

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

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE
TITÂNIO SOBRE A ALGA *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA* E SOBRE O
CLADÓCERO *CERIODAPHNIA SILVESTRII* POR DIFERENTES VIAS DE
EXPOSIÇÃO

Gisele Maria de Lucca

São Carlos - 2016

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

EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO SOBRE A ALGA *PSEUDOKIRCHNERIELLA SUBCAPITATA* E SOBRE O CLADÓCERO *CERIODAPHNIA SILVESTRII* POR DIFERENTES VIAS DE EXPOSIÇÃO

Gisele Maria de Lucca

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPGERN) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Área de Concentração: Ecologia e Recursos Naturais

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão

Co-Orientadora: Dra. Emanuela Cristina Freitas

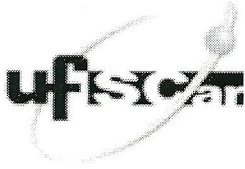
São Carlos – 2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

L934ee Lucca, Gisele Maria de
Efeitos ecotoxicológicos das nanopartículas de dióxido de titânio sobre a alga *Pseudokirchneriella Subcapitata* e sobre o Cladóceros *Ceriodaphnia Silvestrii* por diferentes vias de exposição / Gisele Maria de Lucca. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
148 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Ecotoxicologia. 2. Método de desagregação. 3. Nano-tio2. 4. Microalga. 5. Cladóceros. I. Título.



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 Gisele Maria de Lucca, realizada em 10/06/2016:

Maria da Graça G. Melão

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão
UFSCar

Odete Rocha

Profa. Dra. Odete Rocha
UFSCar

Fernanda

Profa. Dra. Fernanda Cristina Massaro
Biotox Ambiental

Dedico este trabalho aos meus pais Lourdes e José, aos meus irmãos e ao meu noivo pela ajuda, amor, incentivo e confiança, tornando-o possível.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida e por tudo que nela vivencio.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão, pela confiança e oportunidade concedida de iniciação a pesquisa, ensinamentos e amizade. Muito obrigada!!!

À minha co-orientadora Dra. Emanuela Cristina de Freitas por toda dedicação à área, exemplo profissional, ensinamentos, confiança, conselhos e por sempre me acolher, vencendo comigo cada etapa dessa minha formação.

Um agradecimento especial a Profa. Dra. Odete Rocha pela transmissão de conhecimentos, paciência, incentivo, compreensão e apoio principalmente nos momentos de dificuldade.

À Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi e ao Prof. Dr. Hugo Sarmento por todo auxílio e acompanhamento durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais Lourdes de Lucca e José de Lucca, por sempre me protegerem com carinho e amor. Pelo exemplo de luta e por terem orgulho ao me verem adquirindo conhecimento. Eu os amo muito e lhes devo tudo o que sou.

Ao meu irmão Prof. Dr. José Valdecir de Lucca, pelo incentivo e auxílio constante durante toda a elaboração desse trabalho.

Aos meus irmãos Valdir Antônio de Lucca e Joana D'Arc Ap. de Lucca também responsáveis pela minha educação ao longo de toda minha vida.

Ao meu noivo Bruno Pacanhela Escher, meu eterno amor, por todo incentivo, companheirismo, cumplicidade e ajuda na construção desse trabalho me apoiando e me ajudando a ser uma pessoa melhor.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais pela minha formação acadêmica em nível de mestrado, à coordenação do curso e à secretaria do programa por todo apoio e incentivo concedido.

Aos componentes que participaram da minha banca de qualificação: Dra. Denise Tieme Okumura e Dra. Fernanda Massaro e da defesa, pela contribuição neste trabalho.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Hidrobiologia (DHb) pelas conversas diárias e amizade que tornaram meu dia a dia mais alegre e interessante.

Aos funcionários e amigos do Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE), pela simpatia com que me receberam tornando possível a realização de parte deste trabalho.

Aos amigos de laboratório e de convivência Lucia, Raquel, Mariana, Naiara, Lays, Denise, Adrislaine, Edna e Marcos pelos momentos de partilha de experiências e palavras de incentivo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida.

Ao CNPq (305698/2013-30) e à FAPESP (processos nº 2014/14139-3 e 2016/00753-7) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

A todas as pessoas que de maneira mais ou menos próxima colaboraram para a finalização deste trabalho, tornando meu sonho possível.

*“Muitas vezes as pessoas
são egocêntricas, ilógicas e insensatas.
Perdoe-as assim mesmo.*

...

*Se você é gentil,
as pessoas podem acusá-lo de interesseiro.
Seja gentil assim mesmo.*

...

*Se você é um vencedor,
terá alguns falsos amigos e alguns inimigos verdadeiros.
Vença assim mesmo.*

...

*Se você é honesto e franco,
as pessoas podem enganá-lo.
Seja honesto e franco assim mesmo.*

...

*O que você levou anos para construir,
alguém pode destruir de uma hora para outra.
Construa assim mesmo.*

...

*Se você tem paz e é feliz,
as pessoas podem sentir inveja.
Seja feliz assim mesmo.*

...

*O bem que você faz hoje,
pode ser esquecido amanhã.
Faça o bem assim mesmo.*

...

*Dê ao mundo o melhor de você,
mas isso pode não ser o bastante.
Dê o melhor de você assim mesmo.*

...

*Veja você que, no final das contas,
é tudo entre você e Deus.
Nunca foi entre você e os outros”.*

*Creditado a Madre Teresa de Calcutá
(Original do Dr. Kent M. Keith)*

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xv
RESUMO.....	xvii
ABSTRACT	xviii
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	19
1.1. Aspectos Gerais	19
1.2. Propriedades estruturais, agregação e sedimentação das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO ₂).....	23
1.3. As nanopartículas de dióxido de titânio nos ecossistemas aquáticos	26
2. Objetivos.....	30
2.1. Objetivos específicos	30
3. Material e métodos	31
3.1. Cultivo e manutenção da clorófitica <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	31
3.2. Espécie zooplantônica estudada e condições de manutenção e cultivo	31
3.3. Nanopartículas de dióxido de titânio	34
3.4. Preparo da solução-estoque para os ensaios com a clorófitica <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	34
3.5. Teste de toxicidade preliminar com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	35
3.6. Determinação da densidade celular	35
3.6.1. Absorbância.....	35
3.6.2. Fluorescência.....	36
3.6.3. Clorofila- <i>a</i>	36
3.6.4. Contagem numérica das células	37
3.7. Métodos para a desagregação das células algais e das nano-TiO ₂	37
3.7.1. Agitação em vórtex	38
3.7.2. Banho ultrassônico.....	38
3.7.3. Utilização de um quelante de metal	39
3.7.4. Combinação do quelante EDTA e da agitação em vórtex.....	39
3.8. Teste de toxicidade definitivo com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	40
3.8.1. Determinação da densidade celular	41
3.8.2. Viabilidade celular.....	41
3.9. Ensaio de sensibilidade com o cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	42

3.10. Teste de toxicidade aguda com o cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	43
3.11. Testes de toxicidade crônica com o cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> utilizando como via de exposição o alimento contaminado	44
3.11.1. Contaminação da clorofíceas com as nano-TiO ₂	44
3.11.2. Testes crônicos com o cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	46
3.12. Quantificação do titânio particulado e dissolvido.....	47
3.13. Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO ₂).....	48
3.13.1. Para o ensaio de toxicidade definitivo com a alga	48
3.13.2. Para o ensaio de contaminação das algas.....	48
3.13.3. Para o ensaio de toxicidade aguda com o cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	49
3.14. Tratamentos dos dados e análises estatísticas	49
4. Resultados e discussão.....	50
4.1. Caracterização das nanopartículas de TiO ₂ nos ensaios de toxicidade	50
4.1.1. Ensaio de toxicidade crônico definitivo com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . 50	
4.1.1.1. Determinação do espectro de absorvância das nanopartículas de TiO ₂ em meio LC Oligo	50
4.1.1.2. Diâmetro hidrodinâmico	51
4.1.1.3. Índice de polidispersividade (IPd) e potencial Zeta	52
4.1.2. Ensaio de contaminação da alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	53
4.1.2.1. Diâmetro hidrodinâmico	53
4.1.2.2. Índice de polidispersividade (IPd) e potencial Zeta	54
4.1.3. Ensaio de toxicidade aguda definitivo com o cladóceros <i>silvestrii</i>	55
4.1.3.1. Diâmetro hidrodinâmico.....	55
4.1.3.2. Índice de polidispersividade (IPd) e potencial Zeta	56
4.2. Análise do desempenho dos métodos empregados para a determinação da densidade celular no ensaio de toxicidade preliminar com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	57
4.2.1. Método da Absorvância.....	57
4.2.2. Método da Fluorescência.....	58
4.2.3. Clorofila- <i>a</i>	60
4.2.4. Determinação da densidade celular por contagem direta em microscópio óptico	61
4.3. Métodos empregados para a separação das células	62
4.4. Teste de toxicidade definitivo com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	63
4.5. Ensaio de viabilidade celular no teste de toxicidade definitivo com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	66

4.6. Quantificação das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO ₂) nos meios de ensaio	66
4.6.1. Para o ensaio de toxicidade definitivo com a alga	66
4.6.2. Para o ensaio de contaminação das algas	67
4.7. Teste de sensibilidade com o cladócero <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	68
4.8. Teste de toxicidade aguda com as nano-TiO ₂ utilizando o cladócero <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> como organismo-teste	70
4.9. Teste de toxicidade crônica das nano-TiO ₂ com o cladócero <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	74
4.9.1. Comprimento corporal	75
4.9.2. Sobrevivência	77
4.9.3. Número total de ovos produzidos pelas fêmeas	78
4.9.4. Número de neonatas produzidas por fêmea	80
5. Conclusões	83
6. Recomendações	84
Referências Bibliográficas	85
APÊNDICE A	101
APÊNDICE B	104
APÊNDICE C	109
APÊNDICE D	111
APÊNDICE E	115
APÊNDICE F	119
APÊNDICE G	122
APÊNDICE H	127

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Comparação de estruturas nas escalas nanométrica e micrométrica. Adaptado de <https://munlait.wordpress.com/category/biotecnologia/page/3/> 19
- Figura 2.** Formas minerais que contém titânio em sua composição (Fonte: <http://www.aldoroggiani.it/museo.htm> e google imagens). 21
- Figura 3.** Principais fontes, rotas de exposição e interação de diferentes nanopartículas com o ambiente e organismos vivos. Retirado de Paschoalino et al. (2010). 22
- Figura 4.** Estruturas cristalinas das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂). Adaptado de Matos (2010), adaptado de Diebold (2003). 25
- Figura 5.** Ilustração das diferenças entre partículas livres, aglomeradas, agregadas e agregadas/aglomeradas. Retirado de Pereira (2010), adaptado de Oberdörster et al. (2007). 26
- Figura 6.** Vista geral do organismo-teste *Ceriodaphnia silvestrii*. Aumento de 40 vezes. (Foto: Gisele M. de Lucca). 32
- Figura 7.** Desenho experimental do teste de toxicidade aguda com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* expostas a nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂). Adaptado de Dalai et al. (2014). 44
- Figura 8.** Desenho experimental do teste de toxicidade crônica com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* pela contaminação do alimento, a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (círculos verdes), com nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂). Adaptado de Dalai et al. (2014). 47
- Figura 9.** Caracterização do espectro de absorvância das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) dispersas no meio LC Oligo em diferentes comprimentos de onda no espectro do UV-vis ao longo do tempo (de 0 a 96 horas). 51

Figura 10. Diâmetro hidrodinâmico (nm) das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO ₂) para a menor e para a maior concentração testadas e para a solução-estoque ao longo do tempo (0 a 96 horas) no teste definitivo de crescimento populacional de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	52
Figura 11. Diâmetro hidrodinâmico (nm) das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO ₂) para todas as concentrações testadas ao longo do tempo (0 a 96 horas) no teste de contaminação da alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	54
Figura 12. Diâmetro hidrodinâmico (nm) das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO ₂) para a menor e para a maior concentração testada no tempo de 0 a 48 horas no teste definitivo de toxicidade aguda com o cladóceros <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	56
Figura 13. Valores de absorvância nos comprimentos de onda de 440, 687 e 670 nm obtidos no controle e em diferentes concentrações das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO ₂) testadas para um período de exposição de 96 horas, no ensaio de toxicidade preliminar com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	58
Figura 14. Valores de fluorescência obtidos para as diferentes concentrações de nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO ₂) testadas e no controle para o ensaio de toxicidade preliminar com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> com um período de exposição de 96 horas.....	59
Figura 15. Valores da concentração de clorofila- <i>a</i> (µg mL ⁻¹) obtidos nas diferentes concentrações de nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO ₂) testadas e no controle para o ensaio de toxicidade preliminar com a alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , por um período de exposição de 96 horas.....	61
Figura 16. Valores da densidade algal (células por mL ⁻¹) obtidos nas diferentes concentrações de nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO ₂) testadas e no controle para o ensaio de toxicidade preliminar da alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> com um período de exposição de 96 horas.....	62
Figura 17. Porcentagem do crescimento (média para três réplicas ± desvio-padrão) da alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> exposta a diferentes concentrações de nano-TiO ₂	

em 24 horas (A), 48 h (B), 72 h (C) e 96 h (D). O símbolo * refere-se a uma diferença significativa em relação ao controle (teste de Tukey, $p \leq 0,05$)..... 63

Figura 18. Faixa de sensibilidade do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* ao cloreto de sódio (NaCl).....69

Figura 19. Média das porcentagens (\pm desvio-padrão) de organismos imóveis do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* durante os quatro testes de toxicidade aguda definitivos com as nanopartículas de dióxido de titânio após 48 horas de exposição..... 72

Figura 20. Comprimento corporal médio de *Ceriodaphnia silvestrii* antes da exposição e depois da exposição às nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) para as três concentrações testadas. Os asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao controle (teste de Tukey, $p < 0,05$). 76

Figura 21. Média da porcentagem de sobrevivência do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* quando exposto as nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) no teste de toxicidade crônica. Os asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao controle (teste de Tukey, $p < 0,05$). 78

Figura 22. Número médio de ovos produzidos por fêmea de *Ceriodaphnia silvestrii* quando submetidas ao teste de toxicidade crônica com as nanopartículas de dióxido de titânio. Os asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao controle (teste de Tukey, $p < 0,05$). 79

Figura 23. Número médio de neonatas produzidas por fêmea de *Ceriodaphnia silvestrii* quando submetidas ao teste de toxicidade crônica com as nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂). Os asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao controle (teste de Tukey). 82

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Vias de exposição utilizadas em testes de toxicidade com cladóceros expostos às nanopartículas de dióxido de titânio em pesquisas realizadas durante os últimos cinco anos..... 23
- Tabela 2.** Valores de pH no controle e nos diferentes tratamentos (mg L^{-1}) medidos a cada 24 horas nos meios de cultura da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* no teste de toxicidade definitivo..... 65
- Tabela 3.** Valores das concentrações nominais e reais (total, particulado e dissolvido e porcentagem de variação entre as concentrações nominais e reais) para todas as concentrações testadas de nanopartículas de dióxido de titânio (mg L^{-1}) no início (0 hora) e no final (96 horas) do teste de toxicidade definitivo com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. 67
- Tabela 4 .** Valores médios das concentrações de titânio particulado após o processo de uma e três lavagens no teste de contaminação da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. 68
- Tabela 5.** Valores de CE_{50} - 48 h e respectivos intervalos de confiança, desvio-padrão, coeficiente de variação e faixa de sensibilidade do organismo-teste *Ceriodaphnia silvestrii* para a substância de referência cloreto de sódio (NaCl). Concentração de Efeito (CE_{50}), Tendência Central (TC), Limite Superior (LS) e Limite Inferior (LI) 69
- Tabela 6.** Valores de CE_{50} - 48 h das nanopartículas de dióxido de titânio, e seus respectivos intervalos de confiança, para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* em testes de toxicidade aguda..... 71
- Tabela 7.** Valores de CE/CL_{50} para as nanopartículas de dióxido de titânio (nano- TiO_2) para diversas espécies de cladóceros e outros organismos compilados da literatura, e comparados com o valor obtido no presente estudo para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*. 73

Tabela 8. Número de trabalhos publicados envolvendo nanopartículas de dióxido de titânio e sua toxicidade crônica.	80
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas

ABS - Absorbância

AFNOR – Association Française Normalization

APHA - American Public Health Association

CENO – Concentração de Efeito Não Observado

CEO - Concentração de Efeito Observado

CE₅₀ – Concentração de Efeito a 50% da população

CI₅₀ Concentração de Inibição a 50% da população

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo

DEBE – Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva

DMSO – Solvente Dimetilsulfóxido

EDTA – Ácido Etilenodiaminotetraacético de Sódio

IPd – Índice de Polidispersividade

Nano-TiO₂ – Nanopartículas de dióxido de titânio

PS – Poliestireno

PP – Polipropileno

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive Oxygen Species - ROS)

TiO₂ – Dióxido de titânio

Efeitos ecotoxicológicos das nanopartículas de dióxido de titânio sobre a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e sobre o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* por diferentes vias de exposição.

RESUMO

Nos últimos anos, o aumento do uso das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) em produtos de consumo e em dispositivos tecnológicos tem gerado preocupações relativas aos seus impactos ambientais e seus riscos à saúde humana. Estudos ecotoxicológicos têm sido utilizados como uma ferramenta para analisar o potencial tóxico das nano-TiO₂ em diversos níveis tróficos, tais como produtores primários (algas) e consumidores de primeira ordem (cladóceros). No presente estudo, os efeitos crônicos das nano-TiO₂ sobre o crescimento populacional da microalga clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata* foi avaliado durante um período de exposição de 96 horas, sob condições de temperatura e de fotoperíodo semelhantes às encontradas em ecossistemas de regiões tropicais. Foram desenvolvidas novas metodologias para separação dos agregados entre as células algais e as nano-TiO₂, cuja formação foi observada nas concentrações acima de 0,01 mg L⁻¹ após um período de exposição de 96 horas. O único método eficiente foi aquele em que as células foram lavadas três vezes com um quelante de metal (EDTA), com duração de 1 minuto para cada lavagem. No teste de toxicidade crônico obteve-se inibição significativa do crescimento algal a partir da concentração de 64 mg L⁻¹ de nano-TiO₂, com uma concentração de inibição a 50% das células algais (CI₅₀ - 96h) de 201,22 mg L⁻¹ em 96 h de exposição. Em seguida, foram avaliados os efeitos agudos via exposição por contato e os efeitos crônicos das nano-TiO₂ para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, utilizando o alimento (*Pseudokirchneriella subcapitata*) contaminado como via de exposição. Nos testes de toxicidade aguda foi obtido o valor médio de CE₅₀ - 48 h de 77,57 mg L⁻¹. Nos ensaios de toxicidade crônica, diferenças significativas foram observadas na sobrevivência a partir da concentração de 0,01 mg L⁻¹, enquanto que para o comprimento corporal, o número de ovos e o número de neonatas produzidos, os efeitos tóxicos foram observados a partir da concentração de 1 mg L⁻¹. Tais resultados indicam que as nano-TiO₂ possuíram um efeito deletério sobre o crescimento de *Pseudokirchneriella subcapitata* somente em concentrações acima daquelas normalmente encontradas em ambientes aquáticos naturais. Para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, a via de exposição alimentar indicou um maior efeito tóxico.

Palavras-chave: ecotoxicologia; método de desagregação; alimento; microalga, cladóceros; nano-TiO₂.

Ecotoxicological effects of the titanium dioxide nanoparticles on the algae *Pseudokirchneriella subcapitata* and on the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* by different exposure routes.

ABSTRACT

In recent years, increased use of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NPs) in consumer products and technological devices has raised concerns regarding their environmental impacts and their risks to human health. Ecotoxicological studies have been used as a tool to analyze the toxic potential of TiO₂ NPs in different trophic levels, such as primary producers (algae) and first order consumers (cladocerans). In the present study, the chronic effects of TiO₂ NPs on the population growth of the microalgae chlorophycean *Pseudokirchneriella subcapitata* was evaluated during an exposure period of 96 hours, under conditions of temperature and photoperiod similar to those found in tropical ecosystems. New methods were developed for the separation of the aggregates between the algae cells and TiO₂ NPs, whose formation was observed at above 0.01 mg L⁻¹ concentrations after a period of 96 hours' exposure. The only effective method was the one in which the cells were washed three times with a metal chelator (EDTA), with duration of 1 minute for each wash. In the toxicity chronic test, there was obtained a significant inhibition of algal growth from the concentration of 64 mg L⁻¹ of TiO₂ NPs, with a concentration of 50% inhibition of algal cells (96 h - IC₅₀) of 201.22 mg L⁻¹ in 96 h of exposure. Then, it was evaluated the acute effects of exposure by contact and the chronic effects of TiO₂ NPs for the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*, using contaminated food (*Pseudokirchneriella subcapitata*) as a route of exposure. In acute toxicity tests was obtained the average value of EC₅₀ - 48 h of 77.57 mg L⁻¹. In chronic toxicity tests, it was observed significant differences in survival from the concentration of 0.01 mg L⁻¹, while for the body length, the number of eggs and neonates produced, toxic effects were observed from the concentration of 1 mg L⁻¹. These results indicate that the nano-TiO₂ NPs had a deleterious effect on the growth of *Pseudokirchneriella subcapitata* only at concentrations above those normally found in natural aquatic environments. For the cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*, the route of dietary exposure indicated a greater toxic effect.

Keywords: ecotoxicology; method of disaggregation; dietary; microalgae; cladoceran; TiO₂ NPs.

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1. Aspectos Gerais

Os nanomateriais fazem parte de uma evolução tecnológica criada pelo homem, que resultou no desenvolvimento de materiais com pelo menos uma de suas dimensões em escala nanométrica, i.e., medindo de 1 a 100 nm, seja na condição de partículas desagregadas, seja como partículas agregadas ou aglomeradas (European Commission, 2012; Navarro et al., 2008). Seguindo esta definição, quando todas as suas três dimensões possuem medidas inferiores a 100 nm, estamos diante de uma nanopartícula (Crane et al., 2008). O prefixo “nano” (do grego “anão”) é parte da palavra nanômetro (nm), a qual corresponde à grandeza de um bilionésimo do metro (10^{-9} m) (Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial - ABDI, 2010; Galembeck e Rippel, 2004). A Figura 1 ilustra uma simples comparação da escala nanométrica com outras estruturas pertencentes a escala micrométrica. Nessa comparação, por exemplo, as células vermelhas do sangue, as bactérias e até mesmo os vírus são considerados bem maiores comparados à escala nanométrica (ABDI, 2010).

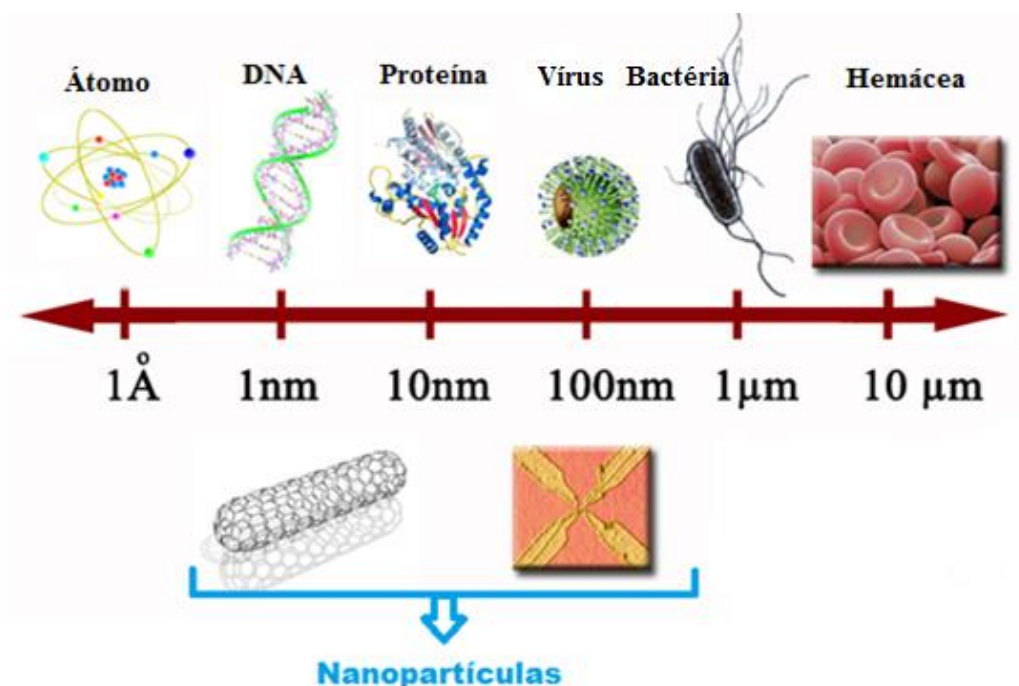


Figura 1. Comparação de estruturas nas escalas nanométrica e micrométrica. Adaptado de <https://munlait.wordpress.com/category/biotecnologia/page/3/>

Historicamente, o interesse pelo estudo e pela utilização de materiais e dispositivos em nanoescala surgiu de uma palestra realizada pelo físico americano Richard Feynman no ano de 1959, intitulada “Há mais espaços lá embaixo”, a qual definiu o que era nanotecnologia, mesmo sem utilizar essa terminologia, como uma atividade científica dada pela manipulação de moléculas individuais que resultariam em materiais e aplicações de dimensões nanométricas, para todas as áreas do conhecimento (Fishbine, 2002; Melo e Pimenta, 2004; Pereira, 2010). A definição do termo nanotecnologia só veio a ganhar destaque algumas décadas depois, mais precisamente no ano de 1976, com um artigo escrito pelo pesquisador Norio Taniguchi da Universidade de Ciências de Tóquio (Foresight Institute, 2015; Pereira, 2010).

A década de 80 foi muito promissora para o desenvolvimento da nanotecnologia, devido ao grande desenvolvimento observado na área da microscopia, tanto que no ano de 1986, um grande incentivador da área chamado Eric Drexler publicou seu primeiro livro intitulado “Engines of Creation: The Coming Era of Nanotechnology”, aprofundando o assunto (Foresight Institute, 2015).

A capacidade de manipular átomos ou moléculas com uma dimensão de 10^{-9} m e, assim, obter uma nova organização estrutural (nanomaterial) proporcionou uma revolução tanto nas Ciências como na Engenharia (Cadioli e Salla, 2006), assim como em outras áreas do conhecimento, tais como energia, segurança, agricultura, medicina, farmacologia e meio ambiente (Fangueiro et al., 2015; Gao et al., 2016; Joner et al., 2008; Masciangioli e Zhang, 2003; Piccino et al., 2012), com destaque para as áreas de nanoeletrônica, nanobiotecnologia e nanomateriais (Cadioli e Salla, 2006).

Os nanomateriais mais produzidos no mundo nos últimos anos são, respectivamente, as nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂), as nanopartículas de dióxido de silício (nano-SiO₂) e as nanopartículas de óxido de zinco (nano-ZnO) (Piccino et al., 2012; Keller et al., 2013). Destaque deve ser dado para o concentrado de titânio que, em 2013, teve sua produção global aumentada em 4,5% comparada com a do ano de 2012, atingindo 7,6 toneladas métricas (Queiroz-Filho e Amorim-Neto, 2014).

Aproximadamente 88% da produção mundial de titânio provém do mineral ilmenita e os restantes 12% vêm do rutilo, mineral mais concentrado, porém mais escasso na natureza (Queiroz-Filho e Amorim-Neto, 2014). Além desses, deve-se destacar os minerais anatase e perovskita que têm atraído grande interesse das indústrias devido aos seus valores econômicos (Pereira, 2010; Santos, 2010). Na natureza, esses minerais têm origem nas rochas ígneas e as formas ilmenita e perovskita contêm óxido de titânio ligado a outros elementos químicos, i.e., a ilmenita (FeTiO₃) contém ferro na sua composição, enquanto que

a perovskita (CaTiO_3) contém cálcio. As formas anatase, rutilo e brookita são formas puras do dióxido de titânio (TiO_2) (Maia, 2001; Pereira, 2010; Santos, 2010), (Figura 2).



Figura 2. Formas minerais que contêm titânio em sua composição (Fonte: <http://www.aldoroggiani.it/museo.htm> e google imagens).

Os principais produtores mundiais do concentrado de titânio (soma da produção de ilmenita e rutilo) são: Austrália (18,3%), África do Sul (16,1%), China (12,5%) e Canadá (10,1%). O Brasil, em 2013, contribuiu com 1,1% da produção mundial, sendo considerado o maior produtor da América Latina, com destaque para os municípios de Mataraca (PB), São Francisco de Itabapoana (RJ) e Santa Bárbara de Goiás (GO) (Queiroz-Filho e Amorim-Neto, 2014). A projeção de consumo nacional de dióxido de titânio até o ano de 2030 é estimada atingir entre 150.000 a 374.000 toneladas, a depender do desempenho da economia nos próximos 15 anos (Santos, 2010).

Como o interesse da indústria por produtos manufaturados feitos a partir de nanomateriais tem aumentado nos últimos anos, há uma estimativa de que mais de 1600 produtos contendo materiais em nanoescala já existem no mercado (*Project on Emerging Nanotechnologies*, 2015), com destaque para as nano- TiO_2 utilizadas na fabricação dos mais variados produtos, tais como na produção de cosméticos, incluindo os protetores solares; revestimentos, produtos de limpeza e plástico; tintas; cimento, entre outros produtos. Apesar das indústrias resistirem ao fornecimento de dados quanto à quantidade de nanomateriais utilizados em seus produtos, essas informações são fundamentais para uma correta avaliação dos riscos ambientais, uma vez que constituem a base para todas as vias de exposição (Duester et al., 2014; Piccino et al., 2012) e destino final desses materiais, que usualmente são os corpos de água. A Figura 3 ilustra algumas fontes e rotas de exposição das nanopartículas provenientes de fontes naturais e manufaturadas e sua interação com o ambiente e organismos vivos.

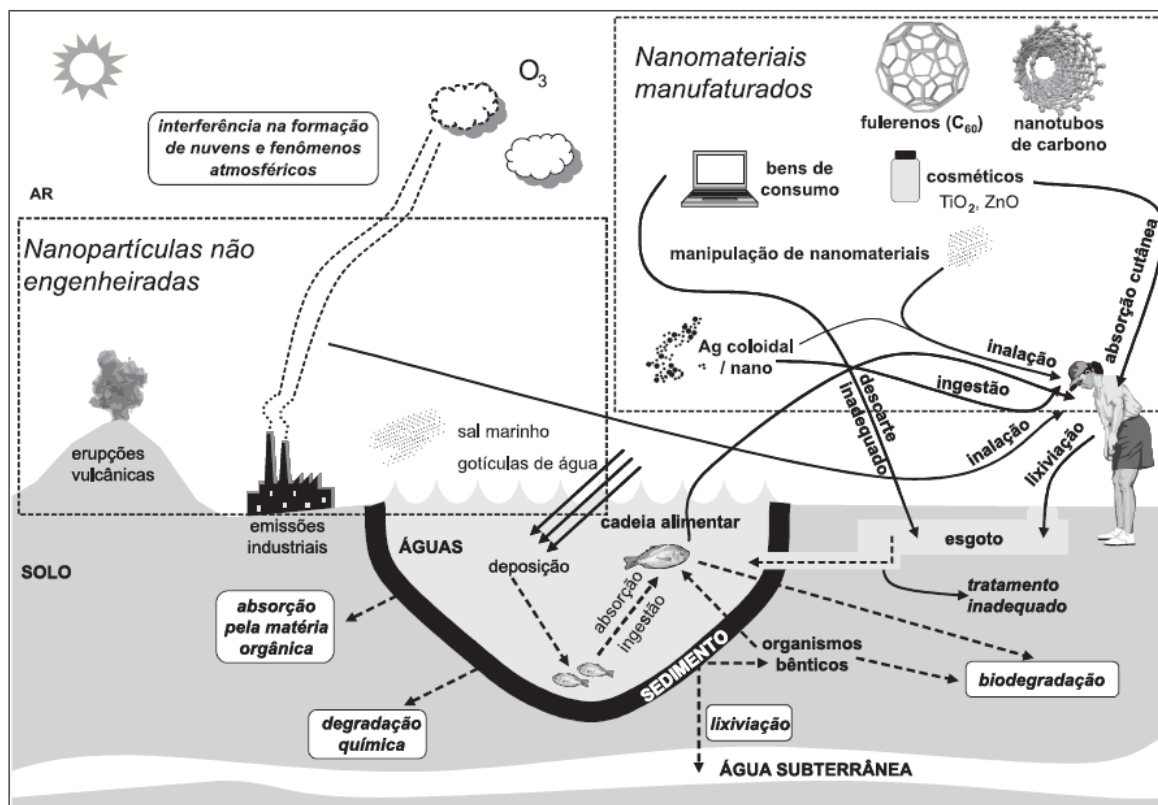


Figura 3. Principais fontes, rotas de exposição e interação de diferentes nanopartículas com o ambiente e organismos vivos. Retirado de Paschoalino et al. (2010).

Nesse sentido, o crescimento rápido e promissor da utilização das nano-TiO₂ pode estar associado a riscos tanto para a saúde humana como para o meio ambiente, devido a algumas características específicas desses novos materiais, tais como seu tamanho reduzido, sua elevada área superficial e presença de cargas na superfície das suas partículas (Clément et al., 2013; Dalai et al., 2013; Marcone et al., 2012; Petosa et al., 2010).

Na literatura, é possível encontrar muitos trabalhos que destacam as características dos nanomateriais que alteram sua absorção e sua distribuição nos organismos aquáticos e seus efeitos tóxicos e influenciam nas interações com os constituintes celulares (Aschberger et al., 2011; Brayner et al., 2010; Nowack e Bucheli, 2007; Krug e Wick, 2011; Smith et al., 2007). Para Paschoalino et al. (2010), os ecossistemas aquáticos são os principais receptores dos nanomateriais e, por isso, pesquisas com organismos aquáticos podem refletir os impactos que esses novos materiais podem exercer nesses ambientes.

Alguns pesquisadores vêm investigando os efeitos tóxicos das nano-TiO₂ para os diferentes organismos pertencentes aos ambientes de água doce. No entanto, a maior parte desses estudos avaliam apenas uma via de exposição, por exemplo, a exposição cutânea dada pela presença de nano-TiO₂ na água, sendo raros os estudos feitos com a via de exposição

pelo alimento contaminado, especialmente para as espécies representativas dos ecossistemas aquáticos tropicais (Tabela 1).

Tabela 1. Vias de exposição utilizadas em testes de toxicidade com cladóceros expostos às nanopartículas de dióxido de titânio em pesquisas realizadas durante os últimos cinco anos.

Organismos-teste	Vias de exposição	Autores	Ano
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	alimento	Este estudo	2016
<i>Daphnia magna</i>	água	Cupi et al.	2016
<i>Daphnia magna</i>	água	Salieri et al.	2015
<i>Daphnia magna</i>	água	Jacobasch et al.	2014
<i>Daphnia magna</i>	água	Tan e Wang	2014
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	alimento	Dalai et al.	2014
<i>Daphnia magna</i>	água	Pinheiro et al.	2013
<i>Daphnia magna</i>	água	Clément et al.	2013
<i>Daphnia magna</i>	água	Campos et al.	2013
<i>Daphnia magna</i>	alimento	Fouqueray et al.	2012
<i>Daphnia similis</i>	água	Marcone et al.	2012
<i>Daphnia magna</i>	água	Dabrunz et al.	2011
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	água	Li et al.	2011

Portanto, estudos que investiguem outras vias de exposição, além da água, como por exemplo a do alimento contaminado, são necessários e de grande relevância para a Ecotoxicologia (Rodgher e Espíndola, 2008a, 2008b).

1.2. Propriedades estruturais, agregação e sedimentação das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂)

O titânio ocupa o quarto grupo da tabela periódica, sendo considerado um elemento de transição. Esse metal possui número atômico 22 e uma massa molar de 4,90 g mol. O

titânio foi descoberto por um geólogo inglês chamado Willian Gregor, no ano de 1791, e foi nomeado no ano de 1795 pelo químico alemão Martin Heinrich Klaproth. O metal puro (99,9%) foi obtido pela primeira vez no ano de 1910 por Matthew A. Hunter, por meio do aquecimento do tetracloreto de titânio. No ano de 1946, o metalúrgico Willian J. Kroll constatou que o titânio poderia ser produzido comercialmente por meio da redução do tetracloreto de titânio com o magnésio, processo utilizado até hoje para sua produção (Fujishima et al., 2008; Santos, 2010).

As nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) são classificadas como um óxido metálico, semicondutor, encontradas nas formas alotrópicas brookita (ortorrômbica), anatase (tetragonal) e rutilo (tetragonal) e apresentam a mesma valência nas três formas em que são encontradas, formando uma geometria octaédrica, com seis átomos de oxigênio, apenas diferenciando entre si pelas suas formas espaciais (Costa et al., 2006) (Figura 4). A forma brookita não é muito utilizada devido a sua escassez na natureza (Allen et al., 2009). As formas alotrópicas anatase e rutilo têm diferentes propriedades de superfície e reatividade, sendo a forma anatase considerada mais citotóxica do que a forma rutilo (Hirakawa et al., 2004).

Poucos são os estudos que destacam a importância de se conhecerem os efeitos tóxicos da forma rutilo sobre os organismos aquáticos (Ji et al., 2011; Yu et al., 2013). A maioria dos estudos sobre os efeitos tóxicos das nano-TiO₂ é realizado utilizando-se a forma anatase como contaminante (Chen et al., 2012, Clément et al., 2013, Dalai et al., 2013, Lee e An, 2013; Sadiq et al., 2011). Isso provavelmente ocorre devido à preferência dessa forma alotrópica pelo mercado consumidor, apesar da forma rutilo também ser comercializada.

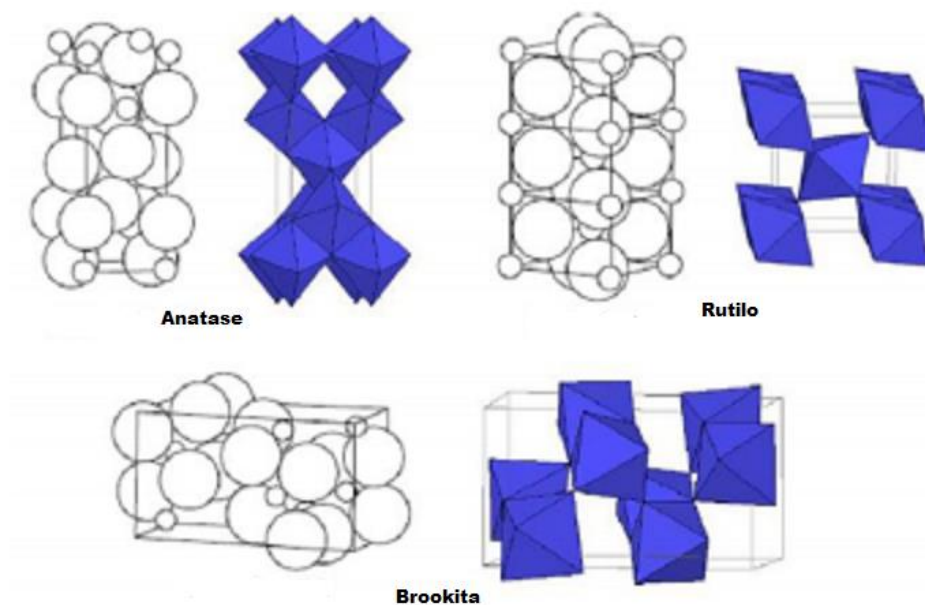


Figura 4. Estruturas cristalinas das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂). Adaptado de Matos (2010), adaptado de Diebold (2003).

Uma característica particular das nano-TiO₂ é a sua capacidade de aglomeração, agregação e sedimentação a que elas estão sujeitas em um período curto de tempo quando dispersas nos meios de ensaio dos testes ecotoxicológicos, o que pode resultar na perda da sua dimensão nanométrica. Essa capacidade de aglomeração/agregação se deve a força iônica do meio de ensaio e também ao pH, além das propriedades específicas das nanopartículas, tais como sua carga de superfície (Nan et al., 2008).

Essa capacidade de aglomeração/agregação das nano-TiO₂ geram dificuldades na realização dos ensaios de toxicidade, uma vez que os efeitos das nanopartículas individualizadas não podem ser medidos (Singh et al., 2009). Outro fator complicador nos testes de toxicidade com as nano-TiO₂ é a concentração utilizada desse químico nos ensaios. Quanto maior for a concentração utilizada das nano-TiO₂, maiores serão os aglomerados/agregados formados. Isso muda a forma como essas nanopartículas interagem diretamente com as células e as superfícies biológicas dos organismos (Clément et al., 2013; Shang et al., 2014).

Portanto, a forma como essas nanopartículas se apresentam e interagem no ambiente e com os organismos vivos, o local onde elas foram depositadas (i.e., na coluna de água ou no sedimento), e estruturalmente como se apresentam (i.e., únicas ou aglomeradas, revestidas ou não, adsorvidas em outras partículas) determinam a sua biodisponibilidade e

sua toxicidade para o meio ambiente (Klaine et al., 2008; Clément et al., 2013; Petosa et al., 2010) (Figura 5).

As consequências da agregação e da sedimentação das nanopartículas e seu comportamento no meio ambiente já foram descritos parcialmente por alguns estudos (Aruoja et al., 2009; Baveye e Laba, 2008; Clément et al., 2013; Navarro et al., 2008; Lin, 2008; Quik et al., 2011). No entanto, ainda se faz necessário elucidar os efeitos que esses nanomateriais podem ter sobre a saúde humana e ambiental, dados por diferentes vias de exposição, possibilitando assim uma maior compreensão do seu destino e do seu comportamento no meio ambiente (Petosa et al., 2010).

Desta forma, os estudos ecotoxicológicos são bastante úteis como ferramentas de avaliação dos efeitos tóxicos desses nanomateriais, fornecendo subsídios para uma regulamentação mais adequada em relação à produção e à liberação das nanopartículas no ambiente, especialmente das nano-TiO₂. Os testes ecotoxicológicos podem viabilizar o uso sustentável dos nanomateriais, uma vez que quaisquer consequências causadas aos ecossistemas por eles, sejam elas danosas ou não, devem ser previamente conhecidas antes da sua comercialização (Mariano, 2014).

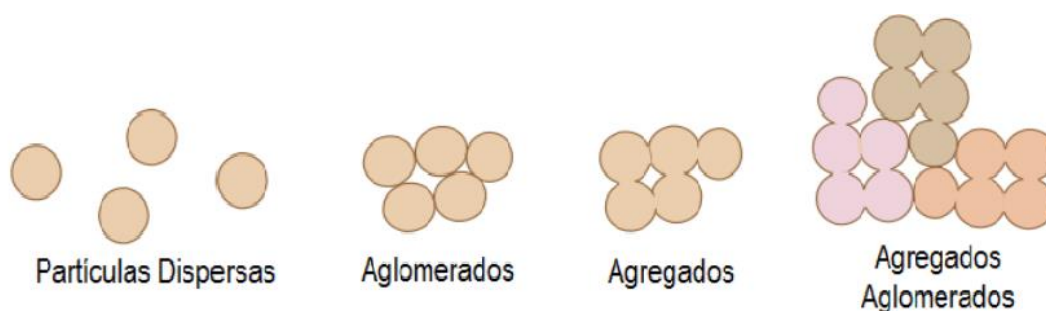


Figura 5. Ilustração das diferenças entre partículas livres, aglomeradas, agregadas e agregadas/aglomeradas. Retirado de Pereira (2010), adaptado de Oberdörster et al. (2007).

1.3. As nanopartículas de dióxido de titânio nos ecossistemas aquáticos

Com a produção e uso crescentes de produtos feitos a partir de nanomateriais, é inevitável que esses materiais atinjam os ecossistemas aquáticos e se tornem uma ameaça em potencial para a saúde dos organismos que vivem nesses ambientes. Independentemente se as nanopartículas estejam presentes na coluna de água ou estejam presentes no

sedimento, elas podem interagir com outros poluentes, tais como xenobióticos e metais pesados, e produzir efeitos deletérios para os organismos expostos a elas (Canesi et al., 2015).

As características únicas das nanopartículas, tais como seu tamanho reduzido e sua área superficial grande, podem facilitar a sua movimentação entre os compartimentos ambientais e ocasionar de forma acumulativa danos às cadeias alimentares, principalmente as dos ambientes aquáticos, os quais são considerados os principais receptores das nanopartículas (Paschoalino et al., 2010), tornando os corpos d'água os precursores da interação entre os organismos e as nanopartículas (Hartmann et al., 2010; Sadiq et al., 2011).

Considerando os diversos efeitos adversos que as nano-TiO₂ podem causar à biota dos ecossistemas aquáticos, principalmente àqueles das regiões tropicais, estudos dos efeitos desses nanomateriais sobre espécies dessa comunidade se tornam de extrema relevância para a etapa de avaliação de risco nesses ambientes. Nesse sentido, somente programas de monitoramento que avaliam a qualidade da água sob aspectos físicos e químicos, sem a aplicação de medidas biológicas que garantam o uso sustentável dos recursos naturais, têm sofrido críticas por parte de alguns pesquisadores (Zagatto e Bertoletti, 2006). Tais abordagens ecossistêmicas são feitas pela Ecotoxicologia, uma vez que os fatores ambientais não podem ser avaliados somente por variáveis abióticas, mas também por variáveis bióticas (Magalhães e Ferrão Filho, 2008).

A Ecotoxicologia refere-se ao estudo científico dos efeitos adversos causados aos organismos vivos (populações e comunidades) pertencentes aos ecossistemas aquáticos e terrestres, principalmente dada pela liberação de substâncias químicas nesses ambientes (Fernicola et al., 2004; Truhaut, 1978).

Dentro desse contexto, a Ecotoxicologia Aquática estuda os efeitos de substâncias químicas provenientes de fontes naturais ou de ação antrópica sobre organismos aquáticos de diversos níveis de organização desde componentes celulares dos organismos, passando por organismos, populações, comunidades e ecossistemas. Esses efeitos podem ser quantificados, por exemplo, por meio da taxa da sobrevivência, do sucesso reprodutivo, do comprimento e peso corpóreo ou da indução ou inibição das atividades enzimáticas (Rand et al., 1995).

Entre os organismos mais recomendados para testes de toxicidade aquática estão as algas, que constituem a base das cadeias alimentares (produtores primários) nos ambientes aquáticos e são de grande importância para a manutenção desse ecossistema, pois esse nível trófico é responsável por manter a estrutura e a função desses ecossistemas e qualquer

estresse sofrido pelas populações fitoplanctônicas pode afetar todo o ecossistema (Aruoja et al., 2009; Kampel, 2003; Masutti, 2004; Pflieger et al., 1991; Silva, 2012).

A exposição das algas às nano-TiO₂ pode alterar seu metabolismo e suas funções biológicas, uma vez que a parede celular desses organismos é semipermeável e seus poros acabam permitindo a entrada das nanopartículas que, conseqüentemente, poderão passar pela membrana plasmática e chegar no interior das células, interagindo com as organelas e influenciando nos processos metabólicos e na formação de espécies reativas de oxigênio (ERO), inclusive podendo causar a morte celular (Dalai et al., 2014; Elsaesser e Howard, 2012; Navarro et al., 2008).

Segundo Ji et al. (2011), a forma anatase das nano-TiO₂ causa graves danos às microalgas verdes de águas doces, indicando que a sua toxicidade varia de acordo com a cristalinidade dessa nanopartícula. Isso foi confirmado também por Cardinale et al. (2012) ao avaliarem a toxicidade das nano-TiO₂ para três espécies de microclorofíceas (*Chlorella vulgaris*, *Scenedesmus quadricauda* e *Chlamydomonas moewusii*). Esses autores observaram também uma diminuição na produção primária bruta dessas microalgas. Miller et al. (2012) observaram um aumento da toxicidade das nano-TiO₂ para algas marinhas quando essas nanopartículas foram irradiadas por raios UV-A. Isso ocorreu devido a um aumento na atividade fotocatalítica.

Existem inúmeros trabalhos na literatura que relatam diferentes valores da Concentração de Inibição de 50% (CI₅₀) do crescimento populacional para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, em testes com 72 ou 96 horas de exposição (Aruoja et al., 2009; Hartmann et al., 2010; Kulacki e Cardinale, 2012; Wartheit et al., 2007). Isso se deve principalmente as variações metodológicas utilizadas nos testes de toxicidade. Outro problema enfrentado nos testes de toxicidade com esta microalga é que as células algais tendem a se agregar com as nano-TiO₂ (Clément et al., 2013; Fouqueray et al., 2012; French et al., 2009; Hartmann et al., 2010), dificultando a quantificação da densidade celular e, por conseguinte, a determinação da taxa de crescimento específico da população, tornando-se necessário testar e desenvolver diferentes metodologias para separação de tais agregados e assim possibilitar a quantificação acurada da densidade celular, uma vez que na literatura não foram encontrados explicações de como resolver essa problemática.

Além do fitoplâncton, os organismos zooplânctônicos, dentre eles os cladóceros, possuem um importante papel nos ecossistemas aquáticos, uma vez que fazem parte dos consumidores primários das cadeias tróficas aquáticas, funcionando como mantenedores do equilíbrio dos ambientes onde são encontrados, um elo na transferência de energia dos produtores primários para os demais consumidores (Dickman et al., 2008). Por isso, é

comum a utilização desses organismos em testes de toxicidade devido à facilidade de coleta, ciclo de vida curto, tamanho reduzido, reprodução por partenogênese (clones), alta sensibilidade e fácil manutenção e cultivo em laboratório, além de serem um dos grupos responsáveis pela transformação do fitoplâncton e de bactérias em proteína animal ofertada para os organismos de níveis tróficos superiores (Maltby e Calow, 1989; Mount e Norberg, 1984).

Com elevada taxa de filtração (McMahon e Rigler, 1965), os dafinídeos apresentam uma alta probabilidade de interação com as nanopartículas presentes no seu ambiente (Casali-Pereira et al., 2015), sendo capazes inclusive de ingeri-las. Segundo Navarro et al. (2008), quando um organismo é exposto às nanopartículas, estas podem penetrar no organismo ou serem incorporadas à sua biomassa, bloquear os canais iônicos e, uma vez dentro da célula, podem exercer seu efeito tóxico.

Nos últimos anos tem havido um aumento na preocupação com a presença das nano-TiO₂ na dieta de organismos aquáticos devido à possibilidade de acumulação e transporte pelos organismos e de sua transferência nas cadeias tróficas (Campos et al., 2013; Dalai et al., 2014; Zhu et al., 2010 a, b). Contudo, a maior parte dos estudos já realizados não foram feitos com espécies nativas pertencentes aos ecossistemas aquáticos tropicais, como o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, que tem sido utilizado como organismo-teste por vários autores brasileiros em testes ecotoxicológicos para diferentes substâncias tóxicas, nos últimos dez anos (Rosa, 2008; Castilho, 2005; Jaconetti, 2005; Moreira et al., 2014; Oliveira-Neto, 2000). Assim, testes de toxicidade com diferentes organismos nativos, que representem diferentes níveis tróficos ou compartimentos dos ecossistemas aquáticos, são muito importantes para se avaliar os efeitos tóxicos que as nanopartículas podem ter sobre eles (Clément et al., 2013).

2. OBJETIVOS

Este estudo teve como objetivo principal investigar os efeitos tóxicos das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) sobre a clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata* e sobre o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* pela via de exposição alimentar, i.e., quando a alga clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata* contaminada com as nanopartículas de dióxido de titânio foi ofertada como alimento ao cladóceros.

2.1. Objetivos específicos

- Cultivar a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* sob condições controladas de laboratório;
- Cultivar o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* sob condições controladas de laboratório;
- Avaliar a toxicidade das nano-TiO₂ para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* em condições semelhantes às encontradas em regiões tropicais (temperatura de 25°C e fotoperíodo de 12/12 horas de claro/escuro, a qual foi utilizada como alimento para o cladóceros).
- Determinar os efeitos agudos das nano-TiO₂ para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* por meio da exposição de contato;
- Determinar os efeitos crônicos das nano-TiO₂ para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, avaliando-se o seu crescimento, sobrevivência e fecundidade, quando os organismos foram expostos ao contaminante por via alimentar (alimento contaminado com as nano-TiO₂).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Cultivo e manutenção da clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata*

A clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata* foi o organismo-teste escolhido para a realização dos ensaios de toxicidade de 96 horas com as nano-TiO₂. Para o seu cultivo, foram utilizados frascos Erlenmeyers com capacidade de 2 L contendo 1 L de meio LC Oligo (AFNOR, 1980), previamente autoclavado a 121°C e 1 atm por 20 minutos. A inoculação do meio algáceo foi feita em capela de fluxo laminar, a qual foi descontaminada utilizando-se álcool 70% e um banho de luz ultravioleta por 15 minutos. A concentração das células algais inoculada no meio de cultura foi de 1×10^4 células mL⁻¹ e a cultura permaneceu sob iluminação de 2000 lux, com fotoperíodo de 12/12 horas de claro/escuro, sem aeração e em temperatura controlada de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ até que atingisse sua fase de crescimento exponencial (ABNT, 2011).

Imediatamente antes dos ensaios de toxicidade, as células algais cultivadas foram concentradas por meio de centrifugação a 4000 ×g, sendo o sobrenadante descartado e as células ressuspendidas em meio LC Oligo previamente autoclavado sob as mesmas condições descritas acima. Uma amostra de 1 mL foi retirada e fixada com uma gota de lugol para posterior contagem das células, a qual foi realizada em câmara de Neubauer (hemocítômetro), sob microscópio óptico (Zeiss Axiostar Plus), utilizando-se o aumento de 400 vezes.

3.2. Espécie zooplantônica estudada e condições de manutenção e cultivo

O organismo-teste selecionado para este estudo foi uma espécie nativa e endêmica de cladóceros padronizada pela ABNT, *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902 (Crustacea, Cladocera). Esse cladóceros atua como consumidor primário nas cadeias alimentares aquáticas e se alimenta por filtração de material orgânico particulado. Esse organismo possui 0,8 a 0,9 mm de comprimento, corpo ovalado com acentuado sino cervical e com 9 a 12 espinhos anais no pós-abdômen (Figura 6) (Fonseca e Rocha, 2004), sendo encontrado no Brasil e na Argentina (ABNT, 2010).



Figura 6. Vista geral do organismo-teste *Ceriodaphnia silvestrii*. Aumento de 40 vezes. (Foto: Gisele M. de Lucca).

A manutenção dos cultivos-estoque dos organismos de *Ceriodaphnia silvestrii* foram feitos de acordo com a norma da ABNT (2010) e mantidos no Laboratório de Ecotoxicologia no Departamento de Ecologia e Biologia Evolutiva (DEBE), da Universidade Federal de São Carlos (São Carlos – SP).

A espécie foi cultivada em água reconstituída previamente preparada com 1500 mg de $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (solução 1) e 200 mg de KCl, 4800 mg de NaHCO_3 e 6100 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (solução 2) ambos diluídos em 1 L de água destilada (ABNT, 2010). Em um recipiente com aeração constante, a água destilada foi acrescida das duas soluções específicas (solução 1 e 2) a fim de que ela tivesse as seguintes características: pH entre 7,0 e 7,5 e uma dureza total entre 40 e 48 $\text{mgCaCO}_3 \text{ L}^{-1}$ (ABNT, 2010). Essa espécie foi mantida em béqueres de 2 L, com um máximo de 120 indivíduos. Os béqueres foram recobertos com um filme plástico para evitar evaporação. As manutenções das culturas foram realizadas três vezes por semana, quando eram renovados a água e o alimento, sendo uma troca total da água e duas parciais (apenas 50% da água de cultivo foi renovada). Os cultivos de *Ceriodaphnia silvestrii* foram mantidos em incubadoras com temperatura controlada a $25^\circ\text{C} \pm 2$ e com fotoperíodo de 12/12 horas de claro/escuro.

A alga *Pseudokirchneriella subcapitata* foi utilizada como alimento para os cultivos de *Ceriodaphnia silvestrii*. Esta alga foi cultivada em meio LC Oligo (AFNOR, 1980), o qual foi autoclavado por 20 minutos, a 121°C , em Erlernmeyer de 2000 mL de capacidade contendo 1000 mL do meio. Os meios de cultivo foram inoculados em capela de fluxo laminar descontaminada com álcool 70%, sob luz UV por 15 minutos. A inoculação foi feita

com uma concentração de 1×10^4 células mL^{-1} . A cultura permaneceu sob iluminação de 4000 lux, com fotoperíodo de 12/12 horas de claro/escuro, com aeração constante e temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ até a fase exponencial (ABNT, 2011; APHA, 1995).

Para a retirada do meio de cultivo, as algas foram centrifugadas a $4000 \times g$, sendo o sobrenadante descartado e a alga ressuspensa em água reconstituída (a mesma utilizada para o cultivo do cladóceros). Logo após a centrifugação, uma alíquota de 1 mL foi retirada e fixada com uma gota de lugol para posterior quantificação das células algais. A concentração algal foi determinada por meio da contagem em câmara de Neubauer (hemocitômetro), sob microscópio óptico (Zeiss Axiostar Plus), utilizando-se um aumento de 400 vezes.

A concentração diária de células algais fornecida como alimento aos indivíduos de *Ceriodaphnia silvestrii* foi de 1×10^5 células mL^{-1} por réplica (ABNT, 2010). De acordo com Vijverberg (1989), os dafinídeos podem ser cultivados com sucesso no laboratório utilizando as células algais de *Pseudokirchneriella subcapitata* como alimento. A alga *Pseudokirchneriella subcapitata* é uma das espécies sugeridas por esse autor devido ao alto valor nutricional proporcionado aos cladóceros.

Foi fornecido aos cladóceros um complemento alimentar a base de ração fermentada (ABNT, 2010), preparado a partir da mistura de partes iguais de fermento biológico seco tipo Fleischmann® e ração para peixe (Vitormômio®). A solução de levedura foi preparada colocando-se 0,5g de fermento biológico seco em 100 mL de água destilada, enquanto que para o preparo da ração de peixe, foram dissolvidos 5g de ração em 1000 mL de água destilada, mantidos com aeração, durante uma semana. Quando necessário, a água perdida por evaporação foi repostada, sendo que a solução foi mantida coberta por papel alumínio. No final desse período, a solução decantou por cerca de 2 horas e o sobrenadante foi filtrado em rede de zooplâncton de 45 μm de abertura de malha. O material sedimentado foi devidamente descartado. A solução final foi distribuída em frascos de 100 mL, os quais foram conservados em geladeira a 4°C até o momento do uso (ABNT, 2010) O alimento composto foi feito ao misturar 100 mL de cada solução descrita acima, sendo conservado sobre refrigeração e utilizado por um período máximo de 10 dias. Para a alimentação do cladóceros, foi adicionado 1 mL L^{-1} desse preparado a cada troca de água.

3.3. Nanopartículas de dióxido de titânio

As nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) utilizadas neste estudo tiveram um diâmetro médio de 21 nm e uma pureza de 99,5%, tendo sido adquiridas da Sigma-Aldrich®. As medidas do diâmetro médio e da cristalinidade das nanopartículas deste lote foram confirmadas por Mariano (2014) por meio da difração de raios-X em um equipamento LAB-X-XRD 6000 (Shimadzu, Japão), sendo que 82% das nano-TiO₂ estavam presentes na forma anatase e 18% na forma rutilo e apresentaram um tamanho médio que variou de 10 a 50 nm. Segundo a autora, essa variação não foi significativa em relação à variação apresentada pelo fabricante.

3.4. Preparo da solução-estoque para os ensaios com a clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata*

A solução-estoque das nano-TiO₂ foi preparada em balão volumétrico de polipropileno com capacidade de 1 L, utilizando-se como dispersante o próprio meio LC Oligo. A concentração da solução-estoque das nano-TiO₂ no teste de toxicidade sempre foi igual à maior concentração testada. A solução-estoque do teste de toxicidade preliminar foi preparada a partir de uma concentração de 10 mg L⁻¹ e, para o teste de toxicidade definitivo, a solução-estoque foi preparada em uma concentração de 2000 mg L⁻¹ de nano-TiO₂. A fim de reduzir as aglomerações e as sedimentações das nanopartículas, as soluções-estoque foram ultrassonicada (Unique DES500) por duas horas a uma potência máxima de 500 W, com pausa a cada 30 minutos para um resfriamento em banho de gelo. As concentrações-teste nominais para as dispersões das nano-TiO₂ foram obtidas por diluição da solução-estoque em meio LC Oligo. Tanto para o teste de toxicidade preliminar como para o teste de toxicidade definitivo a solução-estoque e as concentrações-teste nominais foram preparadas imediatamente antes dos ensaios.

3.5. Teste de toxicidade preliminar com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

O teste preliminar de toxicidade (96 horas) foi realizado de acordo com o protocolo da ABNT (2011) para teste de toxicidade crônica com microalgas clorofíceas, com leituras a cada 24 horas. A única exceção em relação ao protocolo da ABNT (2011) foi que a solução-estoque utilizada no ensaio foi preparada em meio LC Oligo e não em água destilada.

As concentrações-teste nominais das nano-TiO₂ foram preparadas por meio da diluição da solução-estoque em uma ampla faixa de concentrações, variando de 0,001 a 10 mg L⁻¹ de nano-TiO₂. O controle foi constituído apenas pelo meio de cultivo algal, sem adição das nano-TiO₂. Para evitar qualquer contaminação, o manuseio das nanopartículas e das culturas foi sempre realizado em cabine de fluxo laminar. No experimento, um volume de 300 mL das concentrações-teste ou 300 mL do meio LC Oligo (controle) foram colocadas em frascos de polipropileno com capacidade para 1000 mL e uma concentração inicial de 5×10^4 células mL⁻¹ de *Pseudokirchneriella subcapitata* foi adicionada em cada um deles. Uma réplica foi utilizada para cada concentração-teste e para o controle conforme recomendação feita pelo protocolo de testes da ABNT (2011) para testes preliminares. Os recipientes-teste foram mantidos por 96 horas sob as mesmas condições descritas na seção 3.1.

Diferentes métodos foram empregados para a determinação da densidade celular, necessária para calcular a taxa de crescimento específico populacional. Isso foi necessário, uma vez que, no presente estudo, após 96 horas de exposição às nano-TiO₂ e a partir da concentração de 0,01 mg L⁻¹, as células formaram agregados entre si e com as nanopartículas, impossibilitando sua quantificação sob microscópio óptico. Na seção 3.6 estão detalhados os métodos empregados para a quantificação das células.

3.6. Determinação da densidade celular

3.6.1. Absorbância

A leitura da absorbância (ABS) nas concentrações testadas e no controle durante o teste de toxicidade preliminar com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* foi realizada em

espectrofotômetro (Hach DR500), utilizando-se cubetas de poliestireno com capacidade de 4,5 mL preenchidas com um volume de 3 mL de cada réplica testada. A leitura da absorbância foi realizada em três diferentes comprimentos de onda 440, 670 e 687 nm (Valer e Glock, 1998), a cada 24 horas, até o final do ensaio preliminar de toxicidade. Foram utilizados dois tipos de ensaios brancos para cada concentração-teste: o meio LC Oligo com a respectiva concentração-teste das nano-TiO₂ e o meio LC Oligo com a respectiva concentração-teste das nano-TiO₂ previamente filtrado em membrana de acetato de celulose com 0,2 µm de poro.

3.6.2. Fluorescência

A fluorescência das algas nas diferentes concentrações testadas das nano-TiO₂ foi determinada pelo método descrito por Aruoja et al. (2009), utilizando microplacas para a leitura. Amostras de 50 µL em triplicatas foram retiradas de cada concentração-teste e do controle, sendo colocadas em uma microplaca de 96 poços. Em cada poço da microplaca foram adicionados 200 µL de etanol 96%. O ensaio branco constituiu-se apenas de 50 µL do meio LC Oligo mais 200 µL de etanol 96%. A microplaca foi coberta com parafilme M, sendo mantida por 3 horas sob leve agitação (CIEN TEC Orbital CT165) e sem iluminação. Logo após, a leitura da fluorescência foi realizada em um comprimento de excitação de 440 nm e um comprimento de emissão de 670 nm. A leitura da fluorescência foi feita a cada 24 h até o final do ensaio de toxicidade preliminar.

3.6.3. Clorofila-*a*

A quantificação das concentrações das clorofilas *a* e *b* foi feita pelo método do DMSO, de acordo com Shoaf e Lium (1976). Amostras de 10 mL de cada concentração-teste e do controle foram filtradas em filtros de éster de celulose (Millipore) com poro de 0,45 µm, os quais foram previamente deixados em HCl 1M por 24 horas. Os filtros contendo as células algais foram colocados em tubos Falcon de 15 mL com 5 mL do solvente dimetilsulfóxido (DMSO). Após o acréscimo do solvente, os tubos foram imediatamente agitados manualmente e mantidos no escuro por 30 minutos. Ao término dos 30 minutos, os

tubos foram novamente agitados e deixados em repouso por mais 15 minutos, sob as mesmas condições. A leitura da absorbância foi realizada imediatamente após o término dos 15 minutos em um espectrofotômetro (Hach DR500) nos comprimentos de onda de 664 e 647 nm, conforme recomendação de Shoaf e Lium (1976). O ensaio branco foi constituído apenas por um filtro de éster de celulose. A concentração de clorofila-*a* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) foi obtida por meio da seguinte equação:

Concentração de Clorofila-*a* = $\{[(11,93 \times \text{ABS } 664 \text{ nm}) - (1,93 \times \text{ABS } 647 \text{ nm})] \times \text{Volume do DMSO dado em mL}\} / \text{Volume do filtrado dado em mL}$, onde: ABS significa o valor da absorbância obtida em cada comprimento de onda específico.

3.6.4. Contagem numérica das células

Para a quantificação da densidade numérica das células algais, alíquotas de 1 mL foram retiradas de cada concentração-teste e do controle, as quais foram fixadas em solução de lugol para posterior contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico (Zeiss Axiostar Plus) com um aumento de 400 vezes (Tavares e Rocha, 2001).

3.7. Métodos para a desagregação das células algais e das nano-TiO₂

Em todas as concentrações testadas no teste de toxicidade preliminar houve a formação de agregados entre as células de *Pseudokirchneriella subcapitata* e as nano-TiO₂ após o período de 96 horas de exposição. Isso impossibilitou a determinação acurada da densidade numérica das células algais por meio dos métodos anteriormente descritos. Desta forma, quatro métodos para a separação dos agregados foram desenvolvidos e testados. Estes métodos encontram-se detalhados a seguir.

3.7.1. Agitação em vórtex

Neste método, amostras de 10 mL de uma cultura algal exposta a 10 mg L^{-1} de nano- TiO_2 com uma densidade celular entre 10^5 e 10^6 células mL^{-1} foram agitadas em vórtex (Gehaka AV-2) a uma velocidade aproximada de 2000 rpm. Os intervalos de tempo testados, i.e., a duração da agitação, foram de 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. Ao todo, três réplicas foram feitas para cada intervalo de tempo testado.

Após a agitação em vórtex nos respectivos intervalos de tempos, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5702R) a $2500 \times g$ por 10 minutos a 4°C , sendo o sobrenadante descartado e as células algais ressuspendidas em 10 mL de meio LC Oligo autoclavado. Uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi fixada em lugol para posterior contagem das células algais em câmara de Neubauer sob microscópio óptico (Zeiss Axiostar Plus) com um aumento de 400 vezes.

3.7.2. Banho ultrassônico

Neste método, amostras de 10 mL de uma cultura algal exposta a 10 mg L^{-1} de nano- TiO_2 com uma densidade celular entre 10^5 e 10^6 células mL^{-1} foram submetidas ao banho ultrassônico (Unique USC 1400). Os intervalos de tempo testados em que as amostras permaneceram no banho ultrassônico foram de 30 s, 1, 2, 3, 4 e 5 minutos. Ao todo, três réplicas foram feitas para cada intervalo de tempo testado. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Eppendorf 5702R) a $2500 \times g$ por 10 minutos a 4°C , sendo o sobrenadante descartado e as células algais ressuspendidas em 10 mL de meio LC Oligo autoclavado. Uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi fixada em lugol para posterior contagem das células algais em câmara de Neubauer sob microscópio óptico (Zeiss Axiostar Plus) com um aumento de 400 vezes.

3.7.3. Utilização de um quelante de metal

Essa metodologia foi adaptada do trabalho de Lombardi et al. (2002) com algumas modificações. Esses autores utilizaram essa metodologia com a finalidade de se determinar a concentração de cobre na cápsula mucilagínosa da alga *Kirchneriella aperta*.

Para este método, células contidas em 10 mL de uma cultura algal exposta a 10 mg L⁻¹ de nano-TiO₂ com uma densidade celular entre 10⁵ e 10⁶ células mL⁻¹ foram lavadas com EDTA (ácido etilenodiaminotetraacético de sódio) em duas concentrações, 1 × 10⁻³ (Lombardi et al., 2002) e 5 × 10⁻⁴ mol L⁻¹. Essas duas concentrações do quelante de metais foram preparadas em meio LC Oligo autoclavado. As células algais passaram por diferentes quantidades de lavagens: uma única lavagem e por três lavagens. O intervalo de tempo em que as células algais permaneceram em contato com o quelante também foi testado (1, 2, 3, 4, 5 e 10 minutos). Três réplicas foram feitas para cada intervalo de tempo testado, para cada concentração do quelante e para cada quantidade de lavagem das células algais.

As amostras de 10 mL das células algais foram centrifugadas a 2500 ×g por 10 minutos a 4°C, sendo o sobrenadante descartado e as células algais ressuspensas em 10 mL de EDTA, nas duas respectivas concentrações testadas. Após isso, as células permaneceram em contato com o EDTA para cada intervalo de tempo estipulado. Imediatamente após o término dos intervalos de tempo testados, as amostras foram centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente e o sobrenadante descartado. No caso de uma lavagem, as células foram ressuspensas em meio LC Oligo, enquanto que para três lavagens, o contato com o EDTA foi repetido mais duas vezes e, ao final, as células foram ressuspensas em meio LC Oligo. Por fim, uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi fixada em lugol para posterior contagem das células algais em câmara de Neubauer sob microscópio óptico com um aumento de 400 vezes.

3.7.4. Combinação do quelante EDTA e da agitação em vórtex

Para este método, amostras de 10 mL de uma cultura algal exposta a 10 mg L⁻¹ de nano-TiO₂ com densidade celular entre 10⁵ e 10⁶ células mL⁻¹ foram submetidas a uma combinação de duas concentrações do quelante EDTA (5 × 10⁻⁴ e 1 × 10⁻³ mol L⁻¹) preparadas em meio LC Oligo em conjunto com a utilização do vórtex para agitação das mesmas. Os

intervalos de tempo em que as células algais permaneceram em contato com o EDTA foram de 1, 2, 3, 4, 5 e 10 minutos. Três réplicas foram feitas para cada intervalo de tempo.

As amostras das culturas algais foram centrifugadas a $2500 \times g$ por 10 minutos a 4°C , sendo o sobrenadante descartado e as células algais ressuspensas em 10 mL de EDTA, nas duas respectivas concentrações testadas. Após isso, as amostras foram agitadas no vórtex e as células permaneceram em contato com o EDTA para cada intervalo de tempo estipulado. Imediatamente após o término dos intervalos de tempo testados, as amostras foram novamente agitadas em vórtex e centrifugadas nas mesmas condições descritas anteriormente. Por fim, o sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em meio LC Oligo autoclavado. Uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi fixada em lugol para posterior contagem das células algais em câmara de Neubauer sob microscópio óptico com aumento de 400 vezes.

3.8. Teste de toxicidade definitivo com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

O teste de toxicidade definitivo (96 horas) foi feito de acordo com o protocolo da ABNT (2011) para o ensaio de toxicidade com algas clorofíceas. A única exceção em relação ao protocolo da ABNT (2011) foi que a solução-estoque utilizada no ensaio foi preparada em meio LC Oligo e não em água destilada.

As concentrações-teste nominais das nano-TiO₂ foram preparadas por meio da diluição da solução-estoque em uma faixa de concentrações-teste variando entre 16 a 512 mg L⁻¹. O controle foi constituído apenas pelo meio de cultivo algal, sem adição das nano-TiO₂. Tanto para as concentrações testadas quanto para o controle, o meio LC Oligo foi suplementado com uma fonte extra de bicarbonato de sódio (duas vezes mais) e o pH foi ajustado para 7,5. Para evitar qualquer contaminação, o manuseio das nanopartículas e das culturas foi sempre realizado em cabine de fluxo laminar. No experimento, alíquotas de 400 mL das concentrações-teste ou 400 mL do meio LC Oligo (controle) foram colocadas em frascos de polipropileno com capacidade para 500 mL e uma concentração de 5×10^4 células de *Pseudokirchneriella subcapitata* mL⁻¹ foi adicionada em cada um deles. Três réplicas foram utilizadas para cada concentração-teste e para o controle. Os recipientes-teste foram mantidos por 96 horas em agitação leve (cerca de 130 rpm) e iluminação (2000 lux) constantes, na temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. A cada intervalo de 24 h, alíquotas de 10 mL de cada réplica foram retiradas para a quantificação do pH, densidade celular e viabilidade

celular nas concentrações-teste e no controle. Para a quantificação do titânio, 20 mL foram retirados de cada concentração-teste e do controle após 24 e 96 horas de exposição para a determinação do titânio particulado e do titânio dissolvido. Com a determinação da densidade celular, foi possível obter os valores das Concentrações de Inibição de 50% (CI₅₀) do crescimento da população de algas e a taxa de crescimento específico nos períodos de tempo de 24, 48, 72 e 96 horas.

3.8.1. Determinação da densidade celular

Para obtenção da densidade celular, o método mais eficaz na separação das células que foram expostas às nano-TiO₂ foi a lavagem por três vezes com o quelante de metal EDTA na concentração de 5×10^{-3} mol L⁻¹ e por um período de tempo de um minuto para cada lavagem, i.e., um total de três minutos em que as células permaneceram em contato direto com o quelante. Desta forma, este método foi empregado aqui e a descrição dele se encontra na seção 3.7.3. Após o processo de separação das células algais, uma alíquota de 1 mL foi retirada de cada concentração-teste e do controle, fixada em lugol e contada em uma câmara de Neubauer por meio de um microscópio óptico com um aumento de 400 vezes.

3.8.2. Viabilidade celular

O teste de viabilidade celular foi baseado na Associação Brasileira de Normas Técnicas com algumas modificações (ABNT, 2011). Para a determinação da viabilidade celular das algas expostas às diferentes concentrações-teste das nano-TiO₂, alíquotas de 10 mL foram retiradas a cada 24 horas de cada concentração-teste e do controle, com a finalidade de se verificar se, após o período de exposição, elas continuariam viáveis. Desta forma, sub-amostras de 10 mL da suspensão algal foram centrifugadas a $2500 \times g$ por 10 minutos a 4°C e ressuspendidas em meio LC Oligo autoclavado. Após a centrifugação, as células foram inoculadas novamente em 100 mL de meio algal autoclavado preparado em frascos Erlenmeyer de 250 mL de capacidade. Os frascos foram mantidos em temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (12/12 horas claro/escuro) constantes e a viabilidade celular pós-

exposição foi observada verificando-se a ocorrência ou não de crescimento após um período de 96 horas.

3.9. Ensaios de sensibilidade com o cladócer *Ceriodaphnia silvestrii*

Os ensaios de sensibilidade para determinar a saúde dos organismos foram realizados periodicamente, com a substância de referência cloreto de sódio (NaCl). Esses ensaios garantem uma maior confiabilidade e precisão dos dados ao longo do tempo por um mesmo laboratório ou entre laboratórios. É recomendado que os testes de sensibilidade sejam realizados mensalmente ou dentro de 14 dias antes da realização dos testes de toxicidade, ou ainda, se necessário, paralelamente a estes (ABNT, 2009, 2010; Environment Canada, 1992).

As concentrações de ensaio para os testes de sensibilidade com o cloreto de sódio (NaCl) para a espécie *Ceriodaphnia silvestrii* foram estabelecidas por Takenaka (2007). Essa autora utilizou uma faixa de concentrações que variou de 0,6 a 2,2 g L⁻¹.

Para os seis ensaios de sensibilidade realizados neste estudo, cinco neonatas (< 24 h) foram colocadas em recipientes plásticos de poliestireno (PS) com capacidade de 50 mL, os quais continham 10 mL da solução de cloreto de sódio (NaCl) ou do controle (apenas água reconstituída). As concentrações testadas em três réplicas foram: 0,6; 1,0; 1,3; 1,6 e 2,2 g L⁻¹. Elas foram preparadas a partir de uma solução-estoque de 100 g L⁻¹, utilizando-se a água reconstituída como diluente.

Durante o período de exposição (48 horas), os organismos-teste foram mantidos em uma temperatura controlada de 25 ± 1° C, em câmara incubadora. Os organismos-teste foram mantidos sem iluminação e sem alimento durante todo o período de exposição. Após 48 horas, o número de organismos imóveis foi determinado para o cálculo da CE₅₀ - 48 h, a concentração efetiva mediana que causa efeito agudo (imobilidade) a 50% dos organismos após 48 horas de exposição. Os organismos foram considerados saudáveis e adequados para serem utilizados nos testes de toxicidade quando os valores da CE₅₀ - 48 h ficaram dentro dos limites inferior e superior estabelecidos na carta controle construída neste estudo. A validação dos seis testes de sensibilidade foi dada quando a porcentagem de organismos imóveis no controle não ultrapassou a 10% durante o período do teste (ABNT, 2009; 2010).

3.10. Teste de toxicidade aguda com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*

A solução-estoque foi preparada em um balão volumétrico de polipropileno (PP) com capacidade de 1L a partir da maior concentração a ser testada (1600 mg L^{-1}) de nano-TiO₂ do mesmo lote já descrito na seção 3.3 e utilizando-se como meio de diluição a água reconstituída. Após o seu preparo, a solução-estoque foi ultrassonicada (Unique DES500) por duas horas a uma potência de 500 W (100% da capacidade do aparelho), com pausa a cada 30 minutos para um resfriamento em banho de gelo.

As concentrações de ensaio foram obtidas por diluição da solução-estoque em água reconstituída nas seguintes concentrações: controle (somente água reconstituída); 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800 e 1600 mg L^{-1} de nano-TiO₂. Essas concentrações foram determinadas em dois testes de toxicidade aguda preliminares realizados com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* para estabelecer o intervalo de concentrações das nano-TiO₂ a serem utilizadas nos quatro testes definitivos. O intervalo foi determinado pela menor concentração que causou imobilidade a 100% dos organismos e a maior concentração na qual não houve nenhuma imobilidade aos organismos testados.

Os testes de toxicidade aguda definitivos consistiram na exposição de cinco neonatas com idade inferior a 24 horas em 100 mL de cada concentrações-teste de nano-TiO₂, mais o controle. Os experimentos foram mantidos a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em incubadora, sem iluminação, e os organismos não foram alimentados durante todo o teste. Para cada concentração-teste das nano-TiO₂ e para o controle foram estabelecidas três réplicas.

As variáveis dureza total (titulometria com EDTA), pH (medidor de pH digital), oxigênio dissolvido e temperatura (ambos oxímetro portátil, Phtek DO-48) foram medidas no início e no final de todos os ensaios.

A imobilidade dos organismos foi verificada a cada 24 h e os resultados foram expressos em porcentagem de organismos imóveis. O teste de toxicidade foi invalidado quando o controle apresentou mais de 10% de organismos imóveis (Figura 7) (ABNT, 2009; CETESB, 1991;1992).

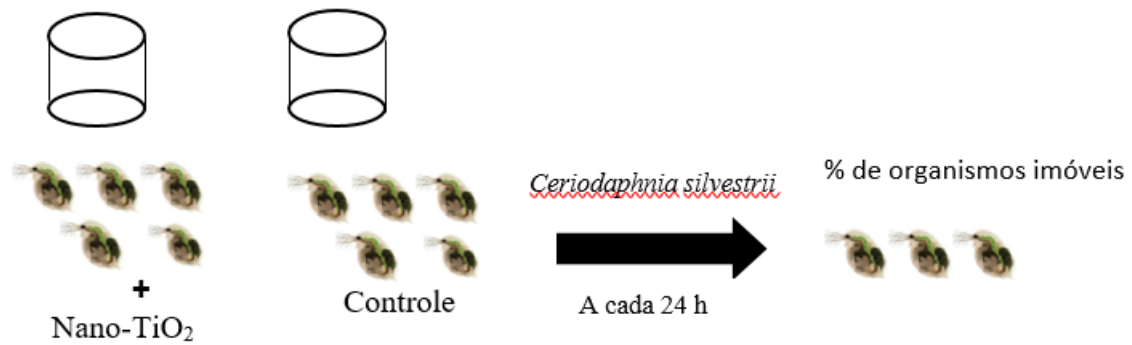


Figura 7. Desenho experimental do teste de toxicidade aguda com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* expostas a nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂). Adaptado de Dalai et al. (2014).

3.11. Testes de toxicidade crônica com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* utilizando como via de exposição o alimento contaminado

A partir dos resultados dos testes de toxicidade com as algas e com os cladóceros, a definição das concentrações-teste das nano-TiO₂ que foram utilizadas para a contaminação das algas a fim de que elas pudessem ser oferecidas como alimento contaminado para os cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* foi possível.

3.11.1. Contaminação da clorofícea com as nano-TiO₂

A contaminação da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* com as nano-TiO₂, a qual foi fornecida como alimento para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, foi feita de acordo com as normas da ABNT (2011) com algumas modificações.

Para o cultivo das algas, foram utilizados frascos Erlenmeyer com capacidade de 2 L, contendo 1 L de meio de cultivo para algas (meio LC Oligo), o qual foi previamente autoclavado para evitar qualquer contaminação (AFNOR, 1980). A inoculação do meio de cultivo foi feita em cabine de fluxo laminar, no qual 5×10^5 células de *Pseudokirchneriella subcapitata* foram adicionadas a cada frasco e o cultivo mantido nas mesmas condições dos cultivos-estoque já descritos na seção 3.1, até que atingissem a fase de crescimento exponencial.

Imediatamente antes da contaminação das células algais com as nano-TiO₂, estas foram concentradas por meio de centrifugação a 4000 ×g por 10 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, 1 mL foi retirado e fixado com uma gota de lugol para determinar a densidade de células em câmara de Neubauer (hemocitômetro), sob microscópio óptico (Zeiss AxioStar Plus) com um aumento de 400 vezes.

Para a contaminação das células algais, uma solução-estoque de 20 mg L⁻¹ de nano-TiO₂ foi preparada em um balão volumétrico de 250 mL de polipropileno (PP), utilizando como meio de diluição o próprio meio LC Oligo. A solução-estoque foi ultrassonicada (Unique DES 500) por 2 horas a uma potência máxima de 500 W, com pausa a cada 30 minutos para um resfriamento em banho de gelo.

O preparo das concentrações-teste foi realizado em balão volumétrico de polipropileno com capacidade de 100 mL, nas concentrações de 0; 0,01; 1 e 10 mg L⁻¹ de nano-TiO₂. Essas concentrações foram utilizadas, pois elas não produziram qualquer efeito deletério tanto para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* quanto para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* nos testes de toxicidade anteriormente descritos.

Para cada 100 mL das concentrações testadas, adicionou-se 5 × 10⁶ células mL⁻¹ da clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata* com a finalidade de que as células algais ficassem expostas as nano-TiO₂. Após o seu preparo, as células algais em contato com às nano-TiO₂ foram colocadas em recipientes de polipropileno com capacidade para 250 mL, em três réplicas para cada concentração-teste e o controle. Os recipientes permaneceram sob as mesmas condições das culturas-estoque por 96 h, em uma temperatura de 25 ± 1°C e um fotoperíodo de 12 horas claro/escuro.

Após 96 horas, cada réplica foi centrifugada por 10 minutos a 4000 ×g, em seguida o sobrenadante foi descartado e a células ressuspendidas com 50 mL de água reconstituída. As três réplicas de cada concentração-teste foram armazenadas em um único recipiente de polipropileno com capacidade de 500 mL. O concentrado contendo 300 mL de células algais contaminadas com nano-TiO₂ foram armazenados na geladeira e envoltos em papel alumínio para evitar o contato com a luz.

Imediatamente antes dos ensaios crônicos com os cladóceros serem realizados, o número de células algais por mL para cada concentração-teste do ensaio de contaminação das algas foi determinado em câmara de Neubauer (hemocitômetro), utilizando a metodologia do EDTA (três lavagens com duração de um minuto cada uma) para separação dos agregados de células algais e nano-TiO₂. Após definir a concentração de células algais em cada concentração-teste, um volume diário de 1 × 10⁵ células por mL⁻¹ foi definido como

a concentração alimentar que os indivíduos de *Ceriodaphnia silvestrii* receberiam ao longo do ensaio de toxicidade crônica.

3.11.2. Testes crônicos com o cladócero *Ceriodaphnia silvestrii*

Os testes de toxicidade crônica foram realizados de acordo com as normas da ABNT (2010) para o cladócero *Ceriodaphnia silvestrii*, utilizando neonatas com idade inferior a 24 horas e obtidas a partir da terceira ninhada. Para isso, recipientes de polipropileno de 145 mL contendo 100 mL de água reconstituída (a mesma utilizada no cultivo-estoque) foram utilizados. Cada recipiente continha um organismo de *Ceriodaphnia silvestrii*, os quais foram alimentados com as algas *Pseudokirchneriella subcapitata* previamente contaminadas com as nano-TiO₂. Dez réplicas foram utilizadas para cada concentração estabelecida no ensaio de contaminação das células algais. O controle foi constituído por organismos cultivados em água reconstituída e alimentados com células algais que não foram contaminadas com as nano-TiO₂. Para o controle também foram utilizadas 10 réplicas. Todos os organismos foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura e de fotoperíodo dos cultivos-estoque.

Durante os sete dias de exposição, a água reconstituída foi renovada a cada 24 horas, sendo os organismos-teste alimentados diariamente com as células algais contaminadas com as diferentes concentrações de nano-TiO₂ ou com células algais sem nenhuma contaminação (controle). O alimento composto também foi fornecido como alimento para os diferentes tratamentos e para o controle.

Em cada renovação da água reconstituída, a sobrevivência dos organismos foi observada, assim como o número de ovos e de neonatas nascidas vivas foram registrados para cada réplica. O número de ovos e de neonatas produzidas por fêmea foram obtidos somente a partir das fêmeas vivas, já o parâmetro comprimento corporal foi medido antes da exposição as nano-TiO₂ e após o período de exposição para as fêmeas vivas. Foram realizados três ensaios definitivos. (Figura 8).

As variáveis pH, concentração de oxigênio dissolvido, dureza e temperatura foram medidas diariamente na água reconstituída de cada tratamento e no controle, no momento em que ela foi renovada e antes dela ser descartada. Os testes foram considerados válidos quando a mortalidade dos organismos adultos no controle não excedeu 20% e quando 60%

ou mais das fêmeas adultas sobreviventes no controle tiveram no mínimo quinze neonatas, não ultrapassando o período máximo de sete dias de teste (ABNT, 2010).

A quantificação do titânio particulado e dissolvido foi realizado conforme os procedimentos que serão descritos a seguir (seção 3.12).

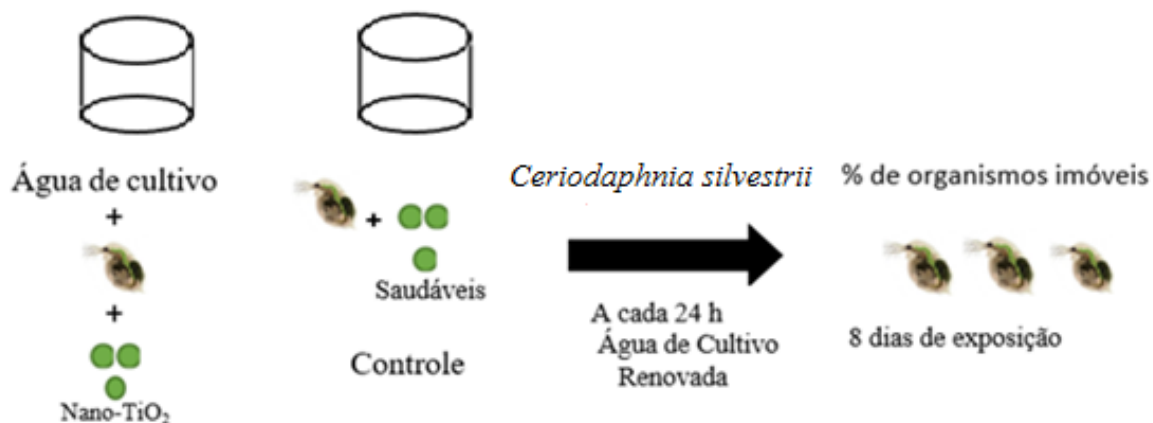


Figura 8. Desenho experimental do teste de toxicidade crônica com o cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* pela contaminação do alimento, a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (círculos verdes), com nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂). Adaptado de Dalai et al. (2014).

3.12. Quantificação do titânio particulado e dissolvido

Para quantificar as concentrações do titânio particulado e do titânio dissolvido nas diferentes concentrações testadas nos testes de toxicidade definitivos com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e do titânio particulado nos testes de contaminação da alga utilizada como fonte alimentar para o cladócero foi empregado o método descrito por Lombardi et al. (2002). Todas as análises foram feitas em triplicatas e as concentrações foram determinadas por meio de um espectrômetro de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES).

3.13. Caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂)

3.13.1. Para o ensaio de toxicidade definitivo com a alga

A caracterização das nano-TiO₂ no meio de cultura LC Oligo foi dada pelo estabelecimento da curva de absorvância das nano-TiO₂ em diferentes comprimentos de onda e pelo espalhamento da luz dinâmica (DLS) para a obtenção, respectivamente, do espectro de absorvância, da distribuição do tamanho para os intervalos de tempo de 0, 24, 48, 72 e 96 horas e do potencial Zeta das nanopartículas no tempo 0 hora.

As curvas de absorvância das nano-TiO₂ foram determinadas na solução-estoque utilizada no teste de toxicidade definitivo com uma cubeta de poliestireno e em uma faixa de comprimento de onda de 400 a 820 nm, variando 10 nm a cada leitura, enquanto que os diâmetros hidrodinâmicos Z-médio das nano-TiO₂ foram medidos na solução-estoque (2000 mg L⁻¹) e na menor (16 mg L⁻¹) e na maior (512 mg L⁻¹) concentração-teste utilizada no ensaio de toxicidade definitivo. As medições foram feitas utilizando o equipamento Malvern Zetasizer (modelo ZS90, Estados Unidos). No total, três réplicas foram feitas e as medidas foram tomadas a partir de 0 hora e a cada 24 horas até completar 96 horas. As medições foram iniciadas em uma posição de medida e atenuador fixados para evitar a otimização do tempo, sendo que o tempo de correlação foi de 2 s e 120 pontos de dados foram obtidos. As réplicas foram armazenadas no escuro para as medidas posteriores. Taxas de contagem derivadas foram incluídas com a finalidade de se comparar a capacidade das partículas permanecerem grandes ou pequenas ao espalhamento da luz. Em relação ao potencial Zeta, esta análise foi feita apenas na solução-estoque do teste de toxicidade definitivo, uma vez que se pretendia conhecer o potencial de agregação das nano-TiO₂ no meio LC Oligo. Este parâmetro também foi obtido por meio do equipamento Malvern Zetasizer (modelo ZS90, Estados Unidos).

3.13.2. Para o ensaio de contaminação das algas

O diâmetro hidrodinâmico das nano-TiO₂ no ensaio de contaminação das algas foi obtido para todas as concentrações testadas (0,01; 1 e 10 mg L⁻¹), em triplicatas, a cada 24

horas, desde a montagem do teste (0 hora) até completar 96 horas. Os valores do potencial zeta das nanopartículas foram obtidos no início do ensaio. Tanto o diâmetro hidrodinâmico quanto o potencial Zeta foram obtidos de acordo com os procedimentos já descritos na seção 3.13.1.

3.13.3. Para o ensaio de toxicidade aguda com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*

O diâmetro hidrodinâmico das nano-TiO₂ no ensaio de toxicidade aguda com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* foi obtido na menor (6,25 mg L⁻¹) e na maior (1600 mg L⁻¹) concentrações testadas, em triplicatas, a cada 24 horas, no início do teste de toxicidade (0 hora) até completar 48 horas. Os valores do potencial Zeta das nanopartículas foram obtidos no início do ensaio.

O diâmetro hidrodinâmico Z-médio e o potencial Zeta no teste definitivo de toxicidade foi realizado de acordo com os procedimentos já descritos na seção 3.13.1.

3.14. Tratamentos dos dados e análises estatísticas

A concentração de inibição para 50% do crescimento da população da alga (CI_{50-96h}) e as concentrações efetivas a 50% da imobilidade dos organismos de *Ceriodaphnia silvestrii* (CE_{50-48h}) nos ensaios com o cloreto de sódio e com as nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) foram calculadas pelo método Probit (Finney, 1971), usando software específico (Programa Probit versão 1.5, U.S. Environmental Protection Agency). Para a definição da Concentração de Efeito Não Observado (CENO) e da Concentração de Efeito Observado (CEO) nos ensaios com as algas e nos ensaios com os cladóceros, todos os dados foram primeiramente checados para normalidade (teste χ^2) e homogeneidade (teste de Bartlett's) da distribuição. Os dados foram analisados pela análise de variância one-way (ANOVA) seguido, pelo teste de Tukey, para identificar diferenças significativas entre o controle e os diferentes tratamentos. Em todos os testes estatísticos, a significância foi aceita quando $\alpha \leq 0,05$.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Caracterização das nanopartículas de TiO₂ nos ensaios de toxicidade

4.1.1. Ensaio de toxicidade crônico definitivo com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

4.1.1.1. Determinação do espectro de absorvância das nanopartículas de TiO₂ em meio LC Oligo

As nano-TiO₂ não tiveram uma banda plasmônica definida nos comprimentos de onda utilizados. Houve apenas um espalhamento de luz e não de absorção, conforme pode ser observado na Figura 9. Os dados brutos da absorvância em diferentes comprimentos de onda podem ser encontrados no Apêndice A Tabela 1.

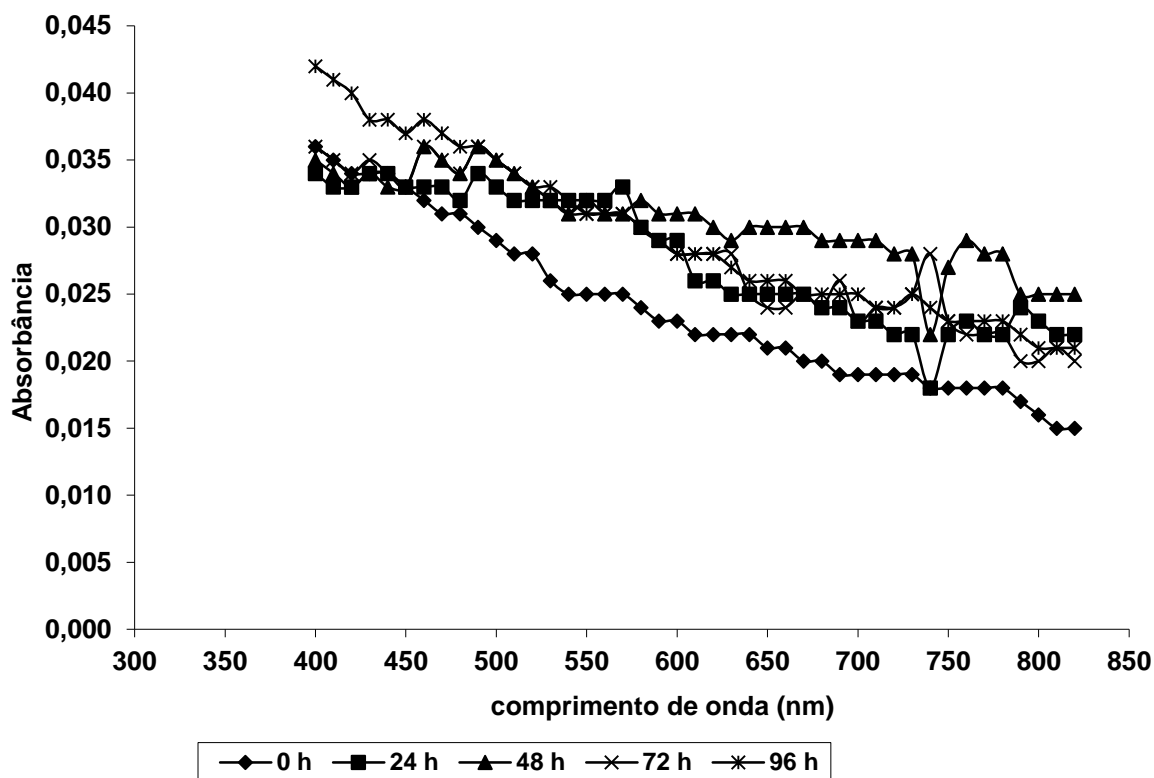


Figura 9. Caracterização do espectro de absorvância das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) dispersas no meio LC Oligo em diferentes comprimentos de onda no espectro do UV-vis ao longo do tempo (de 0 a 96 horas).

4.1.1.2. Diâmetro hidrodinâmico

Os diâmetros hidrodinâmicos das nano-TiO₂ dispersas em meio LC Oligo no tempo 0 hora foram: 890,4 nm para a dispersão de 16 mg L⁻¹, 1527 nm para a dispersão de 512 mg L⁻¹ e 1959 nm para a solução-estoque de 2000 mg L⁻¹. Após 96 horas, o diâmetro hidrodinâmico das nano-TiO₂ na concentração de 16 mg L⁻¹ aumentou aproximadamente 5,9 vezes (5252 nm) o tamanho que apresentava no tempo de 0 hora, enquanto que na concentração de 512 mg L⁻¹ o diâmetro hidrodinâmico da nano-TiO₂ aumentou 1,73 vezes (2642 nm) (Figura 10). Ao longo do tempo, a tendência do diâmetro hidrodinâmico das nano-TiO₂ na menor e na maior concentração testada foi de aumentar até 72 h. O aumento do tamanho hidrodinâmico em função do tempo já foi reportado anteriormente por Sadiq et al. (2011). Outros autores encontraram tamanhos hidrodinâmicos que variaram de 70 a 3096 nm para as nano-TiO₂ quando dispersas ou em água destilada ou em água Milli-Q (Lee e An, 2013; Sadiq et al., 2011). Para dispersões das nano-TiO₂ em meios de cultura algal, o

diâmetro hidrodinâmico variou de 486 a 1024 nm (Fu et al., 2015; Lee e An, 2013; Nur et al., 2015). O tamanho da partícula, tempo de exposição, o meio utilizado para fazer as dispersões (água pura ou meio de cultura) e a concentração de exposição podem influenciar no tamanho hidrodinâmico das nano-TiO₂ (Handy et al., 2008).

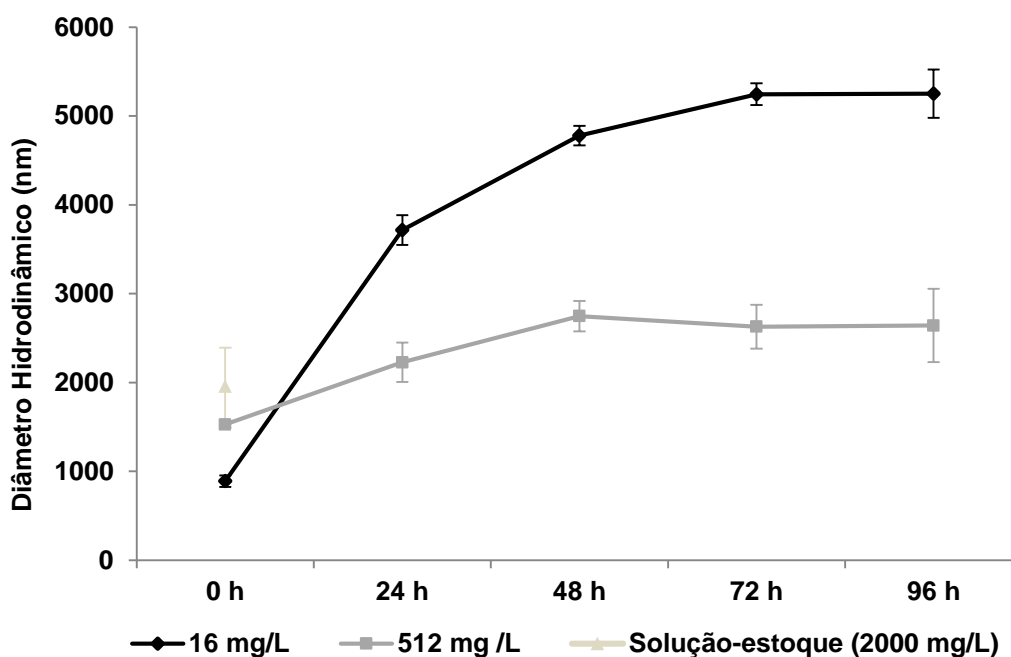


Figura 10. Diâmetro hidrodinâmico (nm) das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) para a menor e para a maior concentração testadas e para a solução-estoque ao longo do tempo (0 a 96 horas) no teste definitivo de crescimento populacional de *Pseudokirchneriella subcapitata*.

4.1.1.3. Índice de polidispersividade (IPd) e potencial Zeta

O índice de Polidispersividade (IPd), o qual indica o quanto as nanopartículas estão dispersas no meio, variou de 0,424 a 0,491 para a concentração de 16 mg L⁻¹ de nano-TiO₂ e variou de 0,143 a 0,426 para a concentração de 512 mg L⁻¹. Um valor de IPd menor ou igual a 0,5 indica que as nanopartículas estão homoganeamente dispersas no meio (Barreto e Silva, 2015). Neste estudo, o IPd ficou dentro deste valor de referência.

O potencial Zeta médio para a solução-estoque com um valor de pH 7,3 no tempo de 0 hora foi de $-23,7 \pm 0,51$ mV (média e desvio-padrão de três réplicas). Esse valor revelou que as nano-TiO₂ utilizadas neste estudo tiveram uma instabilidade incipiente (valores entre ± 10 a ± 30), ou seja, tiveram uma tendência à agregação e sedimentação (Barreto e Silva, 2015). Mariano (2014) encontrou, para o mesmo lote de nano-TiO₂, um valor de potencial Zeta de -40 mV em dispersões de nano-TiO₂ que variaram entre 0,0008 a 0,4 mg L⁻¹ com o mesmo valor de pH (7,3). Este valor foi diferente do encontrado neste estudo e, valores inferiores a -40 , revelam que as nano-TiO₂ possuem baixo potencial de agregação. Visto que o potencial Zeta também é dependente da concentração das dispersões das nanopartículas, esses valores diferentes encontrados para o mesmo lote de nanopartículas é compreensível. Valores brutos do diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de Polidispersividade (IPd) e potencial zeta para o teste de toxicidade crônica definitivo com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* pode ser encontrado no Apêndice D, Tabela 1.

4.1.2. Ensaio de contaminação da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

4.1.2.1. Diâmetro hidrodinâmico

Os diâmetros hidrodinâmicos das partículas de nano-TiO₂ que estavam aderidas na parede celular da clorofícea no tempo de contaminação de 0 hora tiveram os seguintes valores: 930 nm para a dispersão de 0,01 mg L⁻¹, 1199 nm para a dispersão de 1 mg L⁻¹ e 1145 nm para a dispersão de 10 mg L⁻¹. Após 96 horas, o diâmetro hidrodinâmico das nano-TiO₂ na concentração de 0,01 mg L⁻¹ aumentou aproximadamente 3 vezes (3514 nm) o tamanho que apresentava no tempo de 0 hora, enquanto que na concentração de 1 mg L⁻¹, o diâmetro hidrodinâmico da nano-TiO₂ aumentou 1,64 vezes (2838 nm). Para a concentração de 10 mg L⁻¹, o aumento foi de 4,53 vezes (5676 nm) (Figura 11). Ao longo do tempo, a tendência do diâmetro hidrodinâmico das nano-TiO₂ para as concentrações testadas foi aumentar até 72 horas para a maior concentração testada (10 mg L⁻¹). Nas menores concentrações testadas, esse aumento foi verificado até o final do período de exposição.

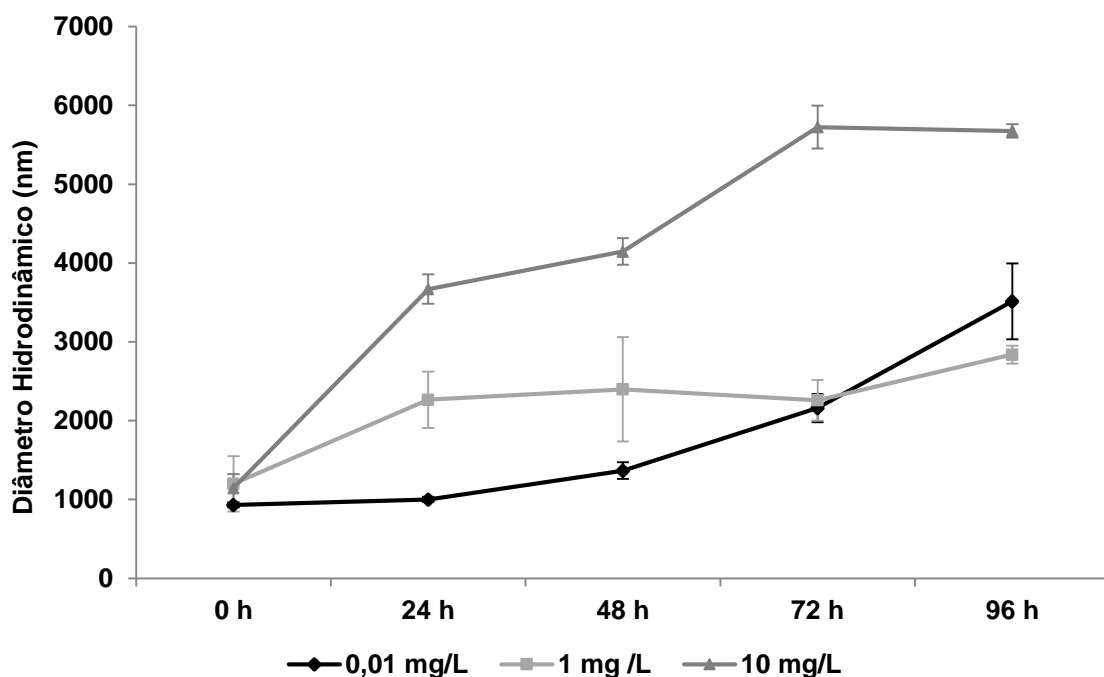


Figura 11. Diâmetro hidrodinâmico (nm) das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) para todas as concentrações testadas ao longo do tempo (0 a 96 horas) no teste de contaminação da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

4.1.2.2. Índice de polidispersividade (IPd) e potencial Zeta

O índice de Polidispersividade (IPd) variou de 0,392 a 0,495 para a concentração de 0,01 mg L⁻¹ de nano-TiO₂, variou de 0,395 a 0,586 para a concentração de 1 mg L⁻¹ e variou de 0,426 a 0,506 para a concentração de 10 mg L⁻¹. Mais uma vez os valores de IPd foram menores ou iguais a 0,5 indicando que as nanopartículas estão homoganeamente distribuídas no meio (Barreto e Silva, 2015). Neste estudo, o IPd ficou dentro deste valor de referência. Clément et al. (2013) diz que, em concentrações baixas (0,01 a 1 mg L⁻¹) de nano-TiO₂, o índice de Polidispersividade aumenta (IPd).

O potencial Zeta médio para a solução-estoque com um valor de pH 7,0 no tempo de 0 hora foi de $-22,43 \pm 0,71$ mV (média e desvio-padrão de três réplicas). Esse valor revelou que as nano-TiO₂ utilizadas neste estudo tiveram uma instabilidade incipiente (valores entre ± 10 a ± 30), ou seja, tiveram uma tendência à agregação e sedimentação (Barreto e Silva, 2015). A tendência na formação desses agregados é dependente da química da superfície das nano-TiO₂, da concentração de partículas que aumentam a probabilidade de contato ou mesmo a composição do meio (Clément et al., 2013). Valores brutos do diâmetro

hidrodinâmico (DH), índice de Polidispersividade (IPd) e potencial zeta para o ensaio de contaminação com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* podem ser encontrados no Apêndice D, Tabela 2.

4.1.3. Ensaio de toxicidade aguda definitivo com o cladóceros *silvestrii*

4.1.3.1. Diâmetro hidrodinâmico

Os diâmetros hidrodinâmicos das nano-TiO₂ dispersas em água reconstituída no tempo 0 hora foram: 852,4 nm para a dispersão de 6,25 mg L⁻¹ e 1079 nm para a dispersão de 1600 mg L⁻¹ e 2852 nm para a solução-estoque de 1600 mg L⁻¹. Após 48 horas, o diâmetro hidrodinâmico das nano-TiO₂ na concentração de 6,25 mg L⁻¹ aumentou aproximadamente 1,9 vezes (2685 nm) o tamanho que apresentava no tempo de 0 hora, enquanto que na concentração de 1600 mg L⁻¹ o diâmetro hidrodinâmico da nano-TiO₂ aumentou 1,3 vezes (2409 nm) (Figura 12). A tendência do diâmetro hidrodinâmico das nano-TiO₂ na menor e na maior concentração testada foi de aumentar em até 24 horas.

Para Marcone et al. (2012), Jiang et al. (2011) e Reeves et al. (2008), o tamanho da partícula influencia na sua toxicidade devido à facilidade de absorção por parte de células algais em contato com partículas pequenas (nm). Esses autores encontraram em seus estudos uma maior toxicidade para partículas menores que 10 nm. Bang et al. (2011) encontraram resultados diferentes para tamanhos diferentes de nano-TiO₂ (21 e 250 nm e 500 nm), indicando que partículas com tamanho menor (21nm) a toxicidade é muito mais elevada do que em partículas maiores. O mesmo ocorreu em um estudo com a bactéria *Escherichia coli* que acumulou partículas pequenas de nano-TiO₂ (anatase), internalizando tais partículas e causando danos à sua membrana celular (Lin et al., 2014).

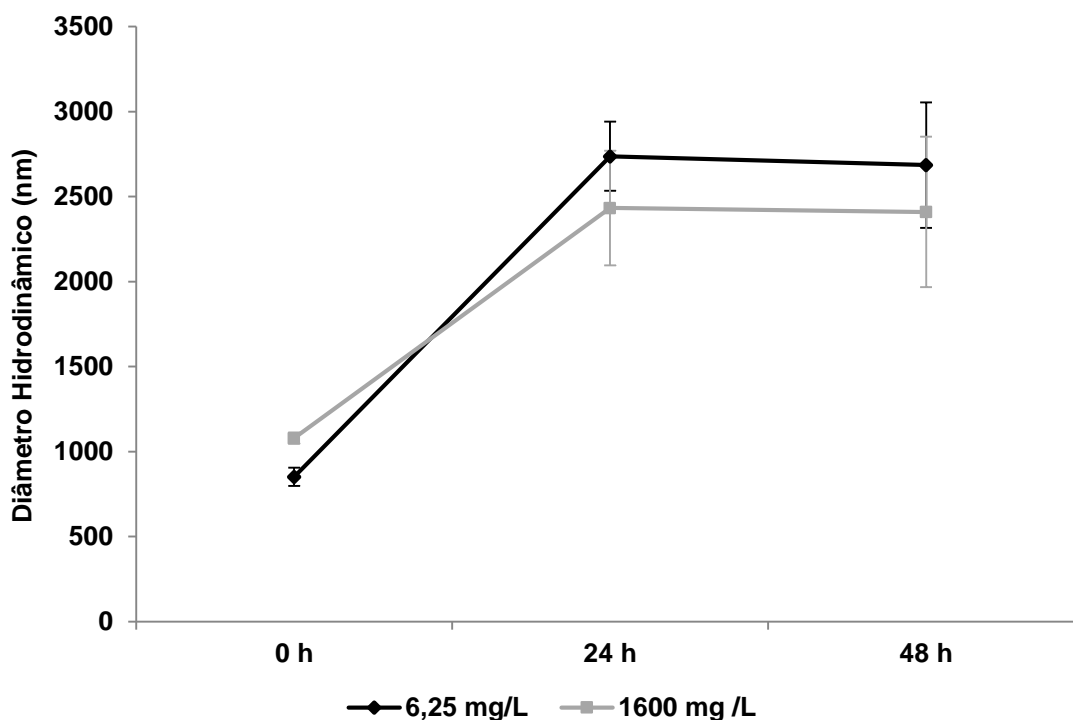


Figura 12. Diâmetro hidrodinâmico (nm) das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) para a menor e para a maior concentração testada no tempo de 0 a 48 horas no teste definitivo de toxicidade aguda com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.

4.1.3.2. Índice de polidispersividade (IPd) e potencial Zeta

O índice de Polidispersividade (IPd) variou de 0,415 a 0,469 para a concentração de 6,25 mg L⁻¹ de nano-TiO₂ e variou de 0,425 a 0,492 para a concentração de 1600 mg L⁻¹. Um valor de IPd menor ou igual a 0,5 indica que as nanopartículas estão homoganeamente dispersas no meio (Barreto e Silva, 2015). Neste estudo, o IPd ficou dentro deste valor de referência.

O potencial Zeta médio para a solução-estoque com um valor de pH 7,0 no tempo de 0 hora foi de $-15,77 \pm 0,25$ mV (média e desvio-padrão de três réplicas). Esse valor revelou que as nano-TiO₂ utilizadas neste estudo tiveram uma instabilidade incipiente (valores entre ± 10 a ± 30), ou seja, tiveram uma tendência à agregação e sedimentação (Barreto e Silva, 2015). Valores brutos do diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de Polidispersividade (IPd) e potencial zeta para o teste de toxicidade aguda com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* podem ser encontrados no apêndice D, tabela 3.

4.2. Análise do desempenho dos métodos empregados para a determinação da densidade celular no ensaio de toxicidade preliminar com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

4.2.1. Método da Absorbância

Na Figura 13, pode-se observar que no controle houve um aumento da absorbância em relação ao tempo de exposição em todos os comprimentos de onda, um padrão que reflete que houve crescimento celular ao longo do tempo. Nas concentrações de 0,001, 0,01 e 1 mg L⁻¹ de nano-TiO₂, houve um aumento da absorbância em relação ao tempo, notadamente até 72 horas de exposição, em todos os comprimentos de onda. No entanto, para a concentração de 0,1 mg L⁻¹, ocorreu uma diminuição da absorbância em 72 horas, seguido por um aumento da absorbância em 96 horas, para todos os comprimentos de onda. Na concentração de 10 mg L⁻¹, não foi observado um padrão de aumento ou de decréscimo nos valores de absorbância relacionado com o tempo de exposição. Apesar disso, nessa concentração foram registrados os maiores valores de absorbância em relação às demais concentrações. A falta de um padrão do tipo concentração-resposta nos valores de absorbância obtidos deve ter sido ocasionada pela interferência do espalhamento da luz dada pelas nano-TiO₂ em conjunto com a formação dos agregados de células algais e nanopartículas. Quanto maior a concentração das nanopartículas no meio de dispersão, maior é o espalhamento de luz dado por elas e maior o valor de absorbância obtido.

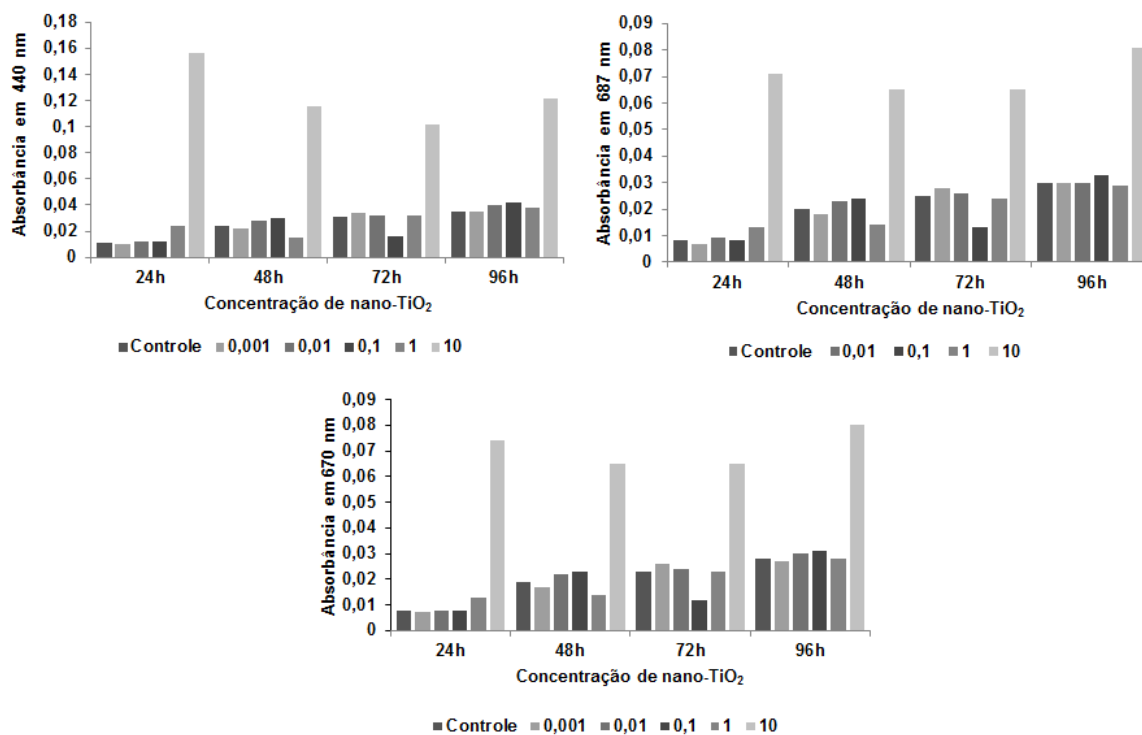


Figura 13. Valores de absorbância nos comprimentos de onda de 440, 687 e 670 nm obtidos no controle e em diferentes concentrações das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) testadas para um período de exposição de 96 horas, no ensaio de toxicidade preliminar com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

4.2.2. Método da Fluorescência

Na Figura 14, pode-se observar que no controle houve um aumento da fluorescência em relação ao tempo de exposição, um padrão que reflete que houve crescimento celular ao longo do tempo. Nas concentrações de 0,001, 0,01, 1 e 10 mg L⁻¹ de nano-TiO₂, houve um aumento da fluorescência em relação ao tempo. Já para a concentração de 1 mg L⁻¹, observou-se uma queda na fluorescência a partir de 48 horas de exposição, quando comparado ao controle, tal exceção não pode ser explicada. Além disso, na concentração de 10 mg L⁻¹, foi observado a partir de 72 horas um aumento da fluorescência em relação ao controle. Nesse caso, as algas podem ter sintetizado mais clorofila devido ao efeito de sombreamento dado pelas nano-TiO₂ (Aruoja et al., 2009).

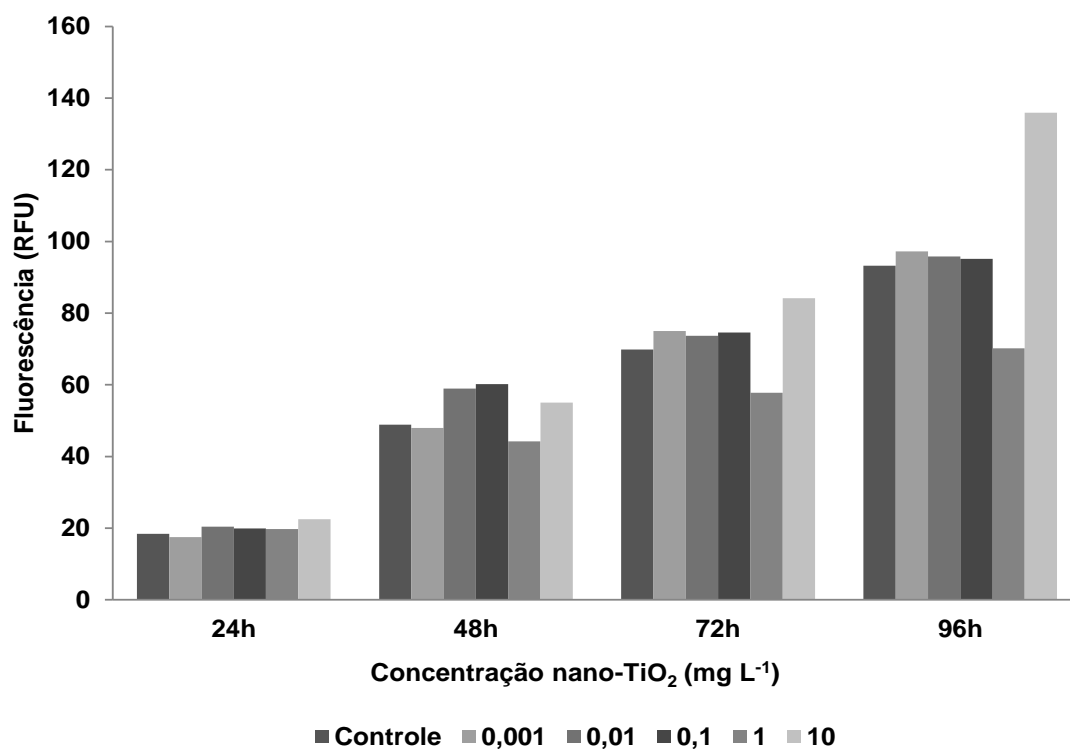


Figura 14. Valores de fluorescência obtidos para as diferentes concentrações de nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) testadas e no controle para o ensaio de toxicidade preliminar com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* com um período de exposição de 96 horas.

Não foi observado um padrão de aumento ou de decréscimo nos valores de fluorescência relacionado com cada tempo de exposição (Figura 14). Como observado anteriormente para a absorvância, a falta de um padrão do tipo concentração-resposta nos valores de fluorescência obtidos pode ter sido ocasionada pela interferência do espalhamento da luz dada pelas nano-TiO₂ em conjunto com a formação dos agregados de células algais e nanopartículas. Aruoja et al. (2009), a partir da concentração de 10 mg L⁻¹, observaram a formação de grandes agregados de células algais e nano-TiO₂ por meio de microscopia de fluorescência, sugerindo que tais agregados podiam reduzir a disponibilidade de luz para as células algais e, assim, inibir o seu crescimento. Além disso, para amenizar o estresse sofrido pela exposição às nano-TiO₂, as algas produzem uma maior quantidade de polissacarídeos (Nielsen et al., 2008). Tais exsudatos funcionam como ligantes orgânicos, podendo se ligar aos metais e permitir a acumulação crescente de nano-TiO₂ nas paredes celulares das algas, acelerando também a sua sedimentação (Lin et al., 2008). Desta forma, a agregação das células algais com as nano-TiO₂ pode ter implicações ecológicas relevantes que podem levar a efeitos adversos para o ecossistema como um todo (Baveye e Laba, 2008).

Já é conhecido que as nano-TiO₂ têm propriedades fotorreativas (Aruoja et al., 2009), existindo relatos da sua fotoatividade quando elas são expostas à radiação UV desde o início do século XX (Hashimoto et al., 2005; Konaka et al., 1999). Hartmann et al. (2010) e Lee e An (2013) observaram que as nano-TiO₂ têm propriedades de absorver a luz visível, inibindo o crescimento das algas e causando a desestabilização de suas membranas.

4.2.3. Clorofila-*a*

A concentração de clorofila-*a* das algas pode ser utilizada como uma medição da sua saúde fisiológica (Eaton et al., 1995), assim como pode ser utilizada como estimativa de biomassa de culturas algais.

Em relação à concentração de clorofila-*a*, observou-se neste estudo que não existiu um padrão entre o conteúdo desse pigmento nas células algais do controle e dos diferentes tratamentos ao longo do período de exposição de 96 horas (Figura 15). Mais uma vez, os agregados entre as células algais e as nano-TiO₂ foram possivelmente os responsáveis pela falta de uma resposta padrão definida, uma vez que a concentração de clorofila-*a* é estimada por meio de métodos que utilizam a absorbância (Figura 15).

Hartmann et al. (2010) e Sadiq et al. (2011) encontraram uma redução de 50% do teor de clorofila-*a* nas algas *Scenedesmus* sp e *Chlorella* sp ao final do tempo de exposição de 72 horas nas concentrações de 16,12 mg L⁻¹ e 21,20 mg L⁻¹ de nano-TiO₂. Metzeler et al. (2012) sugeriam que a concentração de clorofila-*a* nas células algais de *Pseudokirchneriella subcapitata* foi influenciada pela presença das nanopartículas. Com o aumento da turbidez e da adsorção dos nutrientes sobre a superfície das nanopartículas, houve inclusive uma diminuição da produção de alimento. Outro resultado encontrado por Iswarya et al. (2015) foi que as nano-TiO₂ também podem produzir espécies reativas de oxigênio (ERO), influenciando no crescimento e, portanto, no conteúdo de clorofila das algas.

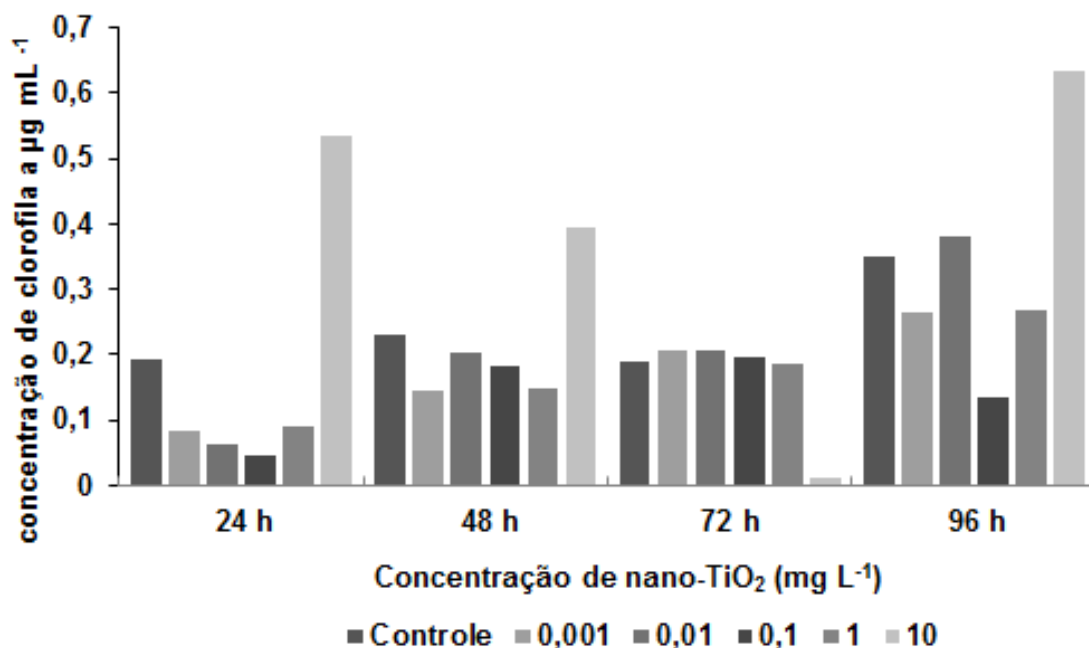


Figura 15. Valores da concentração de clorofila-*a* ($\mu\text{g mL}^{-1}$) obtidos nas diferentes concentrações de nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) testadas e no controle para o ensaio de toxicidade preliminar com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, por um período de exposição de 96 horas.

4.2.4. Determinação da densidade celular por contagem direta em microscópio óptico

Foi possível observar uma resposta de inibição da densidade celular das algas em relação ao aumento das concentrações de nano-TiO₂ apenas em 72 horas (Figura 16). Para os demais períodos de tempo (24, 48 e 96 horas), foi possível observar um padrão irregular na concentração-resposta (Figura 16). Isso ocorreu devido à formação de agregados entre as células algais e de nano-TiO₂, o que dificultou a contagem de células de uma forma acurada.

Lin (2008) observou que a superfície das nano-TiO₂ podem interagir eletrostaticamente com a parede celular das algas, fazendo com que as nanopartículas sejam adsorvidas pela parede celular da alga e, assim, formando também agregados entre as células algais e as nano-TiO₂. Em valores de pH inferiores a 6,4, essa interação torna-se mais favorável do que em valores mais elevados de pH (Lin, 2008). Os dados brutos relativos aos testes preliminares de toxicidade crônica com a clorófitca *Pseudokirchneriella subcapitata* expostas às nano-TiO₂ podem ser encontrados no Apêndice B, Tabelas 1, 2, 3 e 4.

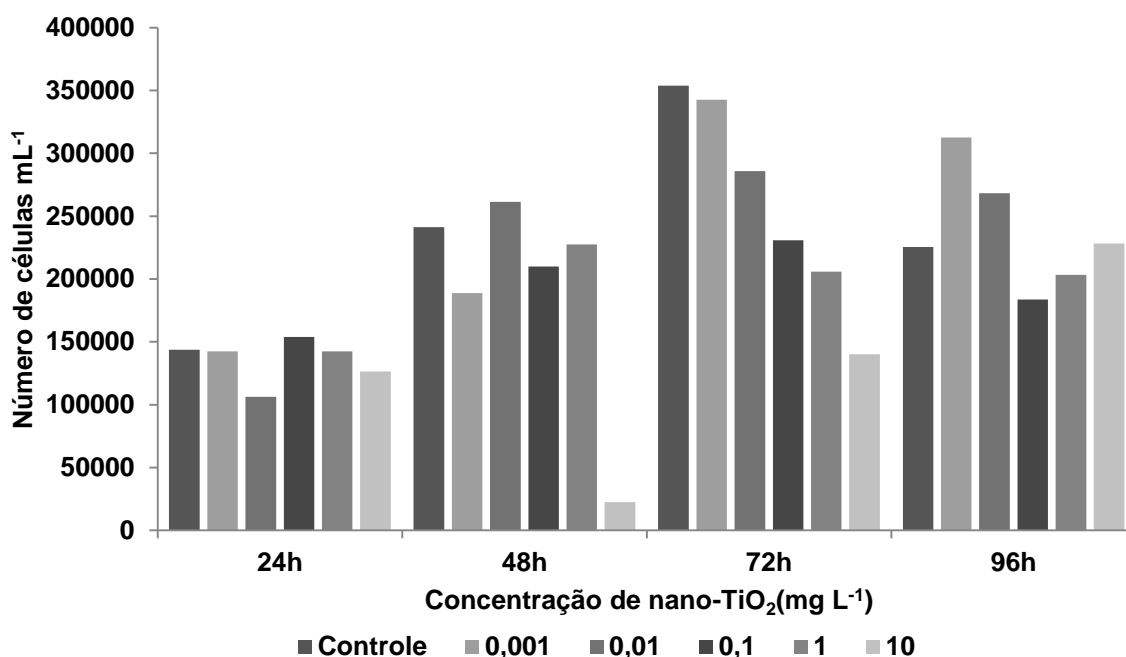


Figura 16. Valores da densidade algal (células por mL⁻¹) obtidos nas diferentes concentrações de nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) testadas e no controle para o ensaio de toxicidade preliminar da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* com um período de exposição de 96 horas.

4.3. Métodos empregados para a separação das células

Não foi possível separar os agregados de células algais e de nanopartículas com o emprego dos métodos agitação em vórtex e banho ultrassônico e, por conseguinte, não foi possível quantificar a densidade celular das algas para esses casos. No método em que foi combinado o uso do quelante EDTA e do vórtex, além de não separar os agregados das células algais e das nanopartículas, também foi possível observar a perda de células por rompimento.

O único método empregado, no qual foi possível obter a separação dos agregados das células algais e das nanopartículas, foi o método da lavagem com o quelante EDTA. O melhor resultado foi encontrado para o tempo total de 3 minutos de lavagem (três lavagens com uma duração de 1 minuto cada). Após a separação das células, foi possível estimar a densidade celular em até 72 horas após a lavagem com EDTA e a fixação das células com lugol, foi possível ainda encontrá-las sem a formação de agregados. Este método foi considerado o mais adequado para desagregação das células e obtenção da densidade celular

da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando as células algais foram expostas à nanopartícula estudada. Este método foi utilizado no teste de toxicidade definitivo para a quantificação da densidade celular. Desta forma, é recomendado que este método seja utilizado na quantificação da densidade celular das algas em ensaios realizados com as nano-TiO₂, a fim de que este parâmetro seja obtido de uma forma acurada.

4.4. Teste de toxicidade definitivo com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

Uma inibição do crescimento algal foi encontrada a partir da concentração de 64 mg L⁻¹ de nano TiO₂ para o período de exposição de 24 horas. Para os períodos de 48 e 72 horas de exposição, houve uma recuperação do crescimento, seguida por decréscimo para o período de exposição de 96 horas. A partir da concentração de 256 mg L⁻¹, o crescimento das células algais foi inibido em relação ao controle para todos os períodos de exposição ($F_{4,14} = 181,76$, $p < 0,001$) (Figura 17).

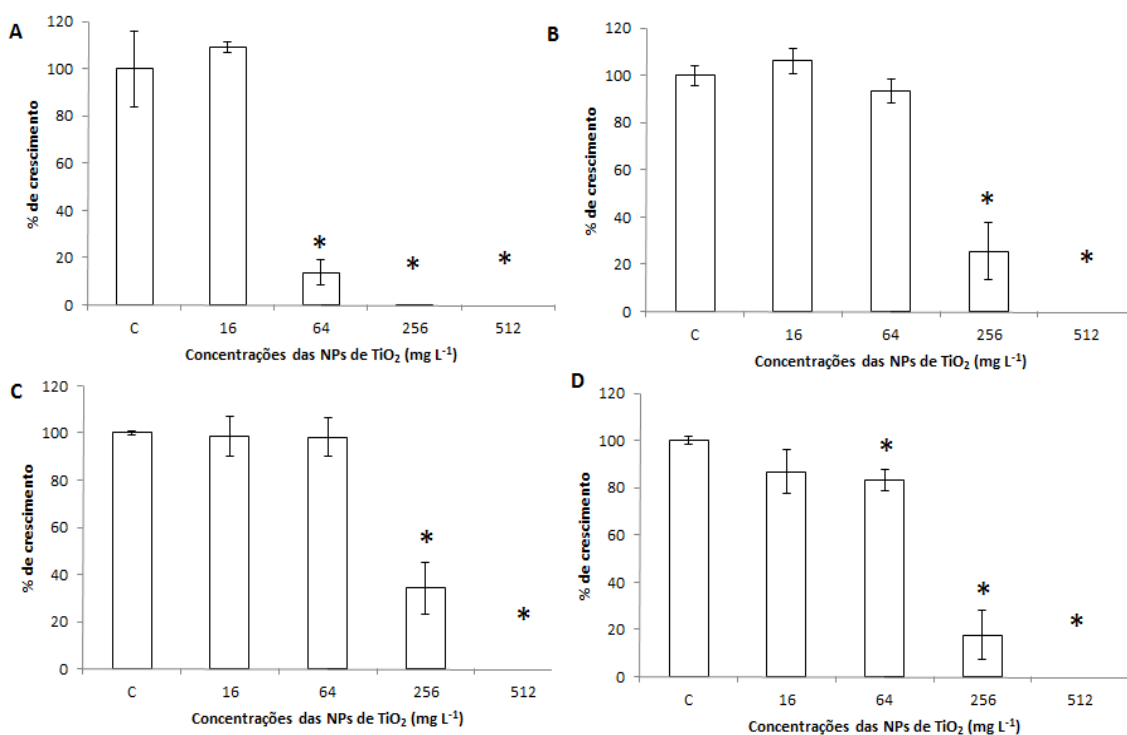


Figura 17. Porcentagem do crescimento (média para três réplicas \pm desvio-padrão) da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* exposta a diferentes concentrações de nano-TiO₂ em 24 horas (A), 48 h (B), 72 h (C) e 96 h (D). O símbolo * refere-se a uma diferença significativa em relação ao controle (teste de Tukey, $p \leq 0,05$).

Dentre as concentrações testadas, a maior concentração efetiva com efeito não observado (CENO) foi de 16 mg L⁻¹, na qual nenhuma diferença significativa no crescimento foi observada em relação ao controle. Já a menor concentração efetiva com efeito observado (CEO) foi obtida na concentração de 64 mg L⁻¹.

A CI₅₀ – 24 h estimada neste estudo para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta às nano-TiO₂ foi de 113,81 mg L⁻¹, com um intervalo de confiança de 95% (IC 95%) entre 80,62 e 134,53 mg L⁻¹. Após 48 horas de exposição, a CI₅₀ foi de 246,03 mg L⁻¹, com IC 95% entre 228,46 e 265,14 mg L⁻¹. Em 72 horas, a CI₅₀ foi de 262,74 mg L⁻¹ de nano-TiO₂, com IC 95% entre 237,87 e 279,08 mg L⁻¹, enquanto que a CI₅₀ - 96 h foi de 201,22 mg L⁻¹, sendo que o IC 95% situou-se entre 187,66 e 213,53 mg L⁻¹. Essas concentrações de nanopartículas de titânio são bem mais elevadas do que aquelas encontradas em corpos de águas doces naturais, ou seja, concentrações que variam de 0,7 a 16 µg L⁻¹ (Mariano, 2014; Muller e Nowack, 2008).

Vários estudos ecotoxicológicos que utilizaram a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* como um organismo-teste na avaliação dos efeitos das nano-TiO₂ são encontrados na literatura. Os resultados, em grande parte, foram bastante diversos, sendo encontrados valores de CI₅₀ que variaram desde 2,53 até 241 mg L⁻¹ de nano-TiO₂ quando as microalgas foram expostas por um período de tempo de 72 horas (Arouja et al., 2009; Hartmann et al., 2010; Hund-Rinke et al., 2010; Lee e An, 2013).

Baveye e Laba (2008) reportaram que pequenas alterações como, por exemplo, no pH ou na força iônica do meio de cultura algal, podem interferir na formação de tamanhos diferentes de agregados de nano-TiO₂ e, por conseguinte, ter efeitos tóxicos distintos sobre as células algais. Neste trabalho, o pH no meio de cultivo das algas variou entre 7,5 (0 hora) a 8,2 (96 horas) (Tabela 2), uma variação inferior a uma unidade (ABNT, 2011). Em seu trabalho, Lin (2008) relacionou as variações do pH com a capacidade da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* adsorver as nano-TiO₂ em sua parede celular. Segundo esse autor, no geral, a adsorção das nano-TiO₂ aumenta com o aumento do pH até o valor máximo de pH de 6,9, diminuindo em seguida com o aumento do pH. Por exemplo, as células algais conseguiram captar as nano-TiO₂ cerca de 1,23 vezes o seu próprio peso, quando o pH atingiu 4,2. Isso explicaria, em parte, os resultados tão distintos encontrados na literatura em relação à toxicidade das nano-TiO₂ a esta espécie de alga verde.

Tabela 2. Valores de pH no controle e nos diferentes tratamentos (mg L^{-1}) medidos a cada 24 horas nos meios de cultura da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* no teste de toxicidade definitivo.

	24 h	48 h	72 h	96 h
Controle	7,9	7,8	7,9	7,9
16	8,2	8,0	8,0	8,2
64	8,0	8,0	8,0	8,1
256	8,0	8,0	8,0	8,2
512	8,0	8,0	8,0	8,2

Hartmann et al. (2010) encontraram uma CI_{50} de 241 mg L^{-1} ao expor a clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata* às nano- TiO_2 por 72 horas em combinação com uma fonte de luz ultravioleta. Este valor foi muito similar ao encontrado neste estudo. Por outro lado, Aruoja et al. (2009) encontraram uma CI_{50} - 72 h de $5,8 \text{ mg L}^{-1}$, um valor muito menor do que aquele encontrado neste estudo. Diferentes tipos e tamanhos de partículas como também as diferentes metodologias utilizadas nos testes e os meios de ensaio, podem explicar as diferentes respostas das algas às nano- TiO_2 (Hartmann et al., 2010; Kulacki e Cardinale, 2012; Metzler et al., 2012).

Comparando os resultados obtidos neste estudo com os resultados encontrados para outras espécies de algas verdes, Kulacki e Cardinale (2012) observaram uma inibição no crescimento da clorofícea *Spirogyra communis* e um estímulo no crescimento da clorofícea *Stigeoclonium tenue*, indicando que quanto maiores as concentrações de nano- TiO_2 , maiores seus efeitos positivos ou negativos de acordo com a espécie. Hund-Rinke e Simon (2006) encontraram, para a alga *Desmodesmus subspicatus*, uma CI_{50} - 72 h de 32 mg L^{-1} , quando as células algais foram expostas a nano- TiO_2 de aproximadamente 25 nm de diâmetro. Sadiq et al. (2011) observaram um efeito inibidor para duas espécies de alga verde durante exposições de 72 horas de duração, sendo a CI_{50} de $16,12 \text{ mg L}^{-1}$ para a *Chlorella* sp. e CI_{50} de $21,2 \text{ mg L}^{-1}$ para a *Scenedesmus* sp. Para a microalga marinha *Dunaliella tertiolecta*, uma CI_{50} - 96 h de $24,10 \text{ mg L}^{-1}$ das nano- TiO_2 dispersas em água do mar foi encontrada. Portanto, devido aos diferentes valores de CI_{50} (72 horas ou 96 horas), podemos dizer que, dentre as espécies de microalga estudadas, *Pseudokirchneriella subcapitata* foi a menos sensível às nano- TiO_2 .

4.5. Ensaio de viabilidade celular no teste de toxicidade definitivo com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*

Nos ensaios de viabilidade celular, somente as células que foram expostas às concentrações de 16 e 64 mg L⁻¹ de nano-TiO₂ permaneceram viáveis. Para as concentrações de 256 e 512 mg L⁻¹ de nano-TiO₂, não houve crescimento das células, o que demonstra que as nano-TiO₂ tiveram um efeito algicida nestas concentrações. Iswarya et al. (2015) e Navarro et al. (2008) em seus estudos confirmaram a diminuição da viabilidade celular, sendo que a toxicidade das nano-TiO₂ foi condicionada pelo tempo de exposição. Também, a estabilidade da membrana celular das algas pode ser afetada pela presença das nano-TiO₂, causando como consequência a sua ruptura e levando à morte celular (Elsaesser e Howard, 2012).

4.6. Quantificação das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) nos meios de ensaio

4.6.1. Para o ensaio de toxicidade definitivo com a alga

A quantificação das concentrações testadas de nano-TiO₂ mostrou que as concentrações reais foram próximas as concentrações nominais esperadas (99 a 105%). Assim, todas as concentrações foram relatadas como concentrações nominais.

A concentração do metal particulado foi sempre maior quando comparada com a concentração do metal dissolvido, tanto no início do ensaio (0 hora) quanto ao final de 96 horas de exposição. Após 96 horas, houve um aumento da concentração do titânio na sua forma dissolvida (Tabela 3). Portanto, as nano-TiO₂ sofreram ionização, aumentando a concentração de íons de titânio no meio de cultivo da alga, apesar de se ter relatos que as nano-TiO₂ são difíceis de ionizar (Jacobasch et al., 2014). Os dados brutos referentes a quantificação das nano-TiO₂ no teste de toxicidade definitivo podem ser encontrados no Apêndice C, Tabela 1.

Tabela 3. Valores das concentrações nominais e reais (total, particulado e dissolvido e porcentagem de variação entre as concentrações nominais e reais) para todas as concentrações testadas de nanopartículas de dióxido de titânio (mg L^{-1}) no início (0 hora) e no final (96 horas) do teste de toxicidade definitivo com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Início do teste (0 h)				
Concentração nominal	Concentração real			Variação (%)
	Total	Particulado	Dissolvido	
0	0	0	0	0
16	16,8	16,0	0,8	105,0
64	65,3	64,5	0,8	102,0
256	256,3	255,5	0,9	100,1
512	514,6	513,8	0,8	100,5
Final do teste (96 h)				
Concentração nominal	Concentração real			Variação (%)
	Total	Particulado	Dissolvido	
0	0	0	0	0
16	15,8	11,0	4,8	99,0
64	63,9	44,9	19,0	99,8
256	255,3	178,7	76,6	99,7
512	509,6	352,2	157,4	99,5

4.6.2. Para o ensaio de contaminação das algas

A quantificação da concentração do metal particulado foi feita com o objetivo mensurar a concentração de nano-TiO₂ no interior da célula e na parede celular da clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata* após passarem pelo processo de uma lavagem e três lavagens com o quelante EDTA. Após 96 horas de exposição, foi observado que as nano-TiO₂ ficaram aderidas na parede celular da clorofícea, uma vez que com o processo de três lavagens todo o metal foi perdido, por isso, para os ensaios de contaminação das algas, a lavagem com o quelante EDTA foi feita uma única vez (Tabela 4). Dalai et al. (2014) ao exporem as células algais de *Scenedesmus obliquus* às nano-TiO₂ também realizaram o

procedimento de lavagem, no mínimo três vezes, após 48 horas de exposição com o mesmo objetivo deste estudo, o que acarretou uma baixa toxicidade para o cladóceros *Daphnia magna*, não sendo alcançado 50% de mortalidade. Provavelmente, isso aconteceu devido à perda das nano-TiO₂ que ficaram aderidas à parede celular da alga. Os dados brutos referentes a quantificação das nano-TiO₂ no teste de contaminação da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* podem ser encontrados no Apêndice C, Tabela 2.

Tabela 4. Valores médios das concentrações de titânio particulado após o processo de uma e três lavagens no teste de contaminação da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Titânio Particulado mg L ⁻¹ (96 h)				
Concentração Nominal	Lavagem 1 x	Variação (%) para lavagem 1 x	Lavagem 3 x	Variação (%) para lavagem 3 x
0	0,000	0	0,000	0
0,01	0,020	200	0,000	0
1	1,078	107,8	0,000	0
10	10,389	103,9	0,000	0

4.7. Teste de sensibilidade com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*

Os valores de CE₅₀ - 48 h dos testes de sensibilidade com o cloreto de sódio (NaCl) para o organismo-teste *Ceriodaphnia silvestrii* ficaram dentro dos limites inferior e superior da carta controle determinada neste estudo, i.e., 1,00 a 1,48 g L⁻¹, indicando que os organismos estavam saudáveis para serem utilizados nos testes de toxicidade aguda e crônica (Tabela 5).

Takenaka (2007) determinou para o mesmo organismo-teste uma faixa de sensibilidade de 0,76 - 1,46 g L⁻¹ com o cloreto de sódio (NaCl), enquanto que Machado et al. (2009) obtiveram uma faixa de sensibilidade de 1,22 – 1,52 g L⁻¹. Tais valores são muito semelhantes aos encontrados neste estudo, o que comprova que os indivíduos de *Ceriodaphnia silvestrii* estavam aptos para os ensaios de toxicidade (Figura 18).

Os dados brutos relativos aos testes de sensibilidade com o cloreto de sódio (NaCl) para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* se encontram no Apêndice E, Tabelas 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Tabela 5. Valores de CE₅₀ - 48 h e respectivos intervalos de confiança, desvio-padrão, coeficiente de variação e da sensibilidade do organismo-teste *Ceriodaphnia silvestrii* para a substância de referência cloreto de sódio (NaCl), em seis ensaios de toxicidade.

Números de ensaio	CE ₅₀ (48h) IC g L ⁻¹
1	1,18 (1,15 - 1,21)
2	1,13 (1,11 - 1,15)
3	1,27 (1,15 - 1,41)
4	1,29 (1,24 - 1,34)
5	1,15 (1,04 - 1,27)
6	1,44 (1,39 - 1,49)
Média g L ⁻¹	1,24
Desvio Padrão	0,12
Coeficiente de Variação (%)	9,68
Faixa de Sensibilidade g L ⁻¹	1,00 – 1,48

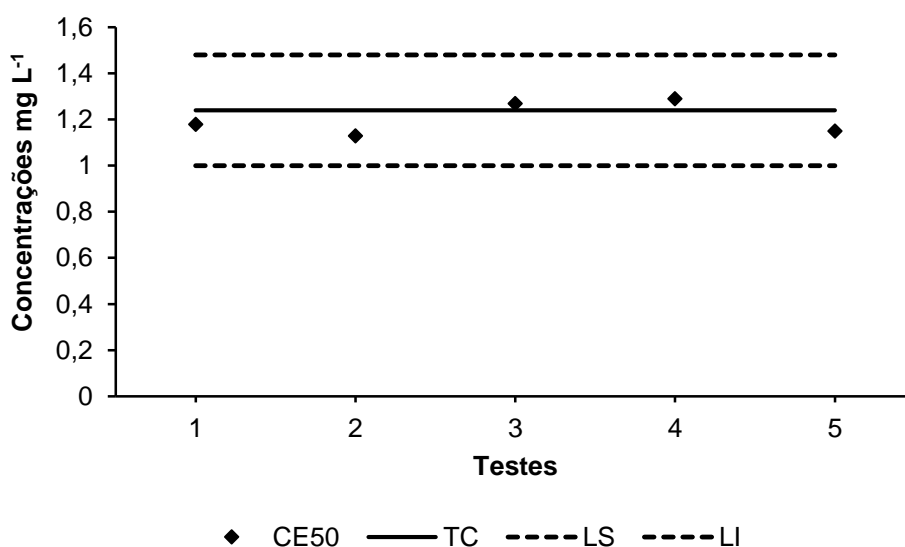


Figura 18. Faixa de sensibilidade do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* ao cloreto de sódio (NaCl). Concentração de Efeito (CE₅₀), Tendência Central (TC), Limite Superior (LS) e Limite Inferior (LI).

4.8. Teste de toxicidade aguda com as nano-TiO₂ utilizando o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* como organismo-teste

De acordo com os testes de toxicidade preliminares (Apêndice F, tabelas 1 e 2), foi determinada uma ampla faixa de concentrações entre 6,25 a 1600 mg L⁻¹ para a realização dos testes definitivos. As concentrações estabelecidas para os testes definitivos foram: 6,25; 12,5; 25; 50; 100; 200; 400; 800 e 1600 mg L⁻¹. O pH, a dureza, a concentração de oxigênio dissolvido e a temperatura das soluções testadas não apresentaram diferenças observadas nos intervalos de tempo testados. Portanto, não foram essas variáveis físicas e químicas da água que afetaram a sobrevivência dos organismos-teste. Nos testes agudos definitivos, os valores iniciais e finais de pH variaram de 7,00 a 8,53, a dureza ficou entre 40 a 43 mgCaCO₃ L⁻¹, a amplitude de variação do oxigênio dissolvido foi de 7,42 a 8,11 e a temperatura ficou dentro da faixa estabelecida pela ABNT (2010) de 25° C ± 1°C.

Para os quatro testes de toxicidade aguda, os valores de CE₅₀ foram: 96,59; 84,20; 48,70 e 80,80 mg L⁻¹, respectivamente (Tabela 6). Nos controles, para todos os testes durante o período de exposição, não foi observada a ocorrência de mais de 10% de organismos imóveis, sendo os mesmos, portanto, considerados válidos. Até a concentração de 25 mg L⁻¹, menos de 10% dos organismos ficaram imóveis, enquanto que a partir da concentração de 50 mg L⁻¹, em média, mais de 30% dos organismos ficaram imóveis no final das 48 h de exposição. Na concentração de 400 mg L⁻¹, 95% dos organismos ficaram imóveis e, a partir da concentração de 800 mg L⁻¹, 100% dos organismos ficaram imóveis (Figura 19). Os dados brutos relativos aos testes definitivos de toxicidade aguda com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* se encontram no Apêndice G, Tabelas 1, 2, 3 e 4.

Tabela 6. Valores de CE₅₀ - 48 h das nanopartículas de dióxido de titânio, e seus respectivos intervalos de confiança, para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* em testes de toxicidade aguda.

Números de Ensaio	CE ₅₀ (48h) IC mg L ⁻¹
1	96,59 (74,29 - 125,60)
2	84,20 (61,80 - 114,40)
3	48,70 (39,98 - 57,42)
4	80,80 (74,66 - 86,94)
Média mg L ⁻¹	77,57
Desvio Padrão	20,41
Coeficiente de Variação (%)	26,31

Zhu et al. (2009 a) encontraram 100% de imobilidade para *Daphnia magna* em 48 horas de exposição com nano-TiO₂ a partir da concentração de 500 mg L⁻¹. Wang et al. (2011), para a espécie *Ceriodaphnia dubia*, não encontraram nenhuma toxicidade com as nano-TiO₂ em concentrações inferiores a 400 mg L⁻¹ em 96 horas de exposição. Já Clément et al. (2013) obtiveram 100% de organismos imóveis de *Daphnia magna* na concentração de 100 mg L⁻¹, bem abaixo dos encontrados neste estudo. Assim como Lovern e Klaper (2006) encontraram em seu estudo para *Daphnia magna* uma porcentagem baixa de organismos-imóveis (9%) na concentração de 500 mg L⁻¹ em exposição com nano-TiO₂ sonicadas em água destilada e seus dados indicaram também, uma maior toxicidade CL₅₀ - 48 h de 5,5 mg L⁻¹ de nano-TiO₂ previamente filtrada (tetrahydrofurano).

Para outra espécie de crustáceo, o *Thamnocephalus platyurus*, Heinlaan et al. (2008) não encontraram nenhuma toxicidade para a concentração de 20 g L⁻¹ em 72 horas de exposição, mas eles encontraram uma mortalidade de 60% para *Daphnia magna* para a mesma concentração em 48 horas de exposição.

Os resultados encontrados neste estudo demonstraram um aumento na toxicidade aguda com o aumento das concentrações de nano-TiO₂ testadas (Figura 19). Zhu et al. (2009 a) também encontraram uma relação entre o aumento na toxicidade aguda para a *Daphnia magna* com o aumento gradual das concentrações testadas. Isso pode ser explicado pelo

aumento no gasto energético sofrido por esses organismos para a manutenção da vida, que aumenta proporcionalmente com o aumento da concentração de nano-TiO₂ (Li et al., 2011).

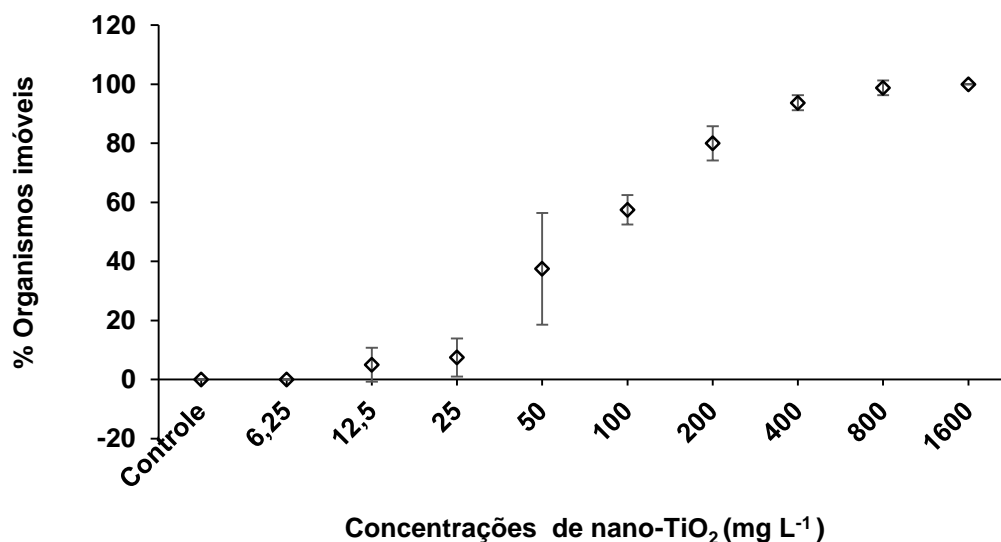


Figura 19. Média das porcentagens (\pm desvio-padrão) de organismos imóveis do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* durante os quatro testes de toxicidade aguda definitivos com as nanopartículas de dióxido de titânio após 48 horas de exposição.

Variações nos resultados em testes de toxicidade aguda com nano-TiO₂ podem ser influenciados por procedimentos divergentes no preparo da solução-teste, a duração do tempo de exposição, o tamanho e a forma alotrópica das nano-TiO₂ que causam uma variabilidade nos valores de CE₅₀ encontrados na literatura para diferentes organismos aquáticos (Clément et al., 2013; Griffitt et al., 2008; Zhu et al., 2009 a; 2010 a). Para Baveye e Laba (2008) e Li et al. (2011) a capacidade de agregação das nano-TiO₂ também podem induzir a sua toxicidade, e, conseqüentemente, acarretar efeitos biológicos específicos para cada organismo-teste.

Para os testes de toxicidade aguda com nano-TiO₂, a maioria dos estudos encontrados na literatura utilizaram como organismos-teste os cladóceros. Isso ocorre porque tais organismos são filtradores podendo ser mais suscetíveis a exposição de nanomateriais do que outros organismos (Griffitt et al., 2008) (Tabela 7). A falta de parâmetros metodológicos e a inconsistência de dados disponíveis até o momento impedem uma comparação avaliativa significativa, reforçando a necessidade de estudos ecotoxicológicos adicionais e a

caracterização físico-química que possam garantir a consistência dos resultados (Lin et al., 2014).

Tabela 7. Valores de CE/CL₅₀ para as nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) para diversas espécies de cladóceros e outros organismos compilados da literatura, e comparados com o valor obtido no presente estudo para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.

Espécies de Cladóceros			
Organismos-teste	Resultados mg L ⁻¹	Comentários	Autores
<i>Ceriodaphnia silvestrii</i>	CE ₅₀ - 48 h: 77,57	Solução-teste água reconstituída	Presente estudo
<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ - 72 h: 1,62	Solução-teste água reconstituída	Zhu et al. (2010 b)
<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ - 48 h: 3,40	Água de rio depois da exposição à radiação UV-A	Amiano et al. (2012)
<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ - 72 h: 3,44	Solução-teste água reconstituída	Clément et al. (2013)
<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ - 72 h: 3,80	Meio de teste do protocolo ISO	Dabrunz et al. (2011)
<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ - 48 h: 5,50	Solução-estoque feita com o solvente tetrahidrofurano e água Milli-Q. O solvente foi evaporado.	Lovern e Klaper et al. (2006)
<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ - 48 h: 35,30	Solução-teste água reconstituída.	Zhu et al. (2009 a)
<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ - 48 h: > 100	Meio de teste água superficial do rio Selz, Alemanha.	Wiench et al. (2009)
<i>Daphnia magna</i>	CE ₅₀ - 48 h: 134,7	Solução-teste água reconstituída.	Clément et al. (2013)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CL ₅₀ - 48 h: > 10	Solução-teste água doce moderadamente dura da Universidade da Florida.	Griffitt et al. (2008)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CE ₅₀ - 48 h: 33,65	Meio de teste água do lago Vit, Vellore, Índia.	Dalai et al. (2013)
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CE ₅₀ - 24 h: 204,3	O autor não especificou o meio de ensaio.	Huang et al. (2005)
<i>Daphnia similis</i>	CE ₅₀ - 48 h: 56, 90	Meio de teste do protocolo ISO.	Marcone et al. (2012)
<i>Thamnocephalus platyurus</i>	CE ₅₀ - 72 h: >2000	Solução-teste água reconstituída.	Heinlaan et al. (2008)
<i>Daphnia pulex</i>	CL ₅₀ - 48 h: > 10	Solução-teste água doce moderadamente dura da Universidade da Florida.	Griffitt et al. (2008)
<i>Continua...</i>			

Continuação Tabela 7.

Para outras espécies			
Organismos-teste	Resultados mg L ⁻¹	Comentários	Autores
<i>Vibrio fischeri</i> (bactéria)	CE ₅₀ - 72h: >20000	Solução-teste em meio ágar com uma solução de 2% de NaCl.	Heinlaan et al. (2008)
<i>Danio rerio</i> (peixe)	CL ₅₀ - 48H: > 10	Solução-teste água doce moderadamente dura da Universidade da Florida.	Griffitt et al. (2008)
<i>Escherichia coli</i> (bactéria)	CL ₅₀ - 3h: 163	Meio de teste Luria Bertani e água ultra-pura.	Lin et al. (2014)
<i>Brachionus plicatilis</i> (rotífero)	CE ₅₀ - 48 h: 107,4	Solução-teste água do mar sintética (OECD, 1984).	Clément et al. (2013)
<i>Phalodactylum tricornutum</i> (diatomácea)	CE ₅₀ - 72 h: 14,30	Meio de cultivo do Kit Marine AlgalTox.	Clément et al. (2013)

4.9. Teste de toxicidade crônica das nano-TiO₂ com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*

A partir dos testes de toxicidade com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, para os ensaios de toxicidade crônica com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, foram estabelecidas concentrações que não afetassem sua sobrevivência quando a microalga contaminada fosse fornecida como alimento para o cladóceros. Essas concentrações foram: 0; 0,01; 1 e 10 mg L⁻¹ de nano-TiO₂. Durante os três testes com a *Ceriodaphnia silvestrii*, apenas no teste de número dois foi verificada a mortalidade de 20% das fêmeas adultas no controle, enquanto que no teste de número 1 e 3, nenhuma mortalidade ocorreu.

As variáveis pH, dureza, concentração de oxigênio dissolvido e a temperatura não variaram entre o início e o final dos testes de toxicidade. Os valores iniciais de pH variaram de 7,0 a 8,5, a dureza ficou entre 38 a 46 mgCaCO₃ L⁻¹, a amplitude de variação do oxigênio dissolvido foi de 6,08 a 8,39 e a temperatura ficou dentro da faixa estabelecida pela ABNT (2010) de 25° C ± 1°C. Os resultados das variáveis físicas e químicas estão no apêndice H nas Tabelas 1, 2 e 3.

4.9.1. Comprimento corporal

Os resultados do comprimento corporal obtidos antes da exposição às nano-TiO₂ mostraram que os organismos de *Ceriodaphnia silvestrii* tinham o mesmo comprimento corporal ($F_{3,35} = 1,20$; $p = 0,32$) para os diferentes tratamentos e para o controle. Após a exposição às nano-TiO₂, houve uma redução significativa do comprimento corporal dos organismos expostos as concentrações de 1 e 10 mg L⁻¹ quando comparados com o controle ($F_{3,35} = 5,85$; $p = 0,003$) (Figura 20). Os dados brutos relativos ao comprimento corporal do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* no teste de toxicidade crônica com as nano-TiO₂ podem ser encontrados no Apêndice H, Tabelas 4, 5 e 6.

A diminuição significativa do comprimento corporal nas concentrações de 1 e 10 mg L⁻¹ também foi observada por Fouqueray et al. (2012) ao expor o cladóceros *Daphnia magna* e a clorofíceas *Pseudokirchneriella subcapitata* contaminada com nano-TiO₂ contida em protetores solares, isto é, nano-TiO₂ revestidas com hidróxido de alumínio - Al (OH)₃. Dalai et al. (2014) também observaram uma redução significativa no comprimento corporal comparado ao controle, quando os indivíduos de *Ceriodaphnia dubia* foram alimentados com a clorofíceas *Scenedesmus obliquus* em concentrações menores que as utilizadas neste estudo: 0,05, 0,5 e 5 µg mL⁻¹ (0,00005, 0,0005 e 0,005 mg L⁻¹). Li et al. (2011) observaram que houve uma redução no comprimento corporal dos indivíduos de *Ceriodaphnia dubia* quando eles foram expostos às nano-TiO₂ por via cutânea (por meio da água) a uma concentração 100 vezes maior (100 mg L⁻¹) do que aquela utilizada nesse estudo (1 mg L⁻¹) por uma via de exposição diferente (via alimentar). Isso demonstrou que a via de exposição é um importante fator para a medição da toxicidade das nano-TiO₂ para a espécie *C. dubia*, na qual a via alimentar foi bem mais tóxica do que por via cutânea. Fouqueray et al. (2012) destacaram que a exposição dos cladóceros às nano-TiO₂ por via alimentar pode ser uma forma bem mais tóxica para os organismos devido ao aumento da biodisponibilidade do metal.

Uma consequência para um comprimento corporal menor nos cladóceros é que o comprimento corporal está estritamente relacionado com a capacidade de reprodução do organismo. Segundo Green (1956), existe um comprimento corporal mínimo no qual os cladóceros precisam atingir para que eles possam produzir ovos. Além disso, quanto menor o comprimento corporal, menos ovos são capazes de serem depositados na câmara de incubação do organismo e, conseqüentemente, menos neonatas podem nascer (Green, 1956). Para Zhu et al. (2010 b), outro fator complicador se refere ao acúmulo de nano-TiO₂ no

interior do corpo dos dafinídeos devido à dificuldade de eliminação dessas nanopartículas, aumentando sua bioconcentração nos organismos ao longo do tempo, interferindo na ingestão de alimentos que, conseqüentemente, acabam afetando seu crescimento e sua reprodução.

Após os sete dias de exposição às nano-TiO₂, os valores de CENO e CEO para o parâmetro comprimento corporal foram de 0,01 e 1 mg L⁻¹, respectivamente. No estudo de Dalai et al. (2014) com o cladóceros *Ceriodaphnia dubia* via dieta alimentar, foi possível observar uma diminuição do comprimento corporal a partir da menor concentração testada que foi de 0,05 µg mL⁻¹. Assim como no estudo de Li et al. (2012) para a mesma espécie, via água, na concentração de 5 mg L⁻¹ foi observado uma redução do comprimento corporal. Valores diferentes dos encontrados neste estudo são compreensíveis uma vez que cada organismo-teste responde de maneira diferente a toxicidade das nano-TiO₂.

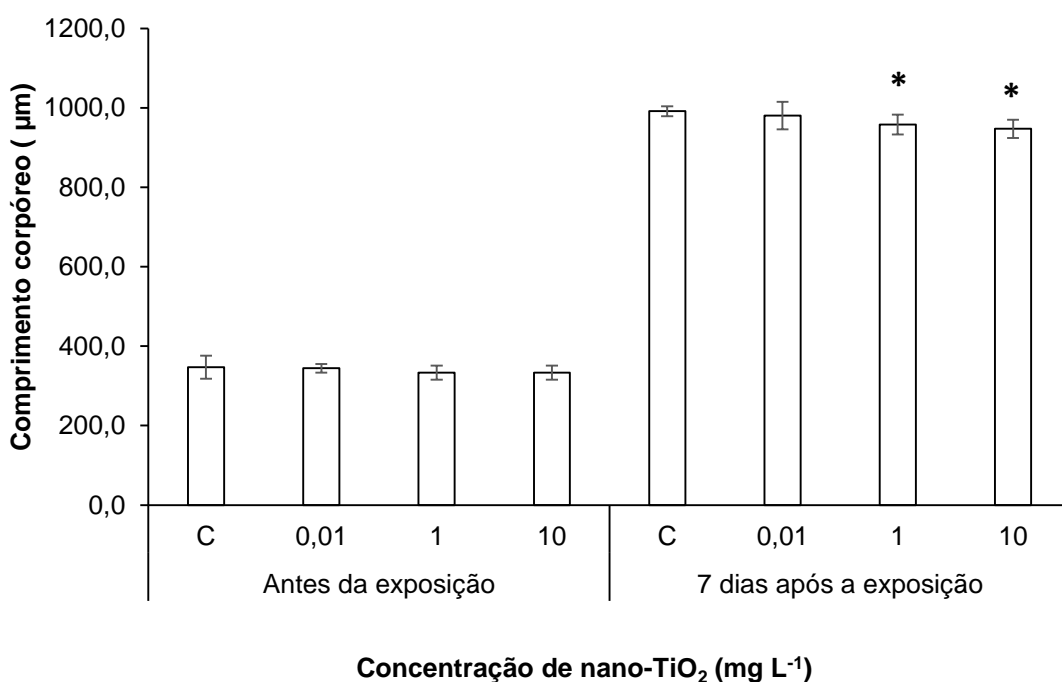


Figura 20. Comprimento corporal médio de *Ceriodaphnia silvestrii* antes da exposição e depois da exposição às nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) para as três concentrações testadas. Os asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao controle (teste de Tukey, $p < 0,05$).

4.9.2. Sobrevivência

A porcentagem média de sobrevivência para os três testes com a *Ceriodaphnia silvestrii* exposta às nano-TiO₂ evidenciaram que existiu uma diferença significativa entre a sobrevivência dos organismos para as três concentrações testadas quando comparadas com o controle ($F_{3,11} = 43,33$; $p < 0,001$) (Figura 21). Neste estudo, a porcentagem de mortalidade média para os três testes realizados foi de 13,3% no controle, 33,3% na concentração de 0,01 mg L⁻¹, 60% na concentração de 1 mg L⁻¹ e 73,3% na concentração de 10 mg L⁻¹. Os dados brutos relativos a sobrevivência do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* no teste de toxicidade crônica com as nano-TiO₂ podem ser observados no Apêndice H, tabelas 7, 8 e 9.

Diferentemente desses resultados, Fouqueray et al. (2012) encontraram uma mortalidade menor (30 a 40%) para o cladóceros *Daphnia magna* alimentado com alga contaminada nas concentrações de 0,1; 1 e 10 mg L⁻¹. Dalai et al. (2014) também observaram uma mortalidade muito menor dos encontrados neste estudo, para o mesmo gênero, *Ceriodaphnia dubia*, com destaque para a concentração de 0,5 µg mL⁻¹ que em 7 e 15 dias de exposição obtiveram cerca de 20% e 40% dos organismos mortos respectivamente, não apresentando nenhuma mortalidade após esse período durante os 21 dias de teste crônico. Esses dados discrepantes encontrados para o mesmo gênero são aceitáveis, uma vez que nem todos os organismos apresentam a mesma tolerância para as nano-TiO₂ e a especificidade dos organismos deve ser considerada para a etapa de avaliação de risco com essas nanopartículas (Hall et al., 2009). Segundo Klerks e Weis (1987) a tolerância a uma determinada substância química pode ocorrer através da seleção natural devido a adaptações genéticas ou por situações fisiológicas (aclimatação) onde os organismos tem contato com concentrações subletais.

Neste estudo o valor de CENO para o parâmetro sobrevivência no teste de toxicidade crônica com as nano-TiO₂ com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* não pode ser obtido, enquanto que o valor CEO para o mesmo parâmetro avaliado foi de 0,01 mg L⁻¹. No estudo de Fouqueray et al. (2012), no qual os organismos de *Daphnia magna* foram expostos às nanopartículas de TiO₂ pela mesma via de exposição utilizada neste estudo (via alimento contaminado), foi possível observar que o valor de CEO foi de 0,1 mg L⁻¹ de nano-TiO₂, um valor dez vezes maior do que aquele encontrado no presente estudo. Em relação à via de exposição cutânea, no qual os organismos foram expostos às nano-TiO₂ por meio do contato da epiderme e das superfícies respiratórias com a água ao seu redor, os valores de CEO para

a sobrevivência de *Daphnia magna*, obtidos por Zhu et al. (2009 b) e por Wiench et al. (2009) foram, respectivamente, 100 (um valor de CEO de 1 mg L⁻¹) a 10000 vezes (um valor de CEO de 100 mg L⁻¹) maiores do que aquele encontrado nesse estudo (valor de CEO de 0,01 mg L⁻¹). Para este parâmetro, a espécie *Ceriodaphnia silvestrii*, neste estudo, se mostrou mais sensível às nano-TiO₂ do que o cladóceros *Daphnia magna*, independente da via de exposição.

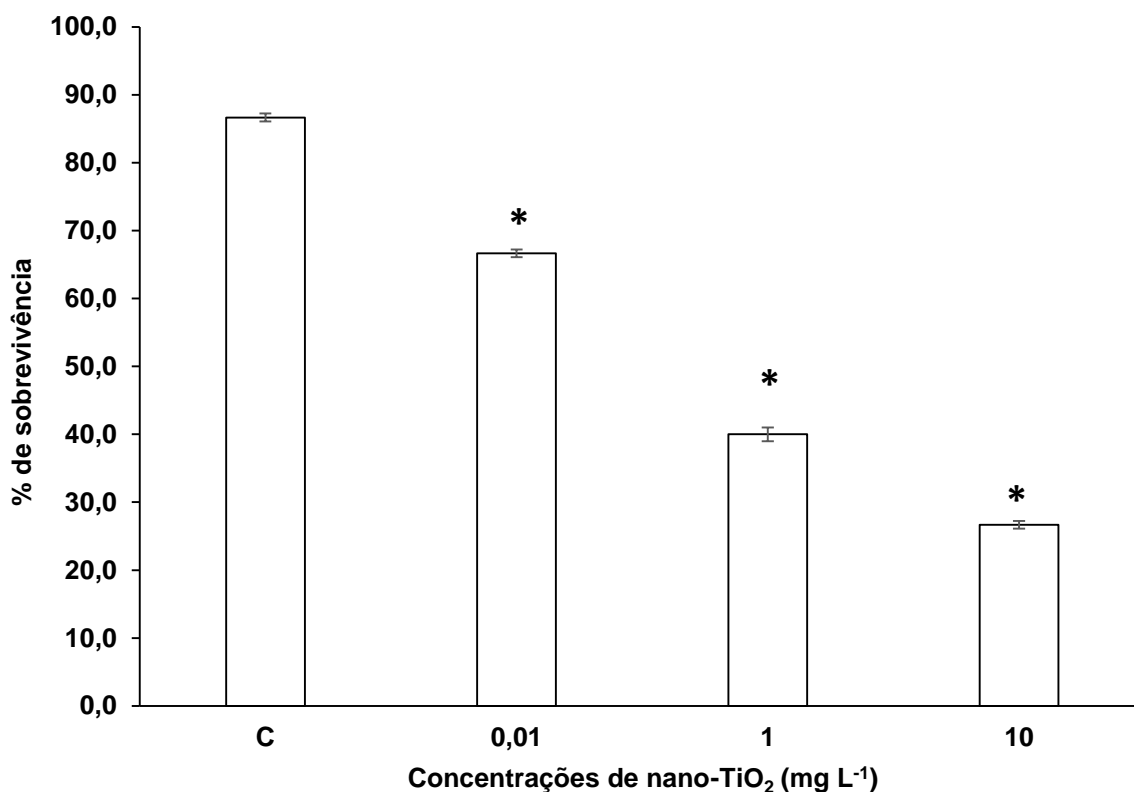


Figura 21. Média da porcentagem de sobrevivência do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* quando exposto as nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) no teste de toxicidade crônica. Os asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao controle (teste de Tukey, p<0,05).

4.9.3. Número total de ovos produzidos pelas fêmeas

Os valores médios de ovos produzidas por fêmeas vivas durante os três testes de toxicidade crônica foram 25,3; 23,2; 19,5 e 17,9 para o controle e as concentrações de 0,01; 1,0 e 10 mg L⁻¹, respectivamente. Foi possível observar um efeito tóxico sobre a produção

total de ovos produzidos por fêmea nas concentrações de 1 e 10 mg L⁻¹(Figura 22). Os dados brutos relativos ao número total de ovos produzidos por fêmeas vivas do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* no teste de toxicidade crônica com as nano-TiO₂ podem ser observados no Apêndice H, tabelas 10, 11 e 12.

Os valores de CENO e CEO para o total de ovos produzidos por fêmeas vivas do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* no teste de toxicidade crônica com as nano-TiO₂ foram 0,01 e 1 mg L⁻¹, respectivamente.

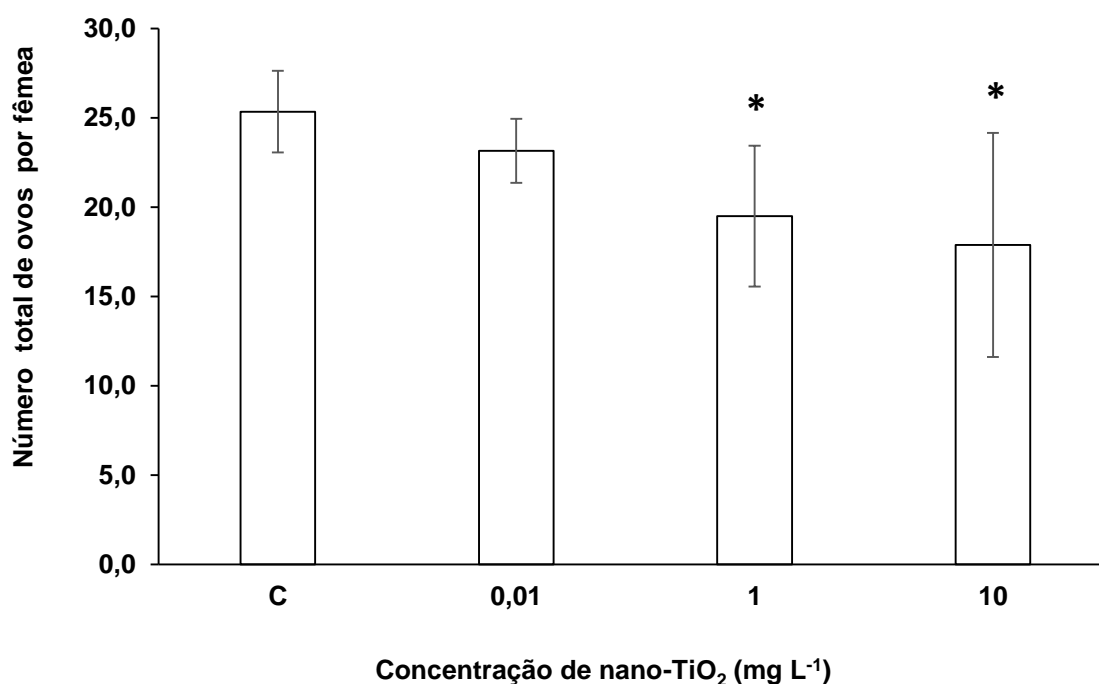


Figura 22. Número médio de ovos produzidos por fêmea de *Ceriodaphnia silvestrii* quando submetidas ao teste de toxicidade crônica com as nanopartículas de dióxido de titânio. Os asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao controle (teste de Tukey, $p < 0,05$).

Até a presente data, não foram encontrados trabalhos de toxicidade crônica na literatura que avaliaram os efeitos das nano-TiO₂ sobre o número de ovos produzidos pelas fêmeas do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*. Provavelmente, neste estudo, foi a primeira vez que este parâmetro foi avaliado, apesar do número de trabalhos publicados nos últimos anos envolvendo a toxicidade de nanopartículas terem aumentado significativamente. O que pode ser confirmado pesquisando a base de dados da Science Direct, utilizando como palavra

de busca *titanium dioxide nanoparticles and chronic toxicity*, onde o número de publicações passou de 7 em 2005 para 122 em 2015 (Tabela 8).

Tabela 8. Número de trabalhos publicados envolvendo nanopartículas de dióxido de titânio e sua toxicidade crônica.

Número de trabalhos	
Ano de publicação	publicados
2005	7
2007	20
2009	41
2011	70
2013	80
2015	122

4.9.4. Número de neonatas produzidas por fêmea

O número médio de neonatas produzidas por fêmea para o controle e demais tratamentos foram: 20,31; 18,75; 14,17 e 14,25. Ocorreram diferenças significativas em relação ao número médio de neonatas produzidas pelas fêmeas ao longo dos três testes de toxicidade crônica ($F_{3,65} = 12,87$; $p < 0,001$) nas concentrações de 1 e 10 mg L⁻¹. Nessas concentrações, o número médio de neonatas por fêmea foi significativamente menor quando comparada com o controle, uma vez as perdas no número médio de neonatas produzidas quando comparadas com o controle foram 7,68%, 30,23% e 29,84% (Figura 23).

Quanto ao desenvolvimento dos ovos, para o controle, 80,3% dos ovos produzidos foram eclodidos em neonatas nascidas vivas e para as concentrações-teste de 0,01; 1 e 10 mg L⁻¹ de nano-TiO₂, as porcentagens foram de 80,8, 72,7 e 79,6%, respectivamente. Uma vez que as porcentagens de eclosão foram muito semelhantes entre si, pode-se concluir que não houve nenhuma interferência das nano-TiO₂ sobre o desenvolvimento normal dos ovos. Os dados brutos relativos ao número de neonatas produzidas por fêmea do cladóceros

Ceriodaphnia silvestrii no teste de toxicidade crônica com as nano-TiO₂ podem ser observados no Apêndice H, tabelas 13, 14 e 15.

Para o número de neonatas vivas de *Daphnia magna*, Fouqueray et al. (2012) obtiveram uma diminuição significativa de 40% para a concentração de 0,1 mg L⁻¹ e 74% para a concentração de 10 mg L⁻¹. Dalai et al. (2014) observaram uma diminuição no número de neonatas produzidos por fêmea de 44% em relação ao controle para a concentração de 0,5 µg mL⁻¹, sugerindo um impacto negativo das nano-TiO₂ na produção de neonatas de *Ceriodaphnia dubia*.

Para Handy et al. (2005), existe uma dificuldade na interpretação dos resultados com experimentos feitos com metal via dieta alimentar, pois muitos princípios fundamentais em Ecotoxicologia são decorrentes de estudos que utilizam a via água como exposição e com experimentos via dieta alimentar os processos de interpretação podem ser diferentes. Segundo esses autores, as espécies sensíveis podem apresentar efeitos tóxicos diferentes dependendo da via de exposição (via dieta alimentar ou via água) e os parâmetros experimentais analisados *endpoints* pertinentes para via água podem não ser os mesmos apropriados para uma outra via de exposição. Nesse sentido, a biodisponibilidade do metal e seus processos físicos e químicos se comportam de maneira diferente dependendo da via de exposição.

Os valores de CENO e CEO para o número de neonatas produzidas por fêmea foram 0,01 e 1 mg L⁻¹ respectivamente. Já Wiench et al. (2009) encontraram valores de CENO e CEO de 3 e 10 mg L⁻¹ para *Daphnia magna* utilizando como via de exposição a água. Por isso, esse estudo indica que os efeitos tóxicos analisados via dieta alimentar são uma via importante de toxicidade para os cladóceros, além daquela dada pela via de exposição por contato.

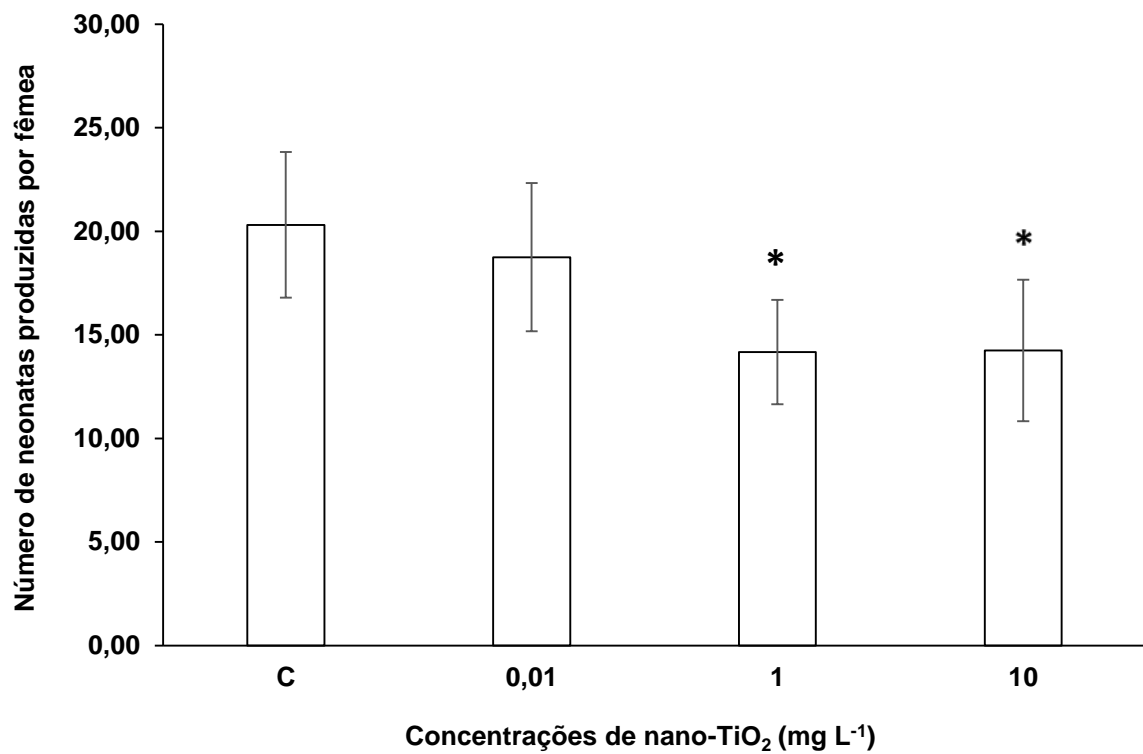


Figura 23. Número médio de neonatas produzidas por fêmea de *Ceriodaphnia silvestrii* quando submetidas ao teste de toxicidade crônica com as nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂). Os asteriscos (*) representam diferenças significativas em relação ao controle (teste de Tukey).

5. CONCLUSÕES

Os diferentes métodos empregados (absorbância, fluorescência, clorofila-*a* e contagem em microscópio óptico) para a quantificação da densidade celular da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* no ensaio preliminar de toxicidade não foram capazes de determinar acuradamente a taxa de crescimento populacional obtido durante o período do ensaio. Isso ocorreu devido à agregação entre as células das algas e as nano-TiO₂ e a característica das nanopartículas de espalharem a luz quando as leituras são feitas por métodos de espectrometria.

O uso do quelante EDTA por três lavagens, com duração de 1 minuto para cada lavagem, mostrou-se um método eficiente para a desagregação das células algais e possibilitou que elas pudessem ser contadas diretamente em hemocítômetro. Portanto, recomenda-se que este método seja utilizado na quantificação da densidade celular das algas em ensaios realizados com as nano-TiO₂, a fim de que este parâmetro seja obtido da forma mais acurada possível.

Em relação à toxicidade das nano-TiO₂ para a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*, essa espécie foi menos sensível quando comparada com outras espécies de algas, sendo afetada em concentrações acima daquelas normalmente encontradas em ambientes aquáticos naturais.

Para o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* no teste de toxicidade crônica foi observado diminuição significativa do comprimento corporal dos indivíduos nas concentrações de 1 e 10 mg L⁻¹. O efeito de maior toxicidade das nano-TiO₂ neste estudo, foi observado para o parâmetro sobrevivência do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*, enquanto que para o parâmetro produção de neonatas, foi observado uma redução de aproximadamente 25% nas concentrações de 1 e 10 mg L⁻¹ o que pode afetar a viabilidade dessa espécie ao longo do tempo em um ambiente com essas concentrações de nano-TiO₂. Portanto, a via de exposição foi um fator determinante da toxicidade para a substância em específico.

6. RECOMENDAÇÕES

- Estudos ecotoxicológicos das nano-TiO₂ com cladóceros nativos, utilizando outras vias de exposição devem ser realizados com o objetivo de estabelecer parâmetros que indicam toxicidade.
- Mais trabalhos sobre a concentração das nano-TiO₂ em ambientes aquáticos brasileiros necessitam ser realizados para a implementação de um sistema de controle de seu uso e disposição nesses ambientes.
- Realização de atividades socioeducativas que incentivem mudanças de comportamento, minimizando o consumo de alguns produtos que contenham as nano-TiO₂ em sua fabricação.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2009. NBR 12713. Ecotoxicologia aquática – toxicologia aguda – método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 23 p.

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2010. NBR 13373. Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Rio de Janeiro, 18 p.

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2011. NBR 12648. Ecotoxicologia aquática – toxicidade crônica – método de ensaio com algas (Chlorophyceae). Rio de Janeiro, 24 p.

AFNOR, Association Française Normalisation, 1980. Norme expérimentale. T90-304. Essais deseaux Determination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance, Paris, France.

Agencia Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI), 2010. Disponível em: < <http://www.abdi.com.br/Estudo/Panorama%20de%20Nanotecnologia.pdf> > Acesso em: 3 de setembro de 2015.

Allen, N. S., Edge, M., Verran, J., Caballero, L., Abrusci, C., Stratton, J., Maltby, J., Bygott, C., 2009. Photocatalytic Surfaces: Environmental Benefits of Nanotitania. The Open Materials Science Journal. 3, 6 - 27.

Amiano, I., Olabarrieta, J., Vitorica, J., Zorita, S., 2012. Acute toxicity of nanosized tio2 to *Daphnia magna* under uva irradiation. Environmental Toxicology and Chemistry. 31 (11), 2564 - 2566.

APHA, 1995. Standard methods. American Public Health Association, Washington, DC, 19. ed.

Aruoja, V., Dubourguier, H.C., Kasements, K., Kahru, A., 2009. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Sci. Total Environ.* 407, 1461-1468. doi: 10.1016/j.scitotenv.2008.10.053.

Aschberger, K., Micheletti, C., Sokull-Klöttgen, B., Christensen F. M., 2011. Analysis of currently available data for characterising the risk of engineered nanomaterials to the environment and human health - lessons learned from four case studies. *Environ. Int.* 37, 1143 - 56.

Bang, S. H., Le, T. H., 1, Lee, S.K., Kim, P., Kim, J. S., Min, J., 2011. Toxicity Assessment of Titanium (IV) Oxide Nanoparticles Using *Daphnia magna* (Water Flea). *Environmental Health and Toxicology*. doi: 10.5620/eht.2011.26.e2011002.

Barreto, G. J., Silva, V. M., 2015. Como interpretar os dados do Zetasizer Nano: análise de potencial zeta. Disponível em: <<http://www.malvern.com/br/events>>. Acesso em: 10 de novembro de 2015.

Baveye, P., Laba, M., 2008. Aggregation and toxicology of titanium dioxide nanoparticles. *Environ. Health Perspect.* 116, 152 - 155. doi: 10.1289/ehp10915.

Brayner, R., Dahoumane, S.A., Yéprémian, C., Djediat, C., Meyer, M., Couté, A., Fiévet, F., 2010. ZnO nanoparticles: synthesis, characterization, and ecotoxicological studies. *Langmuir*, ACS Publications 26, 6522 - 6528. doi: 10.1021/la100293s.

Cadioli, L.P., Salla, L.D., 2006. Nanotecnologia: um estudo sobre seu histórico, definição e principais aplicações desta inovadora tecnologia (2006). Disponível em:< [file:///C:/Users/Gisele/Downloads/2403-9264-1-PB%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Gisele/Downloads/2403-9264-1-PB%20(1).pdf) >. Acesso em: 1 de março de 2016.

Campos, B., Rivetti, C., Rosenkranz, P., Navas, J.M., Barata, C., 2013. Effects of nanoparticles of TiO₂ on food depletion and life-history responses of *Daphnia magna*. *Aquatic Toxicology* 130 - 131, 174 - 183.

Canesi, L., Ciacci, C., Balbi, T., 2015. Interactive effects of nanoparticles with other contaminants in aquatic organisms: Friend or foe? *Marine Environmental Research* 111, 128 - 134.

Cardinale, B. J., Bier, R., Kwan, C., 2012. Effects of TiO₂ nanoparticles on the growth and metabolism of three species of freshwater algae. *J Nanopart Res.* 14, 913. doi: 10.1007/s11051-012-0913-6.

Casali-Pereira, M. P., Daam, M. A., Resende, J. C., Vasconcelos, A. M., Espíndola, E. L. G., Botta, C. M. R., 2015. Toxicity of Vertimec 18 EC (active ingredient abamectin) to the neotropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii*. *Chemosphere (Oxford)*. 139, 558 - 564.

Castilho, P. M. J., 2005. Validação de ensaios ecotoxicológicos com organismos autóctones *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Dissertação. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental, 1991. Água – Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea). CETESB Norma Técnica L5018, São Paulo.

CETESB – Companhia de Tecnologia e Saneamento Ambiental, 1992. Água – Métodos de avaliação da toxicidade de poluentes a organismos aquáticos. V. 1, São Paulo: CETESB.

Chen, E. Y., Garnica, M., Wang, Y. C., Mintiz, A., Chen, C. S., Chin, W. C., 2012. A mixture of anatase and rutile TiO₂ nanoparticles induces histamine secretion in mast cells. *Toxicology*. 9 (1), 2.

Clément, L., Hurel, C., Marmier, N., 2013. Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants – Effects of size and crystalline structure. *Chemosphere*. 90, 1083 - 1090.

Costa, A.C.F.M., Vilar, M.A., Lira, H. L., Kiminami, R.H.G.A., Gama, L., 2006. Síntese e caracterização de nanopartículas de TiO₂, *Cerâmica*, 52, 255 – 259.

Crane, M., Handy, R.D., Garrod, J., Owen, R., 2008. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles., *Ecotoxicology* (London, England). 17, 421- 437.

Cupi, N., Hartmann, N.B., Baun, A., 2016. Influence of pH and media composition on suspension stability of silver, zinc oxide, and titanium dioxide nanoparticles and immobilization of *Daphnia magna* under guideline testing conditions *Ecotoxicology and Environmental Safety* 127, 144 -152.

Dabrunz A, Duester L, Prasse C, Seitz F, Rosenfeldt R, et al., 2011. Biological Surface Coating and Molting Inhibition as Mechanisms of TiO₂ Nanoparticle Toxicity in *Daphnia magna*. *PLoS ONE* 6(5): e20112. doi:10.1371/journal.pone.0020112.

Dalai, S., Pakrashi, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., 2013. Acute Toxicity of TiO₂ Nanoparticles to *Ceriodaphnia dubia* under Visible Light and Dark Conditions in a Freshwater System. *PLoS ONE*. 8(4): e62970. doi:10.1371/journal.pone.0062970.

Dalai, S., Iswarya, V., Bhuvaneshwari, M., Pakrashi, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., 2014. Different modes of TiO₂ uptake by *Ceriodaphnia dubia*: relevance to toxicity and bioaccumulation. *Aquatic Toxicology* 152, 139 - 146.

Dickman, E. M, Newell, J. M., Gonzalez, M. J., Vanni, M. J., 2008. Light, nutrients, and food-chain length constrain planktonic energy transfer efficiency across multiple trophic levels. Department of Zoology, Miami University, Oxford. OH 45056.

Diebold, U., 2003. *Surface Science Reports*. 48, 5 - 8, 53 – 229 p.

Duester, L., Burkhardt, M., Gutleb, A. C., Kaegi, R., Macken, A., Meermann, B., Kammer, F., 2014. Toward a comprehensive and realistic risk evaluation of engineered nanomaterials in the urban water system. *PERSPECTIVE ARTICLE*. doi: 10.3389/fchem.2014.0003.

Eaton, A.D., Clesceri, L.S., Greenberg, A.E., 1995. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. American Public Health Association. American Water Works Association, and Water Environment Federation Washington, 19th edition.

Elsaesser, A., Howard, C.V., 2012. Toxicology of nanoparticles. *Adv. Drug Deliver. Ver.* 64, 129 - 137.

Environmental Canada, 1992. Biological test methods: test of reproduction and survival using the cladoceran *Ceriodaphnia dubia*. Report EPS 1/RM/21. Environmental Canada Conservation and Protection, Ottawa, Ontario, 72 p.

European Commission, 2012. Commission staff working paper: Types and uses of nanomaterials, including safety aspects. Accompanying the communication from the commission to the European parliament, the council and the European economic and social committee on the second regulatory review on nanomaterials. Disponível em: <http://ec.europa.eu/health/nanotechnology/docs/swd_2012_288_en.pdf > Acesso em: 4 de fevereiro de 2016.

Fangueiro, J. F., Silva, A. M., Garcia, M. L., Souto, E. B., 2015. Current nanotechnology approaches for the treatment and management of diabetic retinopathy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 95, 307 - 322.

Fernicola, N. A. G. G., Bohrer-Morel, M. B. C., Bainy A. C. D., 2003. Ecotoxicologia. In: Azevedo, F. A., Chasin, A. A. M., *As bases toxicológicas da ecotoxicologia.* Rima, São Carlos, Intertox, São Paulo, 221 - 243 p.

Finney, D.J., 1971. *Probit Analysis*, third ed. Cambridge University Press. Cambridge.

Fishbine, G., 2002. *The inventor's guide to nanotechnology & micromachines.* John Wiley & Sons, Inc.: New York.

Fonseca, A. R., Rocha, O., 2004. The life-cycle of *Ceriodaphnia silvestrii* Daday, 1902, a neotropical endemic species (Crustacea, Cladocera, Daphnidae). *Acta Limnol. Bras.*, 16(4), 319 - 328.

Foresight institute: A Short History of Nanotechnology. Disponível em: <<http://www.foresight.org/nano/history>> Acesso em: 21 de dezembro de 2015

Fouqueray, M., Dufils, B., Vollat, B., Chaurand, P., Botta, C., Abacci, K., Labilli, J., Rose, J., Garric, J., 2012. Effects of aged TiO₂ nanomaterial from sunscreen on *Daphnia magna* exposed by dietary route. *Environ. Pollut.* 163, 55-61. doi: 10.1016/j.envpol.2011.11.035.

French, R.A., Jacobson, A.R., Kim, B., Isley, S.L., Penn, R.L., Baveye, P.C., 2009. Influence of ionic, pH, and cation valence on aggregation kinetics of titanium dioxide nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 43(5), 1354 -1359. doi: 10.1021/es802628n.

Fu, L., Hamzeh, M., Dodard, S., Zhào, Y.H., Sunahara, G.I., 2015. Effects of TiO₂ nanoparticles on ROS production and growth inhibition using freshwater green algae pre-exposed to UV irradiation. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 39, 1074 - 1080.

Fujishima, A., Zhang, X., Tryk, D. A., 2008. TiO₂ photocatalysis and related surface phenomena. *Surface Science Reports* 63, 515 - 582.

Galembeck, F., Rippel, M. M., 2004. Nanocompósitos poliméricos e nanofármacos: fatos, oportunidades e estratégias. *Parcerias Estratégicas* (Brasília).

Gao, Y., Jin, B., Weiyu, S., Sinko, P.J., Xie, X., Zhang, H., Jia, L., 2015. China and the United States-Global partners, competitors and collaborators in nanotechnology development. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine.* 12, 13 – 19.

Green, J., 1956. Growth, size and reproduction in *Daphnia* (Crustacea: Cladocera). *Proceedings of the Zoological Society of London*, 126, 173 - 204. doi: 10.1111/j.1096-3642.1956.tb00432.x.

Griffitt, R. J., Luo, J., Gao, J., Bonzongo, J. C., Barber, D. S., 2008. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environmental Toxicology and Chemistry.* 27 (9), 1972 - 1978.

Hall, S., Bradley, T., Moore, J. T., Kuykindall, T., L., 2009. Acute and chronic toxicity of nano-scale TiO₂ particles to freshwater fish, cladocerans, and green algae, and effects of organic and inorganic substrate on TiO₂ toxicity. 91 - 97. doi: 10.1080/17435390902788078.

Handy, R.D., Alen, H.E., Drevnick, P.E., Gorsuch, J.W., Green, A.S., Haldorsen, A.K.L., Hook, S.E., Mount, D.R., Stubblefield, W.A., 2005. Toxic effects of dietborne metals: laboratory studies In: Meyer, J.S., Adams, W.J., Brix, K.V., Luoma, S.N., Mount, D.R., Stubblefield, W.A., Wood, C.M. Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms. Setac: Pensacola. 291, 59 - 98.

Handy, R.D., von der Kammer, F., Lead, J.R., Hasselov, M., Owen, R., Crane, M., 2008. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology* 17, 287 - 314.

Hartmann, N.B., Kammer, F.V., Hofmann, T., Baalousha, M., Ottofuelling, S., Baun, A., 2010. Algal testing of titanium dioxide nanoparticles-testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability. *Toxicology* 269, 190 - 197. doi: 10.1016/j.tox.2009.08.008

Hashimoto, K., Irie, H., Fujishima, A., 2005. TiO₂ photocatalysis: A historical overview and future prospects. *Jpn. J. Appl. Phys.* 44, 8269 - 8285. doi: <http://iopscience.iop.org/1347-4065/44/12R/8269>.

Heinlaan, M., Ivask, A., Blinova, I., Dubourguier, H. C., Kahru, A., 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*. 71, 1308 - 1316.

Hirakawa, K., Mori, M., Yoshida, M., Oikawa, S., Kawanishi, S., 2004. Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide. *Free Radic. Res.* 38, 439 - 447.

Huang, C. P., Cha, D. K., Ismat S. S., 2005. Short-term chronic toxicity of photocatalytic nanoparticles to bacteria, algae, and zooplankton. Disponível em: <http://cfpub.epa.gov/ncer_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.abstractDetail/abstrabs/7384/report/0>. Acesso em: 22 de abril de 2015.

Hund-Rinke, K., Schlich, K., Wenzel, A., 2010. TiO₂ nanoparticles – Relationship between dispersion preparation method and ecotoxicity in the algal growth test. *Umweltwiss. Schadst. Forsch.* 22, 517 - 528. doi: 10.1007/s12302-010-0147-0.

Hund-Rinke, K., Simon, M., 2006. Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 13(4), 225 - 232. doi: <http://dx.doi.org/10.1065/espr2006.06.311>.

Iswarya, V., Bhuvaneshwari, M., Alex, S.A., Iyer, S., Chaudhuri, G., Chandrasekaran, P.T., Bhalerao, G.M., Chakravarty, S., Raichur, A.M., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., 2015. Combined toxicity of two crystalline phases (anatase and rutile) of titania nanoparticles towards freshwater microalgae: *Chlorella* sp. *Aquat. Toxicol.* 161, 154 - 169.

Jacobasch, C., Völker, C., Giebner, S., Völker, J., Alsenz, H., Potouridis, T., Heidenreich, H., Kayser, G., Oehlmann, J., Oetken, M., 2014. Long-term effects of nanoscaled titanium dioxide on the cladoceran *Daphnia magna* over six generations. *Environ. Pollut.* 186, 180 - 186.

Jaconeti, P. C. M., 2005. Validação de ensaios ecotoxicológicos com organismos autóctones *Daphnia laevis* e *Ceriodaphnia silvestrii*. Dissertação. Ipen: Autarquia associada a Universidade de São Paulo.

Ji, J., Long, Z., Lin, D., 2011. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. *Chemical Engineering Journal* 170, 525 - 530.

Jiang, G., Shen, Z., Niu, J., Bao, Y., Chen, j., He T., 2011. Toxicological assessment of TiO₂ nanoparticles by recombinant *Escherichia coli* bacteria. *J. Environ. Monit.* 13, 42.

Joner, E.J., Hartnik, T., Amundsen, C.E., 2008. Norwegian Pollution Control Authority (2008) Environmental fate and ecotoxicity of engineered nanoparticles. Report no. TA 2304/2007. Eds. 64 p.

Klaine, S. J., Alvarez, P. J. J., Batley, G. E., Fernandes, T. F., Handy, R. D., Lyon, D. Y., Mahendra, S., McLaughlin, M. J., Lead, J. R., 2008. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 27 (9), 1825 - 1851.

Kampel, M., 2003. Estimativa da produção primária e biomassa fitoplanctônica através de sensoriamento remoto da cor do oceano e dados in situ na costa sudeste brasileira. Dissertação, Universidade de São Paulo.

Keller, A.A., McFerran, S., Lazareva, A., Suh, S., 2013. Global life cycle releases of engineered nanomaterials. *J Nanopart Res.* 15:1692. doi: 10.1007/s11051-013-1692-4.

Konaka, R., Kasahara, E., Dunlap, W.C., Yamamoto, Y., Chien, K.C., Inoue, M., 1999. Irradiation of titanium dioxide generates both singlet oxygen and superoxide anion. *Free. Biol. Med.* 27, 294-300. doi: 10.1016/S0891-5849(99)00050-7.

Klerks, P. L., Weis, J. L., 1987. Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review. *Environmental Pollution.* 45, 173 - 205.

Kulacki, K.J., Cardinale, B., 2012. Effects of nano-titanium dioxide on freshwater algal population dynamics. *Plos One* 7(10), e47130. doi: 10.1371/journal.pone.0047130.

Krug, H.F., Wick, P., 2011. Nanotoxicology: An Interdisciplinary Challenge. *Angewandte Chemie.* doi: 10.1002/anie.201001037.

Lee, W.M., An, Y.J., 2013. Effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on green algae under visible, UV-A, and UV-B irradiations: no evidence of enhanced algal, toxicity under UV pre-irradiation. *Chemosphere* 91, 536 - 544. doi: 10.1016/j.chemosphere.2012.12.033.

Li, M., Czymmek, K. J., Huanga, C. P., 2011. Responses of *Ceriodaphnia dubia* to TiO₂ and Al₂O₃ nanoparticles: A dynamic nano-toxicity assessment of energy budget distribution. *Journal of Hazardous Materials* 187, 502 - 508.

Lin, M.Y., 2008. Interactions between titanium dioxide nanoparticles and algal cells at moderate particle concentration. *Dissertação*, University of Delaware.

Lin, X., Li, J., Ma, S., Liu, G., Yang, K., Tong, M. Lin, D., 2014. Toxicity of TiO₂ nanoparticles to *Escherichia coli*: effects of particle size, crystal phase and water chemistry. *PLoS ONE* 9(10): e110247. doi:10.1371/journal.pone.0110247.

Lombardi, A.T., Vieira, A.A.H., Sartori, L.A., 2002. Muscilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kircheriella aperta* (Chlorococcales). *J. Phycol.* 38, 322 - 337.

Lovern, S. B., Klaper, R., 2006. *Daphnia Magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (c60) nanoparticles. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 25, 1132 - 1137.

Machado, K. S., Casali-Pereira, M. P., Oliveira, D. M., Isique, W. D., Leite, M. A., Minillo, A., 2009. Bioensaios de toxicidade aguda com fármacos: diclofenaco de sódio e paracetamol. In: VI congresso de Meio Ambiente da AUGM, São Carlos. Anais de eventos da UFSCar. 5.

Maia, A., 2001. Titânio. In: Balanço Mineral Brasileiro, Departamento Nacional da Produção Mineral. 23p.

Maltby, L., Calow, P., 1989. Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater detritivore. *Hydrobiologia*. 27, 517 - 523.

Marcone, G.P.S., Oliveira, A.C., Almeida, G., Umbuzeiro, G.A., Jardim, W.F., 2012. Ecotoxicity of TiO₂ to *Daphnia similis* irradiation. *J. Hazard. Mater.* 211 - 212, 436 - 442. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.12.075.

Mariano, D.S., 2014. Respostas de *Scenedesmus bijugus* a nanopartículas de TiO₂ em concentrações ambientalmente relevantes. Dissertação, Universidade Federal de São Carlos.

Magalhães, D. P., Ferrão-Filho, A. S., 2008. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.* 12 (3), 355 - 381.

Masciangli, T., Zhang, W-X., 2003. Environmental Technologies at the Nanoscale. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es0323998>>. Acesso em: 21 de outubro de 2015.

Masutti, M. B., 2004. Distribuição e efeitos de cromo e cobre em ecossistemas aquáticos: uma análise laboratorial e “In Situ” (experimentos em micro e mesocosmos). Dissertação. Escola de Engenharia de São Carlos.

McMahon, J.W., Rigler, F.H., 1965. Feeding rate of *Daphnia magna* Straus in different food labeled with radioactive phosphorus. *Limnol. Oceanogr.* 10, 105 - 113.

Matos, J. P., 2010. Funcionalização de materiais têxteis com nanopartículas de dióxido de titânio. Dissertação, Universidade da Beira Interior.

Melo, C. P; Pimenta, M. A. Nanociências e nanotecnologia. Parcerias Estratégicas, 2004. Brasília, 18, 9 - 21. Disponível em: < http://www.cgee.org.br/arquivos/pe_18.pdf >. Acesso em: 11 de agosto 2015.

Metzler, D.M., Erdem, A., Tseng, Y.H., Huang, C.P., 2012. Responses of algal cells to engineered nanoparticles measured as algal cell population, chlorophyll a, and lipid peroxidation: effect of particle size and type. J. Nanotechnol. ID 237284. 12 pages . doi: 10.1155/2012/237284.

Miller, R. J., Bennett, S., Keller, A.A., Pease, S., Lenihan, H. S., 2012. TiO₂ nanoparticles are phototoxic to marine phytoplankton. PLoS ONE 7(1): e30321. doi:10.1371/journal.pone.0030321.

Mount, D. I., Norberg, I. J., 1984. A seven-day lifecycle cladoceran toxicity test. Environmental toxicology and chemistry. 3, 425 - 434.

Moreira, R.A., Mansano, A. S., Silva, L.C., Rocha, O., 2014. A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. Acta Limnol. Bras. 6 (1).

Munlait, Categoria em biotecnologia. Disponível em: < <https://munlait.wordpress.com/category/biotecnologia/page/3/> > Acesso em: 2 de junho de 2015.

Mueller, N.C., Nowack, B., 2008. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. Environ. Sci. Technol. 42, 4447 - 4453.

Nan, A., Bai, X., Son, S. J., Lee, S. B., Ghandehari, H., 2008. Cellular Uptake and Cytotoxicity of Silica Nanotubes. Nano Letters, 8, 2150 - 2154.

Navarro, E., Baun, A., Behara, R., Hartmann, N.B., Filser, J., Miao, A.J., Quigg, E.A., Santschi, P.H., Sigg, L., 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered

nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology* 17, 372 - 386. doi: 10.1007/s10646-008-0214-0.

Nielsen, H.D., Berry, L.S., Stone, V., Burrige, T.R., Fernandes, T.F., 2008. Interactions between carbon black nanoparticles and the brown algae *Fucus serratus*: inhibition of fertilization and zygotic development. *Nanotoxicology* 2, 88 - 97. doi: 10.1080/17435390802109185.

Nowack, B., Bucheli, T.D., 2007. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.* 150, 5 - 22. doi: 10.1016/j.envpol.2007.06.006.

Nur, Y., Lead, J.R., Baalousha, M., 2015. Evaluation of charge and agglomeration behavior of TiO₂ nanoparticles in ecotoxicological media. *Sci. Total. Environ.* 535, 45 - 53.

Oberdorster, G., Stone, V., Donaldson, K., 2007. Toxicology of nanoparticles: A historical perspective. *Nanotoxicology*. 1, 2 - 25.

Oliveira-Neto, A.L., Botta-Paschoal, C. M. R., 2000. Sensibilidade do Cladocera lacustre planctônico *Ceriodaphnia silvestrii* (Família Daphnidae) aos metais cádmio, cromo e chumbo. In: Espíndola, E., L., G., Botta-Paschoal, C., M., R., Rocha, O., Bohrer, M., B., C., Oliveira-Neto, A., L. (Eds). *Ecotoxicologia - Perspectivas para o século XXI*. São Carlos: Rima Editora. 537-543 p.

Pascoalino, M.P., 2006. Utilização da fotocatalise heterogênea na desinfecção de atmosferas confinadas. Dissertação, Universidade Estadual de Campinas.

Pereira, J.C., 2010. Estudo do comportamento de nanopartículas de dióxido de titânio em diferentes suspensões. Dissertação. Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa.

Petosa, A., Jaisi, D., Quevedo, I. R., Elimelech, M., Tufenkji, N. (2010). Aggregation and Deposition of Engineered Nanomaterials in Aquatic Environments: Role of Physicochemical Interactions. *Environ. Sci. Technol.* 44, 6532 - 6549.

PFleeger, T., McFarlane, C., Sherman, R., Volk, G., 1991. A short-term bioassay for whole plant toxicity. In: Gorsuch, J. W.; Lower, W. R., Wang, W., Lewis M. A. (Eds.). Plants for toxicity assessment. Philadelphia: American Society for Testing and Materials. 2, 355 - 364.

Piccinno, F., Gottschalk, F., Seeger, S., Nowack, B., 2012. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. *J Nanopart Res* 14:1109. doi: 10.1007/s11051-012-1109-9.

Pinheiro, T., Moita, L., Silva, L., Mendonca, E., Picado, A., 2013. Nuclear microscopy as a tool in TiO₂ nanoparticles bioaccumulation studies in aquatic species. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*. 306, 117 - 120.

Queiroz-Filho, A. A., Amorim-Neto, A. A., 2014. Sumário mineral anual: Titânio. Disponível em: < <http://www.dnppm.gov.br/dnppm/sumarios/sumario-mineral-2014>>. Acesso em: 1 de março de 2105.

Quik, J. T. K, Vonk, J. A., Hansen, S. F., Baun, A., Meent, D. V. D., 2011. How to assess exposure of aquatic organisms to manufactured nanoparticles? *Environment International*. 37, 1068 - 1077.

Rand, G. M., 1995. Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. 2. Ed. Washington, D. C.: Taylor and Francis.

Reeves, J. F., Davies, S. J., Dood, N. J. F., Jha, A. N., 2008. Hydroxyl radicals (OH) are associated with titanium dioxide (TiO₂) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutata*. 640, 113 – 122.

Rodgher, S., Espíndola, E. L. G., 2008a. Effects of interactions between algal densities and cadmium concentrations on *Ceriodaphnia dubia* fecundity and survival. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 71, 765 - 773.

Rodgher, S., Espíndola, E. L. G., 2008b. The influence of algal densities on the toxicity of chromium for *Ceriodaphnia dubia* Richard (Cladocera, Crustacea). *Brazilian Journal of Biology*. 68 (2), 341 - 348.

Rosa, G. A. B., 2008. Estudo dos efeitos do fármaco propranolol para *Ceriodaphnia silvestrii* (Cladocera, crustácea) com ênfase em efeitos nas populações. Dissertação. Instituto de Pesquisa Energética e Nucleares. Universidade de São Paulo.

Sadiq, M., Dalai, S., Chandrasekaran, N., Mukherjee, A., 2011. Ecotoxicity study of titania (TiO₂) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus* sp and *Chlorella* sp Ecotoxicol. Environ. Saf. 74, 118-1187. doi: 10.1016/j.ecoenv.2011.03.006.

Salieri, B., Righi, S., Pasteris, A., Olsen, S. I., 2015. Freshwater ecotoxicity characterisation factor for metal oxide nanoparticles: A case study on titanium dioxide nanoparticle. Science of the Total Environment 505, 494 - 502.

Santos, j. F., 2010. Relatório Técnico 36: Perfil do Titânio. Disponível em: <http://www.mme.gov.br/documents/1138775/1256650/P16_RT36Perfil_do_Titxnio.pdf/99cfddec-0e1b-44bf-a01d-9e781507baeb> > Acesso em: 15 de dezembro de 2015.

Scopo Del Mineração, 2015. Disponível em:< <http://www.aldoroggiani.it/museo.htm>>. Acesso em: 15 de setembro de 2015.

Silva, E. M. F., 2012. O uso da alga clorófitica *Pseudokirchneriella subcapitata* e análises limnológicas para avaliação da qualidade ambiental dos sistemas lóticos e lênticos da bacia hidrográfica dos rios Itaqueri/Lobo (Itirapina/Brotas – SP). Monografia. Escola de Engenharia de São Carlos.

Shang, L., Nienhaus, K., Nienhaus, G., U., 2004. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. Journal of Nanobiotechnology. 12, 5 - 16.

Shih, Y. J., Su, C.C., Chen, C.W., Dong, C.D., Liu, W.S., Huang, C.P., 2016. Adsorption characteristics of nano-TiO₂ onto zebrafish embryos and its impacts on egg hatching. Chemosphere. 154, 109 - 117.

Shoaf, T.W., Lium, B.W., 1976. Improved extraction of chlorophyll *a* and *b* from algae using dimethylsulphoxide. Limnol. Oceanogr. 2, 926 - 928.

Singh, S., Palel, P., Jaiswall, S., Prabhune, A. A., Ramana, C. V., Prasad, B. L. V., 2009. A direct method for the preparation of glycolipid – metal nanoparticles conjugates: as reducing and capping agents for the synthesis of water re-dispersible silver nanoparticles and their antibacterial activity. *New J. Chem.* 33, 646 - 652. doi: 10.1039/B811829A.

Smith, C.J., Shaw, B.J., Handy, R.D., 2007. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquatic Toxicology* 82, 94 - 109.

Takenaka, R. A., 2007. Avaliação da toxicidade de *Mycrocystis aeruginosa* de florações naturais de cianobactérias de reservatórios do rio Tietê. Dissertação. Escola de Engenharia de São Carlos.

Tan, C., Wang, W.X., 2014. Modification of metal bioaccumulation and toxicity in *Daphnia magna* by titanium dioxide nanoparticles. *Environmental Pollution* 186, 36 - 42.

Tavares, L.H.S., Rocha, O., 2001. Cultivo de fitoplâncton. In: Tavares, L.H.S., Rocha, O., Produção de plâncton (fitoplâncton e zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos. Editora Rima, São Carlos, SP., 15 - 54.

The Project on Emerging Nanotechnologies, 2015. Consumer products inventory. <http://www.nanotechproject.org/cpi/>. Acesso em: 22 de julho de 2015.

Truhaut, R., 1978. Introduction. In: Butler, G. C., Principles of toxicology. Scientific Committee Problems of the Environment (SCOPE) of the International Council of Scientific Unions. SCOPE report 12. John Wiley & Sons., 350 p.

Valer, R.M., Glock, L., 1998. Quantificação de algas clorofíceas de interesse ecotoxicológico através do método espectrofotométrico. *Acta Limnologica Brasiliensia*, 11(2), 149 - 156.

Vijverberg, J., 1989. Culture techniques for studies on the growth, development and reproduction of copepods and cladocerans under laboratory and *in situ* conditions: a review *Freshwater Biology*. 21, 317 - 373.

Wang, D., Hu, J., Irons, D. R., Wang, J. 2011. Synergistic toxic effect of nano-TiO₂ and As(V) on *Ceriodaphnia dubia*. Science of the Total Environment. 409, 1351-1356.

Warheit, D.B., Hoke, R.A., Finlay, C., Donner, E.M., Reed, K.L., Sayes, C.M., 2007. Development of a base set of toxicity test using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. Toxicol. Lett. 171, 99 - 110. doi: 10.1016/j.toxlet.2007.04.008.

Wiench, K., Wohlleben, W., Hisgen, V., Radke, K., Salinas, E., Zok, S., Landsiedel, R., 2009. Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. Chemosphere. 76, 1356 -1365.

Yu, H., Pan, J., Bai, Y., Zong, X., Li, X., Wang, L., 2013. Hydrothermal synthesis of a crystalline rutile TiO₂ nanorod based network for efficient dye-sensitized solar cells. Chemistry-A European Journal. 19 (40).

Zagatto, P. A., Bertoletti, E., 2006. Ecotoxicologia aquática – Princípios e aplicações. Editora Rima, São Carlos. 467 p.

Zhu, X., Zhu, L., Chen, Y., Tian, S., 2009a. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. J Nanopart Res. 11, 67 - 75. doi: 10.1007/s11051-008-9426-8.

Zhu, X., Zhu, L., Chen, Y., Tian, S., 2009b. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. J Nanopart Res. 11, 67 - 75. Doi: 10.1007/s11051-008-9426-8.

Zhu, X., Wang, J., Zhang, X., Chang, Y., Chen, Y., 2010a. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. Chemosphere 79, 928 - 933.

Zhu, X., Chang, Y., Chen, Y., 2010b. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. Chemosphere 78, 209 - 215.

APÊNDICE A

Dados brutos relativos a caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂).

Tabela 1. Dados brutos referente a caracterização das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) no meio de ensaio.

Caracterização das nano-TiO₂ no meio de ensaio					
Período de teste: 27/03/2015 a 30/03/2015 Solução-teste: nano-TiO₂					
Absorbância					
λ	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
400	0,036	0,034	0,035	0,036	0,042
410	0,035	0,033	0,034	0,035	0,041
420	0,034	0,033	0,033	0,034	0,040
430	0,034	0,034	0,034	0,035	0,038
440	0,034	0,034	0,033	0,034	0,038
450	0,033	0,033	0,033	0,033	0,037
460	0,032	0,033	0,036	0,036	0,038
470	0,031	0,033	0,035	0,035	0,037
480	0,031	0,032	0,034	0,034	0,036
490	0,030	0,034	0,036	0,036	0,036
500	0,029	0,033	0,035	0,035	0,035
510	0,028	0,032	0,034	0,034	0,034
520	0,028	0,032	0,033	0,033	0,033
530	0,026	0,032	0,032	0,032	0,033
540	0,025	0,032	0,031	0,031	0,032
550	0,025	0,032	0,032	0,031	0,031
560	0,025	0,032	0,031	0,031	0,031
570	0,025	0,033	0,031	0,031	0,031
580	0,024	0,030	0,032	0,030	0,030
590	0,023	0,029	0,031	0,029	0,029
600	0,023	0,029	0,031	0,028	0,028
610	0,022	0,026	0,031	0,028	0,028
620	0,022	0,026	0,030	0,028	0,028
630	0,022	0,025	0,029	0,028	0,027
640	0,022	0,025	0,030	0,025	0,026
650	0,021	0,025	0,030	0,024	0,026
660	0,021	0,025	0,030	0,024	0,026
670	0,020	0,025	0,030	0,025	0,025
680	0,020	0,024	0,029	0,024	0,025
690	0,019	0,024	0,029	0,026	0,025
700	0,019	0,023	0,029	0,023	0,025
710	0,019	0,023	0,029	0,024	0,024
720	0,019	0,022	0,028	0,024	0,024
730	0,019	0,022	0,028	0,025	0,025
740	0,018	0,018	0,022	0,028	0,024
750	0,018	0,022	0,027	0,023	0,023

Caracterização das nano-TiO₂ no meio de ensaio

Período de teste: 27/03/2015 a 30/03/2015 **Solução-teste:** nano-TiO₂

Absorbância

	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h
760	0,018	0,023	0,029	0,022	0,023
780	0,018	0,022	0,028	0,022	0,023
790	0,017	0,024	0,025	0,020	0,022
800	0,016	0,023	0,025	0,020	0,021
810	0,015	0,022	0,025	0,021	0,021
820	0,015	0,022	0,025	0,020	0,021

APENDICE B

Dados brutos relativos aos testes preliminares de toxicidade crônica com a clorófitica *Pseudokirchneriella subcapitata* exposta as nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂).

Tabela 1. Dados brutos obtidos para determinação da densidade celular algal no teste preliminar de toxicidade com as nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) com 96 horas de exposição utilizando Espectrofotômetro.

Ensaio Preliminar - alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>						
Período de teste: 27/04/2015 a 30/04/2015						
Aparelho: Espectrofotômetro						
Solução-Teste: Meio LC Oligo com nano-TiO ₂						
Absorbância: 440 nm		Concentração: mg L ⁻¹				
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10
Resultado 24 h	0.011	0.010	0.012	0.012	0.024	0.156
Resultado 48 h	0.024	0.022	0.028	0.030	0.015	0.116
Resultado 72 h	0.031	0.034	0.032	0.016	0.032	0.102
Resultado 96 h	0.035	0.035	0.040	0.042	0.038	0.122
Absorbância: 687 nm		Concentração: mg L ⁻¹				
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10
Resultado 24 h	0.008	0.007	0.009	0.008	0.013	0.071
Resultado 48 h	0.020	0.018	0.023	0.024	0.014	0.065
Resultado 72 h	0.025	0.028	0.026	0.013	0.024	0.065
Resultado 96 h	0.030	0.030	0.030	0.033	0.029	0,081
Absorbância: 670 nm		Concentração: mg L ⁻¹				
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10
Resultado 24 h	0,008	0,007	0,008	0,008	0,013	0,074
Resultado 48 h	0,019	0,017	0,022	0,023	0,014	0,065
Resultado 72 h	0,023	0,026	0,024	0,012	0,023	0,065
Resultado 96 h	0,028	0,027	0,030	0,031	0,028	0,080

Tabela 2. Dados brutos obtidos incluindo média, desvio padrão (DP) e coeficiente de variação (CV) para determinação da densidade celular algal no teste preliminar de toxicidade com as nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) com 96 horas de exposição utilizando fluorímetro.

Ensaio Preliminar - alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>							
Período de teste: 27/04/2015 a 30/04/2015							
Solução-Teste: Meio LC Oligo com nano-TiO ₂							
Aparelho: Fluorímetro							
Resultado: 24 horas				Concentração: mg L ⁻¹			
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10	Branco
Réplica 1	18.512	18.659	20.074	20.457	19.953	22.812	0.060
Réplica 2	18.188	15.229	20.328	18.372	19.513	22.427	-0.022
Réplica 3	18.470	18.642	20.779	20.797	19.621	22.325	-0.038
Média	18.39	17.51	20.39	19.87	19.70	22.52	0.00
DP	0.18	1.98	0.36	1.31	0.23	0.26	0.05
CV	0.96	11.28	1.75	6.60	1.16	1.14	
Resultado: 48 horas				Concentração: mg L ⁻¹			
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10	Branco
Réplica 1	50.274	47.283	58.740	60.639	44.561	55.707	0.161
Réplica 2	48.573	47.912	59.022	59.022	44.268	54.339	0.104
Réplica 3	47.631	48.604	59.013	59.013	43.827	55.119	-0.266
Média	48.83	47.93	58.93	60.18	44.22	55.06	0.00
DP	1.34	0.66	0.16	0.40	0.37	0.69	0.23
CV	2.54	1.38	0.27	0.66	0.84	1.25	
Resultado: 72 horas				Concentração: mg L ⁻¹			
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10	Branco
Réplica 1	68.025	75.667	73.464	74.887	61.782	83.505	-0.092
Réplica 2	69.137	74.113	74.099	76.434	53.908	85.007	0.218
Réplica 3	72.287	75.161	73.460	72.481	57.725	84.060	-0.125
Média	69.82	74.98	73.67	74.60	57.81	84.19	0.00
DP	2.21	0.79	0.37	1.99	3.94	0.76	0.19
CV	3.17	1.06	0.50	2.67	6.81	0.90	
Resultado: 96 horas				Concentração: mg L ⁻¹			
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10	Branco
Réplica 1	86.689	95.947	95.029	95.046	72.850	118.670	0.004
Réplica 2	93.295	96.875	95.948	94.167	68.219	166.660	-0.041
Réplica 3	99.674	98.782	96.389	96.304	69.440	122.480	0.038
Média	93.22	97.20	95.79	95.17	70.17	135.94	0.00
DP	6.49	1.45	0.69	1.07	2.40	26.68	0.04
CV	6.97	1.49	0.72	1.13	3.42	19.62	

Tabela 3. Dados brutos obtidos para determinação da densidade celular algal no teste preliminar de toxicidade com as nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) com 96 horas de exposição através da contagem direta em Câmara de Neubauer em microscópio óptico. DP = Desvio Padrão; CV = Coeficiente de Variação.

Ensaio Preliminar - alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>						
Período de teste: 27/04/2015 a 30/04/2015						
Aparelho: Microscópio Óptico						
Solução-Teste: Meio LC Oligo com nano-TiO ₂						
24 h		Concentração: mg L ⁻¹				
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10
Réplica 1	143750	142500	106250	153750	142500	126250
Média	143750	142500	106250	153750	142500	126250
48 h		Concentração: mg L ⁻¹				
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10
Réplica 1	241250	188750	261250	210000	227500	22500
Média	241250	188750	261250	210000	227500	22500
72 h		Concentração: mg L ⁻¹				
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10
Réplica 1	307500	330000	246250	258750	203750	146250
Réplica 2	381250	413750	315000	272500	208750	163750
Réplica 3	372500	283750	296250	161250	205000	110000
Média	353750	342500	285833	230833	205833	140000
DP	40292	65895	35539	60652	2602	27415
CV	11.4	19.2	12.4	26.3	1.3	19.6
96 h		Concentração: mg L ⁻¹				
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10
Réplica 1	338700	265000	380000	165000	186200	131200
Réplica 2	145000	322500	266200	186200	188700	355000
Réplica 3	192500	350000	158700	200000	235000	198700
Média	225400	312500	268300	183733	203300	228300
DP	100954	43373	110665	17630	27481	114799
CV	44.8	13.9	41.2	9.6	13.5	50.3

Tabela 4. Dados brutos obtidos para determinação da densidade celular algal no teste preliminar de toxicidade com as nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) com 96 horas de exposição através da quantificação da clorofila-*a* pelo método DMSO através do espectrofotômetro.

Ensaio Preliminar - alga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>						
Período de teste: 27/04/2015 a 30/04/2015						
Aparelho: Espectrofotômetro						
Solução-Teste: Meio LC Oligo com nano-TiO ₂						
Absorbância: 664 nm			Concentração: mg L ⁻¹			
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10
Resultado 24 h	0.034	0.014	0.011	0.008	0.017	0.106
Resultado 48 h	0.043	0.026	0.037	0.033	0.027	0.076
Resultado 72 h	0.034	0.037	0.037	0.035	0.034	0.002
Resultado 96 h	0.064	0.048	0.068	0.024	0.050	0.120
Absorbância: 647 nm			Concentração: mg L ⁻¹			
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10
Resultado 24 h	0.009	0.002	0.002	0.001	0.010	0.103
Resultado 48 h	0.026	0.010	0.019	0.014	0.012	0.061
Resultado 72 h	0.012	0.013	0.014	0.013	0.017	0.001
Resultado 96 h	0.034	0.022	0.026	0.008	0.030	0.084
Absorbância: 630 nm			Concentração: mg L ⁻¹			
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10
Resultado 24 h	0.005	0.000	0.001	0.000	0.009	0.107
Resultado 48 h	0.006	0.008	0.017	0.012	0.010	0.061
Resultado 72 h	0.007	0.009	0.010	0.009	0.014	0.001
Resultado 96 h	0.008	0.016	0.020	0.006	0.028	0.080
Clorofila a			Concentração: mg L ⁻¹			
	Controle	0,001	0,01	0,1	1	10
Resultado 24 h	0.194	0.082	0.064	0.047	0.092	0.533
Resultado 48 h	0.231	0.145	0.202	0.183	0.149	0.394
Resultado 72 h	0.191	0.208	0.207	0.196	0.186	0.011
Resultado 96 h	0.349	0.265	0.381	0.135	0.269	0.635

APENDICE C

Dados brutos da quantificação das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) nos testes de toxicidade definitivo e contaminação da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Tabela 1. Dados brutos da quantificação das nanopartículas de dióxido de titânio (mg L^{-1}) no meio de cultura do teste de toxicidade definitivo. Variação das concentrações nominais e reais no início (0 hora) e no final (96 horas) do teste de toxicidade com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Concentração	Titânio Particulado mg L^{-1}		Titânio Dissolvido mg L^{-1}		Titânio Total mg L^{-1}	
	0 h	96 h	0 h	96 h	0 h	96 h
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
16	15,97	11,04	0,82	4,81	16,79	15,84
64	64,55	44,94	0,77	18,96	65,31	63,9
256	255,45	178,7	0,87	76,62	256,32	255,32
512	513,77	352,21	0,84	157,4	514,61	509,61

Tabela 2. Dados brutos da quantificação das nanopartículas de dióxido de titânio (mg L^{-1}) do teste de contaminação da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* após passarem pelo processo de 1 e 3 lavagens.

Concentração	Titânio Particulado mg L^{-1}	
	lavagem 1x	Lavagem 3x
Controle (R1)	0,000	0,000
Controle (R2)	0,000	0,000
Controle (R3)	0,000	0,000
0,01 (R1)	0,017	0,000
0,01 (R2)	0,025	0,000
0,01 (R3)	0,019	0,000
1 (R1)	1,195	0,000
1 (R2)	1,052	0,000
1 (R3)	0,987	0,000
10 (R1)	9,091	0,000
10 (R2)	11,558	0,000
10 (R3)	10,519	0,000

APENDICE D

Valores do diâmetro hidrodinâmico (DH), Índice de Polidispersividade (IPd) e Potencial Zeta para o teste de toxicidade crônica definitivo e contaminação da alga *Pseudokirchneriella subcapitata* e do teste de toxicidade aguda com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii*.

Tabela 1. Dados brutos com os valores do diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersividade (IPd) e potencial Zeta para o teste de toxicidade com a alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Leitura em 0 h			Leitura em 24 h		
	DH (Z-ave)	IPd		DH (Z-ave)	IPd
Solução-estoque R1	2456	0,402	16 mg L⁻¹ R1	3894	0,469
Solução-estoque R2	1749	0,456	16 mg L⁻¹ R2	3561	0,406
Solução-estoque R3	1672	0,476	16 mg L⁻¹ R3	3697	0,398
16 mg L⁻¹ R1	825,6	0,494	512 mg L⁻¹ R1	1990	0,211
16 mg L⁻¹ R2	956,4	0,406	512 mg L⁻¹ R2	2429	0,245
16 mg L⁻¹ R3	889,2	0,496	512 mg L⁻¹ R3	2260	0,294
512 mg L⁻¹ R1	1563	0,415			
512 mg L⁻¹ R2	1498	0,468			
512 mg L⁻¹ R3	1521	0,394			
Leitura em 48 h			Leitura em 72 h		
	D (Z-ave)	IPd		DH (Z-ave)	IPd
16 mg L⁻¹ R1	4896	0,509	16 mg L⁻¹ R1	5220	0,482
16 mg L⁻¹ R2	4761	0,499	16 mg L⁻¹ R2	5136	0,495
16 mg L⁻¹ R3	4681	0,467	16 mg L⁻¹ R3	5378	0,462
512 mg L⁻¹ R1	2550	0,147	512 mg L⁻¹ R1	2347	0,3
512 mg L⁻¹ R2	2829	0,07	512 mg L⁻¹ R2	2801	0,222
512 mg L⁻¹ R3	2861	0,213	512 mg L⁻¹ R3	2736	0,124
Leitura em 96 h			Potencial Zeta (solução-estoque em 0h)		
	DH (Z-ave)	IPd			
16 mg L⁻¹ R1	4944	0,485	R1	-23,3	
16 mg L⁻¹ R2	5349	0,475	R2	-23,6	
16 mg L⁻¹ R3	5462	0,435	R3	-24,3	
512 mg L⁻¹ R1	2165	0,164			
512 mg L⁻¹ R2	2894	0,339			
512 mg L⁻¹ R3	2866	0,45			

Tabela 2. Dados brutos com os valores do diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersividade (IPd) e potencial Zeta para o teste de contaminação da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Leitura em 0 h			Leitura em 24 h		
	DH (Z-ave)	IPd		DH (Z-ave)	IPd
0,01 mg L⁻¹ R1	956,5	0,472	0,01 mg L⁻¹ R1	997,9	0,428
0,01 mg L⁻¹ R2	896,5	0,469	0,01 mg L⁻¹ R2	971,4	0,426
0,01 mg L⁻¹ R3	936,8	0,423	0,01 mg L⁻¹ R3	1036	0,392
1 mg L⁻¹ R1	931,2	0,433	1 mg L⁻¹ R1	2677	0,395
1 mg L⁻¹ R2	1068	0,496	1 mg L⁻¹ R2	2047	0,412
1 mg L⁻¹ R3	1598	0,408	1 mg L⁻¹ R3	2072	0,435
10 mg L⁻¹ R1	1342	0,479	10 mg L⁻¹ R1	3646	0,458
10 mg L⁻¹ R2	1095	0,452	10 mg L⁻¹ R2	3869	0,428
10 mg L⁻¹ R3	998,6	0,429	10 mg L⁻¹ R3	3495	0,484
Leitura em 48 h			Leitura em 72 h		
	DH (Z-ave)	IPd		DH (Z-ave)	IPd
0,01 mg L⁻¹ R1	1267	0,479	0,01 mg L⁻¹ R1	2341	0,456
0,01 mg L⁻¹ R2	1477	0,425	0,01 mg L⁻¹ R2	1984	0,426
0,01 mg L⁻¹ R3	1356	0,453	0,01 mg L⁻¹ R3	2158	0,495
1 mg L⁻¹ R1	2977	0,482	1 mg L⁻¹ R1	2440	0,586
1 mg L⁻¹ R2	1679	0,428	1 mg L⁻¹ R2	1964	0,498
1 mg L⁻¹ R3	2540	0,456	1 mg L⁻¹ R3	2374	0,457
10 mg L⁻¹ R1	4306	0,459	10 mg L⁻¹ R1	5537	0,426
10 mg L⁻¹ R2	3968	0,427	10 mg L⁻¹ R2	6036	0,428
10 mg L⁻¹ R3	4168	0,468	10 mg L⁻¹ R3	5603	0,426
Leitura em 96 h			Potencial Zeta (solução-estoque em 0 h)		
	DH (Z-ave)	IPd			
0,01 mg L⁻¹ R1	2959	0,452	R1	-22,6	
0,01 mg L⁻¹ R2	3837	0,429	R2	-22,8	
0,01 mg L⁻¹ R3	3746	0,482	R3	-21,6	
1 mg L⁻¹ R1	2854	0,405			
1 mg L⁻¹ R2	2719	0,495			
1 mg L⁻¹ R3	2942	0,488			
10 mg L⁻¹ R1	5770	0,496			
10 mg L⁻¹ R2	5651	0,506			
10 mg L⁻¹ R3	5606	0,485			

Tabela 3. Dados brutos com os valores do diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersividade (IPd) e potencial Zeta para o teste agudo com o cladócero *Ceriodaphnia silvestrii*.

Leitura em 0 h			Leitura em 24 h		
	DH (Z-ave)	IPd		DH (Z-ave)	IPd
Solução-estoque R1	2376	0,497	6,25 mg/L R1	2586	0,469
Solução-estoque R2	3015	0,468	6,25 mg/L R2	2968	0,435
Solução-estoque R3	3165	0,485	6,25 mg/L R3	2657	0,458
6,25 mg/L R1	914,1	0,465	1600 mg/L R1	2049	0,437
6,25 mg/L R2	826,5	0,468	1600 mg/L R2	2564	0,428
6,25 mg/L R3	816,5	0,425	1600 mg/L R2	2685	0,462
1600 mg/L R1	907,2	0,429			
1600 mg/L R2	1065	0,462			
1600 mg/L R2	1265	0,458			
Leitura em 48 h			Potencial Zeta (solução-estoque em 0 h)		
	DH (Z-ave)	IPd			
6,25 mg/L R1	2259	0,415	R1	-15,8	
6,25 mg/L R2	2891	0,429	R2	-16	
6,25 mg/L R3	2906	0,439	R3	-15,5	
1600 mg/L R1	2905	0,457			
1600 mg/L R2	2055	0,475			
1600 mg/L R2	2268	0,492			

APÊNDICE E

Dados brutos relativos aos testes de sensibilidade com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* exposto a substância de referência cloreto de sódio (NaCl).

Tabela 1. Número de indivíduos imóveis (por réplica, total e porcentagem) do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos a diferentes concentrações da substância de referência cloreto de sódio (NaCl) (teste de sensibilidade número 1). Os valores das variáveis pH e dureza (mg de CaCO₃ L⁻¹) são também apresentados, os quais foram monitoradas no início (0 h) e no final (48 h) do teste.

Período de teste : 25 a 27/05/15							cloreto de sódio			
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>							teste: 1			
Concentração mg L ⁻¹	Número de organismos imóveis por réplica				Imóveis		pH inicial	pH final	Dureza inicial	Dureza final
	1	2	3	4	Total	%				
Controle	0	0	0	0	0	0	7,00	7,30	40	41
0,6	0	0	0	0	0	0	7,30	7,35	40	40
1,0	1	2	1	2	6	30	7,36	7,40	41	41
1,3	3	3	3	3	12	60	7,37	7,41	41	41
1,6	4	4	5	5	18	90	7,36	7,39	41	41
2,2	5	5	5	5	20	100	7,40	7,43	41	41
EC₅₀ (48 h): 1,18					IC (95%): 1,15 - 1,21					

Tabela 2. Número de indivíduos imóveis (por réplica, total e porcentagem) do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos a diferentes concentrações da substância de referência cloreto de sódio (NaCl) (teste de sensibilidade número 2). Os valores das variáveis pH e dureza (mg de CaCO₃ L⁻¹) são também apresentados, os quais foram monitoradas no início (0 h) e no final (48 h) do teste.

Período de teste : 25 a 27/06/15							cloreto de sódio			
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>							teste: 2			
Concentração mg L ⁻¹	Número de organismos imóveis por réplica				Imóveis		pH inicial	pH final	Dureza inicial	Dureza final
	1	2	3	4	Total	%				
Controle	0	0	0	0	0	0	7,20	7,30	40	40
0,6	0	1	0	0	0	0	7,20	7,3	40	40
1,0	2	2	1	2	7	35	7,30	7,32	40	41
1,3	4	3	3	3	13	65	7,30	7,35	40	42
1,6	4	4	5	5	18	90	7,30	7,39	40	40
2,2	5	5	5	5	20	100	7,30	7,35	40	42
EC₅₀ (48 h): 1,13					IC (95%): 1,11 - 1,15					

Tabela 3. Número de indivíduos imóveis (por réplica, total e porcentagem) do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos a diferentes concentrações da substância de referência cloreto de sódio (NaCl) (teste de sensibilidade número 3). Os valores das variáveis pH e dureza (mg de CaCO₃ L⁻¹) são também apresentados, os quais foram monitoradas no início (0 h) e no final (48 h) do teste.

Período de teste : 10 a 12/08/15		cloreto de sódio									
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>		teste: 3									
Concentração mg L ⁻¹	Número de organismos imóveis por réplica				Imóveis		pH inicial	pH final	Dureza inicial	Dureza final	
	1	2	3	4	Total	%					
Controle	0	0	0	1	1	5	7,00	7,30	42	42	
0,6	0	1	0	0	1	5	7,10	7,30	42	42	
1,0	2	0	2	1	5	25	7,00	7,30	42	43	
1,3	3	2	2	2	9	45	7,00	7,30	42	43	
1,6	4	4	4	4	16	80	7,00	7,30	42	42	
2,2	5	5	5	5	20	100	7,20	7,30	42	42	
EC₅₀ (48 h): 1,27							IC (95%): 1,15 - 1,41				

Tabela 4. Número de indivíduos imóveis (por réplica, total e porcentagem) do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos a diferentes concentrações da substância de referência cloreto de sódio (NaCl) (teste de sensibilidade número 4). Os valores das variáveis pH e dureza (mg de CaCO₃ L⁻¹) são também apresentados, os quais foram monitoradas no início (0 h) e no final (48 h) do teste.

Período de teste : 07 a 09/09/15		cloreto de sódio									
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>		teste: 4									
Concentração mg L ⁻¹	Número de organismos imóveis por réplica				Imóveis		pH inicial	pH final	Dureza inicial	Dureza final	
	1	2	3	4	Total	%					
Controle	0	0	0	0	0	0	7,20	7,30	40	40	
0,6	0	1	0	0	0	0	7,20	7,3	40	40	
1,0	2	0	2	1	5	25	7,30	7,32	40	41	
1,3	3	2	2	2	9	45	7,30	7,35	40	42	
1,6	4	4	4	4	16	80	7,30	7,39	40	40	
2,2	5	5	5	5	20	100	7,30	7,35	40	42	
EC₅₀ (48 h): 1,29							IC (95%): 1,24 - 1,34				

Tabela 5. Número de indivíduos imóveis (por réplica, total e porcentagem) do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos a diferentes concentrações da substância de referência cloreto de sódio (NaCl) (teste de sensibilidade número 5). Os valores das variáveis pH e dureza (mg de CaCO₃ L⁻¹) são também apresentados, os quais foram monitoradas no início (0 h) e no final (48 h) do teste.

Período de teste: 01 a 03/10/15		cloreto de sódio									
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>		teste: 5									
Concentração mg L ⁻¹	Número de organismos imóveis por réplica				Imóveis		pH inicial	pH final	Dureza inicial	Dureza final	
	1	2	3	4	Total	%					
Controle	0	0	0	0	0	0	7,20	7,30	41	42	
0,6	0	0	0	0	0	0	7,20	7,3	40	40	
1,0	1	2	1	2	6	30	7,30	7,32	40	41	
1,3	3	3	3	3	12	60	7,30	7,35	40	42	
1,6	4	4	5	5	18	90	7,30	7,39	40	40	
2,2	5	5	5	5	20	100	7,30	7,35	42	43	
EC₅₀ (48 h): 1,15					IC (95%): 1,04 - 1,27						

Tabela 6. Número de indivíduos imóveis (por réplica, total e porcentagem) do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos a diferentes concentrações da substância de referência cloreto de sódio (NaCl) (teste de sensibilidade número 6). Os valores das variáveis pH e dureza (mg de CaCO₃ L⁻¹) são também apresentados, os quais foram monitoradas no início (0 h) e no final (48 h) do teste.

Período de teste: 11 a 13/10/15		cloreto de sódio									
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>		teste: 6									
Concentração mg L ⁻¹	Número de organismos imóveis por réplica				Imóveis		pH inicial	pH final	Dureza inicial	Dureza final	
	1	2	3	4	Total	%					
Controle	0	0	0	0	0	0	7,20	7,40	41	41	
0,6	0	0	0	0	0	0	7,20	7,40	40	40	
1,0	0	0	0	1	1	5	7,20	7,40	42	42	
1,3	4	0	1	3	8	40	7,20	7,42	40	42	
1,6	4	2	2	4	12	60	7,20	7,40	40	40	
2,2	5	5	5	5	20	100	7,20	7,50	40	42	
EC₅₀ (48 h): 1,44					IC (95%): 1,39 - 1,49						

APÊNDICE F

Dados brutos relativos aos testes preliminares de toxicidade aguda com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* exposto às nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂).

Tabela 1. Número de organismos imóveis (por réplica, total e porcentagem) do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos a diferentes concentrações das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) (teste preliminar número 1). Os valores das variáveis pH, dureza (mg de CaCO₃ L⁻¹), Oxigênio Dissolvido (O D) mg L⁻¹ e temperatura (T) são também apresentados, os quais foram monitorados no final (48 h) do teste.

Período de teste: 27 a 29/05/15		nanopartícula de dióxido de titânio									
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>		teste preliminar: 1 - 48 h									
Concentração mg L ⁻¹	Número de organismos imóveis por réplica				Imóveis		pH final	Dureza final	O D final	T (°C) final	
	1	2	3	4	Total	%					
Controle	0	0	0	0	0	0	8,00	42	7,55	25	
100	5	5	5	5	0	0	8,01	42	7,55	25	
200	5	5	5	5	20	100	8,00	42	7,55	25	
400	5	5	5	5	20	100	8,03	42	7,55	25	
800	5	5	5	5	20	100	8,00	42	7,55	25	
1600	5	5	5	5	20	100	8,00	42	7,55	25	
EC₅₀ (48 h)		e				IC (95%): Não pode ser calculado					

Tabela 2. Número de organismos imóveis (por réplica, total e porcentagem) do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos a diferentes concentrações das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) (teste preliminar número 2). Os valores das variáveis pH, dureza (mg de CaCO₃ L⁻¹), Oxigênio Dissolvido (O D) mg L⁻¹ e temperatura (T) são também apresentados, os quais foram monitorados no final (48 h) do teste.

Período de teste: 16 a 18/06/15 nanopartícula de dióxido de titânio											
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>											
teste preliminar: 2 - 48 h											
Concentração mg L ⁻¹	Número de organismos imóveis por réplica						pH final	Dureza final	O D final	T (°C) final	
	1	2	3	4	Total	%					
Controle	0	0	0	0	0	0	8,00	44	7,55	25	
100	1	0	0	0	0	0	8,00	44	7,55	25	
200	1	1	0	0	2	10	8,00	44	7,55	25	
400	1	2	1	0	4	20	8,03	44	7,55	25	
800	3	2	2	1	8	40	8,00	44	7,55	25	
1600	5	5	5	5	20	100	8,00	44	7,55	25	
EC₅₀ (48 h)	e				IC (95%) Não pode ser calculado						

APÊNDICE G

Dados brutos relativos aos testes definitivos de toxicidade aguda definitivos com o cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* exposto às nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂).

Tabela 1. Número de organismos imóveis (por réplica, total e porcentagem) do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos a diferentes concentrações das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) (teste definitivo número 1). Os valores das variáveis pH, dureza (mg de CaCO₃ L⁻¹), Oxigênio Dissolvido (O D) mg L⁻¹ e temperatura (T) são também apresentados, os quais foram monitorados no final (48 h) do teste.

Período de teste: 02 a 04/07/15		nanopartícula de dióxido de titânio								
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>		teste: 1								
48 h										
Concentração mg L ⁻¹	Número de organismos imóveis por réplica				Imóveis		pH final	Dureza final	O D final	T (°C) final
	1	2	3	4	Total	%				
Controle	0	0	0	0	0	0	7,24	40	8,00	25
6,25	0	0	0	0	0	0	7,20	40	8,00	25
12,5	0	0	0	0	0	0	7,20	41	8,00	25
25	0	0	0	1	1	5	7,25	42	8,00	25
50	2	1	1	1	5	25	7,26	40	8,00	25
100	3	3	2	3	11	55	7,26	42	8,00	25
200	4	3	4	4	15	75	7,30	41	8,00	25
400	4	5	5	5	19	95	7,30	41	8,00	25
800	5	5	5	5	20	100	7,30	42	8,00	25
1600	5	5	5	5	20	100	7,30	42	8,00	25
EC₅₀ (48 h): 96,59		IC (95%): 74,29 - 125,6								

Tabela 2. Número de organismos imóveis (por réplica, total e porcentagem) do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos a diferentes concentrações das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) (teste definitivo número 2). Os valores das variáveis pH, dureza (mg de CaCO₃ L⁻¹), Oxigênio Dissolvido (O D) mg L⁻¹ e temperatura (T) são também apresentados, os quais foram monitorados no final (48 h) do teste.

Período de teste: 02 a 04/07/15 nanopartícula de dióxido de titânio										
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> teste: 2										
48 h										
Concentração mg L ⁻¹	Número de organismos imóveis por réplica				Imóveis		pH final	Dureza final	O D final	T (°C) final
	1	2	3	4	Total	%				
Controle	0	0	0	0	0	0	7,30	43	8,00	25
6,25	0	0	0	0	0	0	7,30	40	8,00	25
12,5	0	0	0	0	0	0	7,30	41	8,00	25
25	0	0	0	1	1	5	7,30	42	8,00	25
50	2	1	1	1	5	25	7,30	40	8,00	25
100	3	3	2	3	11	55	7,40	42	8,00	25
200	4	3	4	4	15	75	7,40	42	8,00	25
400	4	5	5	5	19	95	7,50	41	8,00	25
800	5	5	5	5	20	100	7,50	42	8,00	25
1600	5	5	5	5	20	100	7,50	42	8,00	25
EC₅₀ (48 h): 84,2					IC (95%): 61,80 - 114,40					

Tabela 3. Número de organismos imóveis (por réplica, total e porcentagem) do cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos a diferentes concentrações das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) (teste preliminar número 3). Os valores das variáveis pH, dureza (mg de CaCO₃ L⁻¹), Oxigênio Dissolvido (O D) mg L⁻¹ e temperatura (T) são também apresentados, os quais foram monitorados no final (48 h) do teste.

Período de teste: 22 a 24/08/15 nanopartícula de dióxido de titânio										
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> teste: 3										
48 h										
Concentração mg L ⁻¹	Número de organismos imóveis por réplica				Imóveis		pH final	Dureza final	O D final	T (°C) final
	1	2	3	4	Total	%				
Controle	0	0	0	0	0	0	7,30	42	8,10	25
6,25	2	0	0	0	0	0	7,30	42	8,10	25
12,5	0	0	1	1	2	10	7,30	42	8,10	25
25	0	0	2	1	3	15	7,30	42	8,10	25
50	3	3	4	3	13	65	7,30	42	8,10	25
100	4	3	3	3	13	65	7,40	42	8,10	25
200	5	4	5	3	17	85	7,40	42	8,10	25
400	5	4	5	5	19	95	7,50	42	8,10	25
800	5	5	5	5	20	100	7,50	42	8,10	25
1600	5	5	5	5	20	100	7,50	42	8,10	25
EC₅₀ (48 h): 48,7					IC (95%): 39,98 - 57,42					

Tabela 4. Número de organismos imóveis (por réplica, total e porcentagem) do cladóceros *Ceriodaphnia silvestrii* quando expostos a diferentes concentrações das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) (teste preliminar número 4). Os valores das variáveis pH, dureza (mg de CaCO₃ L⁻¹), Oxigênio Dissolvido (O D) mg L⁻¹ e temperatura (T) são também apresentados, os quais foram monitorados no final (48 h) do teste.

Período de teste: 15 a 17/09/15		nanopartícula de dióxido de titânio									
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>		teste: 4									
48 h											
Concentração mg L ⁻¹	Número de organismos imóveis por réplica				Imóveis		pH final	Dureza final	O D final	T (°C) final	
	1	2	3	4	Total	%					
Controle	0	0	0	0	0	0	8,00	42	8,11	25	
6,25	0	0	0	0	0	0	8,10	42	8,11	25	
12,5	1	1	0	0	2	10	8,20	42	8,11	25	
25	1	0	0	1	2	10	8,20	42	8,11	25	
50	2	2	1	2	7	35	8,20	42	8,11	25	
100	3	4	2	2	11	55	8,20	42	8,11	25	
200	5	4	4	4	17	85	8,20	42	8,11	25	
400	4	4	5	5	18	90	8,20	42	8,11	25	
800	4	5	5	5	19	95	8,20	42	8,11	25	
1600	5	5	5	5	20	100	8,20	42	8,11	25	
EC₅₀ (48 h): 80,8					IC (95%): 74,66 - 86,94						

APÊNDICE H

Dados brutos relativos aos testes de toxicidade crônica com o cladócero *Ceriodaphnia silvestrii* exposto às nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂).

Tabela 1. Valores das variáveis físicas e químicas do teste 1 de toxicidade crônica das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) monitoradas diariamente. Início (I) e Final (F) do teste. O D = Oxigênio Dissolvido, T°C = Temperatura.

Variáveis da água - Teste de toxicidade crônica									
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> nano-TiO₂									
Início: 19/08/2015					Término: 26/08/2015				
teste: 1									
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 1 (24 h)	Controle	7,1	8.3	40	44	6,15	8,17	25	24
	0,1	7,1	8.2	44	46	6,15	8,17	25	24
	1	7,1	8.2	42	42	6,15	8,18	25	24
	10	7,1	8.3	44	44	6,15	8,24	25	24
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 2 (48 h)	Controle	7,0	8,3	42	42	6,08	8,18	25	25
	0,1	7,0	8,5	43	44	6,08	8,18	25	25
	1	7,0	8,0	42	43	6,08	8,16	25	25
	10	7,0	8,0	44	44	6,08	8,19	25	25
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 3 (72 h)	Controle	7,1	8,1	40	42	6,22	8,15	25	25
	0,1	7,1	8,2	41	40	6,22	8,18	25	25
	1	7,1	8,1	41	44	6,22	8,17	25	25
	10	7,1	8,2	41	44	6,22	8,18	25	25
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 4 (96 h)	Controle	7,1	8,2	42	42	6,32	8,20	25	25
	0,1	7,1	8,1	42	42	6,32	8,19	25	25
	1	7,1	8,3	41	43	6,32	8,20	25	25
	10	7,1	8,3	41	43	6,32	8,24	25	25
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 4 (120 h)	Controle	7,1	8	40	40	6,20	8,17	25	25
	0,1	7,1	8,2	40	40	6,20	8,18	25	25
	1	7,1	8,1	41	42	6,20	8,19	25	25
	10	7,1	8,3	41	44	6,20	8,22	25	25
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 4 (144 h)	Controle	7,2	8,0	42	42	6,35	8,19	25	25
	0,1	7,2	8,2	44	44	6,35	8,22	25	25
	1	7,2	8,1	44	44	6,35	8,19	25	25
	10	7,2	8,2	44	46	6,35	8,19	25	25

Variáveis da água - Teste de toxicidade crônica

Organismo-teste: *Ceriodaphnia silvestrii* nano-TiO₂

Início: 19/08/2015

Término: 26/08/2015

teste: 1

nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 4 (192 h)	Controle	7,2	8,0	40	40	6,24	8,23	24	25
	0,1	7,2	8,0	40	41	6,24	8,32	24	25
	1	7,2	8,0	40	44	6,24	8,20	24	25
	10	7,2	8,0	40	44	6,24	8,22	24	25

Tabela 2. Valores das variáveis físicas e químicas do teste 2 de toxicidade crônica das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) monitoradas diariamente. Início (I) e Final (F) do teste. O D = Oxigênio Dissolvido, T°C = Temperatura.

Variáveis da água - Teste de toxicidade crônica									
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>									
Início: 26/09/2015					 nano-TiO₂ teste: 2				
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 1 (24 h)	Controle	7,0	7,9	40	44	6,23	8,2	25	25
	0,1	7,0	7,9	43	46	6,23	8,17	25	25
	1	7,0	7,9	44	46	6,23	8,18	25	25
	10	7,0	8,0	44	46	6,23	8,20	25	25
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 2 (48 h)	Controle	7,0	8,3	38	42	6,19	8,18	25	25
	0,1	7,0	8,3	40	42	6,19	8,23	25	25
	1	7,0	8,3	42	42	6,19	8,16	25	25
	10	7,0	8,3	42	42	6,19	8,22	25	25
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 3 (72 h)	Controle	7,1	8,1	38	40	6,27	8,21	25	25
	0,1	7,1	7,9	38	40	6,27	8,20	25	25
	1	7,1	8,1	41	40	6,27	8,22	25	25
	10	7,1	8,0	41	40	6,27	8,23	25	25
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 4 (96 h)	Controle	7	8	40	40	6,33	8,24	25	25
	0,1	7,1	7,9	40	42	6,33	8,23	25	25
	1	7	8,0	40	41	6,33	8,20	25	25
	10	7,1	8,0	40	42	6,33	8,24	25	25
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 4 (120 h)	Controle	7,3	8,0	38	40	6,25	8,27	25	25
	0,1	7,3	8,0	40	42	6,25	8,28	25	25
	1	7,3	8,1	40	42	6,25	8,29	25	25
	10	7,3	8,0	41	42	6,25	8,27	25	25
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 4 (144 h)	Controle	7,2	8,0	40	42	6,25	8,27	25	25
	0,1	7,2	8,0	40	40	6,25	8,28	25	25
	1	7,2	8,1	40	40	6,25	8,29	25	25
	10	7,2	8,2	40	42	6,25	8,27	25	25

Variáveis da água - Teste de toxicidade crônica

Organismo-teste: *Ceriodaphnia silvestrii*

nano-TiO₂

Início: 26/09/2015

Término: 03/10/2015

teste: 2

nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 4 (192 h)	Controle	7,0	8,0	41	40	6,34	8,29	25	25
	0,1	7,0	8,2	40	41	6,34	8,29	25	25
	1	7,0	8,0	42	44	6,34	8,29	25	25
	10	7,0	8,0	44	44	6,34	8,29	25	25

Tabela 3. Valores das variáveis físicas e químicas do teste 3 de toxicidade crônica das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) monitoradas diariamente. Início (I) e Final (F) do teste. O D = Oxigênio Dissolvido. T°C = Temperatura.

Variáveis da água - Teste de toxicidade crônica									
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>									
Início: 27/09/2015					Término: 04/10/2015				
nano-TiO ₂ teste: 3									
nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 1 (24 h)	Controle	7,3	8,1	38	40	6,32	8,35	25	25
	0,1	7,3	8,1	40	40	6,32	8,37	25	25
	1	7,3	8,1	40	40	6,32	8,28	25	25
	10	7,3	8,0	40	40	6,32	8,30	25	25
nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 2 (48 h)	Controle	7,2	8	40	41	6,29	8,27	25	24
	0,1	7,2	8	42	42	6,29	8,23	25	25
	1	7,2	8	42	42	6,29	8,19	25	24
	10	7,2	8	42	44	6,29	8,22	25	24
nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 3 (72 h)	Controle	7,1	7,9	42	42	6,37	8,19	25	25
	0,1	7,1	7,9	42	44	6,37	8,18	25	25
	1	7,1	8,1	42	42	6,37	8,22	25	25
	10	7,1	8	42	44	6,37	8,22	25	25
nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 4 (96 h)	Controle	7,3	7,7	40	40	6,43	8,34	25	25
	0,1	7,3	7,8	38	40	6,43	8,34	25	25
	1	7,3	8,0	40	42	6,43	8,34	25	25
	10	7,3	8,0	40	42	6,43	8,34	25	25
nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 4 (120 h)	Controle	7,2	8,1	38	40	6,35	8,39	24	25
	0,1	7,2	8,0	42	44	6,35	8,38	24	25
	1	7,2	8,1	42	44	6,35	8,39	24	25
	10	7,2	8,1	42	46	6,35	8,39	24	25
nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 4 (144 h)	Controle	7,3	7,9	42	42	6,4	8,22	25	25
	0,1	7,3	7,8	40	42	6,4	8,22	25	25
	1	7,3	7,9	42	44	6,4	8,19	25	25
	10	7,3	7,8	42	44	6,4	8,22	25	25

Variáveis da água - Teste de toxicidade crônica**Organismo-teste:** *Ceriodaphnia silvestrii*nano-TiO₂**Início:** 27/09/2015**Término:** 04/10/2015**teste:** 3

nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		pH		Dureza		O D		T°C	
		I	F	I	F	I	F	I	F
Leitura 4 (192 h)	Controle	7,0	7,8	38	40	6,22	8,39	25	25
	0,1	7,0	7,5	38	40	6,22	8,25	25	25
	1	7,0	7,8	40	42	6,22	8,24	25	25
	10	7,0	8,0	40	42	6,22	8,25	25	25

Tabela 4. Comprimento corporal (μm) de *Ceriodaphnia silvestrii* antes da exposição e após a exposição às nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) para as três concentrações testadas no teste 1.

Registro do teste de toxicidade crônica							
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>				nano-TiO ₂			
Início: 19/08/2015		Término: 26/08/2015		Teste: 1			
Antes da exposição				7 dias após a exposição			
Controle	0,01	1	10	Controle	0,01	1	10
325	325	325	325	1000	950	950	950
325	350	325	325	975	1000	925	925
325	350	325	350	975	975	950	925

Tabela 5. Comprimento corporal (μm) de *Ceriodaphnia silvestrii* antes da exposição e após a exposição às nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) para as três concentrações testadas no teste 2.

Registro do teste de toxicidade crônica							
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>				nano-TiO ₂			
Início: 26/09/2015		Término: 03/10/2015		Teste: 2			
Antes da exposição				7 dias após a exposição			
Controle	0,01	1	10	Controle	0,01	1	10
325	325	325	325	1000	1000	1000	950
325	350	325	325	1000	1000	950	950
350	350	325	325	975	1000	950	925

Tabela 6. Comprimento corporal (μm) de *Ceriodaphnia silvestrii* antes da exposição e após a exposição às nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) para as três concentrações testadas no teste 3.

Registro do teste de toxicidade crônica							
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>				nano-TiO ₂			
Início: 27/09/2015		Término: 04/10/2015		Teste: 3			
Antes da exposição				7 dias após a exposição			
Controle	0,01	1	10	Controle	0,01	1	10
375	350	325	375	1000	900	1000	950
375	350	350	325	1000	1000	950	950
400	350	375	325	1000	1000	950	1000

Tabela 7. Porcentagem de sobrevivência do organismo-teste *Ceriodaphnia silvestrii* durante o teste 1 de toxicidade crônica das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂).

Registro do do teste de toxicidade crônica				
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>		nano-TiO ₂		
Início: 19/08/2015	Término: 26/08/2015	Teste: 1		
	Controle	0,01	1	10
Total	10	10	10	10
Sobrevivência	9	7	3	3
Porcentagem (%)	90	70	30	30

Tabela 8. Porcentagem de sobrevivência do organismo-teste *Ceriodaphnia silvestrii* durante o teste 2 de toxicidade crônica das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂).

Registro do do teste de toxicidade crônica				
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> nano-TiO ₂				
Início: 26/09/2015		Término: 03/10/2015		Teste: 2
	Controle	0,01	1	10
Total	10	10	10	10
Sobrevivência	8	6	5	2
Porcentagem (%)	80	60	50	20

Tabela 9. Porcentagem de sobrevivência do organismo-teste *Ceriodaphnia silvestrii* durante o teste 3 de toxicidade crônica das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂).

Registro do do teste de toxicidade crônica				
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> nano-TiO ₂				
Início: 27/09/2015		Término: 04/10/2015		Teste: 3
	Controle	0,01	1	10
Total	10	10	10	10
Sobrevivência	9	7	4	3
Porcentagem (%)	90	70	40	30

Tabela 10. Número de ovos produzidos durante o teste 1 de toxicidade crônica das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) com o organismo-*teste Ceriodaphnia silvestrii*. A letra M significa que ocorreu a morte dos organismos adultos.

Registro do teste de toxicidade crônica											
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>											
Início: 19/08/2015 Término: 26/08/2015 nano-TiO₂ Teste: 1											
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 1 (24 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 2 (48 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 3 (72 h)	Controle	4	4	3	4	4	3	4	4	4	4
	0,1	4	4	4	3	4	4	4	3	4	3
	1	3	3	3	3	3	3	3	3	3	M
	10	3	3	M	2	2	M	3	M	3	3
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 4 (96 h)	Controle	5	5	4	5	5	4	5	5	5	5
	0,1	M	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	1	0	0	0	0	M	0	0	M	0	M
	10	0	0	M	0	2	M	0	M	0	0
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 5 (120 h)	Controle	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	0,1	M	4	4	4	4	4	4	4	4	4
	1	4	M	4	M	M	3	4	M	3	M
	10	4	4	M	3	M	M	M	M	4	4
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 6 (144 h)	Controle	5	6	5	6	4	6	5	6	5	5
	0,1	M	M	5	M	5	5	6	5	6	6
	1	M	M	5	M	M	4	6	M	M	M
	10	M	5	M	M	M	M	M	M	5	5

Registro do teste de toxicidade crônica

Organismo-teste: *Ceriodaphnia silvestrii* nano-TiO₂
Início: 19/08/2015 **Término:** 26/08/2015 **Teste:** 1

nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 7 (192 h)	Controle	6	5	M	5	4	5	5	5	6	6
	0,1	M	M	5	M	6	5	5	6	6	5
	1	M	M	4	M	M	0	5	M	M	M
	10	M	0	M	M	M	M	M	M	0	5

Tabela 11. Número de ovos produzidas durante o teste 2 de toxicidade crônica das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) com o organismo-*teste Ceriodaphnia silvestrii*. A letra M significa que ocorreu a morte dos organismos adultos.

Registro do teste de toxicidade crônica											
Organismo-<i>teste</i>: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>										nano-TiO ₂	
Início: 26/09/2015					Término: 03/10/2015					Teste: 2	
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 1 (24 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 2 (48 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 3 (72 h)	Controle	4	4	3	4	4	4	3	4	5	3
	0,1	4	4	4	4	4	M	2	4	4	4
	1	M	2	M	3	3	3	3	3	2	2
	10	M	3	3	3	M	M	3	3	3	3
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 4 (96 h)	Controle	0	6	6	6	5	5	5	0	0	M
	0,1	0	4	3	5	M	M	3	4	5	5
	1	M	M	M	4	4	4	4	4	5	5
	10	M	M	0	4	M	M	7	5	M	0
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 5 (120 h)	Controle	6	7	6	5	6	M	6	6	6	M
	0,1	4	0	M	5	M	M	M	5	4	0
	1	M	M	M	M	0	4	0	4	5	4
	10	M	M	5	5	M	M	5	5	M	4
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 6 (144 h)	Controle	7	6	6	5	5	M	5	6	7	M
	0,1	6	7	M	7	M	M	M	5	6	6
	1	M	M	M	M	6	M	6	6	6	5
	10	M	M	6	M	M	M	6	5	M	M

Registro do teste de toxicidade crônica**Organismo-teste:** *Ceriodaphnia silvestrii*nano-TiO₂**Início:** 26/09/2015 **Término:** 03/10/2015**Teste:** 2

nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 7 (192 h)	Controle	6	6	6	6	6	M	7	6	6	M
	0,1	7	6	M	6	M	M	M	6	6	6
	1	M	M	M	M	6	M	5	6	5	6
	10	M	M	6	M	M	M	6	M	M	M

Tabela 12. Número de ovos produzidas durante o teste 3 de toxicidade crônica das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) com o organismo-*teste Ceriodaphnia silvestrii*. A letra M significa que ocorreu a morte dos organismos adultos.

Registro do teste de toxicidade crônica											
Organismo-<i>teste</i>: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>										nano-TiO ₂	
Início: 27/09/2015					Término: 04/10/2015					Teste: 3	
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 1 (24 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 2 (48 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	M	0	0	0	0	0	0	0	0	
	10	0	M	0	0	M	M	0	0	0	M
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 3 (72 h)	Controle	3	4	3	3	4	3	3	4	5	3
	0,1	3	3	3	3	3	4	3	3	3	M
	1	M	3	2	3	M	3	3	3	2	2
	10	3	M	3	3	M	M	3	3	M	M
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 4 (96 h)	Controle	6	6	6	6	0	6	6	6	0	0
	0,1	4	0	0	4	4	0	4	5	4	M
	1	M	0	0	4	M	4	4	4	0	4
	10	0	M	0	6	M	M	0	0	M	M
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 5 (120 h)	Controle	6	6	6	5	6	6	6	6	6	5
	0,1	4	5	6	5	5	6	6	6	M	M
	1	M	5	5	5	M	M	M	4	5	M
	10	0	M	5	5	M	M	5	5	M	M
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 6 (144 h)	Controle	6	6	6	M	6	7	7	7	7	7
	0,1	7	7	7	M	7	7	6	6	M	M
	1	M	M	6	6	M	M	M	6	6	M
	10	M	M	6	6	M	M	6	0	M	M

Registro do teste de toxicidade crônica**Organismo-teste:** *Ceriodaphnia silvestrii*nano-TiO₂**Início:** 27/09/2015**Término:** 04/10/2015**Teste:** 3

nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 7 (192 h)	Controle	7	6	6	M	6	6	7	6	6	7
	0,1	6	6	6	M	6	6	6	6	M	M
	1	M	M	6	6	M	M	M	6	6	M
	10	M	M	6	5	M	M	6	0	M	M

Tabela 13. Número de neonatas produzidas durante o teste 1 de toxicidade crônica das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) com o organismo-*teste Ceriodaphnia silvestrii*. A letra M significa que ocorreu a morte dos organismos adultos.

Registro do teste de toxicidade crônica											
Organismo-<i>teste: Ceriodaphnia silvestrii</i>						nano-TiO₂					
Início: 19/08/2015			Término: 26/08/2015			Teste: 1					
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 1 (24 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 2 (48 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 3 (72 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	M
	10	0	0	M	0	0	M	0	M	0	0
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 4 (96 h)	Controle	4	4	3	4	4	3	4	4	4	4
	0,1	M	4	4	3	4	4	4	3	4	4
	1	0	1	2	2	M	2	3	M	3	M
	10	3	3	M	2	0	M	3	M	2	3
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 5 (120 h)	Controle	5	5	4	5	5	4	5	4	5	4
	0,1	M	4	3	3	4	3	4	3	4	3
	1	0	M	0	M	M	0	0	M	3	M
	10	0	0	M	0	M	M	M	M	0	0
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 6 (144 h)	Controle	4	5	4	4	4	5	3	4	3	5
	0,1	M	3	3	3	4	4	3	3	3	2
	1	3	M	4	M	M	3	4	M	3	M
	10	4	4	M	3	M	M	M	M	4	4

Registro do teste de toxicidade crônica**Organismo-teste:** *Ceriodaphnia silvestrii*nano-TiO₂**Início:** 19/08/2015**Término:** 26/08/2015**Teste:** 1

nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 7 (192 h)	Controle	5	5	4	5	3	5	4	5	4	4
	0,1	M	M	4	M	5	4	4	5	5	5
	1	M	M	4	M	M	4	4	M	M	M
	10	M	4	M	M	M	M	M	M	3	4

Tabela 14. Número de neonatas produzidas durante o teste 2 de toxicidade crônica das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) com o organismo-*teste Ceriodaphnia silvestrii*. A letra M significa que ocorreu a morte dos organismos adultos.

Registro dos dados/teste do teste de toxicidade crônica											
Organismo-<i>teste</i>: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>											nano-TiO ₂
Início: 26/09/2015			Término: 03/10/2015				Teste: 2				
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 1 (24 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 2 (48 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	M	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 3 (72 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	M	0	0	0	0
	1	M	0	M	0	0	0	0	0	0	0
	10	M	0	0	0	M	M	0	0	0	0
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 4 (96 h)	Controle	4	3	4	4	4	3	3	4	5	2
	0,1	3	4	4	4	3	M	2	3	3	4
	1	M	2	M	3	3	2	3	3	2	2
	10	M	2	0	3	M	M	2	3	2	3
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 5 (120 h)	Controle	0	6	5	6	4	4	4	0	0	M
	0,1	0	4	2	5	M	M	2	4	5	5
	1	M	M	M	3	4	3	4	3	4	4
	10	M	M	0	4	M	M	5	5	M	4
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 6 (144 h)	Controle	6	7	6	4	5	M	5	5	5	M
	0,1	4	0	M	5	M	M	M	5	5	0
	1	M	M	M	M	0	3	0	4	5	4
	10	M	M	4	4	M	M	4	5	M	4

Registro dos dados/teste do teste de toxicidade crônica**Organismo-teste:** *Ceriodaphnia silvestrii*nano-TiO₂**Início:** 26/09/2015**Término:** 03/10/2015**Teste:** 2

nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 7 (192 h)	Controle	7	6	6	5	5	M	5	6	7	M
	0,1	6	7	M	7	M	M	M	5	5	5
	1	M	M	M	M	6	M	5	5	6	5
	10	M	M	6	M	M	M	6	M	M	M

Tabela 15. Número de neonatas produzidas durante o teste 3 de toxicidade crônica das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) com o organismo-*teste Ceriodaphnia silvestrii*. A letra M significa que ocorreu a morte dos organismos adultos.

Registro dos dados/teste do teste de toxicidade crônica											
Organismo-teste: <i>Ceriodaphnia silvestrii</i>										nano-TiO₂	
Início: 27/09/2015			Término: 04/10/2015				Teste: 3				
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 1 (24 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 2 (48 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	M	0	0	0	M	0	0	0	0	0
	10	0	M	0	0	M	M	0	0	0	M
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 3 (72 h)	Controle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	M
	1	M	0	0	0	M	0	0	0	0	0
	10	0	M	0	0	M	M	0	0	0	M
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 4 (96 h)	Controle	3	4	3	2	4	3	3	4	3	4
	0,1	3	3	3	3	2	4	3	3	0	M
	1	M	3	2	2	M	2	3	3	2	2
	10	M	M	3	3	M	M	3	2	2	M
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 4 (120 h)	Controle	4	6	5	5	0	4	3	4	0	0
	0,1	0	6	0	4	4	0	4	4	4	M
	1	M	0	0	3	M	4	3	3	0	4
	10	M	M	0	6	M	M	0	0	M	M
nano-TiO₂ - mg L⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 4 (144 h)	Controle	6	5	5	5	6	5	6	5	5	5
	0,1	4	5	5	M	4	6	6	6	M	M
	1	M	5	4	4	M	3	M	4	4	M
	10	M	M	5	5	M	M	4	4	M	M

Registro dos dados/teste do teste de toxicidade crônica**Organismo-teste:** *Ceriodaphnia silvestrii*nano-TiO₂**Início:** 27/09/2015**Término:** 04/10/2015**Teste:** 3

nano-TiO ₂ - mg L ⁻¹		Réplicas									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Leitura 4 (192 h)	Controle	6	6	6	M	6	7	7	7	7	6
	0,1	6	6	7	M	6	7	6	6	M	M
	1	M	M	5	6	M	M	M	6	6	M
	10	M	M	6	6	M	M	5	M	M	M