

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Renan Castelhana Gebara

**Toxicidade de nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4)
para o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii***

São Carlos / SP

Março, 2017

**Toxicidade de nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4)
para o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii***

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

Renan Castelhana Gebara

**Toxicidade de nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4)
para o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii***

Orientadora:

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

Coorientadora:

Dr.^a Jaqueline Pérola de Souza

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

São Carlos / SP

Março, 2017



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 do candidato Renan Castelhana Gebara, realizada em 02/03/2017:

Maria da Graça G. Melão

Profa. Dra. Maria da Graça Gama Melão
UFSCar

Odete Rocha

Profa. Dra. Odete Rocha
UFSCar

Suzelei Rodigher

Profa. Dra. Suzelei Rodigher
UNESP

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus e a toda minha família, por todo suporte e motivação ao longo de minha vida.

À Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Gama Melão pela orientação, por todos os ensinamentos que contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal, pela confiança e por todo tempo investidos em mim.

À Dr.^a Jaqueline Pérola de Souza, pelo coorientação e pela caracterização das nanopartículas.

À Dr.^a Giseli Swerts Rocha pelos valiosos conselhos, pela ajuda de suma importância na revisão do manuscrito em inglês, pela paciência em ensinar e por todos os aprendizados profissionais e pessoais que a mim foram proporcionados.

À Prof.^a Dr.^a Odete Rocha, por estar sempre acessível e disposta a ajudar, pelos conselhos e ajuda durante o desenvolvimento do trabalho, pelas sugestões e correções no exame de qualificação e na defesa da dissertação.

À Dr.^a Liane Biehl Printes e à Dr.^a Denise Tieme Okumura pelas sugestões e correções no exame de qualificação.

À Dr.^a Suzelei Rodgher, pelas sugestões e correções na defesa da dissertação.

Ao Prof. Dr. Hugo Miguel Preto de Moraes Sarmiento por toda ajuda e suporte no laboratório.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto e ao Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia (Instituto de Física – Universidade de São Paulo, campus São Carlos), pela infraestrutura cedida para caracterização das nanopartículas.

Aos meus amigos: Bruna, Roberta, Paulinha, Giseli, Vinicius, Helena, Lays, Michaela, Erika, Mariana e Adriano, pelos bons momentos, conversas e risadas, que tornaram / tornam minha estada em São Carlos mais prazerosa.

Aos meus colegas de laboratório: Lays, Giseli, Helena, Karime, Rodrigo e Ricardo pela troca de experiências, que culminaram em aprendizados profissionais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de estudos concedida (processo 132379/2015-5).

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo auxílio financeiro (processos 2014/14139-3 e 2016/00753-7).

Ao Departamento de Hidrobiologia, por fornecer a infraestrutura necessária para realização deste trabalho.

A todos que de alguma forma contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“[...] And should they tell you

You'll never pull through

Don't hesitate [...]

[...] And every time I feel afraid

I hold tighter to my Faith

And I live one more day

And I make it through the rain [...]”

*(Through the Rain,
Mariah Carey / Lionel Cole)*

RESUMO

As nanopartículas (NPs) têm sido amplamente produzidas em larga escala para vários propósitos tais como: produção de cosméticos, protetores solares, biosensores, próteses humanas e tratamento do câncer. No entanto, devido à ampla produção, eventualmente as NPs podem encontrar seu destino final nos corpos d'água, onde os estudos relativos à presença dessas substâncias muitas vezes não são suficientes para estimar os efeitos que as mesmas poderiam causar nos organismos aquáticos. Estudos de toxicidade crônica com nanopartículas de óxido de ferro (nano-Fe₃O₄) são escassos e, até onde sabemos, inexistentes para cladóceros tropicais, embora avaliações crônicas sejam de grande importância para predição dos efeitos de substâncias, pois abrangem grande parte do ciclo de vida dos organismos. No presente estudo, foram estudadas nanopartículas de Fe₃O₄ para cladóceros neotropical *Ceriodaphnia silvestrii*, por meio de testes de toxicidade aguda (0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00 e 100,00 mg L⁻¹), durante 48 horas, e crônica (0,00; 3,125; 6,25; 12,50; 25,00 e 50,00 mg L⁻¹), durante 14 dias. A caracterização das NPs nos meios de exposição revelou que elas sofreram aglomeração e agregação em escalas micrométricas. Os resultados obtidos apontaram ausência de toxicidade aguda para as nano-Fe₃O₄ (CE(I)50_{48h} > 100,00 mg L⁻¹). Nos testes de toxicidade crônica, no tratamento de 50,00 mg L⁻¹, houve inibição significativa no crescimento e reprodução, afetando o comprimento máximo (inibição de 12,71%) e o número acumulado de ovos (diminuição de 51,99%) e de neonatas (diminuição de 61,37%) produzidos por fêmea (teste de Dunnett p < 0.05). Concluiu-se que as nano-Fe₃O₄ apresentaram efeitos crônicos, no 14º dia, para o cladóceros *C. silvestrii* somente na maior concentração avaliada (50,00 mg L⁻¹). O uso de nano-Fe₃O₄ em ambientes aquáticos pode ser considerado seguro para esta espécie de cladóceros tropical, com base nos parâmetros avaliados, até concentrações de 25,00 mg L⁻¹.

Palavras-chave: ecotoxicologia; nanotoxicologia; nanopartículas magnéticas; magnetita; microcrustáceos; espécies neotropicais.

ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) have been produced on a large scale worldwide for various consumer purposes such as the production of cosmetics, sunscreen, biosensors, human prosthetics and cancer therapy. However, due to its large production, NPs can have water bodies as final destination, where current studies addressing these compounds are not sufficient to estimate the threat that these substances could cause to aquatic organisms. Chronic studies with nano-Fe₃O₄ are scarce and, to the best of our knowledge, inexistent regarding tropical zooplankton species, although chronic studies are of great importance to predict the effects of the substances because they analyses great part of this organisms life cycle. At present study, we investigated nanoparticles of Fe₃O₄, to the tropical cladoceran *Ceriodaphnia silvestrii* using acute toxicity tests (0.00; 0.01; 0.10; 1.00; 10.00 and 100.00 mg L⁻¹) during 48h, and chronic toxicity tests (0.00; 3.125; 6.25; 12.50; 25.00 and 50.00 mg L⁻¹) during 14 days. Characterization of NPs in the exposure medium revealed that they experienced agglomeration and aggregation on a micrometer scale. Results showed non-toxicity of nano-Fe₃O₄ after 48h of acute exposure (EC₅₀_{48h} > 100.00 mg L⁻¹). In chronic tests, treatment of 50 mg L⁻¹ caused significant inhibition of growth and reproduction, affecting the maximum length (inhibited 12.71%), accumulated number of eggs (reduction of 51.99%) and neonates (decrease of 61.37%) per female (Dunnett's test, p < 0.05). We concluded that nano-Fe₃O₄, in the 14th day, was toxic to *C. silvestrii* only at the highest concentration tested (50.00 mg L⁻¹) during this chronic exposure.. The use of nano-Fe₃O₄ in aquatic environments could be considered safe to this species in concentrations up to 25.00 mg L⁻¹, according to the parameters evaluated.

Key-words: ecotoxicology; nanotoxicology; magnetic nanoparticles; magnetite; microcrustaceans; Neotropical species.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1. Introdução geral e objetivos

- Figura. 1 – Desenho esquemático comparando o tamanho das nanopartículas (1-100 nm) com o de outras estruturas conhecidas 20
- Figura. 2 – Esquema demonstrando tratamento contra o câncer, utilizando NPs de óxido de ferro. À esquerda: *drug delivery*. À direita: hipertermia por campo magnético 23
- Figura. 3 – Remediação de solo contaminado, utilizando nanopartículas de óxido de ferro ... 24

Capítulo 2. Metodologia geral

- Figura. 1 – Clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata*, utilizada como alimento para *Ceriodaphnia silvestrii* 32
- Figura. 2 – Cultura de *Pseudokirchneriella subcapitata*, sob leve aeração 33
- Figura. 3 – Cladóceros nativos *Ceriodaphnia silvestrii*, utilizados como organismos teste no presente estudo 35
- Figura. 4 – Desenho experimental do teste de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia silvestrii* exposta a cinco concentrações de nano-Fe₃O₄ (0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00 e 100,00 mg L⁻¹) 39
- Figura. 5 – Desenho experimental do teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia silvestrii* exposta a 5 concentrações de nano-Fe₃O₄ (0,00; 3,125; 6,25; 12,50; 25,00 e 50,00 mg L⁻¹) .. 40

Capítulo 3. Artigo científico: “Efeitos de nanopartículas de óxido de ferro (Fe₃O₄) para o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*”

- Fig. 1 – Comprimento corporal médio (µm) de *Ceriodaphnia silvestrii* durante 14 dias de exposição a 5 concentrações de nano-Fe₃O₄ (0,00; 3,125; 6,25; 12,50; 25,00 e 50,00 mg L⁻¹). Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle ($\alpha = 0.05$). 54

Fig. 2 – Número acumulado médio de ovos (A) e neonatas (B) por fêmea de *Ceriodaphnia silvestrii*, exposta a 5 concentrações de nano-Fe₃O₄ (0,00; 3,125; 6,25; 12,50; 25,00 e 50,00 mg L⁻¹) durante 14 dias. Cada ponto representa o valor médio de 10 replicas Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle ($\alpha = 0.05$). 57

Fig. 3 – *Ceriodaphnia silvestrii* exposta a 6,25 mg L⁻¹ de nano-Fe₃O₄ durante teste de toxicidade crônica (dias de exposição: A = 9; B = 11). As figuras indicam as NPs internalizadas no sistema digestivo (flechas sólidas) e nos ovos (flechas pontilhadas) dos cladóceros 59

Apêndices

Apêndice 1 – Carta controle de *Ceriodaphnia silvestrii* exposta à substância de referência cloreto de sódio (NaCl). Onde: as linhas pontilhadas representam os limites inferior e superior; a linha sólida o valor médio de CE(I)50_{48h}; e os quadrados o valor de CE(I)50_{48h} de cada teste..... 72

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1. Introdução geral e objetivos

Tabela. 1 – Estimativa da produção mundial de nanopartículas metálicas ao ano (Piccinno et al., 2012)..... 21

Capítulo 3. Artigo científico: “Efeitos de nanopartículas de óxido de ferro (Fe₃O₄) para o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*”

Tabela. 1 – Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (SD) para os seguintes parâmetros de caracterização, durante os testes de toxicidade crônica, das nano-Fe₃O₄: tamanho hidrodinâmico (diâmetro em nm), índice de polidispersividade (PdI) e potencial-zeta (mV). Amostras foram coletadas durante dois períodos experimentais (T): 0 e 72h após o início do teste de toxicidade crônica..... 52

Tabela. 2 – Testes de toxicidade aguda de nanopartículas de óxido ferro (nano-Fe₃O₄) encapsadas e não, para diferentes espécies de cladóceros, onde TMAOH é a sigla para tetramethylammonium hydroxide; e PVP significa polymer polyvinyl pyrrolidone. *D.* = *Daphnia*; *C.* = *Ceriodaphnia*; SR = sem revestimento..... 53

Tabela. 3 – Valores de CENO(I) (concentração inicial de efeito não observado) e CEO(I) (concentração inicial de efeito observado) para parâmetros de bionomia de *Ceriodaphnia silvestrii* exposta a nano-Fe₃O₄ por 14 dias e análise estatística utilizada. As abreviações representam os seguintes testes estatísticos: A= one way-ANOVA; KW = Kruskal-Wallis; D = Dunnett; Du = Dunn's; T = Tukey 55

Tabela. 4 – Parâmetros de ciclo de vida de *Ceriodaphnia silvestrii* exposta a 5 concentrações de nano-Fe₃O₄ (mg L⁻¹). Os valores médio estão apresentados, seguidos dos desvios-padrões. Linhas em que os valores apresentam mesma letra sobscrita correspondem a diferenças não significativas (p > 0.05). 60

Apêndices

Apêndice 2 – Parâmetros físicos e químicos da água durante os testes de toxicidade aguda e crônica com <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> exposta a 5 concentrações de nano-Fe ₃ O ₄	73
--	----

LISTA DE ABREVIACOES

- ANOVA: anlise de varincia;
- CE(I)50 (concentrao inicial efetiva): concentrao nominal que causa efeito agudo a 50% dos organismos no tempo de exposio, nas condioes do ensaio;
- CL(I)50 (concentrao inicial letal): concentrao nominal que causa letalidade a 50% dos organismos no tempo de exposio, nas condioes do ensaio;
- Nano-Fe₃O₄: nanoprticulas de xido de ferro (Fe₃O₄);
- NP: nanoprticula;
- UV: ultravioleta.

SUMÁRIO

Estrutura do trabalho	15
Capítulo 1. Introdução geral e objetivos.....	16
1. Introdução geral	17
1.1 Ecotoxicologia	17
1.2 Nanopartículas	19
1.2.1 O que são nanopartículas?	19
1.2.2 Nanopartículas metálicas	21
1.2.3 Nanopartículas de óxido de ferro.....	22
2. Objetivos.....	26
2.1 Geral.....	26
2.2 Específicos	26
Referências bibliográficas	27
Capítulo 2. Metodologia geral	31
1. Alimentação dos cladóceros e cultivo das microalgas	32
2. Manutenção das culturas estoque de microcrustáceos.....	34
3. Nanopartículas: fonte, preparação e caracterização.....	35
4. Testes de toxicidade com cladóceros.....	36
4.1. Testes de sensibilidade.....	36
4.2. Testes de toxicidade aguda e crônica com nano-Fe ₃ O ₄	38
5. Análises estatísticas	41
Referências bibliográficas	42

Capítulo 3. Artigo científico: “Efeitos de nanopartículas de óxido de ferro (Fe ₃ O ₄) para o cladócero tropical <i>Ceriodaphnia silvestrii</i> ”	43
1. Introdução	44
2. Material e métodos	46
3. Resultados e discussão	50
4. Conclusões.....	62
Referências	63
Conclusões gerais	68
Apêndices	71

Estrutura do trabalho

Esta dissertação está estruturada da seguinte maneira:

- Capítulo 1: breve introdução à temática da pesquisa, seguida dos objetivos do estudo;
- Capítulo 2: metodologia geral detalhada;
- Capítulo 3: artigo científico “Efeitos de nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4) para o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*”, com intenção de submissão para um periódico internacional.
- Apêndices: contendo a carta controle de sensibilidade para *Ceriodaphnia silvestrii* exposta à substância de referência cloreto de sódio, e variáveis físicas e químicas das soluções-teste, durante os ensaios agudos e crônicos de *Ceriodaphnia silvestrii* exposta às nano- Fe_3O_4 .

Capítulo 1

Introdução geral e objetivos

1. Introdução geral

1.1. Ecotoxicologia

Nos dias atuais, em meio a crises no setor hídrico e com a crescente perda de diversidade dos ambientes naturais, é grande a preocupação com as substâncias que são lançadas diariamente nos corpos d'água ou que acabam sendo lixiviadas com a chuva, dentre elas: metais, hormônios e pesticidas.

A Ecotoxicologia é um ramo da toxicologia ambiental, que objetiva compreender os efeitos tóxicos de substâncias naturais ou artificiais aos organismos vivos (Butler, 1978). A principal diferença entre os termos Toxicologia Ambiental e Ecotoxicologia é que o primeiro termo se refere aos efeitos adversos causados em seres humanos, enquanto o segundo se refere aos efeitos causados sobre os componentes não humanos (Fericola et al., 2004).

Os ensaios ecotoxicológicos não substituem as análises químicas, mas complementam seus resultados, uma vez que as análises químicas indicam quais compostos estão presentes num corpo d'água, mas não determinam os prejuízos dessas substâncias aos organismos daquele ambiente (Costa et al., 2008).

Os organismos utilizados nos ensaios de toxicidade são denominados organismos-teste (ABNT, 2016a). Um organismo-teste deve apresentar certas características, como por exemplo: possuir ampla distribuição nos ambientes naturais, de modo a ser um organismo representativo; ser, preferencialmente, de fácil cultivo em laboratório, de modo a tornar os testes de toxicidade mais práticos e reproduzíveis em qualquer parte do mundo; e possuir sensibilidade a agentes tóxicos (Costa et al., 2008).

Atualmente, os testes de ecotoxicidade estão bem estabelecidos para alguns organismos-teste. A Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) possui protocolos de ecotoxicologia para algas (ABNT, 2011a, 2013), invertebrados (ABNT, 2011b, 2012, 2013b, 2014, 2016a, 2016b, 2016c, 2016d, 2016e) e peixes (ABNT, 2016f, 2016g).

Os microcrustáceos são organismos-teste bastante utilizados na Ecotoxicologia. Existem, por exemplo, diversos protocolos nacionais e internacionais para a utilização da espécie *Daphnia magna* em ensaios ecotoxicológicos (USEPA, 2002; OECD, 2004; ABNT, 2016b). Da mesma forma, espécies neotropicais de cladóceros como *Ceriodaphnia silvestrii* também possuem protocolos padronizados (ABNT, 2016a) para testes ecotoxicológicos. Sabe-se que o zooplâncton tem um papel importante como elo entre os produtores primários e os consumidores, exercendo papel crucial nas cadeias alimentares aquáticas, sendo considerado um grupo-chave em muitos ecossistemas. Em virtude disso, seu estudo é de extrema relevância em ecologia aquática.

Grandes são os esforços para tornar os testes ecotoxicológicos mais realistas, de modo que as condições experimentais sejam mais próximas das condições ambientais naturais. Nesse sentido, se tem trabalhado ultimamente com ensaios multi-espécie em mesocosmos, os quais são sistemas artificiais simplificados que visam simular o que ocorre nos ambientes naturais (Wilbur, 1997). Porém, nesse tipo de experimento, diversos são os fatores que podem alterar os resultados e, com isso, fica mais complexa a interpretação dos fenômenos, sendo necessário distinguir o que é efeito adverso do contaminante e o que é decorrente dos fatores externos.

Os ensaios laboratoriais de toxicidade crônica são de grande relevância, visto que podem inferir quais os possíveis efeitos de agentes tóxicos sobre parâmetros relativos ao ciclo de vida dos organismos, como, por exemplo, os seguintes parâmetros a serem avaliados

no ciclo de vida dos cladóceros: comprimento corporal, comprimento corporal máximo, comprimento da primípara, número de ovos e neonatos por fêmea, taxa de eclosão dos ovos, longevidade, dentre outros. Com o avanço tecnológico, a Ecotoxicologia também acabou por utilizar as novas ferramentas disponíveis em busca de novos “endpoints”. Os ensaios de genotoxicidade, por exemplo, avaliam os efeitos de agentes genotóxicos, que são aqueles que afetam negativamente a integridade do material genético dos organismos (Nai et al., 2015).

Nos dias atuais, os cientistas não estão preocupados apenas em emitir parecer sobre a toxicidade de uma dada substância. Essa ciência é investigativa, com enfoque sobre causas e efeitos, e como esses efeitos poderiam ser evitados ou neutralizados. Novos avanços tecnológicos continuarão auxiliando esse ramo da toxicologia, para que a cada dia tenhamos mais respostas efetivas sobre os possíveis efeitos de substâncias tóxicas emergentes sobre os ecossistemas naturais.

1.2. Nanopartículas

1.2.1. O que são nanopartículas?

Nanopartículas (NPs) são poluentes emergentes e podem ser definidas como materiais que possuem tamanho entre 1 e 100 nm em pelo menos duas de suas dimensões (Luoma, 2008). Para que seja possível compreender quão pequenas elas são, pode-se comparar seu tamanho com outros componentes conhecidos (Figura 1), sendo as NPs muito menores que um eritrócito humano e até mesmo que os vírus. Os nanomateriais vêm tendo destaque no cenário atual de pesquisas, visto que possuem propriedades físico-químicas específicas e ainda uma grande possibilidade de utilizações em diversas áreas, incluindo biomedicina, área industrial, equipamentos eletrônicos, entre outras. Porém, alguns autores alertam para o fato de que a nanotoxicologia é uma área de conhecimento com grande lacuna de informações, que deve ser preenchida (Wickson et al., 2010), uma vez que diferentes

cientistas possuem diferentes visões acerca dos riscos que as NPs podem acarretar (Scheufele et al., 2007).

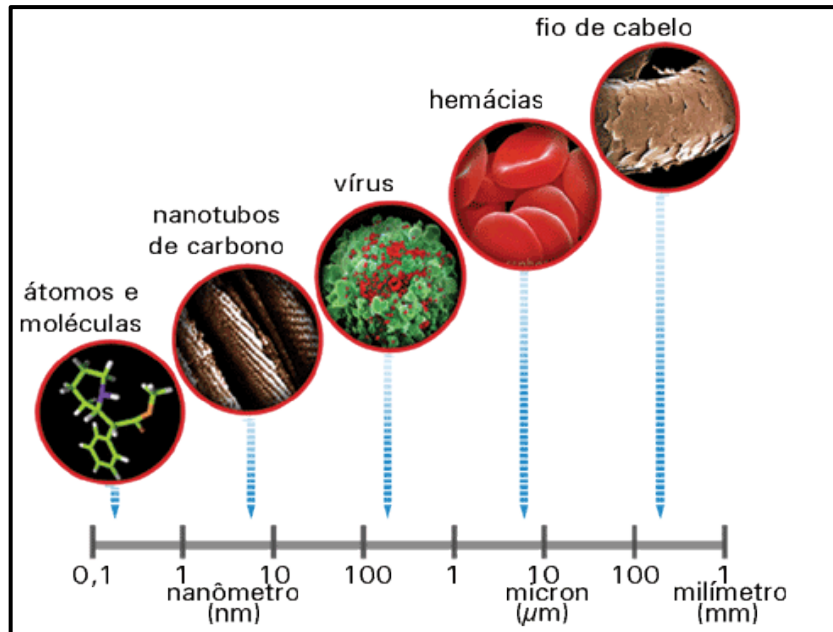


Figura 1. Desenho esquemático comparando o tamanho das nanopartículas (1-100 nm) com o de outras estruturas conhecidas

(Fonte: https://s3-sa-east-1.amazonaws.com/ofitexto.arquivos/deg_230778.htm)

À medida que ocorrem aprimoramentos das tecnologias existentes e que novos produtos são desenvolvidos, riscos iminentes do uso de NPs poderão ser evidenciados. Segundo inventários de produtos catalogados até o ano de 2014, mais de 1800 produtos haviam incorporado nanopartículas em sua composição (Vance et al., 2015).

É primordial que esses possíveis riscos das NPs sejam avaliados, de modo a se criar uma legislação internacional que regule a produção e o descarte de materiais que utilizam nanopartículas (Lapresta-Fernandez et al., 2012). Atualmente, somente a União Europeia e a Suíça possuem legislações específicas quanto à regulamentação de nanomateriais (Amenta et al., 2015); já o Brasil, mesmo sendo país pioneiro na América Latina em

pesquisas com nanotecnologia (Kay e Shapira, 2009), não possui nenhuma regulamentação quanto a esses nanomateriais (Amenta et al., 2015).

1.2.2. Nanopartículas metálicas

NPs metálicas são partículas metálicas com tamanho menor que 100 nm em pelo menos duas de suas dimensões. As NPs metálicas possuem características físicas e químicas diferentes das partículas metálicas com tamanho maior, chamadas de *bulk metals* (Horikoshi e Serpone, 2013).

As nanopartículas metálicas são economicamente relevantes, visto sua produção em larga escala. A Tabela 1, a seguir, contém uma estimativa de produção mundial dessas NPs de acordo com Piccinno et al. (2012).

Tabela 1. Estimativa da produção mundial de nanopartículas metálicas ao ano (Piccinno et al., 2012).

Nanopartículas	Produção mundial estimada (toneladas ano ⁻¹)
Dióxido de titânio	3000
Óxido de zinco	550
Óxido de ferro	55
Óxido de alumínio	55

A preocupação quanto ao uso de NPs se dá pelo fato de não haver legislação que regule sua fabricação e posterior descarte para maioria dos países. Caso estas substâncias cheguem aos corpos d'água, pode haver acumulação nos organismos da base da cadeia alimentar, podendo ocorrer biomagnificação, caracterizada por aumento na

concentração de uma substância contaminante através dos diferentes níveis da cadeia trófica (Bour et al., 2015).

1.2.3 Nanopartículas de óxido de ferro

Dentre as diversas aplicações das NPs de óxido de ferro, destaca-se o seu potencial para a área biomédica. Em um dos tratamentos contra o câncer, por exemplo, essas NPs magnéticas entram em contato com as células cancerígenas e, após isso, aplica-se um campo eletromagnético sobre as mesmas, de modo que ocorra um aumento de temperatura nessas células, causando sua destruição por hipertermia (Souza et al., 2011).

Na Figura 2, pode-se observar um esquema de tratamento contra o câncer, utilizando NPs de óxido de ferro. Na imagem, há dois tipos de tratamento demonstrados: à esquerda temos o exemplo de *drug delivery*, onde os medicamentos quimioterápicos são inseridos entre a NP e seu revestimento, chamado de *coating*; e à direita temos um gráfico demonstrando como funciona o tratamento de hipertermia, por meio de campo magnético.

No entanto, a utilização de NPs com este propósito ainda está em fase de estudos, visto que essas moléculas de até 100 nm poderiam atravessar a barreira hematoencefálica humana (Süssmuth et al., 2009), podendo causar efeitos desconhecidos no sistema nervoso e no corpo humano em geral.

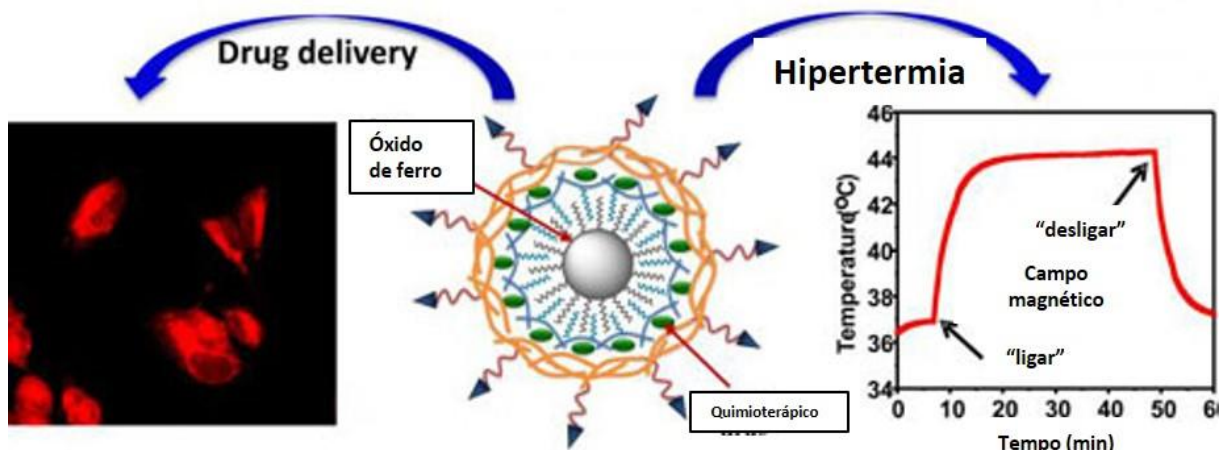


Figura 2. Esquema demonstrando tratamento contra o câncer, utilizando NPs de óxido de ferro. À esquerda: *drug delivery*. À direita: hipertermia por campo magnético.
 (Fonte: modificado de “<http://www.nanowerk.com/news2/newsid=32791.php>”)

As NPs de óxido de ferro também possuem potencial para o tratamento de resíduos, podendo adsorver pesticidas e metais pesados (Xu et al., 2012; Dave e Chopda, 2014). No entanto, experimentos de campo demonstram que essas NPs podem ser lixiviadas pelo fluxo de água para os lençóis freáticos, quando usadas para remediação de solo contaminado (Zhang, 2003). Na Figura 2, podemos observar o esquema de um processo de descontaminação de solo, utilizando NPs de óxido de ferro, onde são utilizados 11,2 kg dessa NP para cada 100 m² de solo (Zhang, 2003).

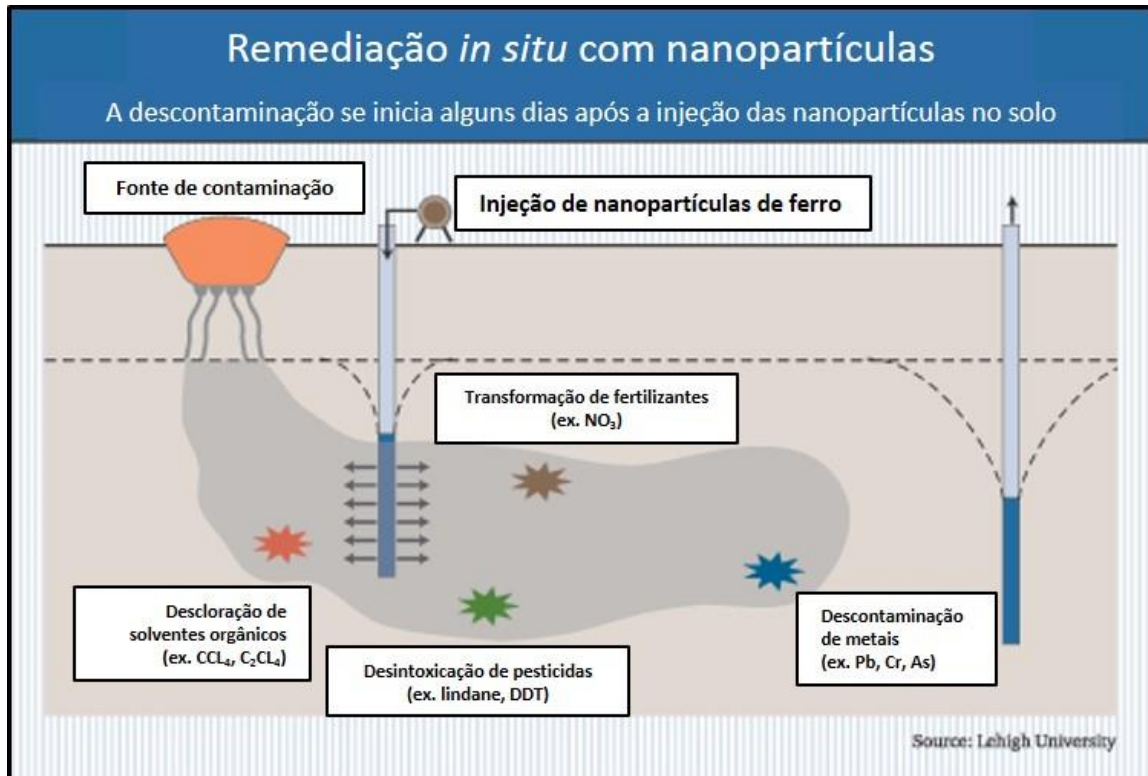


Figura 3. Remediação de solo contaminado, utilizando nanopartículas de óxido de ferro.

(Fonte: modificado de “http://www.eetimes.com/document.asp?doc_id=1146809”)

O efeito crônico de NPs de óxido de ferro sobre cladóceros nativos é pouco estudado, sendo que os trabalhos existentes na literatura a esse respeito estão centrados na toxicidade aguda e testes de bioacumulação desses compostos sobre organismos encontrados em ecossistemas temperados (García et al., 2011; Hu et al., 2012; Baumann et al., 2014; Blinova et al., 2015). As algas e os dafinídeos são organismos mais sensíveis às NPs, de acordo com uma revisão bibliográfica feita por Kahru e Dubourguier (2010). A investigação dos possíveis efeitos de agentes tóxicos em parâmetros de reprodução e crescimento de microcrustáceos, que podem ser analisados somente por meio de testes de toxicidade crônica, é de extrema relevância, uma vez que é através da reprodução que os cladóceros garantem a renovação de suas populações e a perpetuação de suas espécies.

Até onde sabemos, não há estudos envolvendo a toxicidade de NPs de óxido de ferro sobre espécies tropicais de cladóceros. Tais estudos são de extrema importância, pois se sabe que organismos tropicais nativos podem não responder a agentes tóxicos da mesma forma que organismos exóticos, sendo que os nativos podem, inclusive, ser mais sensíveis que os exóticos (Moreira et al., 2014).

Nesse sentido, o presente estudo visa preencher parte da lacuna existente em relação às espécies nativas tropicais, contribuindo para o conhecimento de possíveis efeitos desse material emergente, cuja produção cresce a cada dia, sobre uma espécie nativa de cladócero tropical, para que se possa estimar o possível risco do descarte dessas NPs em ecossistemas dulcícolas naturais de regiões tropicais e subtropicais.

2. Objetivos

2.1. Geral

- Avaliar os efeitos de exposições agudas e crônicas de nanopartículas de óxido de ferro (nano-Fe₃O₄) para o cladóceros nativo *Ceriodaphnia silvestrii*, de modo a estimar os possíveis efeitos que o descarte dessas NPs poderia causar para os cladóceros, em ambientes naturais de água doce.

2.2. Específicos

- Realizar a exposição aguda de nano-Fe₃O₄ sobre *C. silvestrii*, visando obter a concentração efetiva média (CE50), ou seja, a concentração que causa efeito agudo a 50% dos organismos expostos;
- Realizar a exposição crônica de *C. silvestrii* a concentrações subletais de nano-Fe₃O₄, para avaliação dos efeitos sobre os seguintes parâmetros do ciclo de vida dos organismos: crescimento em comprimento, número acumulado de ovos e neonatas por fêmea; comprimento corporal máximo; comprimento da primípara; idade da primípara, longevidade e taxa de eclosão dos ovos.

Referências bibliográficas

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Aquatic ecotoxicology — Chronic toxicity — Method of test with green algae (Chlorophyceae). NBR 12648.** Rio de Janeiro, RJ, 2011a. 28 p.

_____ - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda — Método de ensaio com misídeos (Crustacea). NBR 15308.** Rio de Janeiro, RJ, 2011b. 19 p.

_____ - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica de curta duração — Método de ensaio com ouriço-do-mar (Echinodermata: Echinoidea). NBR 15350.** Rio de Janeiro, RJ, 2012. 21 p.

_____ - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia aquática — Toxicidade crônica — Método de ensaio com microalgas marinhas. NBR 16181.** Rio de Janeiro, RJ, 2013. 27 p.

_____ - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia aquática — Toxicidade aguda e crônica — Método de ensaio com *Hyalella* spp (Amphipoda) em sedimentos. NBR 15470.** Rio de Janeiro, RJ, 2013b. 21 p.

_____ - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia terrestre - Toxicidade aguda - Método de ensaio com minhocas (Lumbricidae). NBR 15537.** Rio de Janeiro, RJ, 2014. 13 p.

_____ - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). NBR 13373:2016.** Rio de Janeiro, RJ, 2016a. 20 p.

_____ - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). NBR 12713.** Rio de Janeiro, RJ, 2016b. 27 p.

_____ - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com anfípodos marinhos e estuarinos em sedimentos. NBR 15638.** Rio de Janeiro, RJ, 2016c. 3 p.

_____ - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia aquática - Método de ensaio de curta duração com embriões de bivalves (Mollusca - Bivalvae). NBR 16456.** Rio de Janeiro, RJ, 2016d. 20 p.

_____ - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Artemia* sp (Crustacea, Brachiopoda). NBR 16530.** Rio de Janeiro, RJ, 2016e. 16 p.

_____ - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica de curta duração - Método de ensaio com peixes. NBR 15499.** Rio de Janeiro, RJ, 2016f. 2 p.

_____ - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Aquatic ecotoxicology - Acute toxicity - Test with fish (Cyprinidae). NBR 15088**. Rio de Janeiro, RJ, 2016g. 25 p.

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

AMENTA, V. et al. Regulatory aspects of nanotechnology in the agri/feed/food sector in EU and non-EU countries. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 463-476, 2015.

BAUMANN, J. et al. The coating makes the difference: acute effects of iron oxide nanoparticles on *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 484, p. 176-84, 2014.

BLINOVA, I. et al. Ecotoxicity of nanosized magnetite to crustacean *Daphnia magna* and duckweed *Lemna minor*. **Hydrobiologia**, p. 1-9, 2015.

BOUR, A. et al. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: a review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, p. 764-777, 2015.

BUTLER, G. C. **Principles of Ecotoxicology. SCOPE 12**. New York: Wiley, 1978.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008.

DAVE, P. N.; CHOPDA, L. V. Application of Iron Oxide Nanomaterials for the Removal of Heavy Metals. **Journal of Nanotechnology**, v. 2014, p. 1-14, 2014.

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

GARCÍA, A. et al. Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. **Desalination**, v. 269, n. 1-3, p. 136-141, 2011.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURTON, R. V. Trimed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

HORIKOSHI, S.; SERPONE, N. Introduction to Nanoparticles. In: HORIKOSHI, S. e SERPONE, N. (Ed.). **Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. p.1-24.

HU, J. et al. Bioaccumulation of Fe₂O₃(magnetic) nanoparticles in *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Pollution**, v. 162, p. 216-22, 2012.

KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H. C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, v. 269, n. 2-3, p. 105-119, 2010.

KAY, L.; SHAPIRA, P. Developing nanotechnology in Latin America. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 2, p. 259-278, 2009.

LAPRESTA-FERNANDEZ, A.; FERNANDEZ, A.; BLASCO, J. Public concern over ecotoxicology risks from nanomaterials: pressing need for research-based information. **Environment International**, v. 39, n. 1, p. 148-149, 2012.

LUOMA, S. N. Silver Nanotechnologies and the Environment: Old Problems or New Challenges? , Washington, DC, p. 68 pp, 2008. Disponível em: < https://wwwrcamnl.wr.usgs.gov/tracel/references/pdf/Luoma%202008_pen_15.pdf >. Acesso em: nov. of 2016.

MOREIRA, R. A. et al. A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, p. 1-8, 2014.

NAI, G. A. et al. Avaliação da genotoxicidade induzida pela administração repetida de anestésicos locais: um estudo experimental em ratos. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 65, n. 1, p. 21-26, 2015.

OECD - Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline for testing of chemicals. *Daphnia* sp., acute immobilisation test. OECD 202**. Paris, 2004. 1-12 p.

PICCINNO, F. et al. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 9, p. 1-11, 2012.

SCHEUFELE, D. A. et al. Scientists worry about some risks more than the public. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 12, p. 732-4, 2007.

SOUZA, K. C.; MOHALLEM, N. D. S.; SOUSA, E. M. B. Nanocompósitos magnéticos: potencialidades de aplicações em Biomedicina. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1692-1703, 2011.

SÜSSMUTH, S. D. et al. Unsolved Medical Problems. Blood-brain barrier in neurodegenerative diseases: perspectives for Nanomedicine. **European Journal of Nanomedicine**, v. 2, n. 1, p. 39-47, 2009.

USEPA - U. S. Environmental Protection Agency. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. Washington, DC, 2002. 350 p.

VANCE, M. E. et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 6, p. 1769-1780, 2015.

WICKSON, F.; DELGADO, A.; KJOLBERG, K. L. Who or what is 'the public'? **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 11, p. 757-758, 2010.

WILBUR, H. M. Experimental Ecology of Food Webs: Complex Systems in Temporary Ponds. **Ecology**, v. 78, n. 8, p. 2279-2302, 1997.

XU, P. et al. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: a review. **Science of The Total Environment**, v. 424, p. 1-10, 2012.

ZHANG, W.-X. Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 5, n. 3/4, p. 323-332, 2003.

Capítulo 2

Metodologia geral

Nesta seção serão apresentados os passos metodológicos do presente estudo, de forma mais detalhada. Todos os procedimentos seguiram normas padronizadas, citadas ao longo deste capítulo.

1. Alimentação dos cladóceros e cultivo das microalgas

Como fonte alimentar para o cultivo de cladóceros foi fornecida a clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata* (Figura 1), na concentração de 2×10^5 células mL^{-1} , três vezes na semana.

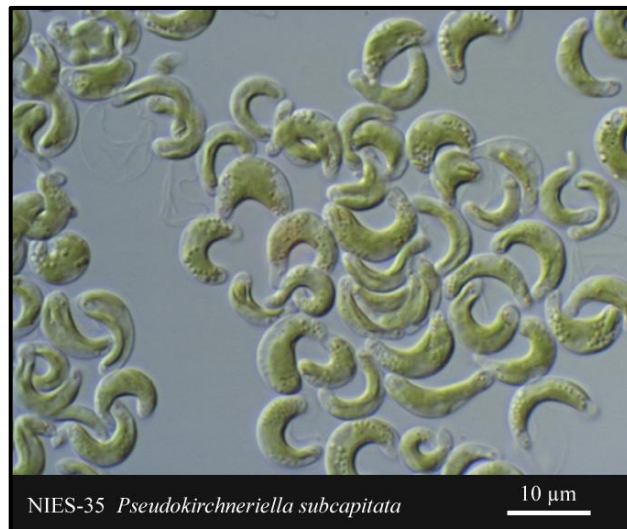


Figura 1. Clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata*, utilizada como alimento para *Ceriodaphnia silvestrii*.
(Fonte: <https://br.pinterest.com/pin/406168460113841753/>)

A clorofícea *P. subcapitata*, foi cultivada em meio L.C. Oligo (AFNOR, 1980), pH 7,0, o qual possui a seguinte composição química (o meio foi modificado de sua composição original, substituindo-se KNO_3 por NaNO_3): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($1,7 \times 10^{-4}$ M), NaNO_3 ($1,0 \times 10^{-3}$ M), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,2 \times 10^{-4}$ M), K_2HPO_4 ($2,3 \times 10^{-4}$ M), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($6,0 \times 10^{-8}$ M), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($2,4 \times 10^{-8}$ M), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,0 \times 10^{-7}$ M), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,3 \times 10^{-7}$ M), $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($1,5 \times 10^{-7}$ M), $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($1,4 \times 10^{-7}$ M), H_3BO_3 ($4,9 \times 10^{-7}$ M), $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($3,1 \times 10^{-6}$ M), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,9 \times 10^{-6}$ M), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,1 \times 10^{-6}$ M) e NaHCO_3 ($1,8 \times 10^{-4}$ M).

O meio foi autoclavado por 20 minutos, a 121°C, em Erlenmeyers de 2.000 mL de capacidade contendo 1.000 mL do meio L.C. Oligo. A cultura algal foi inoculada na concentração de 1×10^5 células mL^{-1} , em condições assépticas em capela de fluxo laminar, que foi previamente esterilizada com álcool 70% e mantida sob luz UV por 15 minutos. As culturas algais (Figura 2) permaneceram sob iluminação de $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, em condições controladas de luz e temperatura ($25^\circ\text{C} \pm 2$; 12: 12h claro: escuro) sob leve aeração constante.



Figura 2. Cultura de *Pseudokirchneriella subcapitata*, sob leve aeração.
(Fonte: autoria própria)

O meio utilizado para cultivo da microalga não é adequado para alimentação dos cladóceros. Por isso, para retirar o excesso do meio de cultura algáceo, de modo a deixar apenas as células algais, esta solução foi centrifugada a 2.000 rpm a 4°C , durante 15 minutos (Eppendorf 5702 R, Alemanha). Após a centrifugação, a alga foi ressuspensa em água reconstituída (a mesma utilizada para cultivo dos cladóceros). Uma subamostra dessa suspensão (1,00 mL) foi retirada e fixada com 200 μL de lugol para determinação da concentração de células de microalgas no meio ressuspensado. A concentração algal foi determinada através da contagem dessa subamostra em um hemocitômetro (Improved

Neubauer-Bright Line), sob microscópio óptico (Zeiss Axiostar Plus, Alemanha).

Como fonte complementar de alimento para o cultivo de zooplâncton foi fornecido o alimento composto três vezes por semana. Este alimento foi preparado segundo métodos disponíveis em ABNT (2016a), utilizando-se: (I) solução de levedura, feita com fermento biológico seco; e (II) uma solução preparada com ração para peixe fermentada. A solução de levedura (I) foi preparada colocando-se 0,5g de fermento biológico seco em 100 mL de água destilada. A solução permaneceu sob agitação até sua total diluição.

No preparo da solução com ração de peixe (II), 5 g de ração foram colocados em 1.000 mL de água deionizada, e mantidos sob aeração constante por uma semana, de forma que a ração permanecesse em suspensão e, quando necessário, a água perdida por evaporação era repostada. Ao final desse período, a solução decantou por cerca de 2 horas e o sobrenadante foi filtrado em rede de zooplâncton de 60 µm de abertura de malha. O material sedimentado foi devidamente descartado. A solução final foi distribuída em sacos plásticos de 20 mL devidamente etiquetados e conservados em freezer a - 4°C até o momento do uso.

Assim, o alimento composto consistiu da mistura de partes iguais das soluções I e II, descritas anteriormente. Esta solução foi conservada sob refrigeração e utilizada por um período máximo de 7 dias. Para a alimentação do zooplâncton, foi adicionado 0,02 mL de alimento composto por organismo. Além do alimento composto, também foi fornecida a vitamina Fishtamin® (Sera, Alemanha), na concentração de 66 µL para cada litro de água reconstituída, ofertada três vezes na semana.

2. Manutenção das culturas estoque de microcrustáceos

Os cultivos estoque de *Ceriodaphnia silvestrii* (Figura 3) foram mantidos em câmara incubadora à temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 12h/12h claro/escuro. O meio utilizado para cultivo foi a água reconstituída, composta por água deionizada com

valores de dureza ajustados para a faixa requerida de 40 a 48 mg/L de CaCO_3 , de pH para faixa de 7,0 a 7,6 e de condutividade elétrica próxima a $160 \mu\text{S cm}^{-2}$ (ABNT, 2016a). A água reconstituída teve a seguinte composição química: $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($1,74 \times 10^{-4}$ M), KCl ($2,68 \times 10^{-5}$ M), NaHCO_3 ($5,71 \times 10^{-4}$ M) e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($2,47 \times 10^{-4}$ M).



Figura 3. Cladóceros nativos *Ceriodaphnia silvestrii*, utilizados como organismo teste no presente estudo. (Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Ceriodaphnia_silvestrii_01.jpg)

A medida da dureza total da água de cultivo foi realizada por meio de titulação com EDTA. Quando necessário, o valor do pH foi ajustado com HCl 1M ou NaOH 1M. Os valores de pH, dureza e condutividade foram medidos antes do uso da água de cultivo.

A troca total de água dos cladóceros ocorreu três vezes por semana, sendo os microcrustáceos alimentados nestes dias. De modo a manter lotes de zooplâncton com idade controlada, a cada 15 dias novos lotes de organismos foram iniciados com indivíduos com idade inferior a 24 horas.

3. Nanopartículas: fonte, preparação e caracterização

As NPs utilizadas neste trabalho foram adquiridas da Sigma-Aldrich (CAS: 1317-61-9). De acordo com o fabricante, estas partículas possuem tamanho menor do que 50 nm. As nano- Fe_3O_4 foram caracterizadas no meio de exposição dos organismos, água

reconstituída nas concentrações de 3,125; 12,50 e 50,00 mg L⁻¹ de nano-Fe₃O₄, em 0 h e 72 h de exposição, durante os testes crônicos.

As nanopartículas foram caracterizadas nos meios de exposição em relação aos seguintes parâmetros: potencial zeta (mV), índice de polidispersividade (PdI) e tamanho hidrodinâmico médio (d.nm), por meio de espalhamento de luz dinâmico (do inglês *Dynamic Light Scattering* DLS), em um espectrômetro Malvern Nano ZS90, Inglaterra.

As soluções estoque de NPs foram preparadas após pesagem em balança (Gehaka AG 200, Brasil) e dissolução em água reconstituída, sendo em seguida dispersas em sonificador de ponta (Unique DES500, Brasil) por 30 minutos (500 W / 20 kHz) antes de seu uso, assim como descrito em procedimentos utilizados para outros tipos de nanopartículas (Aruoja et al., 2009). As soluções-teste foram obtidas a partir de diluições das soluções estoque em água reconstituída.

4. Testes de toxicidade com cladóceros

Para os testes de toxicidade, foi utilizada a espécie nativa de cladóceros neotropical *Ceriodaphnia silvestrii* (Figura 3). Este organismo foi disponibilizado pelo Núcleo de Estudos de Ecologia Aplicada – Centro de Recursos Hídricos e Estudos Ambientais (CHREA), Universidade de São Paulo (USP), *campus* de São Carlos.

4.1 Testes de sensibilidade

Foram realizados periódicos testes de sensibilidade, a fim de se garantir a qualidade dos cultivos para os testes de toxicidade, baseando-se nos parâmetros da ABNT (2016b).

Para realização dos testes, foram selecionados neonatas com menos de 24 h de vida, as quais foram expostas a concentrações de NaCl (cloreto de sódio, substância de

referência utilizada). No preparo da solução estoque de 100 g L^{-1} de NaCl, 25 g do sal foram diluídos em 250 mL de água deionizada. A partir da solução estoque, foram preparadas as soluções-teste em cinco concentrações nominais (0,0; 0,6; 1,0; 1,3; 1,6 e $2,2 \text{ g L}^{-1}$) de NaCl, diluídas em água de cultivo, com 4 réplicas cada, mais um grupo controle negativo com o mesmo número de réplicas, cuja mortalidade não excedeu 10%. A faixa de concentrações foi escolhida com base nos dados de Takenaka (2007).

Os testes foram realizados em recipientes com 20 mL de solução teste, onde foram utilizados 20 neonatas por concentração, sendo portanto, 5 neonatas distribuídas em cada uma das 4 réplicas. Os testes tiveram duração de 48h e, durante todo período, os organismos não foram alimentados e permanecem no escuro, sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$). O efeito observado nos organismos foi a imobilidade e/ou mortalidade, considerando-se imóveis os organismos que não apresentaram movimentação num intervalo de 15 segundos, após leve agitação do recipiente. Os parâmetros físicos e químicos medidos foram o pH e a condutividade das soluções no início e no final dos experimentos.

O método estatístico utilizado para o cálculo da concentração inicial efetiva média (CE(I)50) foi o Trimmed Spermán-Karber (Hamilton et al., 1977). Ao final, foi confeccionada uma carta controle (Apêndice 1), contendo o valor médio (\bar{x}) da CE(I)50_{48h}, e os limites superiores e inferiores: $(\bar{x} + 2\sigma)$ e $(\bar{x} - 2\sigma)$, respectivamente, que são estabelecidos pelo limite de duas vezes o desvio-padrão (σ) em relação ao valor médio (\bar{x}) obtido. O valor médio de CE(I)50_{48h} foi de $1,24 \pm 0,34 \text{ g L}^{-1}$ de NaCl (Apêndice 1), sendo que todos os valores de CE(I)50 estiveram dentro do limite de confiança. Os intervalos de confiança de CE50_{48h} de *C. silvestrii* exposta ao NaCl (g L^{-1}) do presente estudo ficaram próximos aos relatados na literatura, que são de: 0,61 a 1,87 (Monteiro, 2001), 0,76 a 1,76 (Takenaka, 2007) e 0,77 a 1,63 (Coelho, 2008).

4.2 Teste de toxicidade aguda e crônica com nano-Fe₃O₄

Os testes de toxicidade com nano-Fe₃O₄ seguiram normas nacionais, ligeiramente modificadas (no teste de toxicidade crônica ao invés de 7 a 8 dias, a duração total foi de 14 dias), desenvolvidas para espécies de cladóceros tropicais, para testes agudos (ABNT, 2016b) e para testes crônicos (ABNT, 2016a). Todos os materiais utilizados nos testes foram previamente lavados com ácido clorídrico 10% e enxaguadas abundantemente com água de torneira e água deionizada.

Primeiramente, foi realizado um teste de toxicidade aguda com uma ampla faixa de concentrações nominais de nano-Fe₃O₄ (0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00 e 100,00 mg L⁻¹), preparadas a partir de soluções estoque de 0,1 e 10,0 g L⁻¹. O controle consistiu de organismos expostos apenas à água reconstituída.

Nos testes de toxicidade aguda, para cada tratamento, 20 neonatas de *C. silvestrii* com menos de 24h de idade (distribuídos em 4 réplicas) foram distribuídos em grupos de cinco indivíduos em frascos de poliestireno de 50 mL de capacidade, contendo 20 mL de solução teste. O desenho experimental dos testes agudos está esquematizado na Figura 4. O experimento foi realizado em câmara incubadora (Nova Ética B.O.D. 411/D, Brasil) em condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$), no escuro e sem alimentação. A avaliação ocorreu após 24 e 48 h, a partir da contagem dos organismos mortos e imóveis. Para o cálculo da concentração inicial efetiva média (CE(I)50) foi utilizado o Trimmed Sperman-Karber (Hamilton et al., 1977).

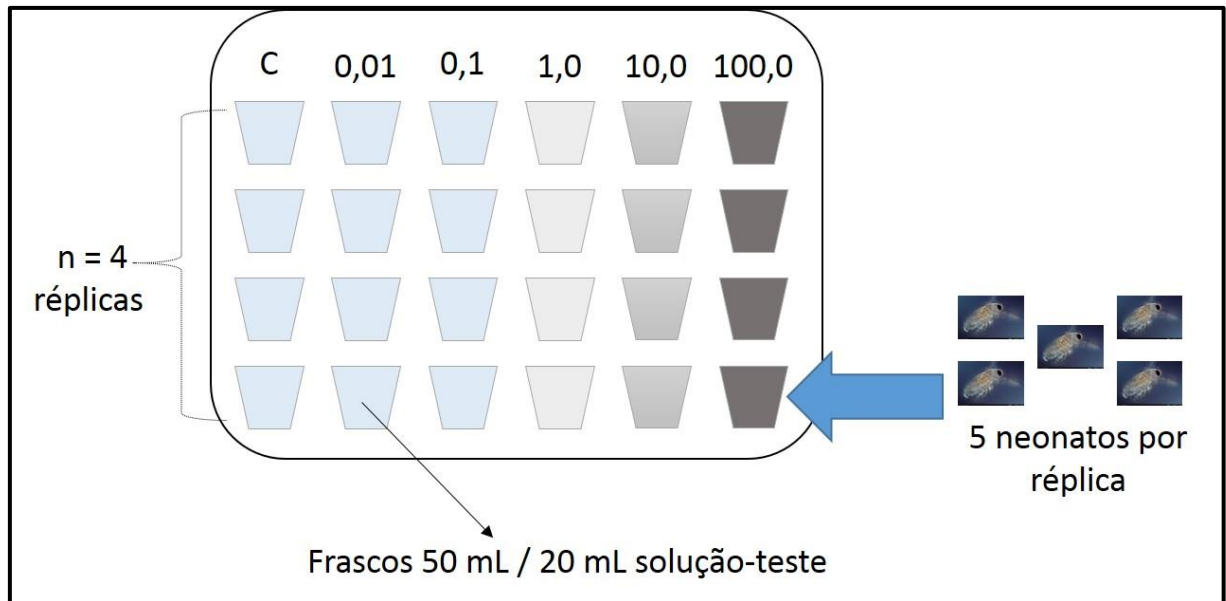


Figura 4. Desenho experimental do teste de toxicidade aguda com *Ceriodaphnia silvestrii* exposta a cinco concentrações de nano-Fe₃O₄ (0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00 e 100,00 mg L⁻¹)

A partir dos resultados obtidos no teste de toxicidade aguda, realizou-se a exposição crônica dos organismos a concentrações subletais. Os testes de toxicidade crônica foram realizados utilizando-se cinco concentrações nominais de nano-Fe₃O₄ (0,00; 3,125; 6,25; 12,50; 25,00 e 50,00 mg L⁻¹) preparadas a partir de uma solução estoque de 10 g L⁻¹. No grupo controle, os cladóceros foram mantidos em água reconstituída não contaminada com NPs. Os testes tiveram 10 réplicas, contendo um organismo (com idade inferior a 24 horas) por replicata (n=10). Os organismos foram colocados em frascos de poliestireno com 50 mL de capacidade, contendo 20 mL de solução teste (Figura 5).

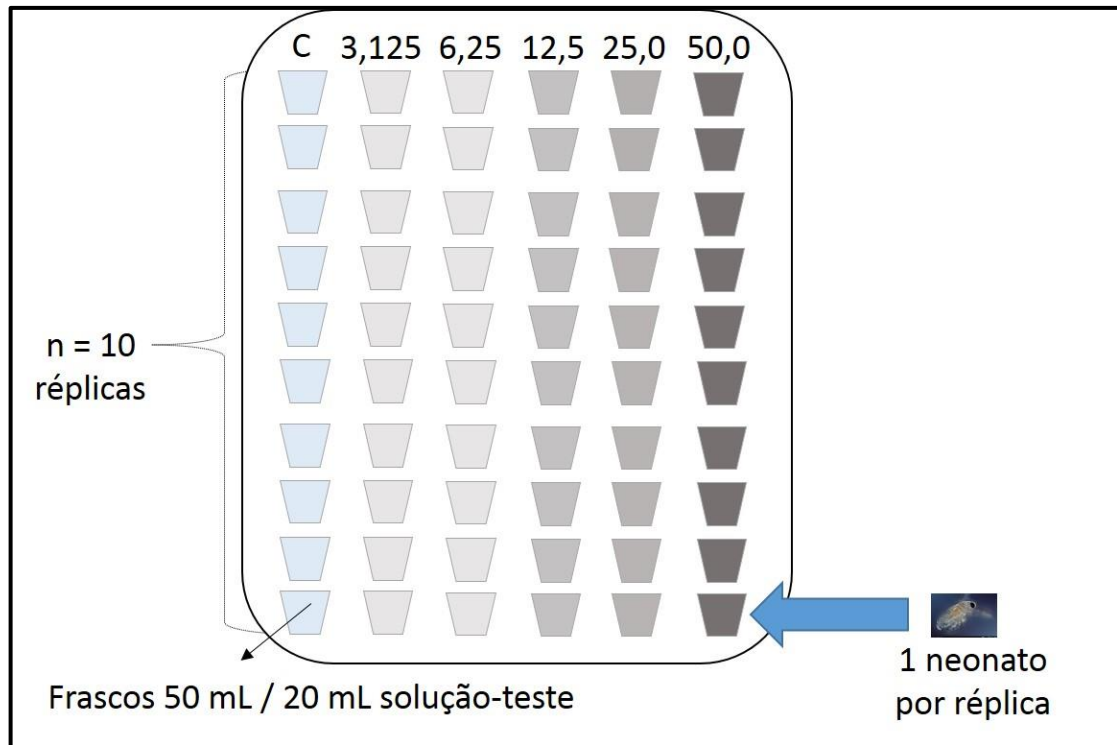


Figura 5. Desenho experimental do teste de toxicidade crônica com *Ceriodaphnia silvestrii* exposta a 5 concentrações de nano-Fe₃O₄ (0,00; 3,125; 6,25; 12,50; 25,00 e 50,00 mg L⁻¹)

Os testes de toxicidade crônica foram realizados em câmara incubadora (Nova Ética B.O.D. 411/D, Brasil), sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 1^\circ\text{C}$) e fotoperíodo (12:12h, claro: escuro). Os organismos foram alimentados diariamente com uma concentração de 2×10^5 células mL⁻¹ de *P. subcapitata*, e três vezes na semana (segundas, quartas e sextas-feiras) com 0,02 mL ind⁻¹ de alimento composto. As soluções teste foram completamente renovadas três vezes na semana (segundas, quartas e sextas-feiras).

Durante os testes crônicos, que duraram 14 dias, os parâmetros avaliados foram: idade da primípara (primeira postura de ovos), número acumulado de ovos e neonatas por fêmea, comprimento diário, comprimento máximo; porcentagem de eclosão dos ovos, e longevidade. Os cladóceros foram observados diariamente sob estereomicroscópio (Leica MZ6, Alemanha).

Em ambos os testes, agudos e crônicos, as seguintes variáveis físicas e químicas foram aferidas: pH (Analion PM 608, Brasil), condutividade (MS TecnoPON mCA-150P, Brasil), concentração de oxigênio dissolvido (Hanna, Brasil), dureza da água e temperatura.

5. Análises estatísticas

Os dados obtidos nos testes crônicos foram testados, a priori, para a normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e igualdade das variâncias (teste de Levene median). Os dados paramétricos foram analisados com one-way-ANOVA, seguido dos testes de Dunnett e post-hoc teste de Tukey; dados não paramétricos foram analisados com teste de Kruskal-Wallis, seguidos de post-hoc testes de Dunn's e Tukey. Diferenças significativas foram consideradas com $\alpha = 0,05$.

Referências bibliográficas

ABNT - Brazilian National Standards Organization (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Aquatic ecotoxicology - Chronic toxicity - Test method with *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). NBR 13373:2016.** Rio de Janeiro, RJ, 2016a. 20 p.

_____ - Brazilian National Standards Organization (Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Aquatic ecotoxicology - Acute toxicity - Test with *Daphnia* spp (Cladocera, Crustacea). NBR 12713.** Rio de Janeiro, RJ, 2016b. 27 p.

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

ARUOJA, V. et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Sci Total Environ**, v. 407, n. 4, p. 1461-1468, 2009.

COELHO, K. S. **Estudos ecotoxicológicos com ênfase na avaliação da toxicidade de surfactantes aniônicos aos cladóceros *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii*.** 2008. 146 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2008.

HAMILTON, M. A.; RUSSO, R. C.; THURTON, R. V. Trimed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science and Technology**, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

MONTEIRO, N. J. C. **Estudos de toxicidade da cepa de *Microcystis aeruginosa* RST9501 da Lagoa dos Patos sobre Cladocera como subsídio ao monitoramento ambiental.** 2001. 178 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2001.

TAKENAKA, R. A. **Avaliação da toxicidade de *Microcystis aeruginosa* de florações naturais de cianobactérias de reservatórios do rio Tietê.** 2006. 330 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2007.

Capítulo 3

*“Efeitos de nanopartículas de óxido de ferro (Fe_3O_4)
para o cladóceros tropical Ceriodaphnia silvestrii”*

1. Introdução

Nanopartículas (NPs) manufaturadas são poluentes emergentes cuja produção vem aumentando, e que têm grande potencial para aplicações tecnológicas e biomédicas (Ai et al., 2011; Laurent et al., 2011; Maximilien et al., 2015; Wang et al., 2016). As NPs são geralmente definidas por suas características únicas: ao menos duas dimensões com tamanho menor que 100 nm, alta reatividade e grande proporção superfície-volume (Luoma, 2008).

Investimentos em nanotecnologia, somente em uma iniciativa de pesquisa governamental dos EUA, alcançaram a marca de US\$ 23 bilhões desde 2001 e estima-se que as vendas de produtos feitos nos EUA com NPs excederam US\$ 500 bilhões até o fim de 2016 (NNI, 2016). Até o ano de 2014, um inventário de produtos com nanotecnologia “Nanotechnology Consumer Product Inventory (CPI)” catalogou mais de 1.800 produtos que haviam incorporado nanopartículas em sua composição (Vance et al., 2015).

As nanopartículas metálicas são umas das mais importantes comercialmente, devido à sua alta produção. De acordo com estimativas, as nanopartículas de dióxido de titânio, óxido de zinco, óxido de ferro e óxido de alumínio possuem, respectivamente, produção mundial anual de 3.000; 550; 55 e 55 toneladas (Piccinno et al., 2012).

No campo da biomedicina, as nanopartículas supermagnéticas de óxido de ferro estão sendo testadas para a entrega de medicamentos nas células, também chamado de “drug delivery”, como por exemplo, tratamentos de quimioterapia, e como agente de contraste para ressonância magnética (Mahmoudi et al., 2011; Zhu e Liao, 2015).

As nanopartículas de óxido de ferro estão sendo estudadas como agentes para tratamentos de resíduos em solos contaminados. Estudos demonstram que essas nanopartículas podem ser nanoadsorventes, adsorvendo metais pesados e compostos

orgânicos, bem como fotocatalizadores para os demais tipos de contaminantes (Xu et al., 2012; Dave e Chopda, 2014). Um estudo indica que as nanopartículas de óxido de ferro também possuem potencial para o tratamento de água utilizada para abastecimento, uma vez que esses nanomateriais podem adsorver e retirar arsênico de águas subterrâneas contaminadas com esse poluente (Aredes et al., 2012).

Devido ao aumento na produção das NPs, há preocupações quanto à produção e ao descarte desses nanomateriais. A concentração de NPs nos corpos d'água tende a aumentar, podendo ser uma ameaça para a biota aquática. No entanto, poucos são os países que possuem regulamentação específica para o descarte dos nanomateriais.

Atualmente, a União Europeia e a Suíça são as únicas localidades em que há determinações específicas, quanto aos nanomateriais, incorporadas às legislações vigentes (Amenta et al., 2015). Nos Estados Unidos (EUA), uma considerável parcela das NPs obedece às regulamentações da “US Food and Drug Administration”, FDA, agência reguladora das drogas e alimentos nos EUA. De acordo com USEPA (2014), a FDA regula os nanomateriais utilizando os mesmos parâmetros utilizados para as partículas *bulk*, apesar de a FDA possuir alguns guias específicos sobre nanomateriais.

Sabe-se também que, em alguns casos, as NPs podem ser mais tóxicas do que as partículas *bulk*. Heinlaan et al. (2008) observaram que *Daphnia magna* teve menores valores de LC50_{48h} para as NPs de ZnO e CuO do que para as partículas *bulk* dos mesmos compostos. No Brasil, apesar de ser o país que lidera as pesquisas com nanotecnologia na América Latina (Kay e Shapira, 2009), não há legislações específicas para nanomaterias (Amenta et al., 2015).

Estudos demonstraram que as nanopartículas de óxido de ferro utilizadas para remediação de solos contaminados podem ser transportadas por até 20 metros de distância

(Zhang, 2003). Há poucos estudos crônicos sobre a toxicidade das NPs de óxido de ferro para cladóceros, sendo que os estudos estão focados na toxicidade aguda dessas NPs (García et al., 2011; Baumann et al., 2014; Blinova et al., 2015). Até onde se sabe, não há relatos de toxicidade aguda ou crônica de NPs de óxido de ferro para cladóceros tropicais.

Com base nisso, o presente estudo objetivou avaliar a toxicidade aguda e crônica de nano-Fe₃O₄ para *Ceriodaphnia silvestrii* (cladóceros tropical), investigando parâmetros de reprodução, crescimento e sobrevivência. Com este estudo, espera-se ampliar o conhecimento na área de nanotoxicologia ambiental, procurando entender quais os efeitos que a nanopartícula estudada pode causar para a biota aquática, especialmente para o zooplâncton, que constitui a base das cadeias alimentares de ecossistemas límnicos.

2. Material e métodos

2.1. Nanopartículas: fonte, preparação e caracterização

As nanopartículas de óxido de ferro (magnetita, Fe₃O₄), com pureza $\geq 98\%$, foram adquiridas da Sigma-Aldrich (CAS: 1317-61-9) e, segundo Blinova et al. (2015), não possuem revestimento. De acordo com informações do fabricante, as nanopartículas em pó possuem tamanho menor que 50 nm.

As nano-Fe₃O₄ foram caracterizadas dispersas em água reconstituída, durante o teste de toxicidade crônica. Para tal, três concentrações (3,125; 12,50 e 50,00 mg L⁻¹) de nano-Fe₃O₄ foram dispersas em água reconstituída e caracterizadas em 0 e 72h após o início do teste.

A caracterização das soluções-teste durante o ensaio crônico consistiu nas determinações de: potencial-zeta (mV), índice de polidispersividade (PdI) e tamanho hidrodinâmico (d.nm) por espalhamento dinâmico da luz (conhecido como *dynamic light*

scattering, DLS). As análises foram realizadas em um espectrômetro Malvern Nano ZS90, Inglaterra.

As soluções-estoque de nanopartículas foram dispersas em sonificador de ponta por 30 minutos (500 W / 20 kHz) antes de serem utilizadas (Unique DES500, Brasil). As soluções-teste foram obtidas a partir de diluições da solução-estoque em água reconstituída, cujos procedimentos estão descritos na seção seguinte.

2.2. Culturas estoque de zooplâncton e fitoplâncton

O zooplâncton foi cultivado de acordo com protocolos padronizados para cladóceros tropicais (ABNT, 2016b), em béqueres com 2 L de capacidade, contendo 1,5 L de água reconstituída (dureza: 46-48 mg CaCO₃ L⁻¹; pH entre 7,0-7,4; condutividade elétrica próxima de 160 µS cm²). Os microcrustáceos foram mantidos em câmaras incubadoras (Nova Ética B.O.D. 411/D, Brasil) sob condições controladas de temperatura (25 ± 1°C) e fotoperíodo (12:12h, luz: escuro).

A água reconstituída foi feita adicionando-se (em água deionizada) os seguintes reagentes de grau-analítico: CaSO₄ · 2H₂O (1,74 x 10⁻⁴ M), KCl (2,68 x 10⁻⁵ M), NaHCO₃ (5,71 x 10⁻⁴ M) e MgSO₄ · 7H₂O (2,47 x 10⁻⁴ M).

O zooplâncton cultivado foi alimentado durante as trocas de água (três vezes por semana) com 2 x 10⁵ células mL⁻¹ de suspensão algal da clorófitica *Pseudokirchneriella subcapitata* e 0,5 mL L⁻¹ de um composto complementar, feito a partir de fermento biológico (5 g L⁻¹) e ração de peixe fermentada (5 g L⁻¹), em uma proporção 1:1 (ABNT, 2016a). Periodicamente, foram realizados testes de sensibilidade com os cladóceros, utilizando-sea substância de referência cloreto de sódio (NaCl), de modo a checar a saúde dos organismos experimentais.

A clorofícea *P. subcapitata*, utilizada como alimento para zooplâncton, foi cultivada em meio L.C. Oligo (AFNOR, 1980), pH 7.0, o qual possui a seguinte composição química (o meio foi modificado de sua composição original, substituindo-se KNO_3 por NaNO_3): $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($1,7 \times 10^{-4}$ M), NaNO_3 ($1,0 \times 10^{-3}$ M), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,2 \times 10^{-4}$ M), K_2HPO_4 ($2,3 \times 10^{-4}$ M), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ($6,0 \times 10^{-8}$ M), $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($2,4 \times 10^{-8}$ M), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,0 \times 10^{-7}$ M), $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,3 \times 10^{-7}$ M), $\text{Mn}(\text{NO}_3)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($1,5 \times 10^{-7}$ M), $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($1,4 \times 10^{-7}$ M), H_3BO_3 ($4,9 \times 10^{-7}$ M), $\text{C}_6\text{H}_5\text{FeO}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ($3,1 \times 10^{-6}$ M), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ($1,9 \times 10^{-6}$ M), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ($1,1 \times 10^{-6}$ M) e NaHCO_3 ($1,8 \times 10^{-4}$ M).

Inicialmente, as algas foram inoculadas a uma concentração de 10^5 células mL^{-1} em meio L.C. Oligo estéril (autoclavado a 121°C , por 20 minutos) e mantidas sob condições controladas de temperatura ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e intensidade luminosa (12:12h luz: escuro; $150 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$). O meio algal foi gentilmente aerado, em condições assépticas, até que as culturas atingissem crescimento exponencial. Após isso, as culturas foram centrifugadas a 2.000 rpm por 15 minutos, a 4°C (Eppendorf 5702 R, Alemanha), o *pellet* foi ressuspensionado em água reconstituída, sendo que as algas na solução final foram quantificadas em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico (Zeiss Axiostar Plus, Alemanha).

2.3. Testes de toxicidade

O desenho experimental seguiu protocolos padronizados (ABNT, 2016a; b) para espécies de cladóceros tropicais. O protocolo para os testes crônicos (ABNT, 2016b) foi ligeiramente modificado, de modo que o teste crônico do presente estudo teve duração total de 14 dias, diferente do tempo determinado pela norma (7 a 8 dias). Todos os materiais utilizados nos ensaios foram previamente lavados em ácido clorídrico 10%.

Primeiramente, foi realizado um teste de toxicidade aguda com uma ampla faixa de concentrações de nano-Fe₃O₄ (0,00; 0,01; 0,10; 1,00; 10,00 e 100,00 mg L⁻¹), preparadas a partir de soluções estoque de 0,1 e 10,0 g L⁻¹.

Nos testes de toxicidade aguda, para cada concentração de nanopartículas e do grupo controle (somente em água reconstituída), 20 neonatas (idade < 24h) de *C. silvestrii* foram distribuídas em grupos de 5 indivíduos em 4 réplicas, em frascos de poliestireno com 50 mL de capacidade, contendo 20 mL de solução-teste. O experimento foi realizado em câmaras incubadoras (Nova Ética B.O.D. 411/D, Brasil) em condições controladas de temperatura (25 ± 1°C), no escuro e sem alimentação. Após 24 e 48h, os organismos imóveis foram quantificados.

Baseados nos testes de toxicidade aguda, foram escolhidas as 5 concentrações nominais de nano-Fe₃O₄ do teste de toxicidade crônica (0,00; 3,125; 6,25; 12,50; 25,00 e 50,00 mg L⁻¹), preparadas a partir de soluções estoque de 10 g L⁻¹. No grupo controle, os cladóceros foram mantidos somente em água reconstituída. O teste teve início com 10 réplicas por tratamento, cada uma contendo 1 neonata (idade < 24h). Os organismos foram mantidos em frascos de poliestireno com 50 mL de capacidade, contendo 20 mL de solução teste.

Os testes de toxicidade crônica foram realizados em câmaras incubadoras (Nova Ética B.O.D. 411/D, Brasil) sob condições controladas de temperatura (25 ± 1°C) e fotoperíodo (12:12h, claro: escuro). Os organismos foram alimentados diariamente com 2 x 10⁵ células mL⁻¹ de *P. subcapitata* e três vezes por semana (segundas, quartas e sextas) com 0,02 mL ind⁻¹ de um complemento alimentar (descrito no item “2.2 Culturas estoque de zooplâncton e fitoplâncton”).

Durante os testes de toxicidade crônica, que tiveram duração de 14 dias, os parâmetros analisados foram: idade da primípara, número de ovos e neonatas por fêmea;

comprimento diário, comprimento máximo, taxa de eclosão e longevidade. Os cladóceros foram observados diariamente e medidos utilizando um estereomicroscópio (Leica MZ6, Alemanha). Na concentração de $6,25 \text{ mg L}^{-1}$, imagens dos organismos foram realizadas, de modo a demonstrar a internalização dessas NPs nos cladóceros.

Em ambos os testes, agudo e crônico, as seguintes variáveis físicas e químicas foram aferidas: pH (Analion PM 608, Brasil), condutividade (MS Tecnoyon mCA-150P, Brasil), oxigênio dissolvido (Hanna, Brasil), dureza da água e temperatura.

2.4. Análises estatísticas

Os dados obtidos nos testes de toxicidade crônica foram testados quanto à normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e variância (teste de Levene median). Os dados paramétricos foram analisados usando one-way-ANOVA, seguido de testes de Dunnett e Tukey; os dados não-paramétricos foram analisados usando one-way-ANOVA on ranks (teste de Kruskal-Wallis) seguido de testes de Dunn's e Tukey. Diferenças significativas foram consideradas para $\alpha = 0.05$.

3. Resultados e discussão

3.1. Caracterização das nano- Fe_3O_4

Os resultados de tamanho hidrodinâmico das nano- Fe_3O_4 demonstraram que as NPs agregaram e aglomeraram imediatamente após o preparo das soluções-teste e esse nível de agregação tendeu a aumentar após o período de 72h em todas as concentrações testadas. Nas concentrações de 3,125; 12,50 e 50,00 mg L^{-1} , respectivamente, os diâmetros eram inicialmente ($t=0$) de 729,6; 710,6 e 1.451,3 nm e, após 72h, eles alcançaram valores médios de 1.110,0; 1.277,3 e 1.712,7 nm (Tabela 1). Possivelmente houve interação entre as cargas superficiais das nanopartículas com os componentes do meio de exposição (água reconstituída) e também com os excretas dos organismos durante a exposição.

Sabe-se que as nanopartículas de óxido de ferro não encapadas tendem a agregar em soluções aquosas e esse nível de agregação tende a aumentar com o aumento da concentração dessas nanopartículas (Maximova e Dahl, 2006; Baalousha, 2009). Em um estudo com nano-Fe₃O₄ não encapadas, o nível de sedimentação e agregação foi tão alto que não foi possível medir o tamanho hidrodinâmico das partículas (Blinova et al., 2015).

De acordo com Handy et al. (2008), deveria haver maior flexibilidade quanto à definição de NPs para os ecotoxicologistas, de modo que partículas ligeiramente maiores que 100 nm pudessem ser consideradas nanopartículas, desde que essas partículas tenham sido preparadas a partir de partículas com tamanho inicial < 100 nm. Há, inclusive, definições que consideram NPs como partículas com tamanho inferior a 1.000 nm (Maximilien et al., 2015).

Os valores de PDI foram maiores que 0,480 em todas as concentrações testadas (Tabela 1). É possível que as nanopartículas possam ter sido bem dispersas, porém tenham agregado após isso. No entanto, para valores PDI maiores do que 0,5 e tamanho hidrodinâmico maior que 500 nm, os dados devem ser interpretados de maneira cautelosa, uma vez que sob essas condições, partículas maiores acabam por dominar o sinal de espalhamento da luz, bloqueando a leitura das partículas menores (NanoComposix, 2015).

Tabela 1. Valores médios (\bar{x}) e desvio padrão (SD) para os seguintes parâmetros de caracterização, durante os testes de toxicidade crônica, das nano-Fe₃O₄: tamanho hidrodinâmico (diâmetro em nm), índice de polidispersividade (PdI) e potencial-zeta (mV). Amostras foram coletadas durante dois períodos experimentais (T): 0 e 72h após o início do teste de toxicidade crônica.

Tratamentos (mg L ⁻¹)	T (h)	Tamanho hidrodinâmico (nm)		Índice de polidispersividade		Potencial-zeta (mV)	
		\bar{x}	SD	\bar{x}	SD	\bar{x}	SD
3,125	0	729,6	29,4	0,834	0,08	- 25,1	0,66
12,5	0	710,6	59,62	0,540	0,13	- 21,7	1,55
50,0	0	1.451,3	299,09	0,723	0,24	- 22,4	0,32
3,125	72	1.110,0	262,51	0,952	0,08	- 24,7	2,37
12,5	72	1.277,3	244,30	0,904	0,16	- 23,9	0,32
50,0	72	1.712,7	165,54	0,481	0,13	- 19,9	0,23

3.2. Testes de toxicidade

Ambos os testes, agudo e crônico, foram validados, já que: a imobilidade e a mortalidade foram inferiores a 10% no grupo controle após 48h, durante os testes de toxicidade aguda (ABNT, 2016a); a mortalidade do grupo controle não excedeu 20% durante os testes de toxicidade crônica, bem como o número médio de neonatas produzidas por fêmea foi superior a 15, durante os primeiros 7 dias de teste (ABNT, 2016b). Em ambos os testes, a temperatura interna das incubadoras e o pH não variaram mais de 1°C e 1 unidade, respectivamente, e os valores de concentração de oxigênio dissolvido foram superiores a 7.5 mg O₂ L⁻¹ em todas as soluções-teste. Os parâmetros físicos e químicos detalhados estão apresentados no Apêndice 2.

Os resultados dos testes de toxicidade aguda (com concentrações na faixa de 0,01 – 100,00 mg L⁻¹) revelaram que as nano-Fe₃O₄ não foram tóxicas, nessa faixa de concentração, para *C. silvestrii*, em testes de até 48h. Com base nesses resultados, foram

realizados testes de toxicidade crônica, de modo a avaliar parâmetros como crescimento e reprodução, não mensuráveis em testes de toxicidade aguda.

Segundo Blinova et al. (2015), nano-Fe₃O₄ não encapadas não apresentaram toxicidade aguda para *D. magna* após 48h de exposição, em concentrações de até 100,00 mg L⁻¹, e não foi observada diferença de toxicidade entre as NPs e as partículas *bulk* desse composto. No entanto, estudos demonstram que a toxicidade das nano-Fe₃O₄ para *D. magna* pode estar relacionada ao tipo de revestimento das nanopartículas, como por exemplo os dados apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Testes de toxicidade aguda de nanopartículas de óxido ferro (nano-Fe₃O₄) encapadas e não, para diferentes espécies de cladóceros, onde TMAOH é a sigla para tetramethylammonium hydroxide; e PVP significa polymer polyvinyl pyrrolidone. *D.* = *Daphnia*; *C.* = *Ceriodaphnia*; SR = sem revestimento.

Revestimentos	Organismos- teste	Parâmetro avaliado	Resultados		Referências
			valores	unidades	
TMAOH	<i>D. magna</i>	CL ₅₀ – 48 h	2,3 x 10 ⁻⁴	mg mL ⁻¹	(García et al., 2011)
Ascorbate	<i>D. magna</i>	CE ₅₀ – 96 h	50,7	mg ferro L ⁻¹	(Baumann et al., 2014)
Citrate	<i>D. magna</i>	CE ₅₀ – 96 h	68,4	mg ferro L ⁻¹	(Baumann et al., 2014)
Dextran	<i>D. magna</i>	CE ₅₀ – 96 h	27,9	mg ferro L ⁻¹	(Baumann et al., 2014)
PVP	<i>D. magna</i>	CE ₅₀ – 96 h	> 100,0	mg ferro L ⁻¹	(Baumann et al., 2014)
SR	<i>D. magna</i>	CE ₅₀ – 48 h	> 100,0	mg L ⁻¹	(Blinova et al., 2015)
SR	<i>C. silvestrii</i>	CE(I) ₅₀ – 48 h	> 100,0	mg L ⁻¹	Presente estudo

Baseado nos dados de toxicidade crônica, o crescimento corporal dos animais expostos às nano-Fe₃O₄ foi comparado aos organismos do grupo controle (Figura 1). Os dados demonstram que, no tratamento de 50,00 mg L⁻¹, a inibição no crescimento se deu a partir do dia 7 até o dia 14, sendo o comprimento médio 12,71% menor do que o obtido no grupo controle. Os valores de CENO(I) (concentração inicial de efeito não observado) e

CEO(I) (concentração inicial de efeito observado) foram, respectivamente, 25,00 e 50,00 mg L⁻¹ de nano-Fe₃O₄ para o parâmetro crescimento (Tabela 3).

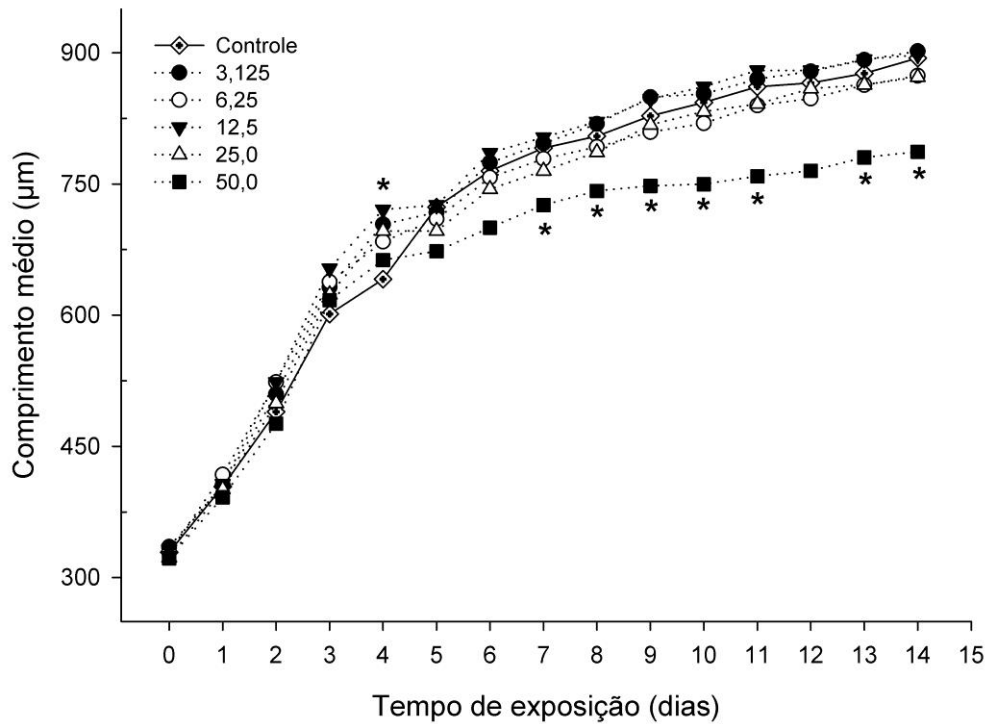


Figura. 1. Comprimento corporal médio (μm) de *Ceriodaphnia silvestrii* durante 14 dias de exposição a 5 concentrações de nano-Fe₃O₄ (0,00; 3,125; 6,25; 12,50; 25,00 e 50,00 mg L⁻¹). Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle ($\alpha = 0.05$).

Tabela 3. Valores de CENO(I) (concentração inicial de efeito não observado) e CEO(I) (concentração inicial de efeito observado) para parâmetros de bionomia de *Ceriodaphnia silvestrii* exposta a nano-Fe₃O₄ por 14 dias e análise estatística utilizada. As abreviações representam os seguintes testes estatísticos: A= one way-ANOVA; KW = Kruskal-Wallis; D = Dunnett; Du = Dunn; T = Tukey.

Parâmetros	CENO(I)	CEO(I)	Estatística
			Teste aplicado (valores de p)
Idade da primípara (dias)	≥ 50,00	> 50,00	KW (0,460)
Tamanho da primípara (µm)	≥ 50,00	> 50,00	KW (0,102)
Tamanho máximo (µm)	25,00	50,00	KW (≤ 0,001) Du (< 0,05) T (< 0,05)
Eclosão dos ovos (%)	≥ 50,00	> 50,00	KW (0,242)
Nº médio de neonatas acumulados/fêmea	25,00	50,00	A/D/T or KW/Du/T
Nº médio de ovos acumulados/ fêmea	25,00	50,00	A/D/T or KW/Du/T
Longevidade (dias)	≥ 50,00	> 50,00	KW (0,870)

Segundo estudo de Dave (1984), partículas *bulk* de ferro (FeCl₃ · 6 H₂O) causaram inibição de 10,85 e 7,63% no comprimento de *D. magna* exposta a 4,06 mg Fe L⁻¹, respectivamente, após 7 e 21 dias. De acordo com o presente estudo, não foi observada inibição na concentração de nanopartícula de ferro (3,125 mg L⁻¹) mais próxima à utilizada concentração de partículas *bulk* no estudo mencionado anteriormente (Figura 1).

No 4º dia de experimento, a concentração intermediária de 12,50 mg L⁻¹ estimulou o (teste de Dunnett, p < 0.05) crescimento, possuindo maior valor médio neste dia

do que todas as outras concentrações, porém a partir do 5º dia, não houve mais resposta de estímulo significativa. Este resultado pode ser explicado pelo efeito de hormesis, no qual baixas doses de uma substância podem causar um efeito benéfico para determinado organismo, enquanto altas doses causam um efeito inibitório (Mattson, 2008).

A Figura 2A demonstra que o número médio acumulado de ovos por fêmea foi reduzido na concentração 50,00 mg L⁻¹ de nano-Fe₃O₄ a partir do 6º dia, atingindo 51,99 % de redução de ovos comparado ao grupo controle no 14º dia (teste de Dunnett, p < 0.05).

O número médio acumulado de neonatas por fêmea (Figura 2B) foi reduzido em 61,37% na concentração de 50,00 mg L⁻¹. Houve uma tendência de estímulo deste parâmetro na concentração de 3,125 mg L⁻¹ (14º dia), corroborando o estudo de Dave (1984), no qual cladóceros tiveram respostas de estímulo em parâmetros reprodutivos quando expostos a baixas concentrações de ferro. No 7º dia, houve uma diferença significativa entre o controle e o tratamento de 25,00 mg L⁻¹ quanto ao número de neonatas por fêmea (teste de Dunn, p < 0.05). Caso o teste tivesse duração de apenas 7 dias, a CEO(I) para o teste seria de 25,00 mg L⁻¹ de nano-Fe₃O₄, porém com o passar o tempo o animal possivelmente conseguiu se recuperar ou se adaptar às NPs, mesmo estando exposto constantemente a elas. Como o teste teve duração de 14 dias, a CEO(I) foi 50,00 mg L⁻¹ para estes parâmetros.

Em experimentos de recuperação de *D. magna* exposta por 48 h a nano-Fe₃O₄ e, após isso, cultivadas em água não contaminada, foram observados efeitos positivos na reprodução (número de ninhadas) em longo prazo, em concentrações de 10,0 mg L⁻¹; e não houve efeitos nas concentrações de 100,0 mg L⁻¹, quando comparadas ao grupo controle (Blinova et al., 2015). No entanto, no presente estudo, no qual os cladóceros foram continuamente expostos ao agente tóxico, observou-se uma tendência de efeitos positivos em concentrações de 3,125 mg L⁻¹ e efeitos positivos significativos em parâmetros reprodutivos e

de crescimento em concentrações de 12,50 mg L⁻¹. Nas concentrações de 50,00 mg L⁻¹, foram observados efeitos inibitórios no crescimento (CENO(I): 25,00 e CEO(I): 50,00 mg L⁻¹, para comprimento do corpo após 14 dias – Tabela 3) e no número de ovos e neonatos por fêmea (ambos com CENO(I): 25,00 e CEO(I): 50,00 mg L⁻¹, após 14 dias – Tabela 3).

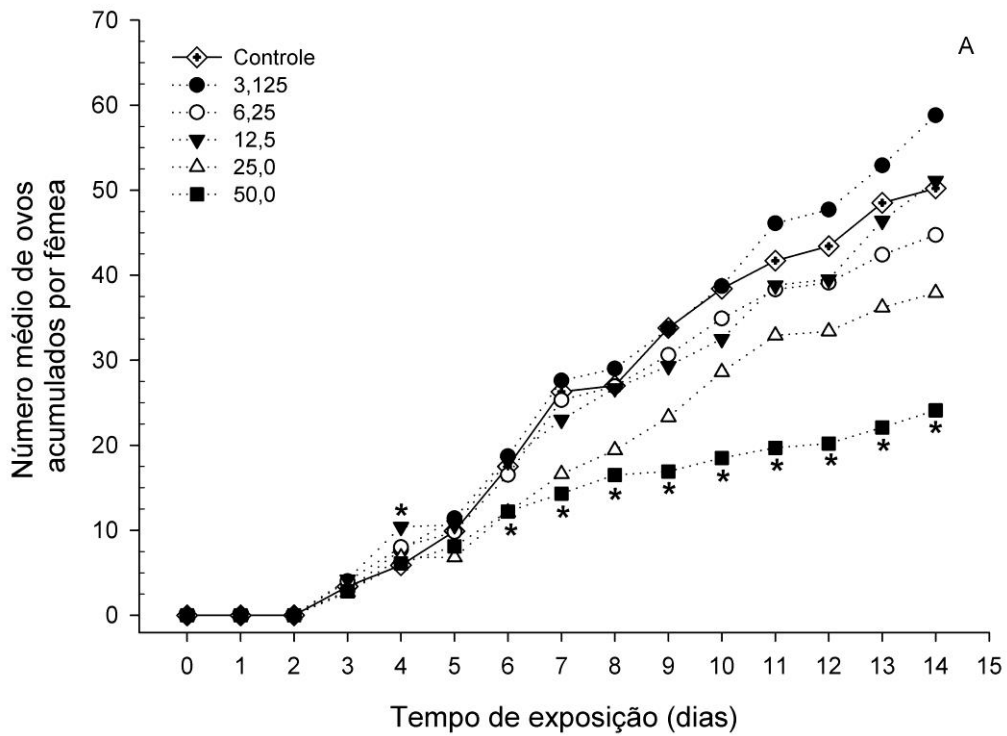


Fig. 2. Número acumulado médio de ovos (A) e neonatas (B) por fêmea de *Ceriodaphnia silvestrii*, exposta a 5 concentrações de nano-Fe₃O₄ (0,00; 3,125; 6,25; 12,50; 25,00 e 50,00 mg L⁻¹) durante 14 dias. Cada ponto representa o valor médio de 10 replicas Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle ($\alpha = 0.05$).

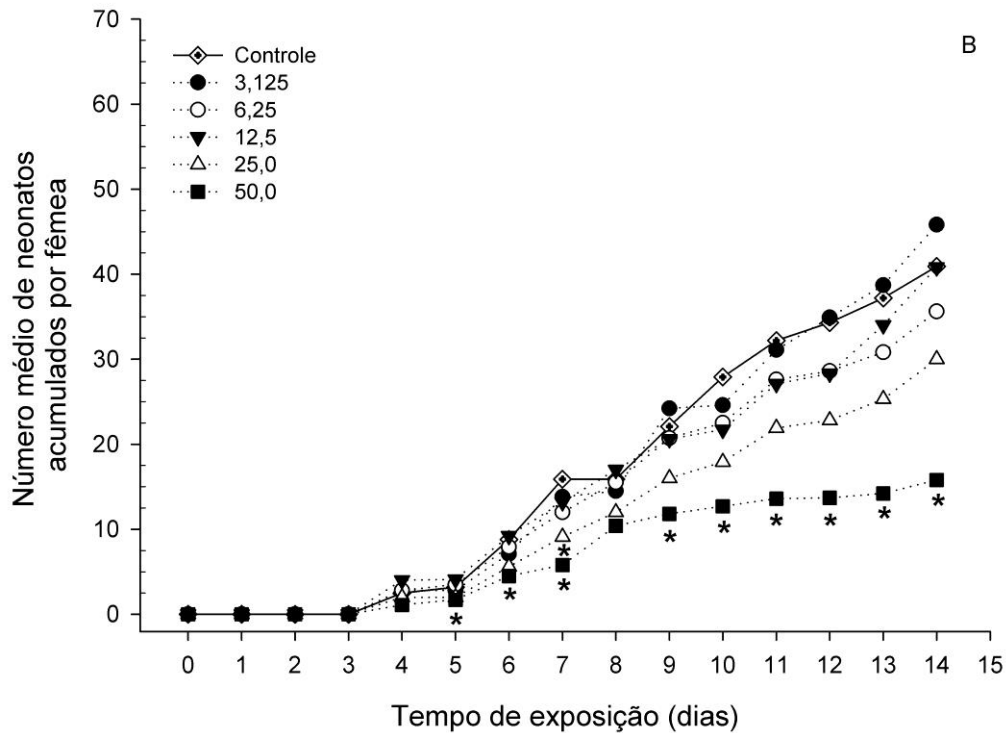


Fig. 2. Número acumulado médio de ovos (A) e neonatos (B) por fêmea de *Ceriodaphnia silvestrii*, exposta a 5 concentrações de nano-Fe₃O₄ (3,125; 6,25; 12,50; 25,00 e 50,0 0mg L⁻¹) durante 14 dias. Cada ponto representa o valor médio de 10 replicas. Asteriscos representam diferenças significativas entre os tratamentos e o grupo controle ($\alpha = 0.05$).

Hu et al. (2012) observou rápida bioacumulação de nano-Fe₂O₃ no sistema digestivo de *Ceriodaphnia dubia* (Figura 3), exposta a uma concentração de 5 mg L⁻¹, após 30 minutos. No presente estudo, embora a presença de nano-Fe₃O₄ no sistema digestivo de *C. silvestrii* tenha sido fotografada apenas nos experimentos em que os cladóceros foram expostos a 6,25 mg L⁻¹ de nano-Fe₃O₄ por exemplo (Figura 3). Este fenômeno também foi observado nas demais concentrações experimentais de NPs. Além disso, foram observadas nanopartículas aderidas aos ovos de *C. silvestrii* (Figura 3B), indicando que houve bioacumulação.

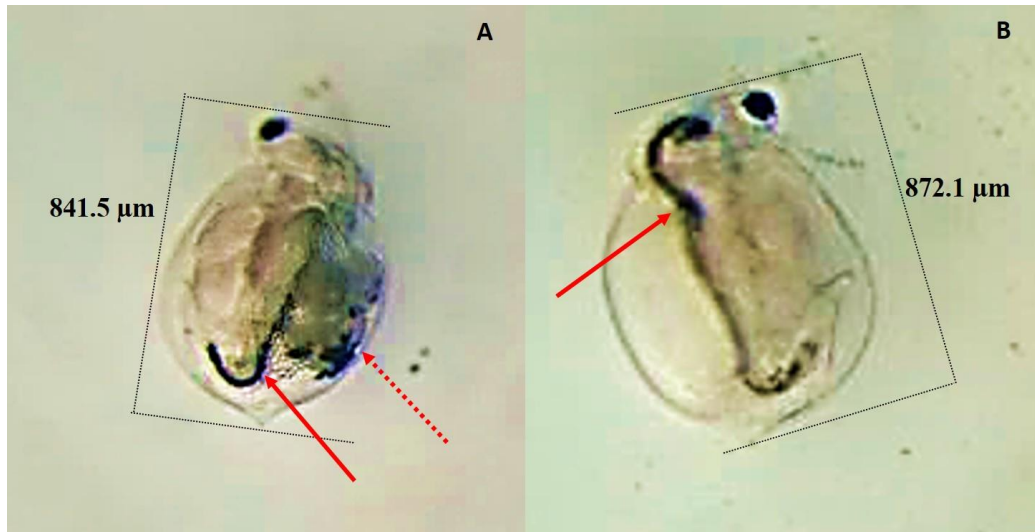


Fig. 3. *Ceriodaphnia silvestrii* exposta a $6,25 \text{ mg L}^{-1}$ de nano- Fe_3O_4 durante teste de toxicidade crônica (dias de exposição: A = 9; B = 11). As figuras indicam as NPs internalizadas no sistema digestivo (flechas sólidas) e nos ovos (flechas pontilhadas) dos cladóceros.

Outros animais também podem transferir os metais para seus ovos como, por exemplo, as tartarugas (Sakai et al., 2000), pássaros (Agusa et al., 2005) e jacarés (Xu et al., 2006). Este pode ser um processo de desintoxicação dos organismos, expelindo o metal não intencionalmente.

Em um estudo com *D. magna*, observou-se acumulação de zinco em seus ovos e, de acordo com os autores, esta acumulação ocorria via alimentação (Evens et al., 2012). No presente estudo, a bioacumulação de nano- Fe_3O_4 nos ovos (Figura 3B) se deu, provavelmente, pela contaminação via água, uma vez que o alimento ofertado era livre de contaminação por ferro. No entanto, esse aspecto necessita de investigações futuras.

Outro estudo com *D. magna* exposta a nano- TiO_2 indicou bioacumulação no intestino e região abdominal dos animais e, de acordo com os autores, a bioacumulação no intestino ocorreu por ingestão ativa dessas NPs (Tan et al., 2016). Zhao e Wang (2011) observaram, em testes de toxicidade crônica de *D. magna* exposta a nano- AgNO_3 , que o

cladóceros bioacumulou maior quantidade de prata quando exposto ao metal via água, do que quando exposto via alimento contaminado.

Estudos de bioacumulação com NPs de diamante demonstram que essas NPs se acumularam no lúmen do intestino de *D. magna*, acarretando perda do formato das células dessa região (Mendonça et al., 2011). No presente estudo, também foi observada acumulação de NPs no intestino de *C. silvestrii*, o que pode ter ocasionado bloqueio na absorção de alimento, levando a um decréscimo no número de ovos e neonatos por fêmea.

A Tabela 4 mostra parâmetros bionômicos de *C. silvestrii*. Os parâmetros idade da primípara, tamanho da primípara, porcentagem de eclosão e longevidade nos tratamentos não diferiram significativamente do controle. O comprimento corporal máximo diferiu entre o grupo controle (teste de Dunnett, $p < 0.05$) e o tratamento com maior concentração de nano- Fe_3O_4 ($50,00 \text{ mg L}^{-1}$), com inibição 16,57% no crescimento, sendo o valor de CEO(I) de $50,00 \text{ mg L}^{-1}$ nano- Fe_3O_4 .

Tabela 4. Parâmetros de ciclo de vida de *Ceriodaphnia silvestrii* exposta a 5 concentrações de nano- Fe_3O_4 (mg L^{-1}). Os valores médio estão apresentados, seguidos dos desvios-padrões. Linhas em que os valores apresentam mesma letra sobscrita correspondem a diferenças não significativas ($p > 0.05$).

Parâmetros	Controle	Tratamentos				
		3,125	6,25	12,50	25,00	50,00
Idade da primípara (dias)	5,00 ± 0,97	4,70 ± 0,63	4,70 ± 0,42	4,50 ± 0,00	5,37 ± 1,80	4,83 ± 0,50
Tamanho da primípara (μm)	636,48 ± 75,97	673,96 ± 43,49	669,37 ± 28,68	686,97 ± 30,12	692,32 ± 33,96	649,40 ± 28,22
Tamanho máximo (μm)	876,69 ± 41,46 ^a	880,51 ± 41,34 ^a	845,32 ± 60,26 ^{a,b}	861,39 ± 60,68 ^a	761,94 ± 199,33 ^a	731,49 ± 122,88 ^b
Eclosão (%)	83,05 ± 11,07	76,64 ± 11,20	78,01 ± 17,07	75,99 ± 14,15	80,61 ± 14,74	66,47 ± 18,42
Longevidade (dias)	13,85 ± 1,87	13,55 ± 2,39	13,25 ± 2,17	12,70 ± 3,33	11,90 ± 5,23	11,64 ± 4,27

Durante as observações diárias, verificou-se que um organismo produzia os ovos e, após poucos segundos, os expelia (4º dia, concentração de 3,125 mg L⁻¹). Este comportamento foi observado apenas uma vez durante o teste de toxicidade crônico, no entanto isso pode ter ocorrido em outras concentrações e em outros dias, o que pode ter levado a uma superestimação na taxa de eclosão dos ovos, uma vez que a produção de ovos pode ter sido subestimada. Ovos abortados são raramente reportados, devido a seu pequeno tamanho e ausência de movimento, tornando difícil sua observação (Sobral et al., 2001).

O estresse oxidativo pode ter sido um possível mecanismo de ação das nano-Fe₃O₄, causando toxicidade para *C. silvestrii*. O estresse oxidativo pode induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (conhecidas como *reactive oxygen species*, ROS), causando danos às células, como por exemplo: peroxidação de membranas celulares (Birben et al., 2012). As NPs podem causar estresse oxidativo para organismos como: a alga verde *Chlamydomonas reinhardtii* (Melegari et al., 2013), os peixes *Oreochromis mossambicus* (Govindasamy e Rahuman, 2012) e *Danio rerio* (Choi et al., 2010) e para cladóceros (Kim et al., 2010).

Experimentos com outros organismos demonstram que as nanopartículas de óxido de ferro podem ser tóxicas para: (I) clorofíceas, como a *Chlorella vulgaris*, induzindo estresse oxidativo (Barhoumi e Dewez, 2013); (II) para a bactéria *Vibrio fisheri*, em altas concentrações, com CE50 de 0,24 g L⁻¹ (García et al., 2011); (III) para as algas marinhas *Nannochloropsis* sp. e *Isochrysis* sp., nas quais houve toxicidade em baixas concentrações de NPs (Demir et al., 2015); (IV) para a briófito *Physcomitrella patens*, com baixa citotoxicidade em concentrações ambientalmente relevantes de até 50,0 µg por planta (Canivet et al., 2015).

Nosso estudo enfatiza a importância de testes de toxicidade crônica, uma vez que os testes de toxicidade aguda, em certos casos, podem não levar a conclusões robustas

sobre o dano que certos poluentes, que não são tóxicos em curtos períodos de tempo, poderiam causar para os ambientes aquáticos. Exposições crônicas geram resultados que podem ser utilizados para criar novas legislações ou complementar legislações vigentes, baseado no Princípio da Precaução, utilizando-se parâmetros de crescimento e reprodutivos para tal, já que são parâmetros essenciais para perpetuação das espécies de cladóceros. Salienta-se que o uso de espécies nativas é de extrema importância em ensaios ecotoxicológicos, trazendo um cenário mais realístico para os ecossistemas tropicais, nos quais, muitas vezes, espécies nativas podem ser mais sensíveis a certos agentes tóxicos do que as espécies exóticas de ambientes temperados (Moreira et al., 2014).

4. Conclusões

Não foram observados efeitos agudos de nano-Fe₃O₄ para *C. silvestrii* em concentrações de até 100,00 mg L⁻¹, após 48h de exposição. No teste de toxicidade crônica, a maior concentração (50,00 mg L⁻¹) de nano-Fe₃O₄ causou inibição significativa no crescimento corporal e reprodução (número médio acumulado de ovos e neonatos por fêmea) do cladóceros, parâmetros esses essenciais para manutenção desta espécie em ambientes naturais. Além disso, observamos bioacumulação de nano-Fe₃O₄ nos ovos dos cladóceros, sugerindo que esses animais estariam transferindo o ferro para os ovos através de nutrientes de reserva presentes nos mesmos. Com isso, as nano-Fe₃O₄ devem ser utilizadas e descartadas com cautela, de modo a não contaminar corpos d'água e sedimento de lagos e rios, uma vez que concentrações elevadas (> 25,00 mg L⁻¹) desse poluente podem ser tóxicas para *C. silvestrii*, já que essa concentração foi a CENO(I) para alguns parâmetros de bionomia no presente estudo.

Referências bibliográficas

ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). NBR 12713**. Rio de Janeiro, RJ, 2016a. 27 p.

_____ - Associação Brasileira de Normas Técnicas). **Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera. NBR 13373**. Rio de Janeiro, RJ, 2016b. 20 p.

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

AGUSA, T. et al. Body Distribution of Trace Elements in Black-Tailed Gulls from Rishiri Island, Japan: Age-Dependent Accumulation and Transfer to Feathers and Eggs. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 9, p. 2107-2120, 2005.

AI, J. et al. Nanotoxicology and nanoparticle safety in biomedical designs. **International Journal of Nanomedicine** v. 6, p. 1117-1127, 2011.

AMENTA, V. et al. Regulatory aspects of nanotechnology in the agri/feed/food sector in EU and non-EU countries. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 73, n. 1, p. 463-476, 2015.

AREDES, S.; KLEIN, B.; PAWLIK, M. The removal of arsenic from water using natural iron oxide minerals. **Journal of Cleaner Production**, v. 29-30, p. 208-213, 2012.

BAALOUSHA, M. Aggregation and disaggregation of iron oxide nanoparticles: Influence of particle concentration, pH and natural organic matter. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 6, p. 2093-2101, 2009.

BARHOUMI, L.; DEWEZ, D. Toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles on green alga *Chlorella vulgaris*. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

BAUMANN, J. et al. The coating makes the difference: acute effects of iron oxide nanoparticles on *Daphnia magna*. **Science of the Total Environment**, v. 484, p. 176-84, 2014.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal** v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BLINOVA, I. et al. Ecotoxicity of nanosized magnetite to crustacean *Daphnia magna* and duckweed *Lemna minor*. **Hydrobiologia**, p. 1-9, 2015.

CANIVET, L. et al. Effects of engineered iron nanoparticles on the bryophyte, *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp, after foliar exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 113, p. 499-505, 2015.

CHOI, J. E. et al. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 151-159, 2010.

DAVE, G. Effects of waterborne iron on growth, reproduction, survival and haemoglobin in *Daphnia magna*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology**, v. 78, n. 2, p. 433-438, 1984.

DAVE, P. N.; CHOPDA, L. V. Application of Iron Oxide Nanomaterials for the Removal of Heavy Metals. **Journal of Nanotechnology**, v. 2014, p. 1-14, 2014.

DEMIR, V. et al. Influence of Alpha and Gamma-Iron Oxide Nanoparticles on Marine Microalgae Species. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 95, n. 6, p. 752-757, 2015.

EVENS, R. et al. Waterborne versus dietary zinc accumulation and toxicity in *Daphnia magna*: a synchrotron radiation based X-ray fluorescence imaging approach. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 2, p. 1178-84, 2012.

GARCÍA, A. et al. Acute toxicity of cerium oxide, titanium oxide and iron oxide nanoparticles using standardized tests. **Desalination**, v. 269, n. 1-3, p. 136-141, 2011.

GOVINDASAMY, R.; RAHUMAN, A. A. Histopathological studies and oxidative stress of synthesized silver nanoparticles in Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). **Journal of Environmental Sciences**, v. 24, n. 6, p. 1091-1098, 2012.

HANDY, R. D. et al. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 4, p. 287-314, 2008.

HEINLAAN, M. et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. **Chemosphere**, v. 71, n. 7, p. 1308-16, 2008.

HU, J. et al. Bioaccumulation of Fe₂O₃(magnetic) nanoparticles in *Ceriodaphnia dubia*. **Environmental Pollution**, v. 162, p. 216-22, 2012.

KAY, L.; SHAPIRA, P. Developing nanotechnology in Latin America. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 2, p. 259-278, 2009.

KIM, K. T. et al. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 10, p. 2268-2272, 2010.

LAURENT, S. et al. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 166, n. 1-2, p. 8-23, 2011.

LUOMA, S. N. Silver Nanotechnologies and the Environment: Old Problems or New Challenges? , Washington, DC, p. 68 pp, 2008. Disponível em: < https://wwwrcamnl.wr.usgs.gov/tracel/references/pdf/Luoma%202008_pen_15.pdf >. Acesso em: nov. of 2016.

MAHMOUDI, M. et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): development, surface modification and applications in chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 1-2, p. 24-46, 2011.

MATTSON, M. P. Hormesis defined. **Ageing Research Reviews**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2008.

MAXIMILIEN, J. et al. Nanoparticles in Biomedical Applications. In: WEGENER, J. (Ed.). **Nanoparticles in Biomedical Applications**: Springer International Publishing, 2015. p.177-210. ISBN 1867-2086 1867-2094.

MAXIMOVA, N.; DAHL, O. Environmental implications of aggregation phenomena: Current understanding. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 11, n. 4, p. 246-266, 2006.

MELEGARI, S. P. et al. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 142-143, p. 431-40, 2013.

MENDONÇA, E. et al. Effects of diamond nanoparticle exposure on the internal structure and reproduction of *Daphnia magna*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 186, n. 1, p. 265-71, 2011.

MOREIRA, R. A. et al. A comparative study of the acute toxicity of the herbicide atrazine to cladocerans *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia silvestrii* and *Macrothrix flabelligera*. **Acta Limnologica Brasiliensia**, v. 26, p. 1-8, 2014.

NANOCOMPOSIX. NanoComposix's guide to dynamic light scattering measurement and analysis. p. 8 pp, 2015. Disponível em: < https://cdn.shopify.com/s/files/1/0257/8237/files/nanoComposix_Guidelines_for_DLS_Measurements_and_Analysis.pdf >. Acesso em: nov. of 2016.

NNI. Are nanotechnology products available today? , 2016. Disponível em: < <http://www.nano.gov/nanotech-101/nanotechnology-facts> >. Acesso em: nov. of 2016.

PICCINNO, F. et al. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 9, p. 1-11, 2012.

SAKAI, H. et al. Species-Specific Distribution of Heavy Metals in Tissues and Organs of Loggerhead Turtle (*Caretta caretta*) and Green Turtle (*Chelonia mydas*) from Japanese Coastal Waters. **Marine Pollution Bulletin**, v. 40, n. 8, p. 701-709, 2000.

SOBRAL, O. et al. In Vitro Development of Parthenogenetic Eggs: A Fast Ecotoxicity Test with *Daphnia magna*? **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 50, n. 3, p. 174-179, 2001.

TAN, L. Y. et al. TiO₂ Nanoparticle Uptake by the Water Flea *Daphnia magna* via Different Routes is Calcium-Dependent. **Environ Sci Technol**, v. 50, n. 14, p. 7799-807, 2016.

USEPA. Technical fact sheet – Nanomaterials. p. 9 pp, 2014. Disponível em: < https://www.epa.gov/sites/production/files/2014-03/documents/ffrofactsheet_emergingcontaminant_nanomaterials_jan2014_final.pdf >. Acesso em: nov. of 2016.

VANCE, M. E. et al. Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 6, p. 1769-1780, 2015.

WANG, T. et al. Preparation of ultra-fine powders from polysaccharide-coated solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by innovative nano spray drying technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 511, n. 1, p. 219-222, 2016.

XU, P. et al. Use of iron oxide nanomaterials in wastewater treatment: a review. **Science of The Total Environment**, v. 424, p. 1-10, 2012.

XU, Q. et al. Heavy metal distribution in tissues and eggs of Chinese alligator (*Alligator sinensis*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 50, n. 4, p. 580-6, 2006.

ZHANG, W.-X. Nanoscale Iron Particles for Environmental Remediation: An Overview. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 5, n. 3/4, p. 323-332, 2003.

ZHAO, C. M.; WANG, W. X. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 30, n. 4, p. 885-892, 2011.

ZHU, Y.; LIAO, L. Applications of Nanoparticles for Anticancer Drug Delivery: A Review. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 7, p. 4753-4773, 2015.

Conclusões gerais

A partir dos dados obtidos no presente estudo, podemos concluir que:

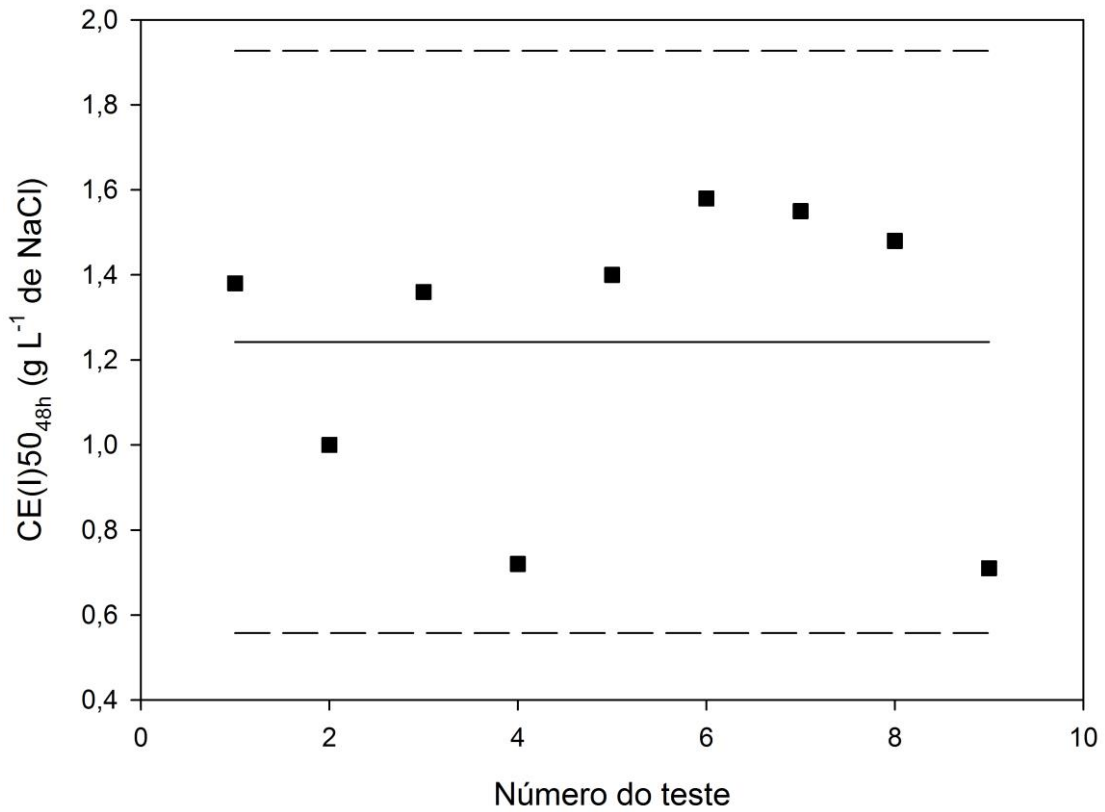
- As nanopartículas de óxido de ferro (nano-Fe₃O₄) utilizadas no presente trabalho, quando em água reconstituída, aglomeraram-se em escala micrométrica e tenderam a sedimentar rapidamente;
- Não houve toxicidade aguda de nano-Fe₃O₄ para o cladóceros nativo *Ceriodaphnia silvestrii*, na faixa de concentrações testada, sendo CE(I)50_{48h} >100 mg L⁻¹;
- Nos testes crônicos, em geral, concentrações de até 25 mg L⁻¹ de nano-Fe₃O₄ não afetaram significativamente ($p > 0,05$) os parâmetros de crescimento, reprodução e de sobrevivência de *C. silvestrii*. Na concentração de 50 mg L⁻¹, houve inibição significativa ($p < 0,05$) no crescimento dos cladóceros, bem como decréscimo significativo ($p < 0,05$) no número de ovos e de neonatos por fêmea;
- No 7º dia experimental, a concentração de 25,00 mg L⁻¹ de nano-Fe₃O₄ diminuiu significativamente o número de neonatos por fêmea. Com o passar do tempo, o animal aparentemente se adaptou ou se recuperou da exposição às NPs (embora tenha sido exposto continuamente a este poluente), de modo que apenas concentrações de 50,00 mg L⁻¹ continuaram a afetar este parâmetro.
- Durante os ensaios crônicos, foi observado ingestão de nano-Fe₃O₄ por *C. silvestrii*, bem como bioacumulação, uma vez que foram observadas nanopartículas em seus ovos, que passaram a ter aspecto acinzentado;
- Como os cladóceros fazem parte da base das cadeias alimentares, o uso e

descarte dessas nanopartículas devem ser efetuados com cautela, uma vez que nano-Fe₃O₄ afetou aspectos reprodutivos de *C. silvestrii*, sendo que o impacto na reprodução afetaria diretamente a perpetuação dessa espécie nativa em ambientes naturais, uma vez que esses microcrustáceos possuem ciclos de vida relativamente curtos.

- Com base nos parâmetros analisados, concentrações abaixo de 25 mg L⁻¹ de nano-Fe₃O₄ em ambientes aquáticos podem ser consideradas seguras para *C. silvestrii*.

Apêndices

Apêndice 1. Carta controle de *Ceriodaphnia silvestrii* exposta à substância de referência cloreto de sódio (NaCl). Onde: as linhas pontilhadas representam os limites inferior e superior; a linha sólida o valor médio de CE(I)50_{48h}; e os quadrados o valor de CE(I)50_{48h} de cada teste.



Apêndice 2. Parâmetros físicos e químicos da água durante os testes de toxicidade aguda e crônica com *Ceriodaphnia silvestrii* exposta a 5 concentrações de nano-Fe₃O₄.

Tipo de teste	Tempo de exposição (dias)	Tratamentos (mg L ⁻¹)	pH	Condutividade (µS cm ⁻¹)	Oxigênio dissolvido (mg L ⁻¹)	Dureza da água (mg CaCO ₃ L ⁻¹)	
Agudo	0	Controle	7,17	150,8	7,8	48	
	0	0,01	7,02	152,0	7,9	-	
	0	0,10	7,11	148,8	7,9	-	
	0	1,00	7,26	160,5	7,9	-	
	0	10,00	7,06	157,3	7,9	-	
	0	100,00	7,27	149,2	7,8	-	
	2	Controle	7,79	165,5	7,6	48	
	2	0,01	7,76	162,3	7,5	-	
	2	0,10	7,75	163,8	7,6	-	
	2	1,00	7,74	167,2	7,5	-	
	2	10,00	7,77	166,3	7,5	-	
	2	100,00	7,66	164,3	7,5	-	
	Crônico (1ª solução- teste)	0	Controle	7,09	157,2	7,7	48
		0	3,125	7,28	157,8	7,9	-
0		6,25	7,04	157,6	8,0	-	
0		12,50	7,00	157,3	7,8	-	
0		25,00	7,09	157,3	7,9	-	
0		50,00	7,03	157,4	7,8	-	
3		Controle	7,45	176,3	7,8	54	
3		3,125	7,49	183,7	7,9	-	
3		6,25	7,52	181,4	8,0	-	
3		12,50	7,61	179,5	8,1	-	
3		25,00	7,49	194,7	8,1	-	
3		50,00	7,62	189,1	7,9	-	
Crônico (2ª solução- teste)		3	Controle	7,20	158,1	7,8	48
		3	3,125	7,43	151,9	7,8	-
	3	6,25	7,38	150,3	7,9	-	
	3	12,50	7,32	151,7	7,8	-	
	3	25,00	7,43	152,6	7,9	-	
	3	50,00	7,47	150,7	7,8	-	
	5	Controle	7,62	165,9	8,0	50	
	5	3,125	7,77	164,0	7,8	-	
	5	6,25	7,66	171,5	8,1	-	
	5	12,50	7,67	169,3	7,9	-	
	5	25,00	7,71	169,8	8,1	-	
	5	50,00	7,77	180,9	8,0	-	
	Crônico (3ª solução- teste)	5	Controle	7,45	146,9	7,8	48
		5	3,125	7,25	166,7	7,7	-
5		6,25	7,29	155,6	8,0	-	
5		12,50	7,38	150,1	8,0	-	
5		25,00	7,37	151,7	8,1	-	
5		50,00	7,27	149,3	8,0	-	
7		Controle	7,74	177,0	7,8	48	
7		3,125	8,10	185,2	7,6	-	
7		6,25	7,63	168,7	7,5	-	
7		12,50	7,75	181,5	8,0	-	
7		25,00	7,74	202,4	8,0	-	
7		50,00	7,65	189,8	8,0	-	