, campus São Carlos*), pela disponibilização de equipamentos para a caracterização de nanopartículas utilizadas no trabalho.

Aos meus queridos amigos Roberta, Carolina, Mariana, Renan, Karime, Lays, Giseli, Larissa, pelos diversos momentos de descontração e risadas, fazendo com que São Carlos se tornasse um lugar especial.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos (processo 132397/2016-1).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do estudo (processo 2016/00753-7).

A todos que, de alguma forma, direta ou indiretamente, contribuíram para o desenvolvimento desta pesquisa.

Muito obrigada a todos!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcutá- 1910-1997)

RESUMO

O zinco é um metal essencial para os seres vivos, mas pode tornar-se tóxico em concentrações elevadas. Atualmente, o zinco tem sido usado na produção industrial de nanopartículas (NPs), as quais têm se destacado no cenário da nanotecnologia devido à sua ampla utilização em produtos de higiene pessoal, cosméticos, tintas, tecidos, biossensores e no diagnóstico e terapia de diversos tipos de câncer. Entretanto, a produção de NPs em larga escala tem gerado preocupações quanto ao descarte desses nanomateriais em ecossistemas aquáticos e as consequências para a biota. O presente estudo objetivou comparar os efeitos de dois compostos de zinco, as nanopartículas de óxido de zinco (NP-ZnO) e o sulfato de zinco (ZnSO₄), sobre o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*, de maneira a identificar os possíveis efeitos na concentração efetiva (CE₅₀) em testes de exposição aguda, e no crescimento e reprodução em testes de exposição crônica, bem como distinguir se a principal causa da eventual toxicidade das NPs é devida à liberação de íons de zinco ou à propriedades intrínsecas das mesmas. Os testes agudos (controle; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹ para NP-ZnO e controle; 0,032; 0,1; 0,32; 1,04 e 3,35 mg L⁻¹ para ZnSO₄) tiveram a duração de 48 horas e os crônicos (controle; 0,006; 0,0125; 0,025; 0,05 e 0,1 mg L⁻¹ para NP-ZnO e controle, 0,006; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,09 mg L⁻¹ para ZnSO₄), de 8 dias. A CE_{50-48h} para NP-ZnO foi de 0,35 mg L⁻¹, enquanto a CE_{50-48h} para ZnSO₄ foi de 0,92 mg L⁻¹. Nos testes crônicos, houve redução significativa do tamanho corporal médio de 11,3% no tratamento de 0,1 mg L⁻¹ de NP-ZnO e de 10% no tratamento de 0,01 mg L⁻¹ de ZnSO₄; redução do número médio de ovos acumulados e de neonatas produzidos por fêmea de 53,9% e 72,5% para NP-ZnO, e de 55% e 50% para ZnSO₄, respectivamente. Foram observados, ainda, efeitos de bioacumulação e ausência de eclosão (aborto) de ovos nas maiores concentrações avaliadas para as NP-ZnO. Nossos resultados indicaram efeitos tóxicos agudos e crônicos pela exposição de *C. silvestrii* às NP-ZnO e ao ZnSO₄. A exposição crônica afetou os parâmetros de crescimento e reprodução do microcrustáceo em concentrações a partir de 0,006 mg L⁻¹ para ambas as substâncias, sendo a toxicidade proveniente tanto dos íons metálicos livres, quanto das propriedades das NPs. Assim, o presente trabalho pode subsidiar estudos e regulamentações que visem o manejo e o descarte de NP-ZnO e de ZnSO₄ em ecossistemas de água doce.

Palavras-chave: poluentes emergentes, nanopartículas metálicas, zooplâncton, microcrustáceo, ecotoxicidade, nanotoxicidade, metais pesados.

ABSTRACT

Zinc is an essential metal for living beings, but can become toxic at high concentrations. Currently, zinc has been used in the industrial production of nanoparticles (NPs), which have been calling attention in the nanotechnological scenario due to their large use in personal hygiene products, cosmetics, paints, fabrics, biosensors and in diagnosis and therapy of several types of cancer. However, the production of NPs on a large scale has raised concerns about the disposal of these nanomaterials in aquatic ecosystems and the consequences for the biota. The objective of this study was to compare the effects of two zinc compounds, zinc oxide nanoparticles (NP-ZnO) and zinc sulfate (ZnSO₄), on the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*, in order to identify the possible effects on the effective concentration (CE₅₀) in acute exposure tests, and in growth and reproduction in chronic exposure tests, as well as to distinguish whether the main cause of the potential toxicity of NPs is due to the release of zinc ions or their intrinsic properties. Acute tests (control; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5 and 1.0 mg L⁻¹ for NP-ZnO and control 0.032; 0.1; 1.04 and 3.35 mg L⁻¹ for ZnSO₄) lasted 48 hours and the chronic ones (control; 0.006; 0.0125; 0.025; 0.05 and 0.1 mg L⁻¹ for NP-ZnO and control; 0.006; 0.01; 0.02; 0.04 and 0.09 mg L⁻¹ for ZnSO₄), 8 days. The EC_{50-48h} for NP-ZnO was 0.35 mg L⁻¹, while the EC_{50-48h} for ZnSO₄ was 0.92 mg L⁻¹. In the chronic tests, there was a significant reduction of the mean body size of 11.3% in the treatment of 0.1 mg L⁻¹ of NP-ZnO and 10% in the treatment of 0.01 mg L⁻¹ of ZnSO₄; reduction in the mean number of accumulated eggs and neonates produced per female of 53.9% and 72.5% for NP-ZnO, and 55% and 50% for ZnSO₄, respectively. Effects of bioaccumulation and absence of egg hatching (abortion) on the highest concentrations evaluated for NP-ZnO were also observed. Our results showed acute and chronic toxic effects by exposure of *C. silvestrii* to NP-ZnO and ZnSO₄. Chronic exposure affected microcrustacean growth and reproduction parameters at concentrations of 0.006 mg L⁻¹ for both substances, with toxicity coming from both free metal ions and the properties of NPs. Therefore, the present work can subsidize studies and regulations aimed at the management and disposal of NP-ZnO and ZnSO₄ in freshwater environments.

Keywords: Emergent pollutants, metallic nanoparticles, zooplankton, microcrustacean, ecotoxicity, nanotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1. Introdução e objetivos gerais

Figura 1. Desenho esquemático com as diversas áreas de aplicação de materiais nanotecnológicos.

Figura 2. Nanopartículas de óxido de zinco (NP-ZnO).

Capítulo 2. Metodologia geral

Figura 1. Cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*, organismo utilizado nos testes no presente estudo.

Figura 2. Microalga *Raphidocelis subcapitata* utilizada nos experimentos

Figura 3. Cultura de *Raphidocelis subcapitata* levemente aerada em laboratório

Figura 4. Montagem dos testes de toxicidade aguda e crônica com NP-ZnO e ZnSO₄

Capítulo 3. Efeito de nanopartículas de óxido de zinco no cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*

Figura 1. Comprimento corporal médio do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* ao longo de oito dias de exposição a cinco concentrações de NP-ZnO (0,006; 0,0125; 0,025; 0,05 e 0,1 mg L⁻¹).

Figura 2. Número acumulado médio de ovos (A) e de neonatas (B) por fêmea de *Ceriodaphnia silvestrii* ao longo de 8 dias de exposição a 5 concentrações de NP-ZnO (0,006; 0,0125; 0,025; 0,05 e 0,1 mg L⁻¹).

Figura 3. *Ceriodaphnia silvestrii* exposta a concentrações de 0,1 mg L⁻¹ (A) e 0,025 mg L⁻¹ (B) de NP-ZnO ao 3º dia do teste de toxicidade crônica. Setas sólidas indicam NP-ZnO acumuladas no sistema digestivo dos organismos, enquanto setas pontilhadas indicam ovos sendo abortados.

Capítulo 4. Efeito do sulfato de zinco no cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*

Figura 1. Comprimento corporal médio do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* ao longo de oito dias de exposição a cinco concentrações de ZnSO₄ (0,006; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,09 mg L⁻¹).

Figura 2. Número acumulado médio de ovos (A) e de neonatas (B) por fêmea de *Ceriodaphnia silvestrii* ao longo de 8 dias de exposição a cinco concentrações de ZnSO₄ (0,006; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,09 mg L⁻¹).

LIST OF FIGURES

Chapter 1. General introduction and purposes

Figure 1. Schematic drawing with the various application areas of nanotechnological materials.

Figura 2. Nanoparticles of zinc oxide (NP-ZnO).

Chapter 2. General methodology

Figure 1. Tropical cladocera *Ceriodaphnia silvestrii*, organism used in tests in the present study

Figure 2. Microalgae *Raphidocelis subcapitata* used in the experiments

Figure 3. Culture of *Raphidocelis subcapitata* lightly aerated in laboratory

Figure 4. Assemblage of acute and chronic toxicity tests with NP-ZnO and ZnSO₄

Chapter 3. The effect of zinc oxide nanoparticles over the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*

Figure 1. Average body length of the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* along eight days exposition to five different concentrations of NP-ZnO (0,006; 0, 0,125; 0,025; 0,05 and 0,1 mg L⁻¹).

Figure 2. Average number of eggs (A) and neonates (B) per female of *Ceriodaphnia silvestrii* along eight days exposition to five different concentrations of NP-ZnO (0,006; 0, 0,125; 0,025; 0,05 and 0,1 mg L⁻¹).

Figure 3. *Ceriodaphnia silvestrii* exposed to concentrations of 0.1 mg L⁻¹ (A) and 0,025 mg L⁻¹ (B) of de NP-ZnO for the 3^o day of chronic toxicity test. Solid arrows indicate the NP-ZnO accumulated in the digestive tract of the organisms, whereas the incomplete arrows show the eggs being aborted.

Chapter 4. The effect of zinc sulfate over the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*

Figure 1. Average body length of the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* along eight days exposition to five different concentrations of ZnSO₄ (0,006; 0, 01; 0,02; 0, 04 and 0,09 mg L⁻¹).

Figure 2. Average number of eggs (A) and neonates (B) per female of *Ceriodaphnia silvestrii* along eight days exposition to five different concentrations of ZnSO₄ (0,006; 0, 01; 0,02; 0,04 and 0,09 mg L⁻¹).

LISTA DE TABELAS

Apêndice 1. - Valores comparativos de tamanho médio corporal e suas respectivas concentrações de NP-ZnO.

Apêndice 2. - Valores de CENO (maior concentração sem efeito estatisticamente significativo) e CEO (menor concentração com efeito estatisticamente significativo) para parâmetros de comprimento corporal, reprodução e crescimento de *C. silvestrii* exposta à cinco concentrações de NP-ZnO (0,006; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 mg L⁻¹), por oito dias.

Apêndice 3. - Valores de CENO (maior concentração sem efeito estatisticamente significativo) e CEO (menor concentração com efeito estatisticamente significativo) para parâmetros de comprimento corporal, reprodução e crescimento de *C. silvestrii* exposta à cinco concentrações de ZnSO₄ (0,006; 0,01; 0,02; 0,04; 0,09 mg L⁻¹), por oito dias.

TABLE LIST

Chapter.3- CENO values (the highest concentration without statistically significant effect) e CEO values (the lowest concentration with a statistically significant effect) for the parameters body length, reproduction and growth of de *C. silvestrii* exposed to five different concentrations of NP-ZnO (0,006; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 mg L⁻¹), along eight days.

Chapter.4- CENO values (concentration of non observed effects) e CEO values (concentration of observed effect) for the parameters body length, reproduction and growth of de *C. silvestrii* exposed to five different concentrations of ZnSO₄ (0,006; 0,01; 0,02; 0,04; 0,09 mg L⁻¹), along eight days.

LISTA DE ABREVIACOES

- ANOVA: anlise de varincia
- ABNT: associao brasileira de normas tcnicas
- ASTM: American society for testing and materials
- CETESB: companhia ambiental do estado de So Paulo
- CE50 (concentrao efetiva mdia): concentrao nominal que causa efeito agudo a 50% dos organismos, nas condioes do teste e no perodo de exposio determinado.
- NP-ZnO: nanopartculas de xido de zinco
- NP: nanopartcula
- OECD: organizao de cooperao e desenvolvimento econmico
- USEPA: United States environmental protection agency
- ZnSO₄: sulfato de zinco

Sumário

Estrutura do trabalho.....	18
Capítulo 1	19
Introdução e objetivos gerais	19
1. Introdução Geral	20
1.2. Nanopartículas de óxido de zinco	22
2. Objetivos	26
2.1. Geral	26
2.2. Específicos	26
Referências.....	27
Capítulo 2	29
Metodologia geral.....	29
1. Organismos-teste: culturas de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	30
2. Alimentação dos organismos-teste e cultivo de microalgas	31
3. Nanopartículas e sal de zinco: procedência, características e preparo	33
4. Testes de Sensibilidade	34
5. Testes de toxicidade aguda e crônica	35
6. Análises estatísticas	38
Referências.....	39
Capítulo 3	40
Efeito de nanopartículas de óxido de zinco sobre o cladóceros tropical <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	40
1. Introdução.....	41
2. Material e método	44
2.1 Nanopartículas de óxido de zinco	44
2.2 Organismos-teste: culturas de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	45
2.3 Testes de toxicidade	46
2.5 Análises estatísticas	47
Resultados.....	48
3. Caracterização das NP-ZnO	48
3.1 Teste de toxicidade	48
Discussão.....	53
Conclusões	59
Referências.....	60

Capítulo 4	64
Efeito do sulfato de zinco sobre o cladóceros tropical <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	64
1. Introdução.....	65
2.2 Organismos-teste: culturas de <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	67
2.3 Testes de toxicidade	68
2.5 Análises estatísticas	69
Considerações Finais.....	76

Estrutura do trabalho

A presente dissertação encontra-se estruturada da seguinte forma:

- Capítulo 1: introdução ao termo da pesquisa e objetivos do estudo;
- Capítulo 2: metodologia geral detalhada;
- Capítulo 3: Efeito de nanopartículas de óxido de zinco sobre o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*.
- Capítulo 4: Efeito do sulfato de zinco sobre o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*.

Capítulo 1

Introdução e objetivos gerais

1. Introdução Geral

1.1.Nanopartículas

Nanopartículas (NPs) manufaturadas são materiais que possuem tamanho entre 1 e 100 nm em pelo menos duas de suas dimensões (Luoma, 2008). Esses nanomateriais têm sido produzidos há muito tempo. Entretanto, somente nos últimos anos, sua produção tomou grande proporção em escala industrial, sendo as vantagens e a aplicabilidade das NPs amplamente conhecidas. Até o ano de 2015, mais de 1800 produtos contendo algum tipo de NP em sua composição foram catalogados pela CPI (Inventário de consumo de produtos nanotecnológicos) e, devido às suas características físicas e químicas, estas puderam ser empregadas em diversas áreas (Figura 1), como medicina, eletrônica e computação, indústria automotiva, produtos de higiene pessoal, cosméticos, entre outros (Bour et al., 2014; Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009; Vance et al., 2015).

Dessa forma, com o aumento da produção e uso das NPs em diversos itens comercializados, o lançamento desses produtos em ambientes naturais, principalmente em ambientes aquáticos que recebem águas residuais de origem doméstica e industrial, tem se tornado alvo de preocupação e estudos (Defra 2007; Vaseashta et al. 2007).

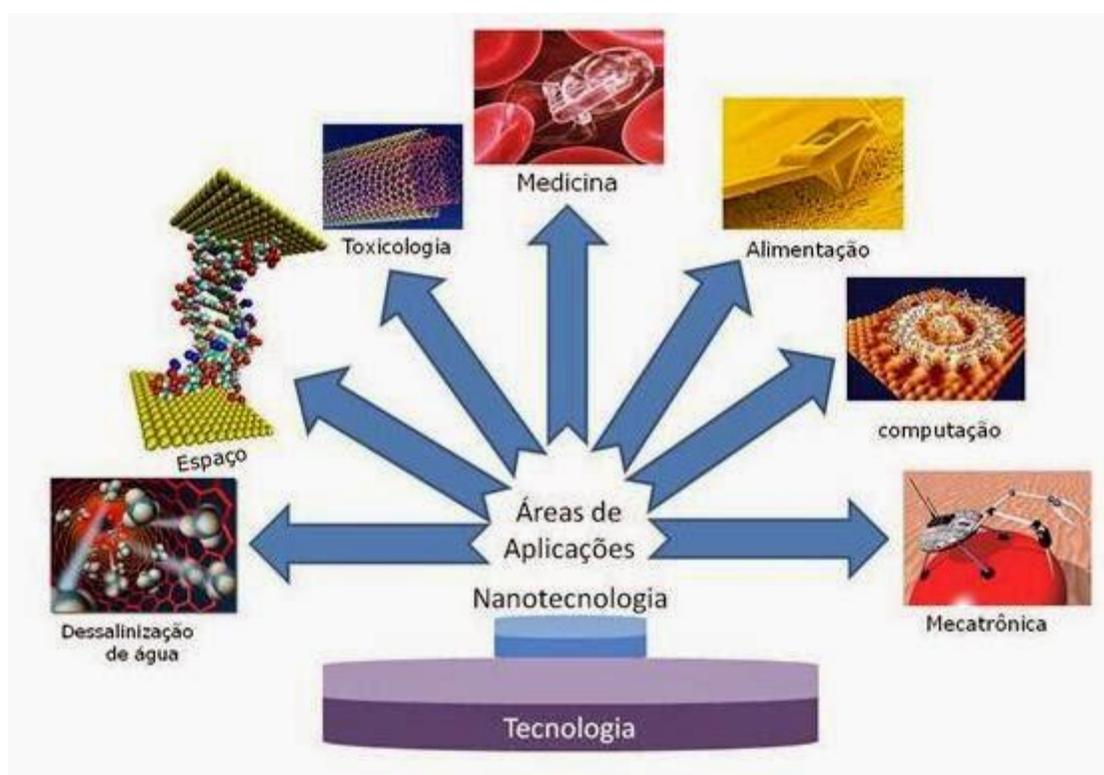


Figura 1. Desenho esquemático com as diversas áreas de aplicação de materiais nanotecnológicos (Fonte:<https://betaeq.com.br/index.php/2015/10/31/nanotecnologia-aplicada-a-engenharia-quimica/>)

Assim, novos estudos e conhecimentos em relação ao potencial tóxico desses materiais são necessários, para que se possa formular legislações regulamentadoras quanto ao descarte dos mesmos no meio ambiente. Na atual conjuntura, poucos países possuem leis concretas relacionadas à produção e destino das NPs, em sua maioria países pertencentes à União Europeia (Amenta et al., 2015). Os países da África e da América do Sul não possuem legislações específicas para o descarte de tais nanomateriais, mesmo sendo o Brasil um dos países líderes em desenvolvimento e pesquisa em nanotecnologia na América Latina (Guillhermo Foladori, 2007).

Nesse sentido, a troca de conhecimento entre os diversos países acerca dos benefícios e riscos das NPs é de extrema importância, para que mais regulamentações sobre o uso desses materiais possam ser desenvolvidas, visando a segurança de seres humanos, bem como a proteção ambiental.

1.2. Nanopartículas de óxido de zinco

Diversos tipos de NPs podem ser encontradas na literatura, tais como NPs metálicas, NPs óxido metálicas e NPs de polímero. Dentre os tipos citados, as NPs óxido metálicas se destacam devido à sua multifuncionalidade, proporcionada por suas características únicas (Vaseem et al., 2010). As nanopartículas de óxido de zinco (NP-ZnO) (Figura 2) são utilizadas em variada gama de áreas atualmente, como cosméticos, aditivos alimentícios, indústrias de concreto e borracha, biosensores, materiais ópticos e eletrônicos, tratamento de doenças, entre outras (Theodore, 2006; Wang et al., 2008; Baxter e Ayudil, 2005; Weber e Yang, 2001).

No entanto, embora haja várias aplicações das NP-ZnO, estas, devido ao seu formato, tamanho em nanoescala e grande área de superfície de contato, podem interagir diretamente com sistemas biológicos, bem como no meio ambiente (Brayner et al., 2010). O acúmulo de NP-ZnO no corpo humano, por exemplo, pode causar toxicidade às células brônquio-epiteliais (Heng et al., 2010) e do fígado (Vyom et al., 2011). Além disso, em outros estudos relacionados ao meio ambiente, diversos autores relatam a toxicidade das NP-ZnO a organismos sensíveis como microcrustáceos, peixes e mamíferos (Lopes et al., 2013; Wei bai et al., 2010; Vyom et al., 2012

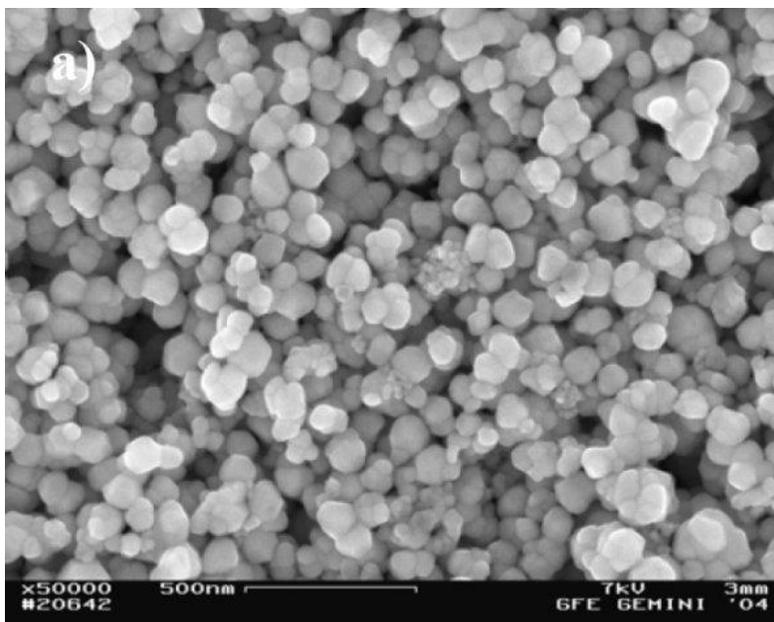


Figura.2- Nanopartículas de óxido de zinco (NP-ZnO)

Fonte: (<https://imagens.tabelaperiodica.org/nanoparticulas-de-oxido-de-zinco/>)

1.3. Ecotoxicologia e seus princípios

A partir do advento da revolução industrial no século XVIII, os processos industriais foram intensificados ao redor do mundo, ganhando grande visibilidade. Desde então, artigos industrializados têm sido produzidos em larga escala. Somente no ano de 2017, por exemplo, esses produtos tiveram sua produção global aumentada em 4,5% (UNIDO, 2017). Dessa forma, diversos produtos químicos, como hormônios, metais, pesticidas e nanomateriais foram produzidos, tendo suas concentrações aumentadas no meio ambiente, devido ao constante lançamento desses produtos nos ecossistemas naturais. Tal fato tem gerado grandes preocupações e crescente necessidade de se conhecer os possíveis efeitos dessas substâncias químicas em indivíduos, populações, comunidades e ecossistemas, bem como as consequências

ao homem. Pesquisas com esse enfoque se enquadram na área de estudo denominada ecotoxicologia.

Segundo Truhaut (1969 *apud* Truhaut, 1977), a ecotoxicologia pode ser definida como uma “ciência que estuda os efeitos das substâncias naturais ou sintéticas sobre organismos vivos, populações e comunidades, animais ou vegetais, terrestres ou aquáticos, que constituem a biosfera, incluindo assim a interação das substâncias com o meio no qual os organismos vivem em um contexto integrado”. Assim, os efeitos de substâncias naturais ou artificiais sobre os seres vivos são conhecidos através de testes ecotoxicológicos, nos quais é possível se determinar as concentrações tóxicas dos compostos em organismos alvo, contribuindo para o desenvolvimento de parâmetros e normas de produção, lançamento e qualidade para proteção de comunidades e o meio ambiente ao seu redor (Bertoletti, 2000). Os testes ecotoxicológicos, portanto, complementarizam as avaliações realizadas a água e no sedimento pelas análises químicas, uma vez que estas últimas limitam-se a detectar contaminantes apenas nos ambientes, não dando importância aos malefícios ocasionados em organismos vivos, fato importantíssimo para uma avaliação robusta em relação aos danos ecológicos ocorridos (Jha,2008).

Os ensaios são realizados com diferentes concentrações de substâncias e compostos químicos, por determinado período de tempo, sendo utilizados organismos de elevada sensibilidade denominados organismos-teste (Magalhães e Filho, 2008; ABNT, 2017). As espécies utilizadas nos testes devem apresentar certas características específicas: sensibilidade constante e elevada aos contaminantes, elevadas disponibilidade e abundância, uniformidade e estabilidade genéticas nas populações, representatividade de seu nível trófico, facilidade de cultivo e adaptação à rotina laboratorial e ampla distribuição (Rand et al., 1995; Ronco et al., 2004; APHA, 1998).

Para serem realizados, os testes de ecotoxicidade necessitam de uma gama de regulamentações e normas estabelecidas a serem seguidas, de maneira a considerarmos válidos os resultados obtidos (Magalhães e Filho, 2008). Assim, uma série de protocolos (ABNT, CETESB, USEPA, OECD e ASTM) estão disponíveis para os organismos-teste utilizados, sendo os mais comuns para a ecotoxicologia aquática: algas, crustáceos, peixes e bactérias (Costa e Olivi, 2008). Dentre os organismos citados, os microcrustáceos são amplamente utilizados em diversos testes ecotoxicológicos, como *Daphnia magna* (OECD, 2004 e ABNT, 2016b), cladóceros originários de regiões temperadas, e cladóceros de origem neotropical como *Ceriodaphnia silvestrii* (ABNT, 2017). A importância do zooplâncton encontra-se em seu papel condutor de fluxo de energia, de produtores primários aos consumidores secundários, tendo fundamental valor, portanto, no transporte de nutrientes no ambiente aquático e, assim, os estudos relacionados às suas atividades são considerados relevantes ao campo da ecotoxicidade (Coelho et al., 2015).

Assim, o controle do lançamento de resíduos nos ambientes aquáticos é de extrema importância para a saúde desses ecossistemas. Para tanto, os dados obtidos a partir dos ensaios ecotoxicológicos podem subsidiar elementos reguladores do uso de substâncias químicas, além de serem utilizados como ferramentas de vigilância no acompanhamento das condições físicas e químicas do ambiente.

2. Objetivos

2.1. Geral

- Comparar os efeitos de dois compostos de zinco, as nanopartículas de óxido de zinco (NP-ZnO) e o sulfato de zinco (ZnSO_4), sobre o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*, durante exposições aguda e crônica, de maneira a identificar os possíveis impactos no ciclo de vida desses microcrustáceos e distinguir se a principal causa da eventual toxicidade é devida à liberação de íons de zinco ou às propriedades intrínsecas das nanopartículas.

2.2. Específicos

- Realizar testes ecotoxicológicos agudos com NP-ZnO e ZnSO_4 utilizando o cladóceros *C. silvestrii* como organismo teste, a fim de se determinar a concentração efetiva média (CE50), que seria a concentração que causa efeito agudo a 50% dos organismos testados;
- Realizar testes ecotoxicológicos crônicos com concentrações subletais de NP-ZnO e ZnSO_4 utilizando *C. silvestrii* como organismo teste, com a finalidade de avaliar os seguintes parâmetros bionômicos dos organismos testados: tamanho corporal, número acumulados de ovos e neonatas por fêmea, idade da primípara, tamanho corporal da primípara e taxa de eclosão de ovos.

Referências

- AMENTA, V. et al. Regulatory aspects of nanotechnology in the agri/feed/food sector in EU and non-EU countries. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 463-476, 2015.
- APHA- American Public Health Association, American Works Association, Water Environment Federation; **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**, 20th ed., American Public Health Association: Washington, 1998.
- BAXTER, J. B. e AYDIL, E. S. Nanowire-based dye-sensitized solar cells. **Appl. Phys. Lett.**, v. 86, 2005.
- BOUR, A., et al. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review. **Journal of Hazardous Materials.**, v.283, p.764- 777, 2014
- BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA G. e GOLIMOWSKI, J. Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. **Waste Management.**, v.29, p. 2587-2589, 2009.
- COELHO, H.A. et al. Monitoramento da água da barragem do Joanes I antes da aplicação de CMH. **2º Congresso Internacional RESAG- Gestão da água e monitoramento ambiental.** p. 1-15, 2015.
- COSTA, C.R e OLIVI, P. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quimi. Nova.**, v.31, p.1820-1830, 2008.
- DEFRA. **Characterising the potential risks posed by engineered nanoparticles: a second UK government research report.** Department for Environment, Food and Rural Affairs, London, p 90, 2007. Disponível em: <http://www.defra.gov.uk/environment/nanotech/research/reports/index.htm>. Acessado em 10/01/2018
- FOLADORI, G. **Nanotechnologies in Latin America.** R. M. RosaLuxemburg-Stiftung, v. 81. Karl Dietz Verlag Berlin GmbH, 2008
- HENG, B.C.et al. Toxicity of zinc oxide (ZnO) nanoparticles on human bronchial epithelial cells (BEAS-2B) is accentuated by oxidative stress. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p. 1762-1766, 2010.
- LOPES, S. et al. Zinc oxide nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*: size-dependent effects and dissolution. **Environ Toxicol Chem.**, v. 33, p. 190-198, 2014.

- LUOMA, S. N., **Silver Nanotechnologies and the Environment: Old Problems or New Challenges?** Washington, DC, p. 68, 2008. Disponível em: http://www.nanotechproject.org/process/assets/files/7036/nano_pen_15_final.pdf
- MAGALHÃES, D.P. e FILHO, A.S.F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.**, v.12, p.355-381, 2008.
- RAND, G. M. et al., **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**; Rand, G. M., ed.; 2nd ed., **Taylor & Francis**: Washington, cap. 1, 1995.
- RONCO, A. et al. Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones; Morales, G. C., ed.; **Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo**: Ottawa, cap. 1, 2004.
- THEODORE, L. **Nanotechnology: basic calculations for engineers and scientists**. Wiley, Hoboken 3. 2006
- TRUHAUT, R. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.1, p. 151-173. 1977.
- VANCE, M. E. et al. Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein Journal of Nanotechnology.**, v. 6, p. 1769-1780, 2015.
- VASEASHTA, A., et al. Nanostructures in environmental pollution detection, monitoring, and remediation. **Sci Technol Adv Mat.**, v. 8, n., p. 47-59, 2007.
- VASEEM, M., et al. **ZnO nanoparticles: growth, properties, and applications**. **Metal Oxide Nanostructures and Their Applications**, Chapter: 4, Publisher: American Scientific Publishers, p.1-36. Disponível em: http://www.nanoscience.gatech.edu/paper/2004/04_JP_1.pdf
- VYOM, S. et al. Induction of oxidative stress, DNA damage and apoptosis in mouse liver after sub-acute oral exposure to zinc oxide nanoparticles. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 745, p. 84-91, 2012.
- WANG, L. Z. Functional oxide nanobelts: materials, properties and potential applications in nanosystems and biotechnology. **Annu. Rev. Phys. Chem.**, v.55, n.159, 2004.
- WANG, X., et al. Sorption of pyrene by regular and nanoscaled metal oxide particles: influence of adsorbed organic matter. **Environ Sci Technol.**, v. 42, p. 7267-7272, 2008.

Capítulo 2

Metodologia geral

Neste capítulo, as etapas metodológicas do presente estudo serão descritas de maneira detalhada. Para todos os procedimentos adotados, normas padronizadas previamente estabelecidas foram seguidas.

1. Organismos-teste: culturas de *Ceriodaphnia silvestrii*

Neonatas de *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera) (Figura 1) foram utilizadas como organismos-teste na análise de possíveis propriedades tóxicas de NP-ZnO a essa espécie ao longo do presente trabalho.



Figura 1. Cladóceros tropicais *Ceriodaphnia silvestrii*, organismo utilizado nos testes de toxicidade do presente estudo. (Fonte: https://species.wikimedia.org/wiki/File:Ceriodaphnia_silvestrii_01.jpg)

Essa espécie foi cultivada em laboratório, sendo mantida em câmara incubadora (Nova Ética B.O.D. 411/D, Brasil) sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), luminosidade ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo (12:12 h luz:escuro). Para os cultivos das culturas-estoque, foram utilizados béqueres com capacidade de 2L contendo 1,5 L de água reconstituída com pH de 7,0 a

7,6, dureza de 40 mg L⁻¹ a 48 mg L⁻¹ de CaCO₃ e condutividade de 160 μS cm⁻², parâmetros recomendados pela Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT, 2016a). A renovação do meio de cultura, composto dessa água reconstituída acrescida de alimento, foi realizada a cada dois dias (3 vezes semana), aferindo-se, após cada troca, todos os parâmetros supracitados. A fim de se garantir a qualidade e a idade dos organismos utilizados nos testes ecotoxicológicos, novos organismos com idade inferior a 24 horas foram utilizados para dar início a novas culturas.

2. Alimentação dos organismos-teste e cultivo de microalgas

Os cladóceros foram alimentados com a microalga clorofícea *Raphidocelis subcapitata* (Figura 2) a partir de uma solução algal com concentração de 2 x 10⁵ células mL⁻¹.

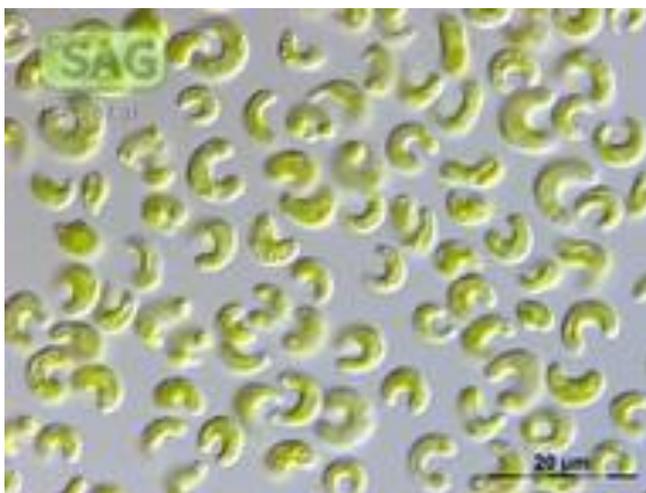


Figura 2. Microalga *Raphidocelis subcapitata* utilizada nos experimentos
(Fonte: https://sagdb.uni-goettingen.de/detailedList.php?str_number=61.81)

A microalga foi cultivada em meio de cultura L.C Oligo (AFNOR, 1980) autoclavado a 121°C por 20 minutos em frasco Erlenmeyer de 2 L de volume, contendo 1 L do meio (Figura 2), o qual foi inoculado com 1 x 10⁵ células mL⁻¹ a partir de uma cultura de algas em crescimento

exponencial, sob condições assépticas em capela de fluxo laminar, que foi previamente esterilizada com álcool 70% e mantida sob luz UV por 15 minutos. As culturas algais permaneceram em condições controladas de temperatura ($25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$), intensidade luminosa ($150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) e fotoperíodo (12:12 h claro:escuro), recebendo aeração contínua de baixa intensidade. Posteriormente, o meio com microalgas em fase exponencial de crescimento foi centrifugado a 2000 rpm a 4°C , durante 15 minutos (Eppendorf 5702 R, Alemanha), sendo o sobrenadante descartado e as células algais ressuspensas em água reconstituída para alimentação do zooplâncton.



Figura 3. Cultura de *Raphidocelis subcapitata* levemente aerada em laboratório.

(Fonte: arquivo pessoal)

Além da solução algal, um alimento complementar foi fornecido aos cladóceros, o qual foi preparado com proporções iguais de soluções de levedura e de ração de peixe fermentada, de acordo com protocolo descrito pela ABNT (2016a). A primeira solução foi preparada a partir de

0,5 g de fermento biológico seco em 100 mL de água destilada, permanecendo sob agitação até sua completa dissolução. A segunda solução foi preparada a partir de 5 g de ração de peixe imersos em 1 L de água deionizada, submetidos a contínua aeração ao longo de uma semana. Após o período referido, a solução passou por processo de decantação no decorrer de 2 horas, sendo o sobrenadante filtrado com o auxílio de rede zooplâncton de 60 μm , e o excesso descartado em local devidamente destinado para esse fim. A solução resultante desse processo foi incorporada à primeira solução de fermento biológico, sendo posteriormente subdividida em pequenos sacos plásticos de 20 mL de volume, os quais foram mantidos em freezer a -4°C .

Como reforço ao desenvolvimento dos cladóceros, a vitamina Fishtamin® (Sera, Alemanha) foi adicionada ao meio de cultura três vezes por semana (a cada troca do meio), na concentração de 100 μL para cada 1,5 L de água reconstituída.

3. Nanopartículas e sal de zinco: procedência, características e preparo

As nanopartículas de óxido de zinco (NP-ZnO) e o sulfato de zinco ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) analisados, foram comercialmente adquiridos da empresa Sigma-Aldrich e utilizadas sem modificação (Brasil, São Paulo; código do lote: #MKBT6312V e nº CAS: 7446-20-0 respectivamente). As partículas possuíam tamanho inferior a 100 nm, sendo seu meio constituído em 50% de água, de acordo com informações do fabricante.

As NP-ZnO foram dispersas em água reconstituída e caracterizadas em 0 e 72h, logo após o início do teste de toxicidade crônica. As NPs foram caracterizadas quanto ao potencial-zeta (mV), tamanho hidrodinâmico (d.nm) e índice de polidispersividade (PdI), em espectrofotômetro

ZetaSizer Malvern ZS90, para três concentrações presentes na exposição crônica (0,006; 0,025 e 0,1 mg L⁻¹).

Uma suspensão-estoque inicial de NP-ZnO foi preparada em água reconstituída previamente autoclavada, para concentração final de 200 mg L⁻¹, sendo em seguida, dispersa em banho ultrassônico (Ultra Cleaner 1400 unique) por 30 minutos a 20 kHz, antes de seu uso (Aruoja et al, 2009). O composto químico utilizado nos experimentos foi o sal de sulfato de zinco (ZnSO₄.7H₂O), o qual foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (n° CAS: 7446-20-0), e utilizado sem nenhuma modificação.

Em relação ao sulfato de zinco, uma solução-estoque inicial foi preparada para concentração final de 500 mg L⁻¹ em água reconstituída autoclavada (ABNT,2017). Para o preparo da solução-estoque inicial, 500 mg de ZnSO₄ foram pesados em balança analítica (Gehaka AG Brasil, 200), e diluídos a 1 L de água reconstituída autoclavada. Dessa maneira, as soluções-teste utilizadas ao longo dos experimentos foram obtidas com base na diluição da solução-estoque inicial.

4. Testes de Sensibilidade

Com a finalidade de se garantir a qualidade dos cladóceros a serem usados nos testes de toxicidade, testes de sensibilidade foram realizados nas culturas-estoque de maneira recorrente, de acordo com parâmetros indicados nas normas da ABNT (2016a). Para tanto, neonatas com idade inferior a 24 horas foram selecionadas e expostas a diferentes concentrações de NaCl (cloreto de sódio, substância de referência), obtidas a partir de uma solução-estoque de 100 g L⁻¹ de NaCl. Com base no trabalho de Takenaka (2007), cinco concentrações da solução-teste (0,0; 0,6; 1,0; 1,3; 1,6; e 2,2 g L⁻¹) de NaCl, mais um grupo controle, foram preparados contendo 4

réplicas para cada um. Os testes foram realizados em recipientes contendo 10 mL de cada concentração das soluções-teste, utilizando-se 5 neonatas para cada réplica, totalizando 20 neonatas (n=20) para cada concentração testada.

Os testes de sensibilidade tiveram duração de 48h, tendo sido realizadas duas leituras, uma 24h e outra 48h após o início do experimento, de forma a se determinar a CE(I)50. Ao longo dos experimentos, os cladóceros não foram alimentados e permaneceram no escuro, em câmara incubadora (Nova Ética B.O.D. 411/D, Brasil), sob temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), sendo a taxa de mortalidade inferior a 10%. Para fins de análise, os efeitos observados foram a imobilidade e/ou letalidade, considerando-se imóveis os organismos sem nenhuma movimentação após suave agitação dos recipientes, em um intervalo de 15 segundos. Ademais, foram medidos condutividade e pH de cada solução-teste no começo e ao final dos testes.

O cálculo da CE(I)50 foi realizado com a ferramenta estatística Trimmed Sperman-Karber (Hamilton et al., 1977). A partir dos resultados, foi elaborada uma carta controle contendo o valor médio (\bar{x}) da CE50 e os limites superiores e inferiores (desvio padrão- σ), ($\bar{x} + 2\sigma$) e ($\bar{x} - 2\sigma$), respectivamente.

5. Testes de toxicidade aguda e crônica

Antes de se iniciar os testes de toxicidade, todos os materiais e vidrarias permaneceram em ácido clorídrico 10% por, no mínimo, 24h e, em seguida, foram lavados em água corrente e, posteriormente, em água deionizada para remoção de quaisquer resquícios químicos. Após

lavagem, o material foi posto em bandeja revestida por papel filtro e coberto com o mesmo material, até sua completa secagem.

Testes de toxicidade aguda e crônica foram realizados para as substâncias experimentais NP-ZnO e ZnSO₄. Para os testes de toxicidade aguda, foram utilizadas 4 réplicas com 5 neonatas com idades entre 6h e 24h por réplica. A partir da suspensão-estoque inicial, seis concentrações experimentais foram preparadas para NP-ZnO (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹), após testes preliminares com diferentes concentrações, e a partir da solução-estoque inicial, cinco concentrações experimentais para ZnSO₄ (0,032; 0,1; 0,32; 1,04 e 3,35 mg L⁻¹) foram elaboradas. Um grupo controle também foi inserido ao teste, tendo os organismos expostos apenas a água reconstituída (ABNT, 2016a).

Recipientes de poliestireno (50 mL) foram utilizados para realização dos testes, e posteriormente descartados ao final dos testes. Em cada recipiente, um volume de 20 mL de solução-teste de cada concentração experimental foi exposto aos organismos testados (Figura 3). Durante todo o período do teste, os cladóceros foram mantidos em ambiente escuro, em câmara incubadora (Nova Ética B.O.D. 411/D, Brasil), sem alimentação e sob temperatura controlada (25± 1°C). Os parâmetros analisados foram a imobilidade e a letalidade após 24h e 48h do início do experimento. Para o cálculo da CE(I)50, utilizou-se o programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977).

A partir dos resultados dos testes de toxicidade aguda, os organismos foram expostos à concentrações subletais de NP-ZnO e ZnSO₄. Para isso, o valor da concentração de 10% de letalidade para os organismos testados (CL10), foi calculado com o auxílio do programa estatístico de análise de sensibilidade Probit. Para os testes de toxicidade crônica, cinco concentrações não-letais foram utilizadas: 0,006; 0,0125; 0,025; 0,05 e 1,0 mg L⁻¹ para NP-ZnO

e cinco concentrações não-letais foram utilizadas (0,006; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,09 mg L⁻¹) para ZnSO₄. Cada concentração contou com 10 réplicas (n=10), com inserção de apenas uma neonata com menos de 24h de idade por réplica. O grupo controle foi exposto somente ao meio contendo água reconstituída. Para o teste de ecotoxicidade crônica com NP-ZnO, a suspensão-estoque foi previamente sonicada durante 30 minutos, sendo 20 mL de cada solução-teste adicionados aos recipientes experimentais.

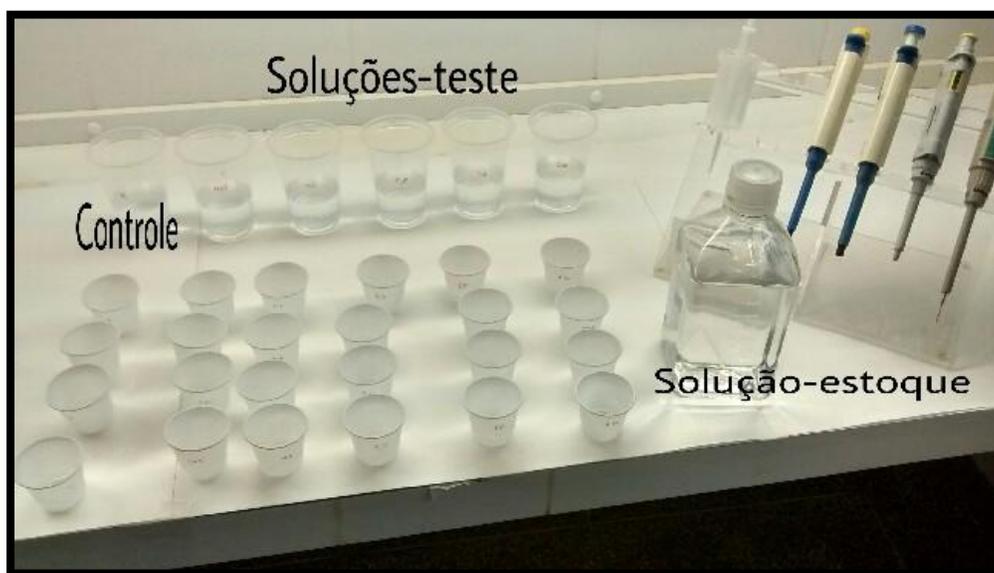


Figura 4. Montagem dos testes de toxicidade aguda e crônica com NP-ZnO
(Fonte: arquivo pessoal)

Os organismos experimentais permaneceram em câmara incubadora (Nova Ética B.O.D. 411/D, Brasil), sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), luminosidade ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo (12:12 h luz:escuro) ao longo de oito dias (ABNT, 2016b). No decorrer desse período, os microcrustáceos tiveram o meio renovado por completo, três vezes na semana, tendo sido alimentados, nessas ocasiões, com uma suspensão algal de *R. subcapitata* à concentração de 2×10^5 cels. mL⁻¹ e com 0,5 mL L⁻¹ do alimento composto. Os parâmetros analisados durante os

testes crônicos foram comprimento do corpo, longevidade, número acumulado de ovos e neonatas produzidos por fêmea adulta, idade da primípara e porcentagem de eclosão dos ovos, sendo os organismos experimentais observados diariamente sob estereomicroscópio (Leica, MZ6, Alemanha).

De acordo com o protocolo da ABNT (2016b), o teste foi validado, pois 60% ou mais das fêmeas adultas utilizadas nos testes tiveram uma produção de ao menos 15 neonatos até o oitavo dia, além de a taxa de mortalidade no grupo controle ter sido inferior a 20%.

Em ambos os testes de toxicidade (aguda e crônica), foram aferidos o pH (Analion PM 608, Brasil), a temperatura (Hach hq30d), a condutividade (Analion PM 608, Brasil), a concentração de oxigênio dissolvido (Hach hq30d) e a dureza da água.

6. Análises estatísticas

Os resultados dos testes de toxicidade crônica foram submetidos à análise estatística para a normalidade, através do teste de Shapiro-Wilk, com o auxílio do software SigmaPlot 11.0. Em relação aos dados paramétricos, uma análise de Variância one-way-ANOVA, foi realizada, e em adição, os testes de post-hoc Tukey e testes de Dunnett. Para dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis foi aplicado, seguido dos testes post-hoc de Dunn's e Tukey. As diferenças significativas dos dados foram estabelecidas quando $\alpha = 0,05$.

Referências

- ABNT - Brazilian National Standards Organization (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Aquatic ecotoxicology - Chronic toxicity - Test method with *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). NBR 13373:2016.** Rio de Janeiro, RJ, 2016a. 20 p.
- ABNT - Brazilian National Standards Organization (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Aquatic ecotoxicology - Acute toxicity - Test with *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). NBR 12713.** Rio de Janeiro, RJ, 2016b. 27 p.
- AFNOR - Association Française de Normalisation. **Norme expérimentale. Essais deseaux Determination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance.** Paris, 1980. T90-304 pp.
- ARUOJA, V. et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Sci Total Environ**, v. 407, n. 4, p. 1461-1468, 2009.
- HAMILTON, M. A et al. Trimed Spearman-Karber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology.**, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.
- TAKENAKA, R. A. **Avaliação da toxicidade de *Microcystis aeruginosa* de florações naturais de cianobactérias de reservatórios do rio Tietê.** 2006. 330 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2007.

Capítulo 3

Efeito de nanopartículas de óxido de zinco sobre o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*

1. Introdução

No campo de estudos da nanociência e da nanotecnologia, têm sido desenvolvidos projetos científicos de grande interesse em todo o mundo, tornando-se prioridade em diversos locais (Aguar-Fernandez e Hullmann, 2007; Zweck et al., 2008). A partir da década de 1990, pôde-se perceber rápido aumento na utilização de nanomateriais em diversos produtos comerciais, tais como cosméticos, loções de bronzamento, tintas, janelas auto-limpantes e roupas resistentes a manchas (Bystrzejewska-Piotrowska et al., 2009; Kahru e Dubourguier, 2010). As nanopartículas (NPs) manufaturadas compõem grande parte do crescente número de produtos comercializados (Project on Emerging Nanotechnologies, 2008), tendo sido catalogados mais de 1800 produtos de uso diário com NPs em sua composição. (Vance et al., 2015). Esses materiais são definidos com base em peculiaridades de seus atributos, tais como a característica de possuir ao menos duas dimensões externas em nanoescala (< 100 nm) e a grande razão entre superfície e volume, o que leva essas partículas a apresentarem elevada reatividade química (Luoma, 2008).

Os materiais mais utilizados na fabricação das NPs são carbono, prata, sílica, dióxido de titânio, óxido de zinco e óxido de cério (Maynard e Michelson, 2006), existindo mais de 1600 métodos de síntese de NPs, de acordo com relatórios da Royal Commission on Environmental Pollution (2008). As NPs de óxido de zinco (NP-ZnO) têm produção anual estimada em 550 toneladas, sendo de extrema importância devido às suas inúmeras aplicações, como em sensores químicos, biossensores, dispositivos ópticos e eletrônicos, aumento da resistência do concreto, aditivo de borracha de pneus, bloqueadores UV em protetores solares, aditivo de alimentos, dentre outras (Brayner et al., 2010; Vaseem et al., 2010; Brown, 1976; Piccinno et al., 2012). Na área médica, o uso das NP-ZnO tem obtido diversos resultados positivos, entre eles o significativo efeito inibidor de crescimento de microrganismos causadores de várias doenças em humanos,

tais como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* (Adams et al., 2006; Zhang et al., 2008), além dos diversos avanços nas pesquisas referentes aos fármacos utilizados no tratamento de doenças, atuando por exemplo no combate às células tumorais através do sistema de entrega de medicamentos, técnica conhecida como “*drug-delivery*” (Rasmussem et al., 2010).

Dessa forma, levando-se em consideração o aumento na produção de NPs sintéticas, a liberação desses materiais no meio ambiente tornou-se uma questão preocupante a ser avaliada. Assim, a necessidade de se analisar e compreender os possíveis efeitos da exposição da biota à NPs é fundamental para avaliação do potencial toxicológico desses nanomateriais, de modo a complementar os estudos referentes ao constante e rápido desenvolvimento da nanotecnologia (Stone e Donaldson, 2006).

Assim, de maneira a se compreender os possíveis efeitos tóxicos de produtos nanoparticulados, cladóceros da espécie *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera), foram utilizados no presente estudo. Esses microcrustáceos são consumidores primários, de ambiente dulcícola, com ampla distribuição geográfica pela América do Sul (ABNT, 2017; Fonseca e Rocha, 2004). Tais microcrustáceos possuem características bionômicas consideradas atraentes para utilização de testes de toxicidade, devido ao seu curto período de ciclo de vida (7 a 10 dias), abundância e facilidade de cultivo (Versteeg et al., 1997; Fonseca e Rocha, 2004), além de já ter sido atestada em diversos experimentos, a sua sensibilidade a inúmeros compostos químicos (Freitas e Rocha, 2011; Spadoto et al., 2017). Assim, o uso desses animais em testes de ecotoxicidade aguda e crônica implicaria redução de tempo e recursos utilizados, além de a espécie apresentar sensibilidade a químicos, semelhante a

de outros cladóceros amplamente utilizados em estudos ecotoxicológicos, evitando assim a introdução de espécies exóticas em ambiente tropical (Versteeg et al., 1997; U.S. EPA 2002).

Entretanto, análises de toxicidade de NP-ZnO no âmbito ecológico, em sua maioria, são realizadas em organismos-teste como peixes (Bai et al., 2010), bactérias (McGuffie et al., 2016), microalgas (Yung et al., 2017) e microcrustáceos como *Daphnia magna*, espécie que necessita de 21 dias corridos para realização de testes de ecotoxicidade crônica (Lopes et al., 2013; Xiao et al., 2015; Adam et al., 2014). Entretanto, não foram encontrados na literatura, outros estudos ecotoxicológicos com NP-ZnO com espécies de cladóceros tropicais.

Em face do exposto, o presente trabalho teve como propósito a análise da toxicidade aguda e crônica de NP-ZnO sobre a espécie de cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*. Para fins avaliativos, os organismos-teste foram observados quanto à sua reprodução, desenvolvimento e taxa de mortalidade, quando expostos às NP-ZnO. Dessa forma, sendo este o primeiro estudo que se tem conhecimento a avaliar a toxicidade de NP-ZnO sobre um cladóceros tropical, espera-se contribuir para a ampliação dos conhecimentos relacionados à área da nanociência e nanotoxicologia, para que a produção e o descarte dessas NPs, bem como a toxicidade ao meio ambiente, sejam melhor compreendidos, de modo a gerar subsídios para formulação de políticas públicas que possibilitem a redução do impacto desses poluentes emergentes nos ecossistemas aquáticos.

2. Material e método

2.1 Nanopartículas de óxido de zinco

As nanopartículas de óxido de zinco (NP-ZnO) foram comercialmente adquiridas da empresa Sigma-Aldrich e utilizadas sem nenhuma modificação. De acordo com o fabricante, as partículas de NP-ZnO possuem tamanho inferior a 100 nm e seu meio é constituído de 50% de água (Brasil, São Paulo; código do lote: #MKBT6312V).

As suspensões-teste utilizadas nos experimentos foram obtidas dispersando-se as NP-ZnO em água reconstituída (ABNT,2017). Para isto, uma suspensão-estoque inicial de NP-ZnO foi preparada para uma concentração final de 200 mg L⁻¹ em água reconstituída autoclavada, sendo a dispersão resultante submetida a banho ultrassônico (Ultra Cleaner 1400 unique) por 30 minutos a 20 kHz, antes de sua utilização. O processo de sonicação tende a reduzir aglomerados, agregados e sedimentações provenientes da dispersão inicial.

Para utilização nos testes agudos e crônicos essa suspensão-estoque inicial foi diluída para as concentrações correspondentes. A suspensão-estoque inicial foi caracterizada em água reconstituída para o tamanho hidrodinâmico inicial (diâmetro - nm), potencial zeta (mV) e índice de polidispersividade (PdI) (ZetaSizer Malvern ZS90), pelo Grupo de Nanomedicina e Nanotecnologia do Instituto de Física da Universidade de São Paulo (Campus São Carlos).

2.2 Organismos-teste: culturas de *Ceriodaphnia silvestrii*

Neonatas de *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera), obtidas no Laboratório de Limnologia no Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (UFSCar-Campus São Carlos), foram utilizadas como organismos-teste nas avaliações ecotoxicológicas com as NP-ZnO.

Para isso, os organismos foram cultivados em laboratório, mantidos em câmara incubadora (Nova Ética B.O.D. 411/D, Brasil) sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), luminosidade ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo (12: 12 h luz: escuro). Para as culturas-estoque, foram utilizados béqueres com capacidade de 2L contendo 1,5 L de água reconstituída com pH de 7,0 a 7,6, dureza de 40 mg L^{-1} a 48 mg L^{-1} de CaCO_3 e condutividade de $160 \mu\text{S cm}^{-1}$, (ABNT, 2017). A renovação do meio de cultura, composto dessa água reconstituída acrescida de alimento, foi realizada a cada dois dias (3 vezes semana), aferindo-se, após cada troca, todos os parâmetros citados anteriormente. Os cladóceros foram alimentados com a microalga clorofícea *Raphidocelis subcapitata* a partir de uma suspensão algal com concentração de 2×10^5 células mL^{-1} , após cada troca do meio de cultura (três vezes na semana). A microalga foi cultivada em meio de cultura L.C. Oligo (AFNOR, 1980), autoclavado a 121°C por 20 minutos, o qual foi inoculado com 1×10^5 células mL^{-1} a partir de uma cultura de algas em crescimento exponencial. Além da suspensão algal, um alimento composto foi fornecido aos cladóceros, o qual foi preparado com ração de peixe fermentada e levedura, ABNT (2017). Como reforço ao desenvolvimento dos cladóceros, a vitamina Fishtamin® (Sera, Alemanha) foi adicionada ao meio de cultura três vezes por semana (a cada troca do meio), na concentração de $100 \mu\text{L}$ para cada 1,5 L de água reconstituída.

2.3 Testes de toxicidade

Para realização dos testes de toxicidade aguda, 20 neonatas com idades entre 6h e 24h, foram selecionadas e subdivididas em quatro réplicas, totalizando cinco neonatas por réplica. Seis concentrações experimentais foram utilizadas para NP-ZnO (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5 e 1,0 mg L⁻¹), as quais foram preparadas a partir da diluição da suspensão-estoque. Um grupo controle também foi inserido no experimento, no qual os organismos foram expostos apenas à água reconstituída, sendo que não mais do que 10% de mortalidade foi aceito no grupo controle para validação do teste (ABNT, 2017).

Os testes foram realizados em recipientes de poliestireno, contendo um volume de 20 mL de suspensão-teste em cada uma das concentrações experimentais. Todos os organismos permaneceram no escuro, em câmara incubadora (Nova Ética B.O.D. 411/D, Brasil), sem alimentação e sob temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Os efeitos observados foram a imobilidade e a letalidade, em estereomicroscópio (Leica, MZ6, Alemanha), após 24h e 48h do início do experimento.

A partir dos resultados dos testes de toxicidade aguda, calculou-se o valor da concentração que causou 10% de letalidade para os organismos testados (CL10). Devido à sua condição de subletalidade, a CL10 foi o ponto de partida para a escolha das concentrações subletais de NP-ZnO utilizadas nos testes de toxicidade crônica. Para os testes de toxicidade crônica, cinco concentrações subletais foram utilizadas: 0,006; 0,0125; 0,025; 0,05 e 0,1 mg L⁻¹. Cada concentração contou com 10 réplicas, com a inserção de apenas uma neonata com menos de 24h de idade por réplica (n=10). O grupo controle não foi exposto a meios contendo NP-ZnO. A suspensão-estoque foi previamente sonicada durante 30 minutos, sendo 20 mL de cada suspensão-teste adicionados aos recipientes experimentais.

As exposições crônicas foram realizadas nas mesmas condições mantidas para os cultivos, sendo temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), luminosidade ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo (12:12 h luz:escuro) por 8 dias (ABNT, 2017). No decorrer desse período, os microcrustáceos tiveram o meio renovado por completo três vezes na semana, tendo sido alimentados, nessas ocasiões, com uma suspensão algal de *R. subcapitata* na concentração de 2×10^5 cells. mL^{-1} e com $0,5 \text{ mL L}^{-1}$ do alimento composto. Os parâmetros analisados durante os testes crônicos foram comprimento do corpo, longevidade, número acumulado de ovos e neonatas produzidos por fêmea adulta, idade da primípara e porcentagem de eclosão dos ovos, sendo os organismos experimentais observados diariamente sob estereomicroscópio (Leica, MZ6, Alemanha).

Em ambos os testes de toxicidade (aguda e crônica), foram aferidos pH (Analion PM 608, Brasil), temperatura (Hach hq30d), condutividade (Analion PM 608, Brasil), concentração de oxigênio dissolvido (Hach hq30d) e dureza da água, ao início e término do teste, sendo todas as soluções-teste aferidas.

2.5 Análises estatísticas

Para o cálculo da CE(I)50 relacionada ao teste de toxicidade aguda, utilizou-se o programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977). A CL10 foi calculada com auxílio do programa estatístico de análise de sensibilidade Probit. Os valores de CENO (maior concentração estatisticamente não significativa) e CEO (menor concentração estatisticamente significativa) também foram utilizados para os resultados obtidos no teste de ecotoxicidade crônica.

Os dados resultantes dos testes de toxicidade crônica foram submetidos à análise estatística para a normalidade, através do teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, foi realizada

análise de Variância one-way-ANOVA, e em adição, os testes de post-hoc Tukey e testes de Dunnett (SigmaPlot 11.0). Para dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis foi aplicado, seguido dos testes post-hoc de Dunn's e Tukey. As diferenças significativas dos dados foram estabelecidas quando $\alpha = 0,05$.

Resultados

3. Caracterização das NP-ZnO

As NP-ZnO caracterizadas em água reconstituída apresentaram tamanho hidrodinâmico inicial médio de $92,14 \pm 2,84$ nanômetros de diâmetro, potencial zeta de $+11,62 \pm 1,46$ mV e índice de polidispersividade de $0,274 \pm 0,05$.

3.1 Teste de toxicidade

Os testes ecotoxicológicos realizados no presente estudo foram validados de acordo com os protocolos da ABNT, uma vez que a mortalidade no grupo controle, após 48h, foi inferior a 10% nos testes de toxicidade aguda (ABNT, 2017), enquanto que, nos teste de toxicidade crônica, a mortalidade no grupo controle ao longo dos 8 dias de experimento foi inferior a 20% e a média de neonatas geradas por fêmea adulta foi superior a 15 indivíduos ao sétimo dia do experimento (ABNT, 2017).

As variáveis físicas e químicas do meio experimental se mantiveram no nível de faixas ideais ao longo dos testes, com variações inferiores a uma unidade para a temperatura e para o pH, com concentrações de oxigênio dissolvido superiores a $7,7 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$ e dureza entre 40 a 48 mg/L de CaCO_3 .

A partir dos resultados do teste de toxicidade aguda (48h) com NP-ZnO, obteve-se um valor de $\text{CE}_{50-48\text{h}}$ de $0,35 \text{ mg L}^{-1}$ (com intervalo de confiança de 95% entre $0,31$ e $0,40 \text{ mg L}^{-1}$) para *Ceriodaphnia silvestrii*.

Os resultados dos testes de toxicidade crônica de NP-ZnO sobre *C. silvestrii* estão apresentados nas Figuras 1 e 2 e na Tabela 1. A exposição às NP-ZnO resultou em inibição significativa do crescimento dos organismos. O tamanho corporal médio dos organismos expostos aos cinco tratamentos ($0,006$; $0,0125$; $0,025$; $0,05$ e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$) com NP-ZnO foi significativamente menor em comparação ao tamanho do corpo dos organismos do grupo controle, a partir do sexto dia ($p < 0,001$ -Figura 1). A exposição à concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-ZnO, resultou na maior taxa de inibição do crescimento corporal dentre os 5 tratamentos utilizados no teste. Do sexto ao oitavo dia de exposição, o tamanho corporal médio não foi alterado para esse tratamento, ou seja, ao final da exposição os organismos expostos a $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-ZnO foram 11,3% menores que os organismos do grupo controle.

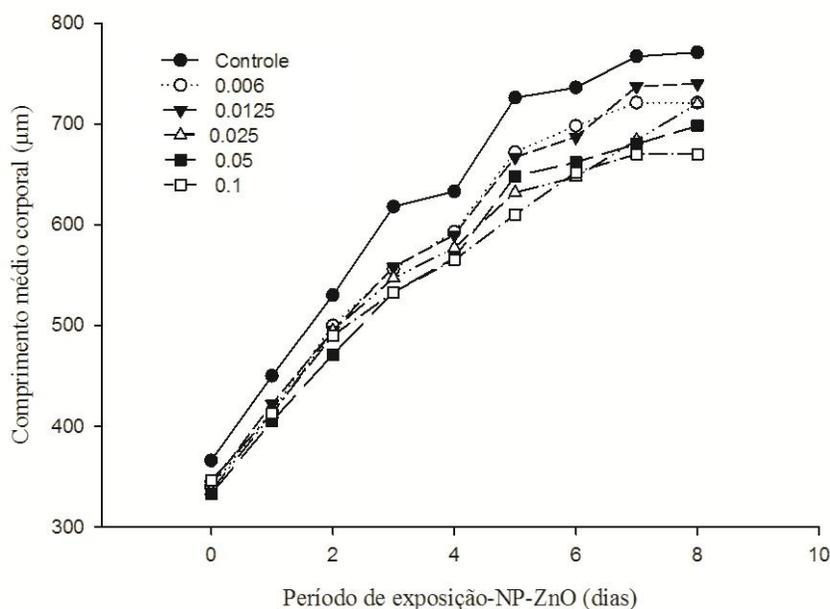


Fig.1. Comprimento corporal médio do cladócer *Ceriodaphnia silvestrii* ao longo de oito dias de exposição a 5 concentrações de NP-ZnO (0,006; 0,0125; 0,025; 0,05 e 0,1 mg L⁻¹).

Dessa maneira, considerando o comprimento médio corporal dos organismos experimentais, o valor encontrado para a CEO, ou seja, a menor concentração estatisticamente significativa, foi de 0,006 mg L⁻¹ de NP-ZnO.

Em relação ao número médio acumulado de ovos por fêmea, é possível observar nos resultados apresentados (figura 2A), que houve redução significativa ($p < 0.05$) a partir do 5º dia de exposição para os tratamentos 0,025, 0,05 e 0,1 mg L⁻¹ de NP-ZnO, atingindo um valor de produção de ovos acumulados 53.9% menor no último dia do teste (8º dia) em relação ao grupo controle, para a concentração de 0,1 mg L⁻¹ (teste de Tukey e Dunnett, $p < 0.05$).

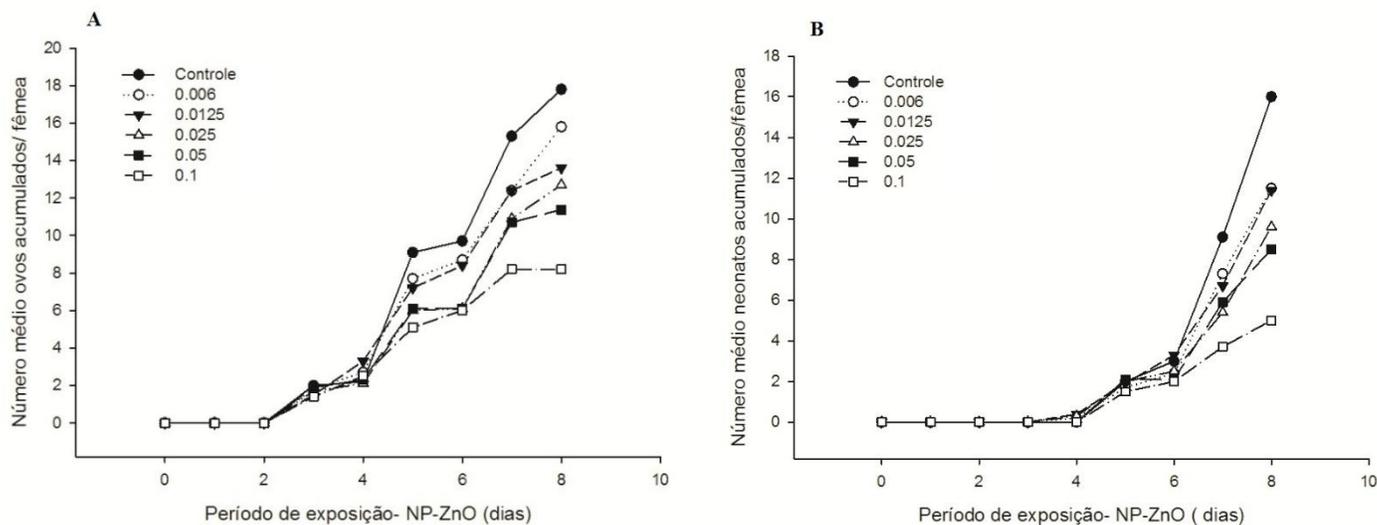


Fig 2. Número acumulado médio de ovos (A) e de neonatas (B) por fêmea de *Ceriodaphnia silvestrii* ao longo de 8 dias de exposição a 5 concentrações de NP-ZnO (0.006; 0.0125; 0.025; 0.05 e 0.1 mg L⁻¹).

No que se refere ao número médio acumulado de neonatas por fêmea (Figura 2B), observa-se uma diminuição significativa a partir do 7º dia de exposição crônica às concentrações de 0,0125, 0,025, 0,05 e 0,1 mg L⁻¹ (teste de Dunnett, $p < 0.05$). A média de neonatas produzidos na concentração de 0,1 mg L⁻¹, foi 72,5% menor, em comparação ao grupo controle no 8º dia. Baseado nos resultados do teste de toxicidade crônica, determinou-se o valor de CENO de 0.006 mg L⁻¹ e o valor de CEO de 0.0125 mg L⁻¹, e a CE₅₀ > 0.1 mg L⁻¹ de NP-ZnO. Nesse tratamento (0.1 mg L⁻¹), verificou-se que os organismos adultos produziram menor número de ovos e, conseqüentemente, geraram menor número de neonatas nos últimos dois dias de exposição. Tratando-se da taxa de eclosão de ovos e idade da primípara, houve diferença estatística significativa somente para a concentração de 0,1 mg L⁻¹ ($p < 0,05$) para os testes de Tukey, Dunnet's e Dunn's em relação ao primeiro parâmetro, enquanto no segundo, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas para nenhuma das concentrações.

No presente estudo, foi possível observar acumulação de NP-ZnO no corpo dos cladóceros expostos aos tratamentos com concentrações de 0.025 mg L^{-1} , 0.05 mg L^{-1} e 0.1 mg L^{-1} (Figura 3 A e B). As NP-ZnO foram acumuladas nos ovos, carapaça e trato intestinal dos organismos expostos.

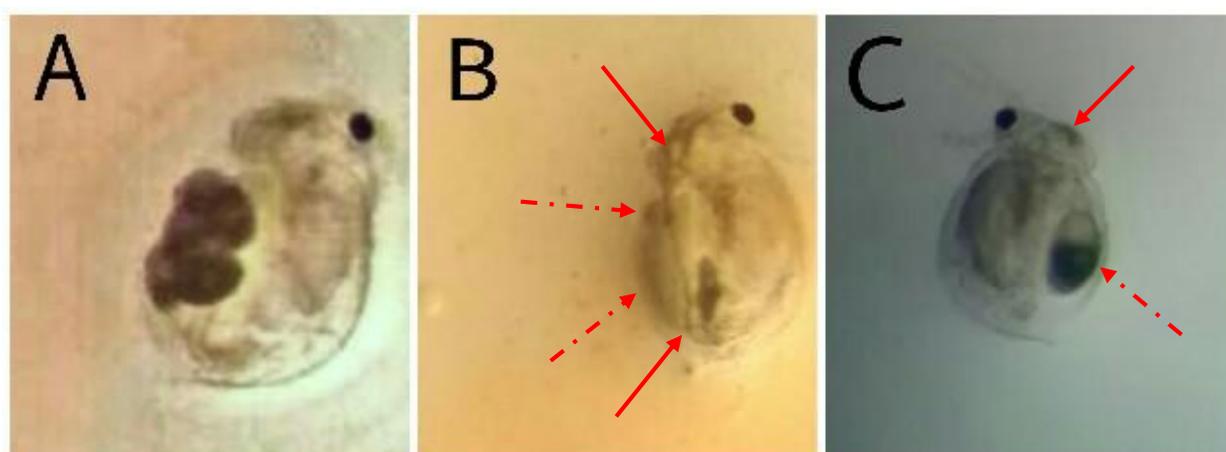


Fig. 3. *Ceriodaphnia silvestrii* em grupo controle (A), e exposta a concentrações de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (B) e $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ (C) de NP-ZnO ao 3º dia do teste de toxicidade crônica. Setas sólidas indicam NP-ZnO acumuladas no sistema digestivo dos organismos, enquanto que setas pontilhadas indicam ovos sendo abortados (fonte: autoria própria).

Discussão

Os resultados para a dispersão das NP-ZnO em água reconstituída demonstraram que as NPs apresentaram tamanho hidrodinâmico inicial inferior a 100 nm, potencial zeta positivo e índice de polidispersividade ($<0,5$). Esses resultados indicam que os organismos foram expostos ao ZnO na forma nanoparticulada. A carga positiva apresentada pelas NP-ZnO indica a tendência para agregação/aglomeração com componentes do meio exposição.

No presente estudo, pôde-se observar que houve efeito tóxico agudo para o cladóceros *C. silvestrii* com uma CE_{50-48h} de $0,35 \text{ mg L}^{-1}$. Outros estudos com NP-ZnO também indicaram toxicidade elevada dessa nanopartícula (Xiao et al. 2015; Lopes et al. 2014). Os valores encontrados para CL_{50-48h} para o cladóceros *Daphnia magna* foram de $0,99 \text{ mg L}^{-1}$ (Xiao et al., 2015) e $1,10 \text{ mg L}^{-1}$ (Lopes et al., 2014). A CE_{50} obtida em nosso estudo para *C. silvestrii* foi menor que os valores descritos na literatura para *D. magna*. Esse resultado pode ser atribuído a maior sensibilidade da *C. silvestrii* às NP-ZnO e a outros compostos químicos em comparação ao microcrustáceo *D. magna* (Versteeg et al., 1997). Essa característica de maior sensibilidade, faz com que o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* sofra os efeitos tóxicos em menores concentrações da substância, tornando essa espécie um excelente organismo bioindicador para estudos de contaminação em ecossistemas tropicais.

De acordo com Hai-zhou et al., (2012), a toxicidade das nanopartículas de óxidos metálicos pode estar parcialmente associada à dispersão de íons metálicos no meio experimental. Essa constatação foi corroborada por outros dois estudos sobre a toxicidade de NP-ZnO, Blinova et al. (2010) avaliando a toxicidade de NP-ZnO em águas naturais e Bacchetta et al. (2016) avaliando a citotoxicidade dessa NP em *D. magna*. No entanto, outros autores encontraram resultados contrastantes. Baek et al. (2011), estudando a toxicidade de NP-ZnO para

bactérias (*E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*), observou que as NP-ZnO liberavam maior quantidade de íons em comparação às outras NPs avaliadas (CuO, NiO, ZnO e Sb₂O₃), mas os íons liberados pelas NP-ZnO não causaram efeitos tóxicos significativos sendo a toxicidade atribuída a própria NP-ZnO. Da mesma forma, Xiao et al. (2015), analisando os efeitos das NP-ZnO em *D. magna*, atribuiu a toxicidade de NP-ZnO essencialmente às partículas em si e não aos íons metálicos. A discrepância entre os resultados encontrados na literatura pode estar atrelada à presença de revestimentos em NP-ZnO (Merdzan et al., 2014), ao tamanho das partículas avaliadas (Meulenkamp, 1998) e aos valores das variáveis monitoradas na solução-teste, como por exemplo, o pH (Li et al., 2013). Assim, o mecanismo de toxicidade de nanopartículas de óxidos metálicos é um assunto de grande complexidade, necessitando de estudos mais aprofundados para sua completa compreensão.

Foi possível verificar também que as NP-ZnO causaram efeitos deletérios sobre os parâmetros de crescimento e reprodução dos organismos estudados. Os efeitos negativos de NP-ZnO sobre o desenvolvimento corporal médio dos cladóceros foram igualmente relatados por outros autores. Hai-zhou et al (2012) obteve valores decrescentes do comprimento corporal médio de *Daphnia magna*, em função do aumento das concentrações de NP-ZnO, de forma semelhante ao presente estudo, sendo que na última concentração testada pelo autor (0.5 mg L⁻¹), o comprimento corporal foi 26,6% menor em relação ao grupo controle.

Do mesmo modo, Adam et al (2014) observaram inibição significativa do crescimento corporal médio em *D. magna* a partir da concentração de 0,16 mg L⁻¹ de NP-ZnO (410 µm) em relação ao controle (460 µm). No entanto, o referido autor notou ligeira discrepância no crescimento corporal entre duas concentrações experimentais de NP-ZnO: o tamanho corporal médio (460 µm) encontrado no tratamento com 0,008 mg L⁻¹ de NP-ZnO foi superior ao

tamanho corporal médio (430 μm) encontrado no tratamento com menor concentração de NP-ZnO (0,0024 mg L^{-1}). Situação semelhante foi observada no presente estudo nas concentrações 0,0125 e 0,006 mg L^{-1} , entre o 5º e o 6º dia de exposição. Esse maior efeito sobre o comprimento do corpo em menores concentrações de NP-ZnO pode indicar que os organismos talvez sejam capazes de se adaptar a situações de estresse e responder de maneira diferente em relação à exposição. A inibição do crescimento corporal também foi registrada em nemátodos expostos a diferentes tratamentos contendo nanopartículas de titânio e nanopartículas de zinco (Wu et al., 2013), com redução significativa ($p < 0.001$) a partir da concentração de 0,05 mg L^{-1} de NP-ZnO, sendo a toxicidade do zinco superior à toxicidade verificada nos tratamentos com titânio.

Em relação ao número acumulado de ovos e neonatas acumulados por fêmea, neste estudo verificou-se resposta concentração dependente. A diminuição dos ovos e neonatas ao final da exposição às NP-ZnO na concentração 0,1 mg L^{-1} foi 50% inferior em relação ao resultado encontrado nos organismos do grupo controle. De acordo com Lopes et al. (2014), o número de neonatas produzidas por fêmea de *D. magna* foi afetado pela exposição às NP-ZnO, resultando em redução de até 62% na prole em relação ao organismos do grupo controle, sendo a média de redução muito próxima à averiguada no presente estudo. O mesmo resultado foi obtido por Adam et al. (2014), em estudo, no qual o número de neonatas decrescia conforme as concentrações de NP-ZnO aumentavam, sendo os valores significativos para o número médio de neonatas encontrados nas duas concentrações mais altas. Esses resultados podem ser entendidos do ponto de vista do ajuste energético sofrido pelos organismos em situações de estresse ambiental. Na presença das NP-ZnO os organismos tendem a investir a energia disponível para sua própria manutenção e sobrevivência ao invés de investir em crescimento e reprodução. Mudanças na estratégia de disponibilidade energética foram já descritas para diversos poluentes

ambientais, ocorrendo também, diante da exposição às NPs (Souza et al. 2018; Lovern et al. 2007; Smolders et al., 2005).

O estudo sobre o crescimento e reprodução dos cladóceros se faz necessário, pois, a partir do conhecimento das taxas de desenvolvimento das diferentes fases do ciclo de vida (desenvolvimento embrionário e pós embrionário) e particularidades reprodutivas, é possível aprimorar o quadro de informações existentes acerca da biologia desse animal, além de promover maior conhecimento para um manejo adequado e preservação de ecossistemas aquáticos. Dessa maneira, sendo o desenvolvimento corporal de *C. silvestrii* afetado pela presença de NP-ZnO no ambiente, haverá conseqüentemente efeito na produção de ovos e neonatas, fazendo com que ocorra a diminuição da produção dos mesmos. Com o tamanho reduzido, menor produtividade de ovos e liberação de neonatas, esses crustáceos perdem sua vantagem competitiva em relação aos outros cladóceros, relacionada ao curto ciclo de vida (7 a 10 dias). Tal fato, poderá culminar na diminuição de sua população dentre os demais organismos presentes em ambientes aquáticos, gerando diversos desequilíbrios em ecossistemas dulcícolas, como por exemplo, no fluxo energético de cadeias alimentares (Melão, 1999).

Dois outros fatos importantes foram constatados ao longo das observações diárias do teste de toxicidade crônica. O primeiro foi a não eclosão de ovos ao terceiro dia do teste, em duas concentrações (0,025 e 0,1 mg L⁻¹), e o segundo foi a acumulação de NP-ZnO no trato digestório dos cladóceros a partir da concentração de 0,025 mg L⁻¹. Em estudo realizado por Sobral et al. (2001), os ovos não eclodidos de cladóceros dificilmente são reportados, em virtude do seu tamanho pequeno e ausência de movimento, o que torna difícil a sua visualização. Entretanto, no decorrer das observações diárias do teste de toxicidade crônica no presente estudo, dois organismos foram observados em seu processo de não eclosão dos ovos produzidos, nas

concentrações de $0,025 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. (Figura 3). De acordo com Bundschuh et al. (2016), conforme a concentração dos tratamentos com nanopartículas de titânio aumentava, o número de aborto de ovos para *Daphnia magna* também crescia.

Segundo Elder et al. (2009) e Santo et al. (2014), o trato gastrointestinal é um dos pontos de entrada mais importantes de nanopartículas, sendo um alvo essencial de absorção das mesmas. Ainda de acordo com Santo et al. (2014), as NP-ZnO agem no lúmen intestinal, criando vacúolos, modificando o formato das células, bem como degradando proteínas presentes na membrana celular. Em estudos envolvendo os efeitos acumulativos de nanopartículas de titânio, Tan et al. (2014) e Zhu et al. (2010) observaram que a ação bioacumulativa no intestino de *D. magna*, ocorria devido à ingestão das mesmas a partir da coluna d'água, fato confirmado por Zhao e Wang (2010) em experimentos com nanopartículas de prata, as quais foram melhor absorvidas pelos cladóceros quando presentes em água, do que em alimento algal contaminado. Tal fenômeno também foi observado por Gebara (2017-dados não publicados) em testes de toxicidade crônica com *C. silvestrii* exposta a $6,25 \text{ mg L}^{-1}$ de nanopartículas de óxido de ferro, registrando bioacumulação no tubo digestivo e nos ovos dos organismos experimentais. Zhu et al. (2010) relataram bioacumulação de nanopartículas de óxido de titânio no aparelho digestivo de *D. magna* exposta às concentrações de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ (período de 12 h) e $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ (período de 24h). Esse assunto, no entanto, ainda está longe de uma completa compreensão. De Lucca (2016), por exemplo, em testes de toxicidade crônicos com *C. silvestrii* exposta a nanopartículas de dióxido de titânio, relatou que a toxicidade dessas NPs para o cladóceros era quase 100 vezes (1 mg L^{-1}) maior pela via alimentar do que a partir da água (100 mg L^{-1}), comparada com outra espécie do mesmo gênero (*C. dubia*), referida por outro autor (Li et al., 2011), o que indica maior absorção a partir do alimento.

Assim, como a bioacumulação de NP-ZnO pode ser observada no presente estudo em *C. silvestrii*, a toxicidade das NPs que culminou na redução do número de ovos e da taxa de eclosão desses ovos, com diminuição do nascimento de neonatas, pode ter ocorrido devido à não depuração eficiente do sistema digestivo. O acúmulo de NP-ZnO no trato intestinal pode ter contribuído para uma significativa redução na ingestão de alimento, provocando deficiências na absorção de nutrientes importantes ao desenvolvimento dos organismos (Souza et al. 2018; Zhu et al., 2010).

Outro possível mecanismo de toxicidade causada por NP-ZnO, refere-se ao estresse oxidativo ocasionado nas células que são expostas ao químico. A produção de espécies reativas de oxigênio (comumente chamado de ROS- Reactive Oxygen Species) pode ser tóxica, pois pode ultrapassar a capacidade de produção de defesa antioxidante da célula, causando a peroxidação dos lipídios da membrana (Xia et al., 2006).

Os efeitos crônicos das NP-ZnO relatados no presente estudo são de grande importância para maior compreensão do comportamento desse contaminante emergente em ambientes aquáticos, pois representam contextos tóxicos de exposição de maneira mais realística do que os apresentados nos cenários de efeitos agudos, devido à possibilidade de análise, a longo prazo, de efeitos subletais dos poluentes. Adicionalmente, este estudo se destaca pelo uso de uma espécie tropical nativa em experimentos ecotoxicológicos (Freitas e Rocha, 2011), o que é muito relevante, considerando que esses organismos foram extremamente sensíveis a essa nanopartícula avaliada, tornando a *C. silvestrii* um organismo fundamental para avaliações de toxicidade em ecossistemas tropicais.

Conclusões

Foram observados efeitos de toxicidade aguda de NP-ZnO para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, com valor de CE_{50-48h} de $0,35 \text{ mg L}^{-1}$. Em relação ao teste de toxicidade crônica, observou-se que a maior concentração de NP-ZnO ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$) provocou inibição estatisticamente significativa no parâmetro de crescimento médio corporal dos organismos, com redução de 11,3% em relação ao grupo controle e CEO estimada em $0,006 \text{ mg L}^{-1}$. Baixas concentrações de NP-ZnO ($0,0125$ e $0,025 \text{ mg L}^{-1}$) causaram efeitos tóxicos sobre o número médio acumulado de ovos e de neonatas, respectivamente. Ademais, a acumulação de NP-ZnO no sistema digestivo dos organismos foi constatada, assim como o fenômeno de não eclosão dos ovos nas maiores concentrações de NPs utilizadas. Assim, recomenda-se maior precaução quanto à utilização e descarte das NP-ZnO, em função da comprovada toxicidade dessa substância à biota aquática em concentrações ambientalmente relevantes.

Assim, os resultados do presente estudo demonstraram os efeitos tóxicos que as NP-ZnO têm sobre o cladóceros tropical *C. silvestrii*, já em baixas concentrações, que, potencialmente podem ser encontradas nos ecossistemas aquáticos naturais, indicando a necessidade de criação de normatização que regulamente o uso e o descarte desse contaminante emergente em países tropicais.

Referências

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2017. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera.)** NBR 13373. Rio de Janeiro, RJ. 23 p.
- ADAMS, N. et al. The chronic toxicity of ZnO nanoparticles and ZnCl₂ to *Daphnia magna* and the use of different methods to assess nanoparticle aggregation and dissolution. **Nanotoxicology.**, v.7, p. 709-717, 2014.
- ADAMS, L. K. et al. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. **Water Res.**, v. 40, p. 3527-3532, 2006.
- AFNOR, Association Française de Normalisation., Essais des eaux. **Determination de Inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Norme expérimentale**, p. 90-304, 1980.
- AGUAR-FERNANDEZ, M.A. e HULLMANN, A. A boost for safer nanotechnology. **Nano Today**, v. 2, p. 56, 2007.
- BACCHETTA, R., et al. Role of soluble zinc in ZnO nanoparticle cytotoxicity in *Daphnia magna*: a morphological approach. **Environ Res**, v.148, p. 376-385, 2016.
- BAEK, Y. W e AN, Y-J., Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. **Sci Total Environ**, v. 409, p. 1603-1608, 2011.
- BAI, W. et al. Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: a physicochemical study of toxicity mechanism. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, p. 1645-1654, 2009.
- BLINOVA, I., et al. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. **Environ Pollut**, v. 158, p. 41-47, 2010.
- BRAYNER, R. et al. ZnO nanoparticles: synthesis, characterization, and ecotoxicological studies. **Langmuir Article**, v. 26, p. 6522-6528, 2010.
- BROWN, H.E. Zinc Oxide Rediscovered, The New Jersey Zinc Company, **New York and Zinc Oxide, Properties and Applications**, 1976.
- BUNDSCHUH, M. et al. Do titanium dioxide nanoparticles induce food depletion for filter feeding organisms? A case study with *Daphnia magna*. **Environ Pollut**, v. 214, p. 840-846, 2016.
- BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G. et al. Nanoparticles: their potential toxicity, waste and environmental management. **Waste Management**, v. 29, p. 2587-2589, 2009.

- DE LUCCA, G. M. **Efeitos ecotoxicológicos das nanopartículas de dióxido de titânio sobre a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e sobre o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* por diferentes vias de exposição.** Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 17-150, 2016.
- ELDER, A., et al. Physicochemical factors that affect metal and metal Oxide nanoparticle passage across epithelial barriers. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 1, p. 434-450, 2009.
- FONSECA, A. L. e ROCHA, O. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a Neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). **Acta Limnol. Bras.**, v. 16, p. 319-328, 2004.
- FREITAS, E. C. e ROCHA, O. Acute toxicity tests with the tropical cladoceran *Pseudosida ramosa*: the importance of using native species as test organisms. **Arch Environ Contam Toxicol.**, v. 60, p. 241-249, 2011.
- GEBARA, R. C. **Toxicidade de nanopartículas de óxido de ferro (Fe₃O₄) para o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*.** Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, p. 2-74, 2016.
- HAI-ZHOU, Z. et al. Toxicity of nanoscale CuO and ZnO to *Daphnia magna*. **Chem. Res. Chinese Universities**, v. 28, p. 209-213, 2012.
- HAMILTON, M. A. et al. Trimed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v. 11, p. 714-719, 1977.
- HEINLAAN, M. et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. **Chemosphere**, v. 71, p.1308-1316, 2008.
- KAHRU, A. e DUBOURGUIER, H. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, v. 269, p. 105-109, 2010.
- KASEMETS, K. et al. Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO₂ to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Toxicol In Vitro**, v. 23, p. 1116-1122, 2009.
- LI M. et al. Responses of *Ceriodaphnia dubia* to TiO₂ and Al₂O₃ nanoparticles: A dynamic nano-toxicity assessment of energy budget distribution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, p. 502 – 508, 2011.
- LI, W. et al. Distinct biokinetic behavior of ZnO nanoparticles in *Daphnia magna* quantified by synthesizing 65504 Zn tracer. **Water Res.**, v. 47, p. 895–902, 2013.
- LOVER, S.B. et al. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx). **Environ. Sci. Technol.**, v. 41, p. 4465-4470, 2007.
- LOPES, S. et al. Zinc oxide nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*: size-dependent effects and dissolution. **Environ Toxicol Chem.**, v. 33, p. 190-198, 2014.

- LUOMA, S. N. **Silver Nanotechnologies and the Environment: Old Problems or New Challenges?** Washington, DC, p. 68, 2008.
- MAYNARD, A. e MICHELSON, E. The Nanotechnology Consumer Products Inventory. Woodrow Wilson International Center for Scholars, 2006. <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>. Acessado em: 15/12/2017
- MCGUFFIE, M.J. et al. Zinc oxide nanoparticle suspensions and layer-by-layer Coatings inhibit staphylococcal growth. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 12, n.1, 2016.
- MELÃO, M. G. G. Desenvolvimento e aspectos reprodutivos dos cladóceros e copépodos de águas continentais brasileiras. *In: POMPEO, M. L. M. ed. Perspectivas na Limnologia do Brasil.* São Luís, Gráfica e Editora União, p. 1-198, 1999. <http://www.ib.usp.br/limnologia/Perspectivas/arquivo%20pdf/Capitulo%203.pdf>
- MERDZAN, V. et al. The effects of different coatings on zinc oxide nanoparticles and their influence on dissolution and bioaccumulation by the green alga, *C. reinhardtii*. **Sci. Total Environ.**, v. 488–489, p. 316–324, 2014.
- MEULENKAMP, E. A. Size dependence of the dissolution of ZnO nanoparticles. **J. Phys. Chem. B.**, v. 102, p. 7764–7769, 1998.
- MORTIMER, M. et al. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. **Toxicology**, v. 269, p.182-189, 2010.
- PICCINNO, F. et al. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, p. 1-11, 2012.
- Project on Emerging Nanotechnologies, 2008. <http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/>. Acessado em : 12/12/2017
- RASMUSSEN, J.W. et al. Zinc oxide nanoparticles for selective destruction of tumor cells and potential for drug delivery applications. **Expert Opinion on Drug Delivery** v.7, p.1063-1077, 2010.
- RCEP, Royal Commission on Environmental Pollution. 27th Report, 2008. <http://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20110322143813/http://www.rcep.org.uk/reports/index.htm>. Acessado em: 20/12/2017
- SANTO, N. et al. Toxic effects and ultrastructural damages to *Daphnia magna* of two differently sized ZnO nanoparticles: does size matter? **Water Res**, v.53, p.339-350, 2014.
- SOBRAL, O. et al. *In vitro* development of parthenogenetic eggs: a fast ecotoxicity test with *Daphnia magna*? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.50, p.174-179, 2001.
- SOUZA, J.P et al. Chronic toxicity in *Ceriodaphnia dubia* induced by graphene oxide. **Chemosphere**, v.190, p. 218-224, 2018.

- SMOLDERS, R. et al. Relationship between the energy status of *Daphnia magna* and its sensitivity to environmental stress. **Aquat. Toxicol.**, v.73, p. 155-170, 2005.
- SPADOTO, M. et al. Ecotoxicological effects of bisphenol A and nonylphenol on the freshwater cladocerans *Ceriodaphnia silvestrii* and *Daphnia similis*. **Drug Chem Toxicol.**, v.8, p. 1-10, 2017.
- STONE, V. et al. Nanotoxicology: signs of stress. **Nature Nanotechnology**, v.1, p.23–24, 2006.
- TAN, C. e WANG, W.X., 2014. Modification of metal bioaccumulation and toxicity in *Daphnia magna* by titanium dioxide nanoparticles. **Environ Pollut**, v.186, p.36-42, 2014.
- USEPA - U. S. Environmental Protection Agency, Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. Washington, DC, 335, 2002.
- VANCE, M. E. et al. Nanotechnology in the real world: redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v.6, p.1769-1780, 2015.
- VASEEM, M. et al. ZnO nanoparticles: growth, properties, and applications. Metal Oxide Nanostructures and Their Applications, Chapter: 4, Publisher: American Scientific Publishers, p.1-36, 2010.
- VERSTEEG, D. J. et al. *Ceriodaphnia* and *Daphnia*: a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species. **Chemosphere**, v.34, p.869-892, 1997.
- WU, Q. et al. Comparison of toxicities from three metal oxide nanoparticles at environmental relevant concentrations in nematode *Caenorhabditis elegans*. **Chemosphere**, v.90, p.1123-1131, 2013.
- XIA, T. et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. **Nano Letters**, v.6, p.1794-1807, 2006.
- XIAO, Y. et al. Toxicity and accumulation of Cu and ZnO nanoparticles in *Daphnia magna*. **Environ Sci Technol**, v.49, p.4657-4664, 2015.
- YUNG, M.M.N. et al. Influences of temperature and salinity on physicochemical properties and toxicity of zinc oxide nanoparticles to the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. **Scientific Reports**, v.7: p.3662, 2017.
- ZHANG, L. et al. Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. **Nanoparticle Research**, v.9, p.479, 2008.
- ZHAO, C. e WANG, W. Biokinetic uptake and efflux of silver nanoparticles in *Daphnia magna*. **Environ. Sci. Technol.** v.44, p.7699–7704, 2010.
- ZHU, X. et al. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. **Chemosphere**, v.78, p.209-215, 2010.
- ZWECK, A. et al. Nanotechnology in Germany: from forecasting to technological assessment to sustainability studies. **Journal of Cleaner Production**, v.16, p.977–987, 2008.

Capítulo 4

**Efeito do sulfato de zinco sobre o cladóceros
tropical *Ceriodaphnia silvestrii***

1. Introdução

Diversas substâncias tóxicas podem afetar a qualidade do ecossistema aquático, atingindo organismos, populações e comunidades e, conseqüentemente, perturbando o equilíbrio da biota no ambiente. Dentre esses compostos químicos, os metais pesados podem estar presentes nos ecossistemas aquáticos provenientes de diversos processos, como intemperismo de rochas, erosão, chuvas e atividades humanas (Guilherme et al., 2002; Esteves, 1998; Jackson, 2002).

Diversos metais pesados, como Fe, Mn, Co, Mo, Mg e Zn, são macronutrientes necessários aos seres vivos, tendo papel importante em processos bioquímicos, como por exemplo, a fotossíntese, a cadeia respiratória e a fixação de nitrogênio (Maldonado e Wendling, 2009). Entretanto, mesmo os elementos essenciais podem causar toxicidade aos organismos, dependendo das condições e concentrações de exposição (Esteves, 1998). O cobre e o zinco, por exemplo, podem provocar redução nas taxas de crescimento e reprodução dos organismos, aumento da taxa de mortalidade, e até a completa eliminação da biota (Mazon et al., 2000). Tal fato ocorre, devido à tendência dos metais pesados de se aglutinarem aos sólidos em suspensão presentes nos corpos d'água, sedimentando-se ao fundo dos mesmos, podendo retornar à solução aquosa através dos poros sedimentares ou mesmo diretamente à lâmina de água (Esteves, 1998; Warren e Hack, 2001). Outra possibilidade de toxicidade no ambiente aquático, se deve à formação de compostos estáveis pelos metais pesados, os quais se mantêm presentes na cadeia alimentar (Marcantonio, 2005).

Segundo Vallee e Auld (1990), o zinco é um componente essencial de diversas enzimas envolvidas no metabolismo de diferentes espécies, de todos os filos, sendo indispensável para a maioria de suas funções de síntese e degradação de metabólitos. No entanto, o zinco quando em

elevadas concentrações no meio ambiente pode agir de maneira tóxica em organismos (Marcantonio, 2005). Em estudo realizado por Wang et al (2017), pesquisadores concluíram que a exposição de camundongos à elevadas concentrações de sulfato de zinco ($ZnSO_4$), resultou em efeitos tóxicos aos animais, havendo diminuição em seu tamanho corporal e alteração na microbiota intestinal. Em relação a estudos que incluem a ecotoxicidade aquática, em Schamphelaere et al (2004) pôde-se observar a toxicidade do zinco na reprodução do cladóceros *Daphnia magna*, em testes de ecotoxicidade crônica.

2. Material e método

2.1. Sal de sulfato de zinco

O composto químico utilizado nos experimentos foi o sal de sulfato de zinco ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$), o qual foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (nº CAS: 7446-20-0), e utilizado sem nenhuma modificação.

Uma solução-estoque inicial de $ZnSO_4$ foi preparada para concentração final de 500 mg L^{-1} em água reconstituída autoclavada (ABNT,2017). Para o preparo da solução-estoque inicial, 500 mg de $ZnSO_4$ foram pesados em balança analítica (Gehaka AG Brasil, 200) e adicionados a 1 L de água reconstituída autoclavada. Dessa maneira, as soluções-teste utilizadas ao longo dos experimentos foram obtidas com base na diluição da solução-estoque inicial acima citada.

2.2 Organismos-teste: culturas de *Ceriodaphnia silvestrii*

Neonatas de *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera) foram utilizadas como organismos-teste nas avaliações ecotoxicológicas com as NP-ZnO, sendo obtidas no Laboratório de Limnologia no Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (UFSCar-Campus São Carlos).

Os organismos foram cultivados em laboratório, mantidos em câmara incubadora (Nova Ética B.O.D. 411/D, Brasil) sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), luminosidade ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo (12: 12 h luz: escuro). Para as culturas-estoque, foram utilizados béqueres com capacidade de 2L contendo 1,5 L de água reconstituída com pH de 7,0 a 7,6, dureza de 40 mg L^{-1} a 48 mg L^{-1} de CaCO_3 e condutividade de $160 \mu\text{S cm}^{-2}$, (ABNT, 2017). A renovação do meio de cultura, composto dessa água reconstituída acrescida de alimento, foi realizada a cada dois dias (3 vezes na semana), aferindo-se, após cada troca, todos os parâmetros citados anteriormente. Os cladóceros foram alimentados com a microalga clorofícea *Raphidocelis subcapitata* a partir de uma suspensão algal com concentração de 2×10^5 células mL^{-1} , após cada troca do meio de cultura (três vezes na semana). A microalga foi cultivada em meio de cultura L.C. Oligo (AFNOR, 1980), autoclavado a 121°C por 20 minutos, o qual foi inoculado com 1×10^5 células mL^{-1} a partir de uma cultura de algas em crescimento exponencial. Além da suspensão algal, um alimento composto foi fornecido aos cladóceros, o qual foi preparado com ração de peixe fermentada e levedura, ABNT (2017). Como reforço ao desenvolvimento dos cladóceros, a vitamina Fishtamin® (Sera, Alemanha) foi adicionada ao meio de cultura três vezes por semana (a cada troca do meio), na concentração de $100 \mu\text{L}$ para cada 1,5 L de água reconstituída.

2.3 Testes de toxicidade

Para a realização dos testes de toxicidade aguda, 20 neonatas com idades entre 6h e 24h, foram selecionadas e subdivididas em quatro réplicas, totalizando cinco neonatas por réplica. Cinco concentrações experimentais foram utilizadas para ZnSO_4 (0,032; 0,1; 0,32; 1,04 e 3,35 mg L^{-1}), as quais foram preparadas a partir da diluição da solução-estoque. Um grupo controle também foi inserido no experimento, no qual os organismos foram expostos apenas à água reconstituída, sendo que não mais do que 10% de mortalidade foi aceito no grupo controle para a validação do teste (ABNT, 2017).

Os testes foram realizados em recipientes de poliestireno, contendo um volume de 20 mL de suspensão-teste em cada uma das concentrações experimentais. Todos os organismos permaneceram no escuro, em câmara incubadora (Nova Ética B.O.D. 411/D, Brasil), sem alimentação e sob temperatura controlada ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). Os efeitos observados foram a imobilidade e a letalidade, em estereomicroscópio (Leica, MZ6, Alemanha), após 24h e 48h do início do experimento.

A partir dos resultados dos testes de toxicidade aguda, calculou-se o valor da concentração que causou 10% de letalidade para os organismos testados (CL10). Devido à sua condição de subletalidade, a CL10 foi o ponto de partida para a escolha das concentrações subletais de ZnSO_4 utilizadas nos testes de toxicidade crônica. Para os testes de toxicidade crônica, cinco concentrações subletais foram utilizadas: 0,006; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,09 mg L^{-1} . Cada concentração contou com 10 réplicas, com a inserção de apenas uma neonata com menos de 24h de idade por réplica ($n=10$). O grupo controle não foi exposto a meios contendo ZnSO_4 . Assim, 20 mL de cada solução-teste foram adicionados aos recipientes experimentais.

As exposições crônicas foram realizadas nas mesmas condições mantidas para os cultivos, sendo temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), luminosidade ($150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) e fotoperíodo (12:12 h luz:escuro) por 8 dias (ABNT, 2017). No decorrer desse período, os microcrustáceos tiveram o meio renovado por completo três vezes na semana, tendo sido alimentados, nessas ocasiões, com uma suspensão algal de *R. subcapitata* à concentração de 2×10^5 cells. mL^{-1} e com $0,5 \text{ mL L}^{-1}$ do alimento composto. Os parâmetros analisados durante os testes crônicos foram comprimento do corpo, longevidade, número acumulado de ovos e neonatas produzidos por fêmea adulta, idade da primípara e porcentagem de eclosão dos ovos, sendo os organismos experimentais observados diariamente sob estereomicroscópio (Leica, MZ6, Alemanha).

Em ambos os testes de toxicidade (aguda e crônica), foram aferidos pH (Analion PM 608, Brasil), temperatura (Hach hq30d), condutividade (Analion PM 608, Brasil), concentração de oxigênio dissolvido (Hach hq30d) e dureza da água ao início e término do teste, sendo todas as soluções-teste aferidas.

2.5 Análises estatísticas

Para o cálculo da CE(I)50 relacionada ao teste de toxicidade aguda, utilizou-se o programa estatístico Trimmed Spearman-Kärber (Hamilton et al., 1977). A CL10 foi calculada com auxílio do programa estatístico de análise de sensibilidade Probit. Os valores de CENO (maior concentração estatisticamente não significativa) e CEO (menor concentração estatisticamente significativa) também foram utilizados para os resultados obtidos no teste de ecotoxicidade crônica.

Os dados resultantes dos testes de toxicidade crônica foram submetidos à análise estatística para a normalidade, através do teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, foi realizada

análise de Variância one-way-ANOVA, e em adição, os testes de post-hoc Tukey e testes de Dunnett (SigmaPlot 11.0). Para dados não paramétricos, o teste de Kruskal-Wallis foi aplicado, seguido dos testes post-hoc de Dunn's e Tukey. As diferenças entre os dados foram considerados quando $\alpha = 0,05$.

3. Resultados

3.1. Testes de toxicidade

De acordo com os protocolos da ABNT (2017), os testes ecotoxicológicos foram validados, pois a mortalidade no grupo controle foi inferior a 10%, após o período de 48h para ecotoxicidade aguda, enquanto a mortalidade no grupo controle para ecotoxicidade crônica, foi inferior a 20% ao longo de 7 dias experimentais. O número médio de neonatas geradas por fêmea adulta foi superior a 15 indivíduos ao sétimo dia do teste.

Em relação às variáveis físicas e químicas, foram observadas variações inferiores a uma unidade para temperatura e pH, concentrações de oxigênio superiores a 7,9 mg O₂ L⁻¹, dureza entre 40 a 48 mg L⁻¹ de CaCO₃ e condutividade em 160 mS cm⁻¹.

A partir dos resultados do teste de ecotoxicidade aguda (48h) com ZnSO₄, obteve-se um valor de CE_{50-48h} de 0,92 mg L⁻¹ (com intervalo de confiança de 95% entre 0,67 e 1,28 mg L⁻¹) para *Ceriodaphnia silvestrii*.

Os resultados referentes aos testes de ecotoxicidade crônica de ZnSO₄ (Figuras 1 e 2), revelam que houve diminuição no comprimento corporal médio dos organismos testados. No entanto, ocorreu também certa disparidade entre as concentrações teste utilizadas. Observa-se

que, a exposição de *C silvestrii* a concentração de 0,09 mg L⁻¹ de sulfato de zinco, resultou em comprimento médio ligeiramente maior, em relação às concentrações menores testadas, enquanto a concentração de 0,01 mg L⁻¹ permaneceu com a menor média de comprimento corporal do cladócer *Ceriodaphnia silvestrii*, sendo 10% menor em relação ao controle no oitavo dia.

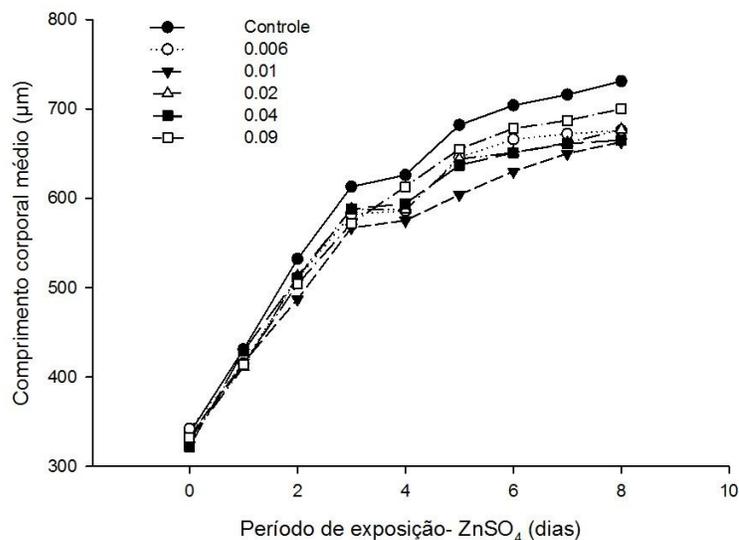


Fig.1. Comprimento corporal médio do cladócer *Ceriodaphnia silvestrii* ao longo de oito dias de exposição a 5 concentrações de ZnSO₄ (0,006; 0,01; 0,02; 0,04 e 0,09 mg L⁻¹).

Assim, considerando o comprimento médio corporal dos organismos experimentais, os valores encontrados para a concentração de efeito não observado (CENO), ou seja, a maior concentração nominal do agente tóxico utilizado no teste que não causa efeito deletério estatisticamente significativo sobre os organismos após exposição, foi de 0,09 mg L⁻¹, enquanto a concentração de efeito observado (CEO), ou seja, a menor concentração nominal do agente tóxico que causa efeito deletério, foi de 0,02 mg L⁻¹ de ZnSO₄.

Em relação ao número médio acumulado de ovos por fêmea, é possível observar nos resultados apresentados (figura 2A), que houve redução significativa ($p < 0.05$) a partir do 6º dia de exposição para os tratamentos 0,01, 0,02, 0,04 e 0,09 mg L⁻¹ de ZnSO₄, atingindo um valor de

produção de ovos acumulados 55% menor no último dia do teste (8º dia) em relação ao grupo controle, para a concentração de 0,09 mg L⁻¹ (teste de Tukey e Dunnett, p<0.05).

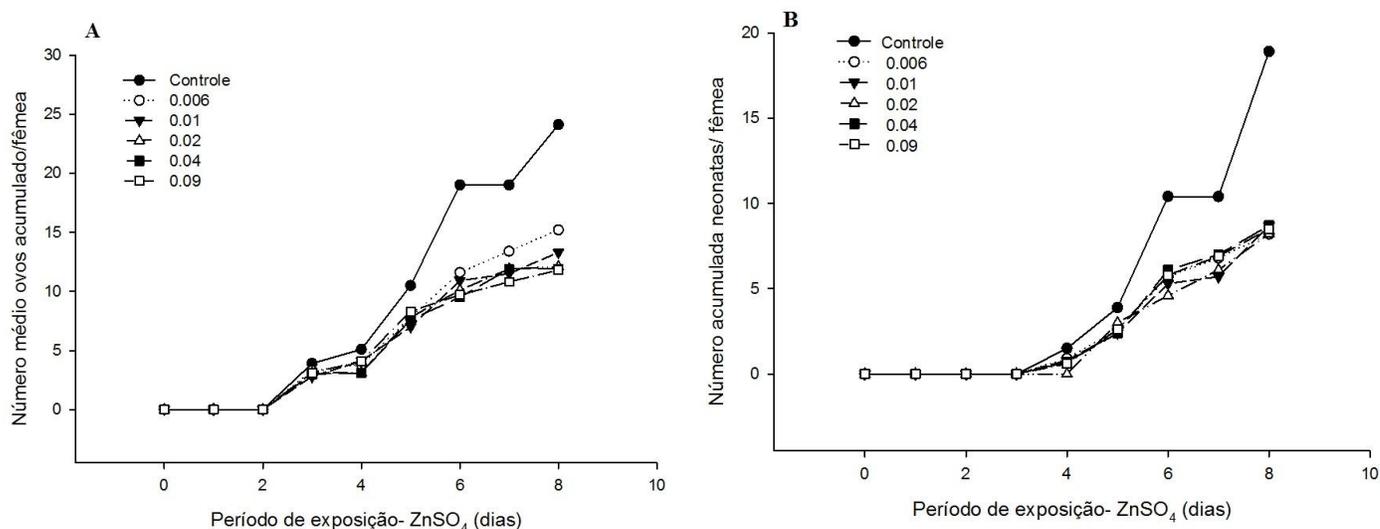


Fig 2. Número acumulado médio de ovos (A) e de neonatas (B) por fêmea de *Ceriodaphnia silvestrii* ao longo de 8 dias de exposição a 5 concentrações de ZnSO₄ (0.006; 0.01; 0.02; 0.04 e 0.09 mg L⁻¹).

Em relação ao número médio acumulado de neonatas por fêmea (Figura 2B), observa-se diminuição significativa a partir do 5º dia de exposição crônica para as concentrações de 0,04 e 0,09 mg L⁻¹ (teste de Dunnett, p<0.05). Nesse caso, pôde-se observar que o número acumulado de neonatas na concentração de 0,09 mg L⁻¹ superou novamente o número acumulado de neonatas na concentração de 0,01 mg L⁻¹. Em comparação ao grupo controle no 8º dia, a média de neonatas por fêmea adulta, foi 53% menor.

A partir dos dados obtidos no teste de ecotoxicidade crônica, determinou-se o valor de CENO de <0,09 mg L⁻¹ e o valor de CEO de 0,006 mg L⁻¹.

4. Discussão

Observou-se efeito tóxico do sulfato de zinco em *Ceriodaphnia silvestrii*, no teste de ecotoxicidade aguda do presente estudo, com $CE_{50-48h} = 0,92 \text{ mg L}^{-1}$. De acordo com Hyne et al (2005), toxicidade aguda de íons zinco também foi encontrada para o cladóceros *Ceriodaphnia dubia* e, conforme a taxa de pH variava no meio, deixando-o mais ácido, a toxicidade ao organismo-teste aumentava. Outro estudo referindo-se à toxicidade do zinco foi realizado por Belanger e Cherry (1990), no qual pôde-se constatar que o zinco exercia efeito tóxico sobre o organismo-teste *Ceriodaphnia dubia*. Dessa forma, podemos dizer que os dados obtidos no presente estudo corroboram os resultados de alguns estudos em relação à ecotoxicidade aguda dos íons de zinco.

Em relação ao teste de ecotoxicidade crônica, efeitos prejudiciais sobre os parâmetros de crescimento corporal e reprodução de *Ceriodaphnia silvestrii* foram constatados. Efeitos deletérios acerca do tamanho corporal médio dos organismos também foram apontados por Winner (1981), em estudo no qual observou-se ligeira redução do desenvolvimento corporal em *Daphnia magna*, ocasionado por íons de zinco provenientes de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$. A toxicidade pelo íons zinco pode ocorrer, devido à interação dos íons com proteínas de alto e baixo peso molecular, assim como com outros compartimentos celulares, e também através da penetração dos íons de zinco por difusão passiva e facilitada (Di Giulio et al, 2003; Rainbow, 1995).

Entretanto, um fato relevante também foi observado quanto ao parâmetro de crescimento corporal. A concentração $0,09 \text{ mg L}^{-1}$ suplantou as demais, enquanto a concentração de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ encontrou-se sendo a mais nociva ao parâmetro de crescimento.

Em relação ao número acumulado de ovos e neonatas acumulados por fêmea, neste estudo verificou-se também o efeito deletério. A diminuição dos ovos ao final da exposição ao $ZnSO_4$

na concentração $0,09 \text{ mg L}^{-1}$ foi 50% inferior em relação ao encontrado nos organismos do grupo controle. Em se tratando do número de neonatas acumuladas por fêmea, observou-se diminuição das mesmas. Contudo, com a concentração de $0,09 \text{ mg L}^{-1}$ superando novamente a concentração de $0,01 \text{ mg L}^{-1}$.

Conclusão

Efeitos de toxicidade aguda foram observados para ZnSO_4 no cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*, com valor de $\text{CE}_{50-48\text{h}}$ de $0,92 \text{ mg L}^{-1}$. Levando-se em consideração o teste de ecotoxicidade crônica, observou-se que a maior concentração de ZnSO_4 induziu a inibição da produção de ovos pelos organismos. Em relação aos parâmetros de crescimento corporal e liberação de neonatas por fêmea, observou-se inibição em ambos. Entretanto, um fenômeno de superação da maior concentração ($0,09 \text{ mg L}^{-1}$) sobre a segunda menor concentração ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$) ocorreu e não pôde ser explicado, devido à falta de registros de tais ocorrências em outros resultados obtidos na literatura atual. Assim, é necessário que esses testes ecotoxicológicos sejam repetidos para confirmação dos resultados.

Referências

- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2017. **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera.)** NBR 13373. Rio de Janeiro, RJ. 23 p.
- AFNOR, Association Française de Normalisation., Essais des eaux. **Determination de Inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance. Norme expérimentale**, p. 90-304, 1980.
- BELANGER, S.E. e CHERRY, D.S. Interacting effects of pH acclimation, pH, and heavy metals on acute and chronic toxicity to *Ceriodaphnia dubia*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 10, n.2. p. 225-235, 1990.
- Di GIULIO, R.T. et al. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. **Fundamentals of aquatic toxicology**. Taylor & Francis, New York, p.523-561, 2003.
- ESTEVES, F. A. **Fundamentos de Limnologia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Interciência/FINEP, p. 602, 1998.
- GUILHERME, L. R. G. et al. Elementos-traço em solos, sedimentos e água. In: V Simpósio Nacional sobre Recuperação de áreas degradadas. Ouro Preto, 2002
- HAMILTON, M. A. et al. Trimed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v. 11, p. 714-719, 1977.
- HYNE, R.V. et al. Influence of water chemistry on the acute toxicity of copper and zinc to the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.24, n.7, p. 1667-1675, 2005.
- JACKSON, J. Metais pesados e outras substâncias tóxicas inorgânicas. In: MATSUI, S. Diretrizes para o gerenciamento de Lagos – Gerenciamento de substâncias tóxicas em lagos e reservatórios, v.4, ILEC, IIE. São Carlos, p. 71-88, 2002.
- MALDONADO, A.C.D e WENDLING, B. Manejo de ecossistemas aquáticos contaminados por metais pesados. **Agropecuária Técnica**, v. 30, n.1, p.21-32, 2009.
- MARCANTONIO, A.S. **Toxicidade do sulfato de cobre e do sulfato de zinco para rã-touro, *Rana catesbiana* Shaw, 1802: toxicidade aguda e crônica e parâmetros hematológicos**. Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus Jaboticabal, 2005.
- MAZON, A.F. et al. Contaminação dos ecossistemas aquáticos pelo cobre e risco potencial a biodiversidade: estudo da toxicidade do cobre em curimatá, *P. scrofa* (Teleostei, Prochilodontidae). **Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI**. 1.ed. São Carlos, RIMA, p.327- 340. 2000.

- RAINBOW, D. Physiology, physicochemistry and metal uptake-a crustacean perspective. **Mar Pollut Bull**, v.31, p.55-59, 1995.
- SCHAMPHELAERE et al. Reproductive toxicity of dietary zinc to *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v.70, p.233-244, 2004.
- VALLEE, B.L e AULD, D.S. Zinc Coordination, Function, and Structure of Zinc Enzymes and Other Proteinst. **American Chemical Society**, v.29, n.24, p.5648-5659, 1990.
- WANG et al. Evaluation of Long-Term Toxicity of Oral Zinc Oxide Nanoparticles and Zinc Sulfate in Mice. **Biol Trace Elem Res**, v.2, p.276-282. 2017.
- WARREN, L. A. e HAACK, E. A. Biogeochemical controls on metal behavior in freshwater environments. **Earth-Science reviews**, v. 54, p.261-320, 2001.
- WINNER, R.W. A comparison of body length, brood size and longevity as indices of chronic cooper and zinc stress in a *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, v.26, p.33-37, 1981.

Considerações Finais

- As NP-ZnO tendem a formar aglomerados quando em meio de exposição, mas, ainda mantêm tamanho nanoparticulado.
- Constatou-se efeito de toxicidade aguda de NP-ZnO para *C. silvestrii*, a partir da faixa de CE_{50-48h} de 0.35 mg L^{-1}
- Nos testes de toxicidade crônica com NP-ZnO, observou-se que, em todas as concentrações, houve diferença significativa em relação aos parâmetros de crescimento e reprodução de *C. silvestrii*.
- A concentração de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ de NP-ZnO provocou inibição estatisticamente significativa no parâmetro de crescimento médio corporal dos organismos, com redução de 11,3% em relação ao grupo controle e CEO estimada em 0.006 mg L^{-1} .
- Baixas concentrações de NP-ZnO (0.025 e 0.0125 mg L^{-1}) causaram efeitos tóxicos sobre o número médio acumulado de ovos e de neonatas, sendo notável o decréscimo a partir do quinto dia e do sétimo dia do experimento, para ovos e neonatas, respectivamente. Na concentração de

0,1 mg L⁻¹, houve redução de 53,9% para o número de ovos e de 72,5% para o número de neonatas em relação ao grupo controle.

- Ao longo dos testes de toxicidade crônica, observou-se também a acumulação de NP-ZnO no trato digestivo de *C. silvestrii*, bem como a não eclosão de ovos.
- Houve toxicidade de NP-ZnO nos cladóceros a partir de concentrações muito baixas, ocasionando impactos relacionados à sua reprodução, dentre outros, o que indica que o manejo e o descarte desses materiais deve ser realizado com cautela, uma vez que esses organismos pertencem à base das cadeias alimentares aquáticas e, conseqüentemente, afetam toda a cadeia alimentar.
- Observou-se inibição dos parâmetros de crescimento e reprodução em *Ceriodaphnia silvestrii* expostas ao ZnSO₄, em baixas concentrações.
- Houve redução de 55% na produção de ovos e de 50% na produção de neonatas nos organismos expostos ao ZnSO₄.
- Os efeitos tóxicos puderam ser observados em ambos os compostos (NP-ZnO e ZnSO₄), com percentual parecido de inibição. No entanto, as NP-ZnO ainda possuem efeito de toxicidade superior ao ZnSO₄.

- Devido aos resultados singulares de ZnSO_4 sobre os parâmetros de crescimento corporal e produção de neonatas (superação de maior concentração sobre as demais), a repetição dos testes realizados no presente trabalho é recomendada.

A exposição crônica promoveu toxicidade de ambas as substâncias para *C. silvestrii*, sendo essa toxicidade proveniente tanto dos íons metálicos livres quanto das propriedades das NPs.

Os resultados do presente trabalho podem subsidiar estudos e regulamentações que visem o manejo e o descarte de NP-ZnO e de ZnSO_4 em ecossistemas de água doce.

Apêndices

Apêndice 1. Valores comparativos de tamanho médio corporal e suas respectivas concentrações de NP-ZnO.

Autores	Valor concentração (mg/L)	Comprimento corporal
Adam et al (2014)	0,008	460 μm
	0,024	430 μm
Presente estudo (2017)	0,006	683 μm
	0,0125	670 μm

Apêndice 2. Valores de CENO (concentração de efeito não observado) e CEO (concentração de efeito observado) para parâmetros avaliados no teste de ecotoxicidade crônica de *C. silvestrii* exposta a 5 concentrações de NP-ZnO (0,006; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 mg L⁻¹), por oito dias.

(D= teste de Dunn ; Du= teste de Dunnett; T= teste de Tukey; KW= teste de Kruskal Wallis)

Fatores avaliados	Teste aplicado	P	CENO	CEO
			mg/L	
Tamanho corporal	D	<0,05	>0,1	0,0125
Nº ovos acum./fêmea	Du/T/KW	<0,05/<0,05/<0,001	0,0125	0,025
Nº neonatos acum./fêmea	D/T/KW	<0,05/<0,05/<0,001	0,006	0,0125
Eclosão de ovos (%)	D/T/Du	<0,05	0,05	0,1
Idade primípara (dias)	KW	0,3333	>0,1	>0,1

Apêndice 3. Valores de CENO (concentração de efeito não observado) e CEO (concentração de efeito observado) para parâmetros avaliados no teste de ecotoxicidade crônica de *C. silvestrii* exposta a 5 concentrações de NP-ZnO (0,006; 0,0125; 0,025; 0,05; 0,1 mg L⁻¹), por oito dias. (D= teste de Dunn ; Du= teste de Dunnett; T= teste de Tukey; KW= teste de Kruskal Wallis)

Fatores avaliados	Teste aplicado	P	CENO	CEO
			mg/L	
Tamanho corporal	D	<0,05	0,09	0,02
Comprimento primípara	KW	0,15	-	-
Nº ovos acum./fêmea	Du/T/	<0,05/<0,05	>0,09	0,006
Nº neonatos acum./fêmea	Du/T	<0,05/<0,05	>0,09	0,006
Eclosão de ovos (%)	D/T/Du	<0,05	0,05	0,1
Idade primípara (dias)	KW	0,4	>0,09	>0,09