

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

**RESPOSTAS DE *Scenedesmus bijugus* A NANOPARTÍCULAS DE TIO₂ EM
CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES**

Daniela da Silva Mariano

São Carlos – 2014

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

Daniela da Silva Mariano

**RESPOSTAS DE *Scenedesmus bijugus* A NANOPARTÍCULAS DE TIO₂ EM
CONCENTRAÇÕES AMBIENTALMENTE RELEVANTES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos (PPGRN) para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recurso Naturais.

Área de concentração: Ecologia e Recursos Naturais

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ana Teresa Lombardi

São Carlos – 2014

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

M333rs Mariano, Daniela da Silva.
Respostas de *Scenedesmus bijugus* a nanopartículas de
TiO₂ em concentrações ambientalmente relevantes / Daniela
da Silva Mariano. -- São Carlos : UFSCar, 2014.
42 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2014.

1. Ficologia. 2. Toxicidade. 3. Proteínas. 4. Carboidratos.
5. Rendimento quântico máximo. 6. Hormesis. I. Título.

CDD: 589.3 (20^a)

Daniela da Silva Mariano

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Aprovada em 16 de junho de 2014

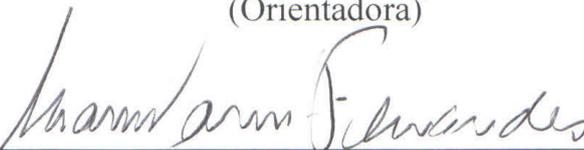
BANCA EXAMINADORA

Presidente



Profª. Dra. Ana Teresa Lombardi
(Orientadora)

1º Examinador



Profª. Dra. Marisa Narciso Fernandes
PPGERN/UFSCar

2º Examinador



Profª. Dra. Jandira Líria Biscalquini Talamoni
UNESP/Bauru-SP

*Dedico este trabalho a minha
família, ao meu eterno amor e
amigos que me ajudaram torná-lo
possível.*

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Aos meus tios, Sebastião Mauricio Alves e Teresa Mariano Alves por sempre me protegerem e dando carinho e amor, desempenhando o verdadeiro papel de pais. Eu os amo muito e lhes devo tudo o que sou.

Ao João Paulo Pires Barreto, meu eterno amor, por sempre estar ao meu lado me apoiando e me ajudando a ser uma pessoa melhor.

À professora Dra Jandira Lira B. Talamoni por abrir meus caminhos e sempre me acolher como uma mãe, tanto nos momentos fáceis quanto nos difíceis.

À professora Dra Ana Teresa Lombardi pela oportunidade concedida, pela possibilidade de ampliação de conhecimento e por toda ajuda sem a qual dificilmente seria possível a concretização desse trabalho.

Ao Carlos Aparecido Casali por todo apoio técnico e alegrias durante o desenvolvimento deste trabalho.

A todos os meus amigos (as) do laboratório Adriano, Alex, Andrea, Camila, Giseli, Graziela, Jaqueline, Monica, Pedro, Renata, Raquel, Thaís, que ajudaram, direta ou indiretamente a realização desse trabalho.

Às minhas amigas da graduação Amanda, Cintia e Paula que sempre estiveram comigo dando todo apoio e incentivo.

Ao Prof. Dr. Edson Roberto Leite e seus colaboradores do LIEC, DQ/UFSCar pela caracterização das nanopartículas.

À CAPES pela bolsa de estudos concedida.

Obrigada a todos (as), do fundo do meu coração, por tornarem este sonho possível.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	xii
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Histórico da nanotecnologia.....	3
2.2 Dióxido de Titânio	4
2.3 Nanopartículas e ambiente	6
2.4 Estudos toxicológicos com as nanopartículas	8
2.5 Algas e nanopartículas	10
3. OBJETIVOS	13
4. MATERIAIS E MÉTODOS	14
4.1 Caracterização das nano-TiO ₂	14
4.2 Organismo teste.....	15
4.3 Condições de cultivo	16
4.4 Teste ecotoxicológico.....	16

4.5 Monitoramento da biomassa	17
4.6 Análise bioquímica	18
4.7 Análise estatística	20
5. RESULTADOS	21
6. DISCUSSÃO	30
7. CONCLUSÕES	36
8. REFERÊNCIAS	37

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Algumas formas minerais que contém óxido de titânio: a- ilemenita, b- anatase, c- rutilo e d- perovskita.

Figura 2- Consumo de Ti no Brasil. (Adaptado de Santos, 2010).

Figura 3- Aplicações das nanopartículas de TiO₂.

Figura 4- Escala nanométrica e micrométrica (Adaptado de Marcone, 2011).

Figura 5- Esquema da CEA (Comprehensive Environmental Assessment). Adaptado de EPA (2010).

Figura 6- Fotografia do experimento em 96 horas.

Figura 7 – Curvas de calibração. Figura 7a: curva de calibração para concentração de proteínas. A reta de regressão obtida foi: $y = 0,0221x + 0,0034$. O ajuste (R^2) foi de 0,995. Figura 7b: Curva de calibração para concentração de carboidratos. A reta de regressão obtida foi: $y = 0,0093x + 0,0649$. O ajuste (R^2) foi de 0,994.

Figura 8- Caracterização das nanopartículas de TiO₂. Figura 8a (superior) mostra o tamanho primário de nano-TiO₂ e 8a (inferior) a cristalinidade. Figura 8b apresenta o potencial Zeta.

Figura 9- Microscopia eletrônica das nano-TiO₂ usadas nesta pesquisa. Figuras 9a e 9b mostram a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Figuras 9c e 9d microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Figura 10 – pH do controle e dos tratamentos em função do tempo experimental. Símbolos utilizados: ■ controle; □ 5.10⁻⁹; ▲ 10⁻⁸; △ 5.10⁻⁸; ● 10⁻⁷; ○ 10⁻⁶; * 5.10⁻⁶ mol L⁻¹.

Figura 11- Curvas de crescimento para o controle e os tratamentos, representada pela densidade de células (células mL⁻¹) em função do tempo experimental (dias). O controle não recebeu nano-TiO₂. Símbolos para as diferentes concentrações de nano-TiO₂ (mol L⁻¹): ■ controle; □ 5.10⁻⁹; ▲ 10⁻⁸; △ 5.10⁻⁸; ● 10⁻⁷; ○ 10⁻⁶; * 5.10⁻⁶ mol L⁻¹.

Figura 12- Concentração de clorofila a (mg L⁻¹) em função do tempo experimental. Símbolos: ■ controle; □ 5.10⁻⁹; ▲ 10⁻⁸; △ 5.10⁻⁸; ● 10⁻⁷; ○ 10⁻⁶; * 5.10⁻⁶ mol L⁻¹.

Figura 13 – Absorbância no comprimento de onda 684 nm para o controle e dos tratamentos em função do tempo experimental. Símbolos utilizados: ■ controle; □ 5.10⁻⁹; ▲ 10⁻⁸; △ 5.10⁻⁸; ● 10⁻⁷; ○ 10⁻⁶; * 5.10⁻⁶ mol L⁻¹.

Figura 14- Rendimento quântico máximo do fotossistema II (U.A.) em função do tempo experimental (dias) para as várias concentrações de nano-TiO₂ (mol L⁻¹) e controle. Símbolos: ■ controle; □ 5.10⁻⁹; ▲ 10⁻⁸; △ 5.10⁻⁸; ● 10⁻⁷; ○ 10⁻⁶; * 5.10⁻⁶ mol L⁻¹.

Figura 15- Rendimento quântico máximo do fotossistema II (U.A.) em função das concentrações de nano-TiO₂ em 96 h de exposição. A linha a tracejada equivale ao controle.

Figura 16- Viabilidade celular. Figura 16a: Células vivas (células mL⁻¹) apresentadas em função da concentração de nano-TiO₂ em 96 h e na figura 16b em função da concentração de nano-TiO₂ para 96 h (barra cinza), 192 h (barra listrada) e 288 h (barra preta) de exposição.

Figura 17- Razão proteínas:carboidratos (pg/célula) para 96 h (barra cinza), 192 h (barra listrada) e 288 h (barra preta) de exposição ao nano-TiO₂.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Número de trabalhos publicados na Science Direct no período de 2003 a 2013.

Tabela 2- Resumo das principais publicações com ecotoxicidade de nanopartículas em microalgas.

Tabela 3- Taxas de crescimento para os controles e concentrações testadas.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

EPA - United States Environmental Protection Agency

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

MET – Microscopia eletrônica de transmissão

nano-TiO₂ - Nanopartículas de dióxido de titânio

NPs - Nanopartículas

ROS - Reactive oxygen species (Espécies reativas de oxigênio)

TiO₂ - Dióxido de Titânio

Φ_M - Rendimento quântico máximo do fotossistema II

RESUMO

Células do fitoplâncton são a base de cadeias alimentares aquáticas, apoiando níveis tróficos superiores e ajudando na manutenção do equilíbrio desses ecossistemas. Na qualidade de resíduos, as nano-TiO₂ alcançam os ambientes aquáticos onde podem impor riscos à biota. A literatura é controversa sobre a toxicidade de nanopartículas ao fitoplâncton e, em geral, a maioria dos dados têm sido obtidos com base em concentrações de nanopartículas superiores às estimadas para ambientes aquáticos naturais. Considerando que as nanopartículas variam de tamanho de acordo com sua concentração, em decorrência da formação de agregados e, que sua toxicidade e reatividade são dependentes de seu tamanho, investigações sobre a toxicidade desses materiais devem ser feitas empregando-se concentrações ambientalmente importantes, ou seja, aquelas que podem ser encontradas em ecossistemas naturais. Este estudo teve como objetivo investigar os efeitos das nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) na clorofíceia de água doce *Scenedesmus bijugus* em concentrações ambientalmente representativas. Nesta pesquisa, apresentamos dados de uma investigação sistemática sobre os efeitos de nano-TiO₂ em amplitude de concentração de $5 \cdot 10^{-9}$ a $5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ em *Scenedesmus bijugus*, focando em sua fisiologia sob condições controladas de laboratório. Foram avaliadas a densidade de células, as concentrações de clorofila a, taxas de crescimento, rendimento quântico máximo do PSII (Φ_M) (PhytoPAM) e razão proteínas:carboidratos, considerando um tempo de exposição de 12 dias. Portanto, avaliou-se a resposta da microalga em exposição aguda e crônica. Os resultados mostraram, em geral, baixa toxicidade das nano-TiO₂ à *S. bijugus*, mas o rendimento fotossintético foi afetado na concentração $5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ em 72 h e 96 h de exposição, havendo recuperação celular após esse período. Não foram detectados efeitos significativos das nano-TiO₂ nas taxas de crescimento. Efeito hormesis, representado por aumento da razão proteínas:carboidratos (P:C) em função do tempo de exposição, foi observado na menor dose de nano-TiO₂ testada ($5 \cdot 10^{-9}$ mol L⁻¹). Observamos que as variações observadas na razão P:C têm implicações ecológicas importantes, uma vez que P:C relaciona-se ao equilíbrio energético nos ecossistemas aquáticos. Nesta pesquisa, testamos apenas nano-TiO₂, no entanto, no ambiente há várias nanopartículas que coexistem e os microrganismos são expostos a esta mistura de partículas simultaneamente, o que pode somar sobre os efeitos individuais.

Palavras-chave: toxicidade, proteínas, carboidratos, rendimento quântico máximo, hormesis

Responses of *Scenedesmus bijugus* to TiO₂ nanoparticles at environmentally relevant concentrations

ABSTRACT

Phytoplankton cells are base of aquatic food webs, so supporting higher trophic levels and helping equilibrium maintenance in such ecosystems. As residues, nano-TiO₂ particles reach aquatic environments where they pose risks to the biota. Literature is controversial about the toxicity of nanoparticles to phytoplankton in general and most data obtained so far has been based on nanoparticles concentrations well above those estimated to occur in natural aquatic environments. Because nanoparticles size vary according to its concentrations, and its toxicity and reactivity are largely dependent on its size, investigations of nanoparticles toxicity at environmentally relevant concentrations are important for the understanding of these compounds onto phytoplankton cells. On the contrary, investigations using higher concentrations can be meaningless. This study aimed at investigating the effects of titanium dioxide nanoparticles (nano-TiO₂) at environmentally relevant concentrations ($5 \cdot 10^{-9}$ to $5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹) on the freshwater Chlorophyceae *Scenedesmus bijugus*. We present data of a systematic investigation onto the effects of TiO₂ nanoparticles to *Scenedesmus bijugus* focusing on its physiology under controlled laboratory conditions. We evaluated cell density, chlorophyll a concentrations, growth rates, photosynthetic quantum yield of PSII (Φ_M) (PhytoPAM) and proteins:carbohydrates ratio in a 12 day culture experiment. The results showed low toxicity of nano-TiO₂ to *S. bijugus*, but significant effects were detected. Photosynthetic yield decrease was obtained at the highest exposure concentration tested ($5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹) at 72 h and 96 h, but cells recovered short after and no significant effects of nano-TiO₂ on growth rates were detected. An hormesis effect was observed for the lowest dose of nano-TiO₂ ($5 \cdot 10^{-9}$ mol L⁻¹) tested, in which an increase in P:C ratio as function of exposure time was obtained. Variations in P:C ratios have important ecological implications, since they are related with the energetic balance in aquatic ecosystems. Here we tested only nano-TiO₂, however, in the environment several nanoparticles coexist and microorganisms are exposed to this mixture of particles simultaneously, what can add on the individual effects.

Keywords: toxicity, proteins, carbohydrates, maximum quantum yield, hormesis

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Desde os primórdios da humanidade nota-se uma crescente busca pelo desenvolvimento social, cultural, político, científico e industrial. A nanotecnologia, considerada 4ª revolução industrial (QUISPE, 2011), é a constatação do poder intelectual humano otimizando o uso de partículas minúsculas para contribuir com benfeitorias à sociedade. As nanopartículas (NPs) com tamanho entre 10^{-9} e 10^{-7} m encontram aplicações na produção de energia, em materiais eletrônicos, óptica, remediação ambiental, indústria de alimentos e cosmética, e na medicina, dentre outras (JONER et al., 2008).

As nanopartículas (ou nanomateriais) apresentam elevada área superficial, o que lhes confere alta reatividade e propriedades características (QUINA, 2004; NAVARRO et al., 2008a; MARCONE, 2011; ELSAESSER e HOWARD 2012) que contribuem para seus múltiplos usos. Uma das consequências desse uso é sua entrada no ambiente, seja como resíduo da produção ou do uso por consumidores. Nos ecossistemas aquáticos, as NPs, assim como qualquer elemento ou composto, encontram ambiente propício para reações das mais diversas, como complexação com constituintes orgânicos e inorgânicos, adsorção em superfícies e interação com a biota.

Os ecossistemas aquáticos continentais ocupam uma pequena parte da superfície da Terra, contudo é grande sua importância para a sociedade (REBOUÇAS et al., 2006). Apesar disso, tais ecossistemas são muitas vezes usados como sistemas gratuitos de esgotamento sanitário (ODUM et al., 2007) e industrial (COSTA et al., 2011).

A comunidade fitoplanctônica, constituinte dos ecossistemas aquáticos, é formada por microalgas e protistas fotossintetizantes que se distribuem pelo ambiente, desde que haja penetração de luz. Na qualidade de produtores primários, o fitoplâncton constitui a base de cadeias alimentares, suportando organismos de outros níveis tróficos, fixando o CO_2 e liberando o O_2 , processos que ocorrem durante a fotossíntese (KAMPEL, 2003). Estudos envolvendo tais organismos podem contribuir para o entendimento de mecanismos que ajudam na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas aquáticos e, conseqüentemente, fornecerão informações para sua preservação.

Considerando que as NPs apresentam elevada superfície de reação e que são cerca de $10^2 - 10^3$ vezes menores que as células algais, cuja superfície é dotada de cargas e capaz de reagir com diversos elementos (LOMBARDI et al., 2002), a interação entre esses dois componentes, nomeadamente as algas e as NPs, pode afetar a dinâmica fitoplactônica nos ambientes aquáticos (NAVARRO et al., 2008a) e, conseqüentemente, o seu equilíbrio.

Os impactos ambientais advindos do desenvolvimento nanotecnológico são ainda pouco conhecidos (JONER et al., 2008) e pesquisas sobre as possíveis consequências ambientais resultantes tanto de sua produção, como também de seu descarte, são importantes para suportar tomadas de decisões e contribuir para o estabelecimento da legislação pertinente. Estima-se que em 2014 aproximadamente 2,6 trilhões de dólares serão investidos por empresas em projetos nanotecnológicos (JONER et al., 2008), o que deve resultar em aumento expressivo desses materiais no ambiente.

Segundo Paschoalino et al. (2010), os ecossistemas aquáticos são o principal compartimento receptor dos nanomateriais e as pesquisas com organismos aquáticos traduzem os impactos que esses materiais podem exercer no ambiente, diferentemente de determinações físicas e químicas, que são pontuais no tempo e no espaço. Entretanto, para que tais pesquisas traduzam os impactos ocasionados pelas NPs, a concentração empregada nos estudos deve ser representativa da existente no ambiente natural. A concentração de nano-TiO₂ presentes em lagos e outros corpos aquáticos continentais é atualmente da ordem de $8,7 \cdot 10^{-9}$ a $2 \cdot 10^{-7}$ mol L⁻¹, segundo estimado por Mueller e Nowack (2008). Entretanto, os estudos dos efeitos tóxicos de NPs em microalgas utilizam concentrações da ordem de 10^{-3} – 10^{-6} mol L⁻¹ (ARUOJA et al., 2009; HARTMANN et al., 2010; SADIQ et al., 2011; HE et al., 2012; RÖHDER et al., 2014), ou seja, muito acima daquelas encontradas no ambiente. Sendo assim, esta pesquisa se distinguiu por buscar respostas fisiológicas do organismo em exposição crônica a concentrações ambientais de NPs, o que melhor representa a realidade das exposições na atualidade.

Assim, tendo *Scenedesmus bijugus* como organismo teste, esta pesquisa avaliou os efeitos de nanopartículas de dióxido de titânio (nano-TiO₂) em concentrações de $5 \cdot 10^{-9}$ a $5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹. Foram analisadas as respostas da microalga Chlorophyceae quanto à densidade celular nas culturas, taxa de crescimento específica, viabilidade celular, rendimento quântico máximo do fotossistema II (Φ_M) e razão proteínas:carboidratos em um período de exposição de 12 dias, e.g., uma exposição crônica em concentrações ambientalmente importantes. Os resultados obtidos mostraram que mesmo em concentrações baixas, em comparação com aquelas encontradas na literatura, o nano-TiO₂ afetou o aparato fotossintético. Mostramos também, que após 96 h de exposição houve total recuperação da microalga aos efeitos do nano-TiO₂.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Histórico da nanotecnologia

Atualmente conhecida como a nova revolução industrial (QUISPE, 2011), a nanotecnologia não surgiu de repente. Uma prova disso ocorreu em 1946, quando foi lançado o primeiro computador, chamado de ENIAC (Electronic Numerical Integrator and Calculator), que pesava trinta toneladas e ocupava uma sala inteira e que no entanto, era menos eficiente que os atuais equipamentos portáteis. Contudo, 24 anos depois a revolução nanotecnológica surgia através do cientista americano Richard P. Feynman, pioneiro da nanotecnologia (TOMA, 2004). Em 1959, seu discurso em “There's Plenty of Room at the Bottom”, foi proferido na reunião anual da Sociedade Americana de Física, no Instituto de Tecnologia da Califórnia e foi considerado o marco inicial na nanociência (FEYNMAN, 1959; PEREIRA, 2010; TOLOCHKO, [s.d.]).

Feynman nunca usou o termo nanotecnologia, que foi cunhado só em 1974 por Norio Taniguchi da Universidade de Ciências de Tóquio, como sendo um processo de separação, consolidação e deformação de matérias, átomo por átomo ou por molécula (PEREIRA, 2010; TOLOCHKO,[s.d.]). Doze anos depois, foi publicado o livro “Vehicles of creation: the arrival of the nanotechnology era” por Kim Eric Drexley que, com ideias de estratégias nanotecnológicas a partir de Feynman (TOLOCHKO, [s.d.]), vislumbrou uma nova fronteira na construção de nanomáquinas inteligentes (TOMA, 2004).

A partir das décadas de 1980 e início de 1990 houve uma série de descobertas e invenções que contribuíram para a evolução nanotecnológica e, desde então, pesquisas e projetos têm se intensificado (TOLOCHKO, [s.d.]).

Devido às propriedades peculiares dos materiais em escala nano, o uso das nanopartículas tem aumentado a cada ano, disponibilizando quantidade crescente desse material, tanto para o ambiente quanto para o Homem. As aplicações das NPs nas áreas médicas, espacial e computacional, dentre outras, tiveram início mesmo antes de se fazer qualquer análise toxicológica, quer para a previsão de riscos ambientais, quer para a saúde humana.

No Homem, a distribuição das NPs dentro do corpo e órgãos é, na maior parte das vezes desconhecida (HANDY et al., 2008; ELSAESSER e HOWARD 2012), mas sabe-se que essas partículas podem ser transportadas adsorvidas em albuminas ou outras proteínas tipicamente encontradas em fluidos corporais (HANDY et al., 2008) e, assim, distribuírem-se para órgãos e

tecidos, podendo ou não causar prejuízos à saúde. No entanto, as consequências da exposição a curto e longo prazo à saúde humana não são totalmente conhecidas. Em se tratando de efeitos das NPs no ambiente e organismos ali presentes, é ainda menor o conhecimento a cerca das consequências de seu descarte/entrada em ecossistemas aquáticos. Nesse caso, o Homem provavelmente sofreria as consequências em um período ainda distante, uma vez que as concentrações ambientais são da ordem de $8,7 \cdot 10^{-9}$ a $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$, segundo Mueller e Nowack (2008).

2.2 Dióxido de Titânio (TiO_2)

O titânio é liberado na crosta terrestre por rochas ígneas e sedimentares através de intemperismo, tornando-o o nono elemento mais abundante (SANTOS, 2010; PEREIRA 2010), cujas formas dominantes são o rutilo (TiO_2) e a ilmenite (FeTiO_3) (KAEGI et al., 2008). Dentre seus compostos, o dióxido de titânio (95%) é o mais utilizado em tintas para a construção civil (SANTOS, 2010).

Segundo Pereira (2010) e Santos (2010), os minerais que contêm óxido de titânio de interesse econômico são: ilmenita, leucoxênio, rutilo e, mais recentemente, o anatase e perovskita, todos de origem ígnea; há também o mais raro chamado broquite. Na Figura 1 é possível observar algumas das formas minerais que contêm óxido de titânio.

O Brasil possui a quinta maior reserva de ilmenita mundial, além de deter as maiores jazidas de titânio na forma de anatase do mundo (SANTOS, 2010).

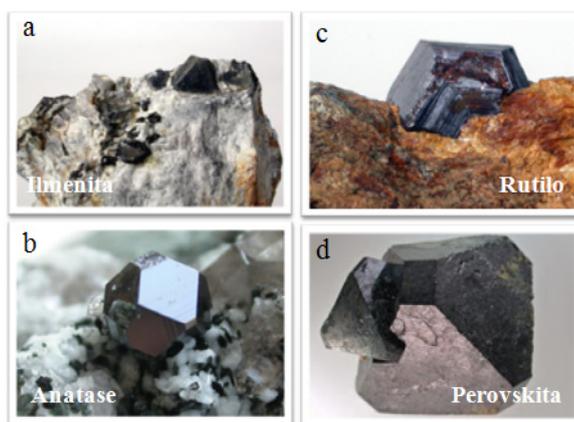


Figura 1 – Algumas formas minerais que contém óxido de titânio: a- ilmenita, b- anatase, c- rutilo e d- perovskita. (Fonte: <http://www.aldoroggiani.it/museo.htm> e Google imagens.)

O mercado de extração de dióxido de titânio (TiO_2) é crescente e o requerimento de investimentos também. O investimento na mineração de titânio em 2009, foi de R\$ 841.806,00 e estimou-se que em 2013 esse valor chegasse a R\$ 1.650.006,00 (ANUÁRIO MINERAL BRASILEIRO, 2010). O consumo de titânio no Brasil está representado na Figura 2, de acordo com Santos (2010).



Figura 2 – Consumo de Ti no Brasil. (Adaptado de Santos, 2010).

A partir da década de 1920, quando o TiO_2 substituiu os pigmentos à base de chumbo, o que hoje representa 70% da produção destinada a esse setor (PEREIRA, 2010), iniciou-se um crescente aumento de sua extração, sendo que atualmente o investimento em pesquisas também tem aumentado, bem como a gama de finalidades para esse metal.

O uso no setor alimentício, em laticínios, doces e coberturas tem aumentado significativamente, Além disso, seu uso tem sido ampliado para outros produtos, como vegetais secos, nozes, sopas e vinhos por retirar a umidade e o oxigênio (PEREIRA, 2010; ASSIS et al., 2012). No entanto, seu uso tem sido indiscriminado e amplificado a cada dia, tanto que recentemente, no Brasil, foi elaborada uma proposta de Projeto de Lei 1370/11 que proíbe a utilização de TiO_2 em alimentos; contudo, esta foi rejeitada já que existe uma legislação da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) que permite o uso da mesma, embora sem especificar sua dose máxima diária aceitável. Além disso, foi alegada a falta de embasamento técnico para o potencial risco à saúde e ao ambiente (<http://www2.camara.leg.br/>).

Diversas são as aplicações das NPs, e suas características frente à radiação ultravioleta as colocam como candidatas ideais para protetores solares, além de serem bastante utilizadas em indústrias de plásticos e tintas, pois previnem a descoloração e deterioração (Pereira, 2010) do produto final.

As pesquisas com nanopartículas também contribuem para o aumento das possibilidades de utilização das mesmas, principalmente por suas propriedades ópticas, magnéticas, elétricas, de transporte, catalíticas e mecânicas que diferem do metal macroscópico (QUINA, 2004; MARCONE, 2011). Algumas das diversas aplicações das nano-TiO₂ são apresentadas na Figura 3.

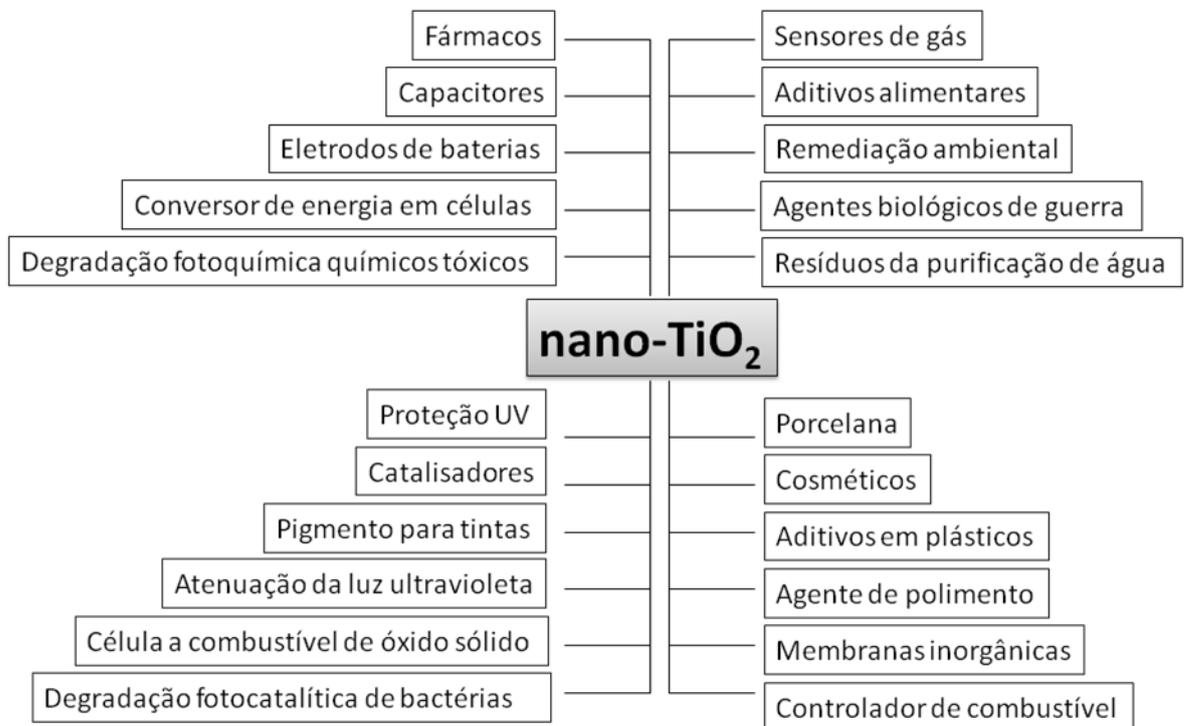


Figura 3 – Aplicações das nanopartículas TiO₂.

2.3 Nanopartículas e ambiente

As nanopartículas presentes no ambiente são provenientes tanto de fontes naturais quanto antrópicas (OBERDÖRSTER et al., 2005; MARCONE, 2011). São consideradas fontes de

nanopartículas naturais as poeiras vulcânicas e atmosféricas, incêndio florestal, vírus, ferritina, sal marinho, núcleos de gelo, solo, água doce, dentre outros; e, as antrópicas podem ser originárias de óxidos metálicos, polímeros de fumo, carbono, produtos comerciais, etc. (OBERDÖRSTER et al., 2005; HANDY et al., 2008; MARCONE, 2011).

A nanotecnologia encontra-se em rápido desenvolvimento graças às dimensões das nanopartículas (10^{-9} a 10^{-7} m) e propriedades mecânicas, ópticas, magnéticas e químicas, que são diferentes dos equivalentes macroscópicos (MASCIANGIOLI e ZHANG, 2003; QUINA, 2004; MARCONE, 2011). A Figura 4 apresenta uma comparação entre estruturas nanométricas e micrométricas.

Essas partículas merecem atenção desde sua extração e consumo até o seu descarte que, muitas vezes, é inadequado. Isso pode disponibilizá-las para o solo, ar e, principalmente, para os ambientes aquáticos (PASCHOALINO et al., 2010); justamente por isso estudos toxicológicos têm aumentado a cada ano (MARCONE, 2011).

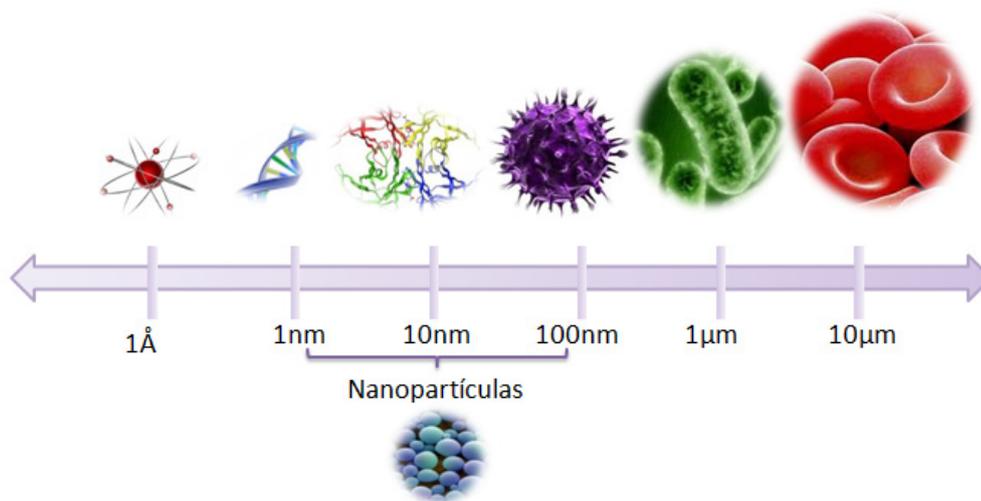


Figura 4- Escala nanométrica e micrométrica. (Adaptado de Marcone, 2011)

O contato das nanopartículas com os organismos de ambientes aquáticos, bem como com o Homem (NAVARRO et al., 2008a; PASCHOALINO et al., 2010), tem sido alvo de pesquisas, principalmente pela preocupação gerada na medida em que essas partículas dispersam-se no

ambiente. Tal dispersão e o consequente contato incontrolado destas com os seres vivos podem ocorrer de forma direta, por ingestão ou inalação, ou de forma indireta, via cadeia alimentar (MARCONE, 2011; FORBE et al., 2011). O esquema apresentado na Figura 5 é uma ilustração do caminho das nanopartículas e sua relação com os ambientes e organismos (UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2010). Apesar de simplista, o esquema permite a inserção de diversas rotas de dispersão e possibilidades de interação das nanopartículas nos ecossistemas e saúde humana.

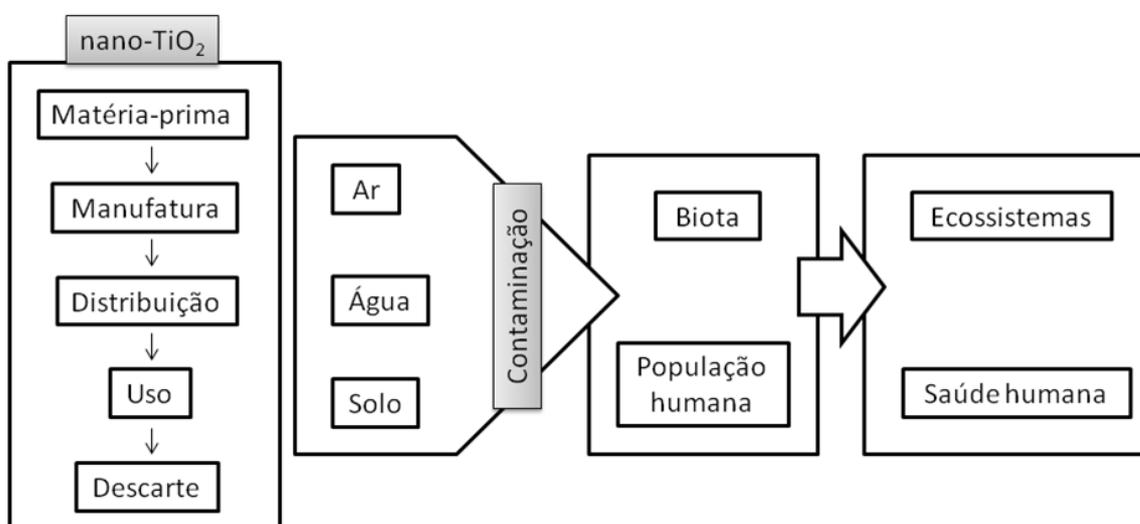


Figura 5 – Esquema representativo do caminho das nanopartículas segundo EPA (2010), a partir da CEA (Comprehensive Environmental Assessment).

2.4 Estudos toxicológicos com as nanopartículas

No planeta são produzidos, anualmente, mais de 3.000 mil compostos (SODRÉ et al., 2007) e, inevitavelmente, muitos deles são descartados no ambiente sem qualquer tratamento prévio, podendo tornarem-se tóxicos a biota a eles exposta. Paralelamente a essa crescente demanda desenvolveu-se a toxicologia, um ramo da ciência que estuda os efeitos de químicos manufaturados, antropogênicos e/ou naturais sobre organismos nos vários níveis de organização (RAND, 1995).

Os estudos toxicológicos tendem a ser cada vez mais imprescindíveis, a fim de estabelecer ferramentas para a regulamentação de compostos produzidos, além da importância para a formulação de legislações que viabilizem o desenvolvimento sustentável. Além disso, qualquer consequência ao ecossistema, prejudicial ou não, deve ser previamente conhecida antes da comercialização e uso de produtos que são lançados para o mercado consumidor.

Dentre os diversos compostos que são produzidos anualmente, as nanopartículas encontram-se em elevada expansão devido às suas propriedades peculiares e amplo potencial de aplicação (ANGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2011). Segundo a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (2011) e ELSAESSER e HOWARD (2012), os nanomateriais mais utilizados são: prata, carbono, zinco, silício, titânio e ouro, e são empregados em maior número na categoria saúde e bem estar.

Em decorrência deste amplo uso, iniciaram-se os testes de toxicidade tendo as nanopartículas como objeto a ser investigado. O número de trabalhos que envolvem a toxicologia das NPs aumentou de modo significativo de 1999 a 2008 (ANGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2011). Ao pesquisar a base de dados da Science Direct utilizando-se *nanomaterials and toxicity* como palavras de busca, nota-se que para o período de 2003 a 2013 o número de publicações passou de 20 para 2000, aproximadamente, como pode ser observado na Tabela 1.

Tabela 1- Número de trabalhos publicados em ecotoxicologia de nanopartículas na *Science Direct* no período de 2003 a 2013.

Ano de publicação	Número de trabalhos publicados
2003	20
2005	100
2007	263
2009	600
2011	1.268
2013	2.184

Segundo HANDY et al. (2008), os estudos ecotoxicológicos com nanopartículas são ainda emergentes e muito há que se adequar nessas investigações, uma vez que para nanopartículas, tanto o tamanho como também o constituinte químico de sua composição são aspectos importantes a serem considerados.

No entanto, os testes toxicológicos realizados com NPs na atualidade utilizam concentrações muito acima das estimadas para ambientes aquáticos naturais (ARUOJA et al., 2009; HARTMANN et al., 2010; SADIQ et al., 2011; HE et al., 2012; RÖHDER et al., 2014). Em geral, esses estudos usam concentrações da ordem de 10^{-4} mol L⁻¹, enquanto Mueller e Nowack (2008) estimaram a concentração de nano-TiO₂ e concluíram que são da ordem de $10^{-9}/10^{-8}$ até um máximo de 10^{-7} mol L⁻¹ para ambientes aquáticos continentais. Essa diferença de 1000 vezes ou mais nas concentrações pode atuar como fator impeditivo na transferência dos resultados da pesquisa para situações reais. Observamos, ainda, que para o acúmulo de conhecimento sobre os efeitos de nanopartículas no ambiente é imprescindível que as concentrações usadas sejam próximas àquelas que ocorrem nos ecossistemas aquáticos naturais.

Em relação à ecotoxicologia, é importante observarmos que nos ambientes naturais os organismos estão expostos a diversos compostos, o tempo todo, que neles coexistem. Isso pode levar a consequências amplificadas, ainda que seja para compostos com baixa toxicidade. Salienta-se que atualmente os ambientes aquáticos têm sido locais de despejo para diversos compostos, inclusive para as NPs, e por isso pesquisas sobre as consequências ambientais e à biota são importantes para se obter uma correta avaliação de risco aos ecossistemas.

2.5 Algas e nanopartículas

Segundo Paschoalino et al. (2010), dentre os ambientes receptores das nanopartículas, os ecossistemas aquáticos são os principais, e no meio aquático as NPs dispersam-se, possibilitando elevada disponibilidade aos organismos e mobilidade no ambiente.

Nos ambientes aquáticos, o fitoplâncton é formado em grande parte por microalgas, cuja paredes celulares podem ser consideradas como o primeiro local de possível interação com as NPs (YEUNG et al., 2009; HARTMANN et al., 2010; FAN et al., 2011, SADIQ et al., 2011). As paredes celulares são semipermeáveis e o diâmetro de seus poros varia de 5 a 20 nm, podendo permitir a entrada de NPs menores até atingirem, finalmente, a membrana plasmática

e o interior celular (NAVARRO et al., 2008b). Segundo Navarro et al. (2008b), logo que as NPs penetram nas células pode haver sua interação com organelas, assim interferindo nos processos metabólicos. Isso, por sua vez, pode resultar na formação de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, Elsaesser e Howard (2012) mostraram que a estabilidade da membrana celular pode ser afetada direta ou indiretamente, podendo resultar em morte celular.

A toxicidade de nanopartículas ao fitoplâncton ainda é pouco compreendida e alguns trabalhos mostram que exposição às mesmas pode resultar em danos nas superfícies e membranas celulares (YEUNG et al., 2009; HARTMANN et al., 2010; SADIQ et al., 2011), na geração de espécies reativas do oxigênio (HE et al., 2012), na redução da concentração de clorofila a (SADIQ et al., 2011) e redução do crescimento (BAKER et al., 2013) e na alteração na composição de ácidos graxos (KADAR et al., 2012). Enquanto uma grande parte dos estudos e publicações com NPs mostram efeitos deletérios às microalgas e outros organismos fotossintéticos, há alguns que mostram estímulo no crescimento, como observado em Navarro et al. (2008b) com nano-TiO₂. Esses autores inferiram aumento de biomassa seca, de síntese de clorofila a e do metabolismo geral em organismos fotossintetizantes mediante a presença de nano-TiO₂. Essa duplicidade de efeito, ora estimulante e ora deletério, não é ainda compreendida e propomos que pode ser tanto devido ao parâmetro resposta que se analisa no organismo, como também à dose de exposição.

As microalgas, que são a base de cadeias alimentares nos ambientes aquáticos, podem ser afetadas pelas NPs, segundo a literatura, o que pode resultar em disfunções bioquímicas, alterando os demais níveis tróficos (SOUZA e KELLY 2000; KULACKI et al., 2012; BAKER et al., 2013) e possivelmente o equilíbrio desses ambientes. Logo, é evidente que tais estudos devam ser cada vez mais estimulados para buscar esclarecer as reais consequências aos organismos frequentemente expostos às nanopartículas.

Se as nanopartículas podem ou não estimular o crescimento de microalgas e se isso é dependente da dose e como ocorre, são ainda fatores que necessitam ser investigados em detalhe, empregando-se uma amplitude de concentração que inclua aquelas presentes nos ambientes naturais. Nessa busca, é um aspecto importante a resposta fisiológica que se investiga, uma vez que diferentes aspectos do metabolismo podem apresentar diferentes sensibilidades para produtos tóxicos específicos. É o caso da atividade fotossintética, parâmetro de elevada sensibilidade para estudos de toxicidade no fitoplâncton (LOMBARDI e MALDONADO 2011).

A Tabela 2 mostra uma síntese do que encontramos na literatura em relação à toxicidade de nanopartículas às microalgas, considerando a concentração usada e o parâmetro fisiológico analisado como resposta à exposição.

Tabela 2. Resumo das principais referências com estudos de nanopartículas em microalgas.

Microalga	Parâmetro analisado	Concentração (mol L ⁻¹)	Referência
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Fotossíntese	5.10 ⁻⁶ e 10 ⁻⁵ nano-Ag	Navarro et al. 2008a
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Contagem celular Fluorescência	9.10 ⁻⁵ e 1,1.10 ⁻³ nano-TiO ₂	Aruoja et al. 2009
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Fluorescência	7,2.10 ⁻⁶ – 3.10 ⁻³ nano-TiO ₂	Hartmann et al. 2010
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	Fluorescência Produtividade primária Respiração	6,26.10 ⁻⁴ – 3,7.10 ⁻³ nano-TiO ₂	Cardinale et al. 2012
<i>Scenedesmus</i> sp.	Absorbância clorofila	3,6.10 ⁻⁵ – 2,3.10 ⁻³ nano-TiO ₂	Sadiq et al. 2011
<i>Chatonella marina</i>	Contagem celular ROS	2.10 ⁻⁸ – 2.10 ⁻⁵ nano-Ag	He et al. 2012
<i>Anabaena</i> sp	Rendimento fotossintético ROS Densidade óptica	1,2.10 ⁻⁵ – 6,3.10 ⁻⁴ nano-TiO ₂	Tang et al. 2013
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Rendimento fotossintético ROS Morfologia celular	5.10 ⁻⁵ – 2,5.10 ⁻⁴ nano-TiO ₂	Röhder et al. 2014
<i>Scenedesmus bijugus</i>	Rendimento fotossintético Viabilidade celular Taxa de crescimento Razão proteínas:carboidratos	5.10 ⁻⁹ – 5.10 ⁻⁶ nano-TiO ₂	Este estudo

3. OBJETIVOS

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos de nano-TiO₂ em concentrações de 5.10⁻⁹ a 5.10⁻⁶ mol L⁻¹ na microalga Chlorophyceae de água doce, *Scenedesmus bijugus*, em um período de exposição de 12 dias para cada uma das concentrações. Para atingir este objetivo, utilizamos culturas estanques sob condições controladas de laboratório. Definimos a seguir os objetivos específicos propostos para avaliação dos efeitos de cada uma das concentrações testadas.

- Quantificar a biomassa (células mL⁻¹, viabilidade celular e clorofila *a*,) da microalga;
- Quantificar o crescimento da microalga em cultura (taxa de crescimento);
- Determinar o rendimento quântico máximo do fotossistema II (Φ_M);
- Determinar a concentração de proteínas totais na microalga;
- Determinar a concentração de carboidratos totais na microalga;
- Determinar a razão proteínas:carboidratos na microalga;
- Observar o número de células por cenóbios.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização das nano-TiO₂

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas nano-TiO₂ comerciais (n° CAS 13463-67-7 - Sigma-Aldrich, Estados Unidos), cujo tamanho médio é de aproximadamente 21 nm e 99,5% de pureza. A caracterização das nano-TiO₂ foi realizada no Laboratório de Nanocaracterização e Laboratório Interdisciplinar de Eletroquímica e Cerâmica da UFSCar, São Carlos (SP, Brasil).

O diâmetro médio das partículas e sua cristalinidade foram obtidos por difração de raio-X, utilizando-se o equipamento LAB X XRD – 6000 (Shimadzu, Japão), com radiação do ânodo de cobre, tendo sido o tamanho primário das partículas calculado pela equação de Debye-Scherrer segundo Gorelik et al. (1963). As fases de cristalito foram determinadas pelo cálculo da área da Gaussiana formada por cada fase através de cálculo da integral no programa OriginPro 8.

Equação de Debye-Scherrer:

$$D_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cos(\Theta)}$$

Onde:

D = diâmetro médio das partículas;

K = constante dependente da forma das partículas;

β = largura na metade da altura do pico da difração;

λ = comprimento de onda da radiação eletromagnética e

θ = ângulo de difração.

A morfologia das nano-TiO₂ foi observada em microscopia eletrônica de varredura (FEI-Inspect F50, Estados Unidos) e microscopia eletrônica de transmissão (FEI-TECNAI G²,

Estados Unidos). As amostras foram submetidas a ultrassom, e o agente de dispersão utilizado foi o etanol. A digestão do polímero da grade de cobre foi feita com acetona e clorofórmio. O procedimento seguiu metodologia descrita em Sadiq et al. (2011).

A área de superfície específica das nano-TiO₂ foi determinada no equipamento ASAP 2000 (Micromeritics, Estados Unidos), de acordo com metodologia descrita em Brunauer et al. (1938). Para isso as amostras foram submetidas à temperatura de 90 °C sob vácuo, até atingirem pressão de degaseificação inferior a 6 µmHg, e isotermas de adsorção de nitrogênio à temperatura de -196 °C foram obtidas. O potencial zeta foi analisado no equipamento (Zeta Plus Zeta Potencial Analyzer – BIC, Estados Unidos), tendo HCl e KOH como eletrólitos.

4.2 *Organismo teste*

Scenedesmus bijugus (Turpin) Kützing, uma microalga Chlorophyceae de água doce, oriunda da coleção de culturas de microalgas do Departamento de Botânica da Universidade Federal de São Carlos (SP, Brasil), foi o organismo teste utilizado nesta pesquisa. O gênero *Scenedesmus* frequentemente apresenta cenóbios de 2, 4, 8 ou 16 células dispostas lado a lado, de formato elipsóide, cloroplastídeo único por célula parietalmente e pirenoide mais ou menos central em cada célula (BICUDO e MENEZES, 2005). A espécie usada apresenta normalmente de 2 a 4 células por cenóbio. A parede celular é lisa, não apresenta espinhos e as dimensões das células variam de 7,30-7,83 x 2,61 µm (FELISBERTO et al., 2001).

A matriz mucilaginosa pode ser ausente ou presente (<http://www.algaebase.org/>), dependendo da espécie, sendo que a espécie estudada apresenta mucilagem. De acordo com BICUDO e MENEZES (2006), esse gênero é o mais cosmopolita de todos, sendo encontrados em qualquer coleta de água, sejam águas oligo, meso ou eutróficas. Além disso, são consideradas *r*-estrategistas devido à sua facilidade para colonizar o ambiente. Organismos desse gênero são facilmente cultivados em laboratório e são frequentemente utilizados em testes ecotoxicológicos (LOMBARDI et al., 2005).

4.3 *Condições de cultivo*

O cultivo da microalga foi mantido em meio de cultura L.C. OLIGO (ASSOCIATION FRANÇAISE NORMALISATION, 1980) duas vezes concentrado, tendo a concentração de

bicarbonato de sódio quadruplicada. Água destilada foi usada para a preparação do meio, que teve o pH ajustado para 7,0 e então autoclavado por 20 minutos em temperatura de 121 °C para esterilização. Após 24 h da autoclavagem, o meio foi inoculado com células de *S. bijugus* oriundas de cultura em fase exponencial de crescimento, tendo concentração inicial nas novas culturas de 5.10^4 células mL⁻¹. A manipulação das culturas foi feita sob condições assépticas, em cabine de fluxo laminar (Veco, Brasil), apesar da cultura ser unialgal e não axênica. A cultura foi mantida sob condições ambientais controladas e exposta a $132 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidade luminosa, fotoperíodo de 12:12 h (claro:escuro) e temperatura de 23 ± 1 °C (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2005). O tipo de cultivo utilizado foi o estanque, no qual não houve reposição nutricional. Os experimentos tiveram a duração de 288 h (12 dias), sendo que a partir do sexto dia a cultura se encontrava no fim da fase exponencial e início da fase estacionária. O cultivo se deu em triplicatas experimentais, em frascos de policarbonato transparentes com capacidade para 1L e contendo 250 mL de meio de cultura.

4.4 Teste ecotoxicológico

As dispersões de nano-TiO₂ foram preparadas através de diluição serial em concentrações finais nos testes de toxicidade de 5.10^{-9} ; 10^{-8} ; 5.10^{-8} ; 10^{-7} ; 10^{-6} e 5.10^{-6} mol L⁻¹ a partir de soluções concentradas (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} e 10^{-2} mol L⁻¹) preparadas em água deionizada, previamente autoclavada, sendo que as soluções das nanopartículas foram preparadas em cabine de fluxo laminar. O controle foi constituído apenas de meio de cultura e algas, sem adição de nano-TiO₂. Para evitar qualquer contaminação, o manuseio das partículas e das culturas foi feito em cabine de fluxo laminar (Veco, Brasil), em ambiente filtrado e estéril. Previamente ao momento da inoculação, as soluções foram sonicadas (sonicador ultrasônico-DES500, Brasil) por 30 minutos, a fim de reduzir a aglomeração e sedimentação das nanopartículas (ARUOJA et al., 2009). Entretanto, nas concentrações testadas, não deve haver a formação significativa de agregados, de acordo com os resultados apresentados em Shang et al. (2014).

Para os bioensaios, a concentração inicial de células de *S. bijugus* foi 5.10^4 células m L⁻¹ oriundas de cultura em fase de crescimento exponencial e cujo estado fisiológico foi monitorado através de medidas de rendimento quântico máximo do fotossistema II. Sabe-se que após a metade da fase exponencial de crescimento, o rendimento quântico máximo pode

apresentar queda de até 30% (LOMBARDI e MALDONADO, 2011) e, por isso, todos os inóculos foram obtidos com três dias de cultivo, garantindo alto rendimento quântico máximo do fotossistema II para a biomassa a ser inoculada ($\Phi_M \sim 0,70$), a fim de garantir que os cultivos estavam saudáveis. Na Figura 6 é apresentada uma foto do cultivo em 96 horas de exposição.



Figura 6 – Fotografia do experimento em 96 horas.(feita pela autora).

Os materiais utilizados no cultivo da alga e nos experimentos de exposição ao nano-TiO₂ foram previamente lavados com detergente neutro, mergulhados em solução de HCl 10% por sete dias e enxaguados abundantemente em água destilada.

4.5 Monitoramento da biomassa

O monitoramento da biomassa foi feito a cada 24 h a partir do primeiro dia de exposição ao nano-TiO₂ até 96 h e, posteriormente, a cada 48 h até o 12º dia experimental. O crescimento dos cultivos foi acompanhado através da contagem do número de células em hemocítmetro (Fuchs-Rosenthal espelhada), sob microscópio óptico (Leica, Alemanha) e em objetiva com aumento de 40 vezes, desde o dia da inoculação até o final da fase de crescimento exponencial/início da fase estacionária. Durante as contagens monitorou-se também o número de células por cenóbio, que pode ser considerado um indicador precoce de toxicidade (LOMBARDI et al., 2005).

A viabilidade celular foi obtida seguindo-se metodologia descrita em Agustí e Sánchez (2002), que envolve a digestão de células em desequilíbrio homeostático utilizando as enzimas DNase I e Trypsina. A cada 48 horas a viabilidade celular foi mensurada através de contagem em hemocítmetro (Fuchs-Rosenthal espelhada) até o fim do experimento.

A concentração de clorofila *a in vivo* foi mensurada em fluorímetro (Turner Designs-Trilogy, Estados Unidos) e foi obtida através de curva de calibração, tendo como variável dependente a intensidade de fluorescência e independente a concentração de clorofila *a* extraída de cultura de *Chlorella sorokiniana* em fase exponencial de crescimento. Foi mensurada a densidade óptica no comprimento de onda 684 nm (espectrofotômetro Femto 800 XI, Brasil). O pH (pHâmetro Hanna, Brasil) das culturas foi monitorado em cada dia de amostragem.

O rendimento quântico máximo do fotossistema II foi obtido após a adaptação das células por 20 minutos ao escuro e determinado através de fluorescência modulada, usando um equipamento PHYTO-PAM (®Heinz Walz GmbH, Alemanha). Antes da medida da atividade fotossintética o branco da amostra de cada tratamento foi obtido através de filtragem da cultura em filtros de membrana de éster de celulose mista com 0,2 µm de diâmetro de poro (Millipore). O rendimento quântico máximo do fotossistema II das células adaptadas ao escuro foi fornecido pelo equipamento, e equivale ao cálculo obtido da aplicação da fórmula abaixo (LOMBARDI e MALDONADO, 2011).

$$\Phi_M = \frac{(F_M - F_0)}{F_M}$$

Onde:

F_M = fluorescência máxima das células adaptadas ao escuro;

F_0 = rendimento inicial constante de fluorescência das células adaptadas ao escuro.

4.6 Análise bioquímica

A determinação da concentração de proteínas e carboidratos totais foi feita de acordo com as metodologias de Bradford (1976) e Liu et al., (1973), respectivamente. A extração de proteínas foi realizada segundo Rausch (1981). Essas análises bioquímicas foram realizadas no quarto dia (96 horas), no oitavo dia e no décimo segundo dia de exposição ao nano-TiO₂ e também para os controles. Para as análises de proteínas e carboidratos foram coletadas 10 mL de amostra que foram centrifugadas a 4.400 rpm por 15 minutos para cada uma das

biomoléculas. O filtrado foi descartado e o material peletizado ao fundo foi congelado. As proteínas totais foram quantificadas usando o método de Bradford (1976) com *serum* de albumina bovina (BSA) como padrão de proteína. A absorção das amostras foram obtidas em espectrofotômetro (Femto 800 XI, Brasil), em comprimento de onda de 595 nm. A quantidade de carboidratos intracelulares foi determinada usando-se o método modificado de Liu et al., (1973), baseado no método do fenol - ácido sulfúrico, tendo glicose como padrão. A absorção das amostras foram determinadas em λ de 485 nm, obtida em espectrofotômetro (Femto 800 XI, Brasil). As curvas de calibração para a determinação de proteínas e carboidratos são mostradas nas Figuras 7a e 7b, respectivamente.

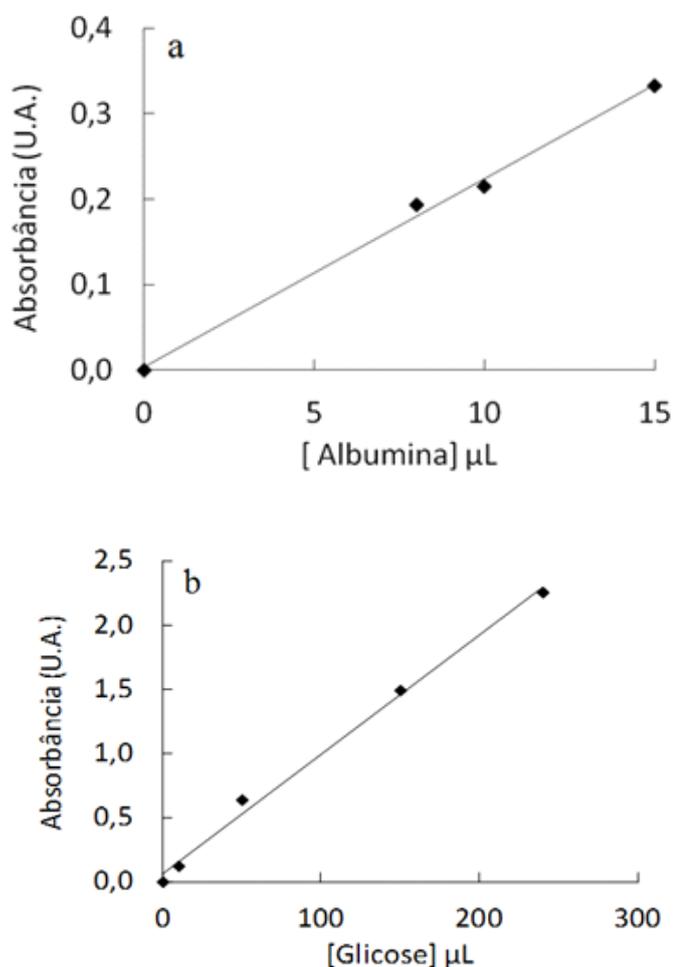


Figura 7 – Curvas de calibração. *Figura 7a: curva de calibração para concentração de proteínas. A reta de regressão obtida foi: $y = 0,0221x + 0,0034$. O ajuste (R^2) foi de 0,995. Figura 7b: Curva de calibração para concentração de carboidratos. A reta de regressão obtida foi: $y = 0,0093x + 0,0649$. O ajuste (R^2) foi de 0,994.*

4.7 Análise estatística

Para os resultados de densidade populacional, viabilidade celular, clorofila a e rendimento quântico máximo do fotossistema II foi utilizado o programa OriginPro 8.5 para os testes de normalidade e homogeneidade. Para o teste de Tukey e ANOVA foi utilizado o programa Sisvar, versão 5.3. Para a elaboração dos gráficos foram utilizados os programas OriginPro 8.5, Microsoft Office Excel 2007 e Igor Pro.

5. RESULTADOS

A caracterização das nano-TiO₂ usadas neste estudo, importante para confirmar as especificações do fabricante, é apresentada nas Figuras 8 e 9. Os resultados confirmaram as especificações do fabricante e mostraram que aproximadamente 82% das nano-TiO₂ estavam presente como anatase e 18% como rutilo. O tamanho médio das NPs variaram de 10-50 nm, sendo que esta variação não é significativa para afetar o resultado. Os gráficos de cristalinidade, tamanho primário e potencial Zeta são mostrados nas Figuras 8a e 8b. Observa-se que a área de superfície específica foi de 45,60 m².g⁻¹, o potencial zeta foi de |25| e na amplitude de pH 2,5 - 3,5 houve maior agregação, no entanto, considerando que as culturas permaneceram em amplitude de pH 6,8 a pH 7,8 a agregação foi baixa.

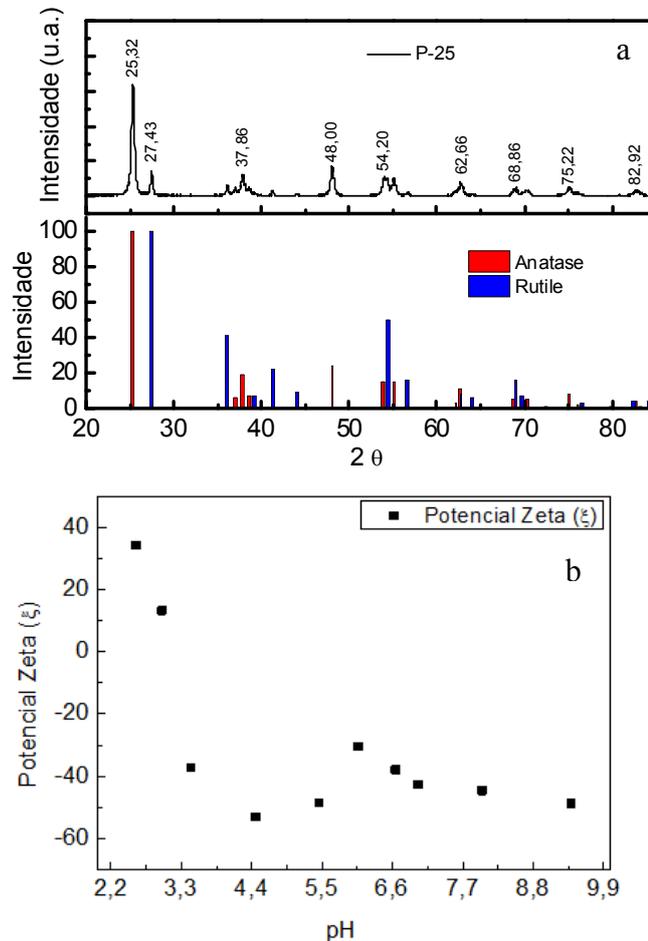


Figura 8- Caracterização das nanopartículas de TiO₂. Figura 8a (superior) mostra o tamanho primário de nano-TiO₂ e 8a (inferior) a cristalinidade. Figura 8b apresenta o potencial Zeta.

A morfologia e topologia do nano-TiO₂, observadas através de microscopia eletrônica de transmissão e de varredura são visualizadas nas Figuras 9a, 9b, 9c e 9d.

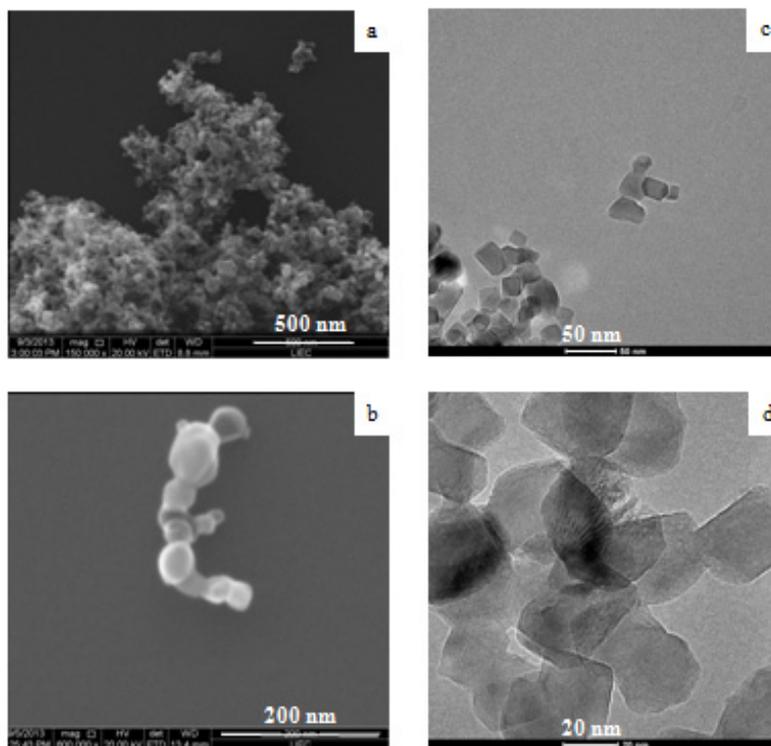


Figura 9 – Microscopia eletrônica das nano-TiO₂ usadas nesta pesquisa. Figuras 9a e 9b mostram a microscopia eletrônica de varredura (MEV) e Figuras 9c e 9d microscopia eletrônica de transmissão (MET).

O gráfico do pH em função do período experimental pode ser visto na Figura 10, nós não obtivemos diferença significativa (ANOVA, $p > 0,05$) entre os tratamentos ao longo do período experimental.

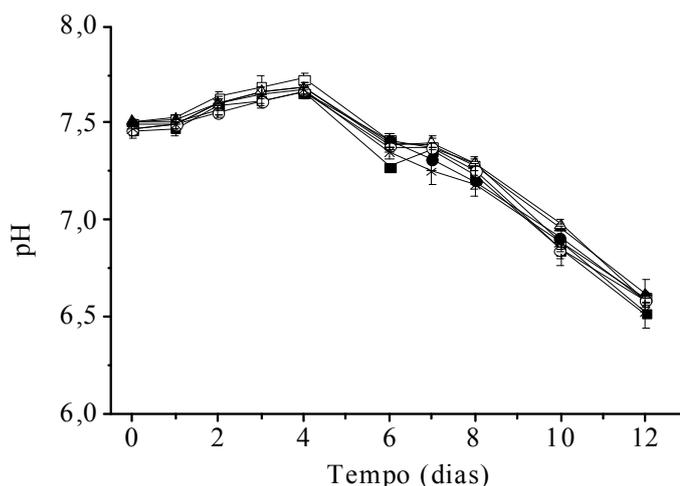


Figura 10 – pH do controle e dos tratamentos em função do tempo experimental. Símbolos utilizados: ■ controle; □ $5 \cdot 10^{-9}$; ▲ 10^{-8} ; △ $5 \cdot 10^{-8}$; ● 10^{-7} ; ○ 10^{-6} ; * $5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹.

O número de células por cenóbio, monitorado durante os experimentos, não foi significativamente influenciado pela presença dos nano-TiO₂.

A curva de crescimento populacional para todos os tratamentos e controle é mostrada na Figura 11. A Análise estatística (ANOVA, $p > 0,05$) confirmou que não houve diferença significativa entre a densidade celular do controle e dos tratamentos com nano-TiO₂, exceto em 96 h de exposição, quando a densidade populacional foi afetada pelas NPs, reduzindo em 6% a população de *Scenedesmus bijugus*. As taxas de crescimento dos tratamentos não diferiram das obtidas para os controles (ANOVA, $p > 0,05$), como pode ser observado através dos dados apresentados na Tabela 3. Os valores de concentração de clorofila a, apresentados na Figura 12, também foram similares entre o controle e os tratamentos com nano-TiO₂, exceto para a concentração mais elevada ($5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹), cujo valor foi menor. A Figura 13 mostra os valores da absorvância em função do tempo experimental. Observa-se que a concentração de $5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ de nano-TiO₂, foi suficiente para aumentar a absorvância da amostra em todos os

pontos experimentais. Isso sugere ter havido a formação de agregados de nano-TiO₂, assim reforçamos aqui a importância das medidas de densidade celular reportadas em número de células por mL.

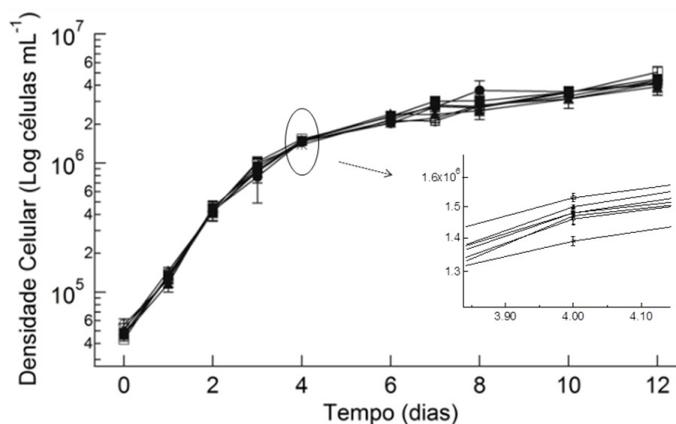


Figura 11 – Curvas de crescimento para o controle e os tratamentos em função do tempo experimental (dias). Símbolos representam os diferentes tratamentos: ■ controle; □ $5 \cdot 10^{-9}$; ▲ 10^{-8} ; Δ $5 \cdot 10^{-8}$; ● 10^{-7} ; ○ 10^{-6} ; * $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

Tabela 3 – Taxas de crescimento para os controles e as concentrações.

[nano-TiO ₂] mol L ⁻¹	Growth rates (μ) (d ⁻¹)
0	1,06 ± 0,02
$5 \cdot 10^{-9}$	1,06 ± 0,05
$1 \cdot 10^{-8}$	1,09 ± 0,10
$5 \cdot 10^{-8}$	1,05 ± 0,07
$1 \cdot 10^{-7}$	1,04 ± 0,04
$1 \cdot 10^{-6}$	1,01 ± 0,05
$5 \cdot 10^{-6}$	1,07 ± 0,02

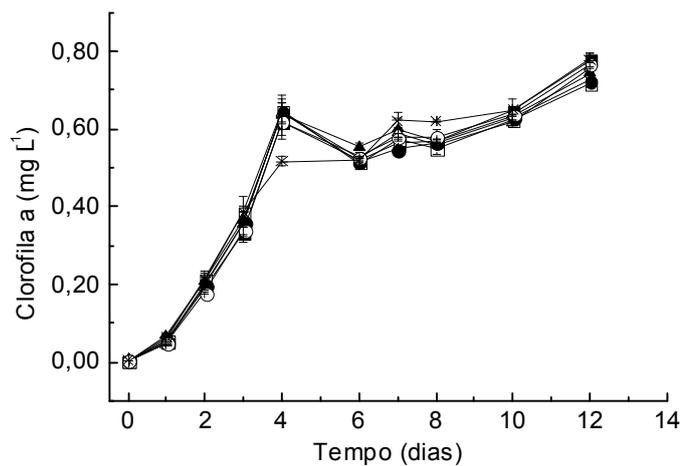


Figura 12 – Concentração de clorofila a (mg L^{-1}) em função do tempo experimental.

Símbolos: ■ controle; □ 5.10^{-9} ; ▲ 10^{-8} ; △ 5.10^{-8} ; ● 10^{-7} ; ○ 10^{-6} ; * $5.10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

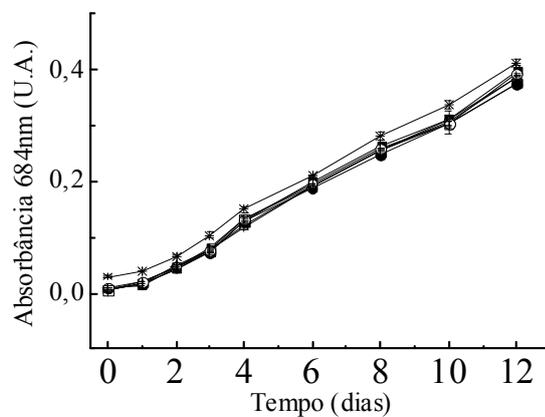


Figura 13 – Absorbância no comprimento de onda 684 nm para o controle e dos tratamentos em função do tempo experimental. Símbolos utilizados: ■ controle; □ 5.10^{-9} ; ▲

10^{-8} ; △ 5.10^{-8} ; ● 10^{-7} ; ○ 10^{-6} ; * $5.10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

A Figura 14 mostra o rendimento quântico máximo em função do tempo experimental. Observamos que para a maior concentração testada, $5 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, houve redução gradativa do rendimento quântico até 96 h, atingindo neste momento, o menor valor (0,51 U.A.), 23% menor do que o controle (ANOVA, $p < 0,05$) no mesmo período. Contudo, após a partir do 6º dia, houve recuperação da microalga à presença do nano-TiO₂, detectada através do aumento nos valores do rendimento quântico, que foram então similares ao controle (ANOVA, $p > 0,05$).

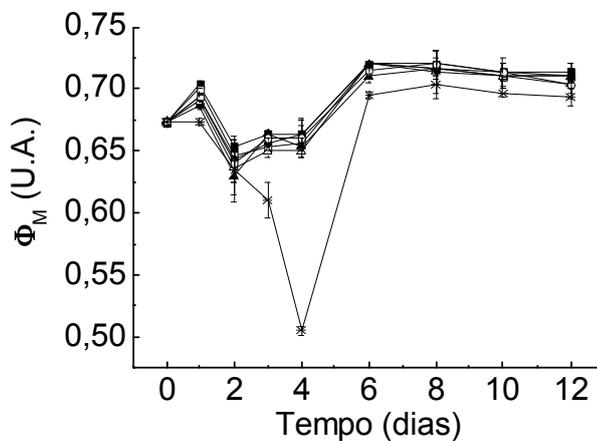


Figura 14 – O rendimento quântico máximo do fotossistema II (U.A.) em função do tempo experimental (dias) para as várias concentrações de nano-TiO₂ (mol L^{-1}) e controle. Símbolos: ■ controle; □ $5 \cdot 10^{-9}$; ▲ 10^{-8} ; △ $5 \cdot 10^{-8}$; ● 10^{-7} ; ○ 10^{-6} ; * $5 \cdot 10^{-6}$.

O rendimento quântico máximo do fotossistema II para 96 h de exposição em função da concentração do nano-TiO₂ está apresentado na Figura 15. Confirmamos o decréscimo significativo do rendimento quântico apenas na maior concentração testada. Em menor intensidade do que os efeitos sobre o rendimento quântico, a densidade populacional também sofreu com a presença das nano-TiO₂ em 96 h, ficando 6% menor em relação ao controle.

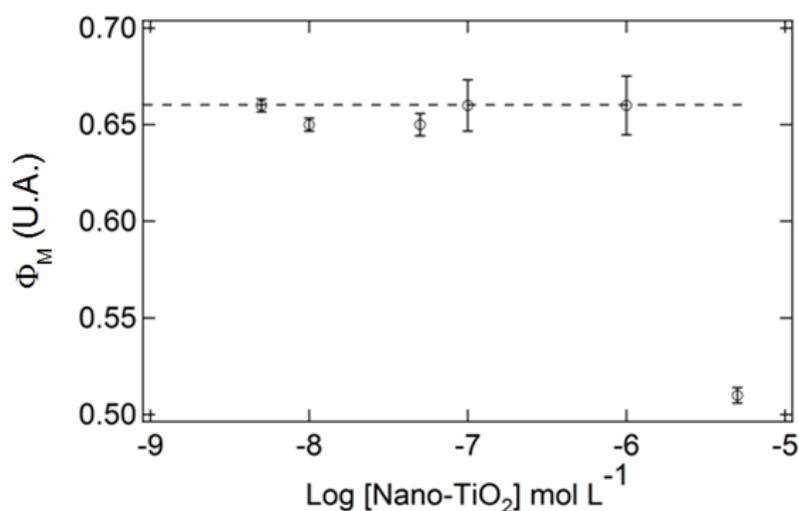


Figura 15 – Rendimento quântico máximo do fotossistema II (U.A.) em função da concentração de nano-TiO₂ em 96 h de exposição. A linha a tracejada representa o controle.

A Figura 16 mostra os resultados de viabilidade celular. Na figura 16a são mostrados os valores para os tratamentos em 96 horas de exposição e na figura 16b os valores em função do tempo experimental para todos os tratamentos. Observa-se uma tendência de redução da densidade de células vivas com o aumento da concentração de nano-TiO₂ em 96 horas de exposição (Figura 16a). Entretanto, observamos que há uma aclimação celular, aumentando o número de células viáveis em função do tempo experimental após as 96 horas de exposição. A análise estatística realizada mostrou haver diferença significativa entre o cultivo controle (sem adição de nano-TiO₂) e os expostos às concentrações de 10⁻⁸, 10⁻⁷ e 5.10⁻⁶ mol L⁻¹ de nanopartículas (ANOVA, p < 0,05) para 96 horas de exposição.

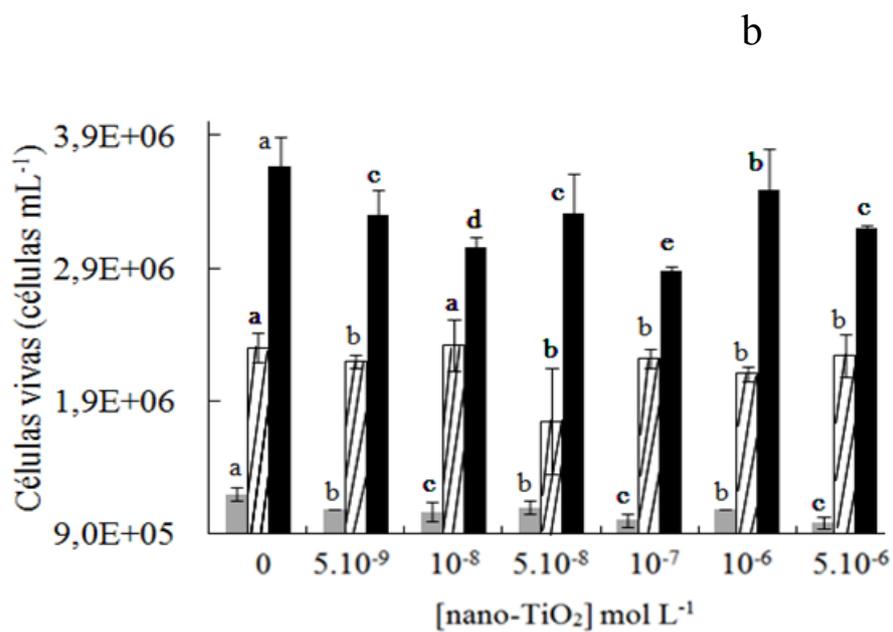
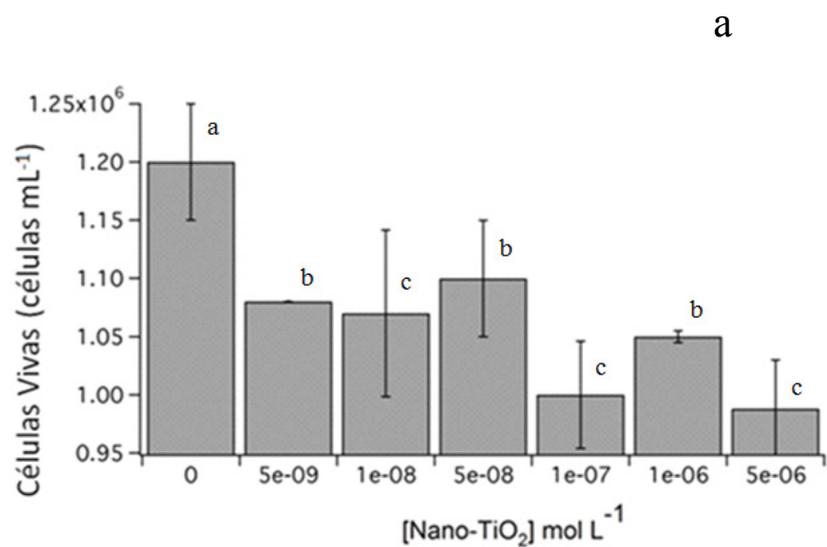


Figura 16 – Viabilidade celular. Figura 16a: Células vivas (células mL⁻¹) apresentadas em função da concentração de nano-TiO₂ em 96 h e na figura 16b em função da concentração de nano-TiO₂ para 96 h (barra cinza), 192 h (barra listrada) e 288 h (barra preta) de exposição.

Na Figura 17 são mostrados os valores obtidos para a razão proteínas:carboidratos (P:C) na biomassa para os vários tratamentos em 96 h, 192 h e 288 h de exposição. Em geral, observa-se uma queda (ANOVA, $p < 0,05$) na razão proteínas:carboidratos em função do tempo experimental para todos os tratamentos, exceto na menor concentração testada, $5 \cdot 10^{-9} \text{ mol L}^{-1}$, onde se observa aumento desta razão.

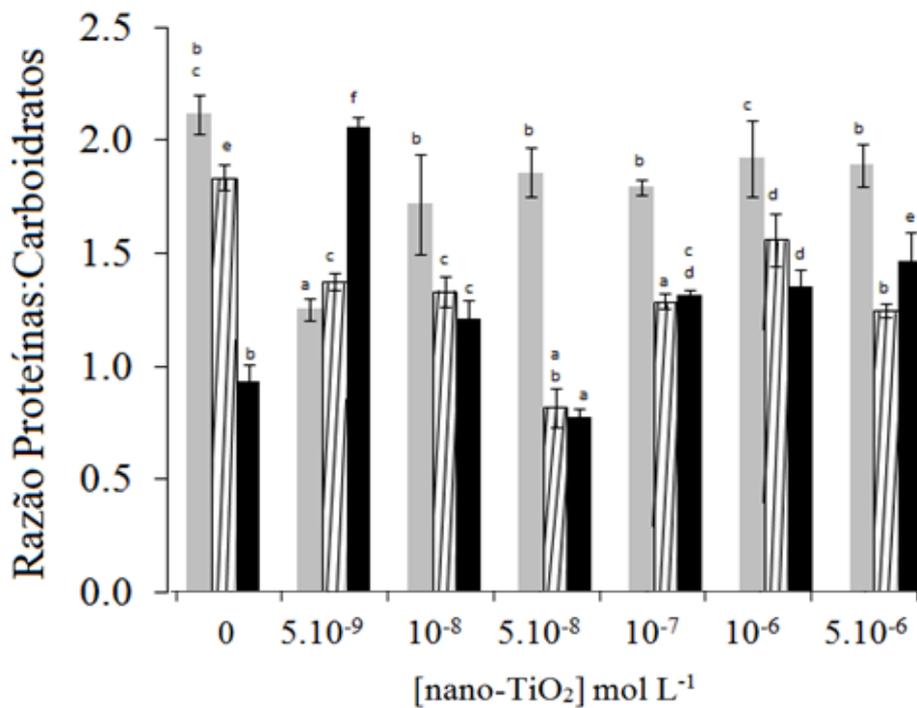


Figura 17- Razão proteínas:carboidratos (pg/célula) em função da concentração de nano-TiO₂ para 96 h (barra cinza), 192 h (barra listrada) e 288 h (barra preta) de exposição.

6. DISCUSSÃO

As nano-TiO₂ usadas nesta pesquisa apresentaram predomínio de partículas esféricas ou cubóides, variando de 10 a 50 nm, com 82% na fase anatase, resultados que estão em acordo com os reportados em Dalai et al. (2013) e Hartmann et al. (2010) para esse mesmo material. Handy et al. (2008) discutem sobre a importância da caracterização dos nanomateriais para estudos de ecotoxicologia, enfatizando a necessidade de seleção de materiais que tenham o mínimo de diferença quanto ao tamanho das partículas. O predomínio da fase anatase sobre a fase rutilo observado no presente estudo pode significar diferentes reatividades no meio, induzindo possivelmente a diferentes respostas, como apresentado em Yang et al. (2007). Esses autores mostraram que foi a forma nanoanatase do TiO₂ a mais atuante sobre o metabolismo do nitrogênio em espinafre, estimulando a fotossíntese e aumentando as massas fresca e seca do vegetal.

As imagens de MEV e MET das partículas, como recebidas do fabricante, confirmam sua forma e ficou demonstrada a possibilidade de formação de aglomerados. Entretanto, Dalai et al. (2013) relatam que a formação de agregados é significativa somente em soluções da ordem de 10⁻⁵ - 10⁻⁴ mol L⁻¹ e, segundo esses autores, seria insignificante a formação de agregados nas concentrações usadas nesta pesquisa (10⁻⁹ - 10⁻⁶ mol L⁻¹). A importância do conhecimento quanto à formação de agregados em estudos de ecotoxicologia reside no efeito dessas formações sobre a toxicidade do material, uma vez que alterando a dimensão haverá alteração da superfície de contato, reações e propriedades (HASSELOV et al., 2008).

No presente estudo, as nano-TiO₂ mostraram-se em geral de baixa toxicidade para *S. bijugus*. A similaridade entre as taxas de crescimento para as diferentes concentrações de nano-TiO₂ e o controle (ANOVA, $p > 0,05$) permitiu o cálculo de uma única taxa de crescimento, obtendo-se o valor médio de $1,05 \pm 0,03 \text{ d}^{-1}$. Esse valor foi três vezes superior ao encontrado para outras espécies de *Scenedesmus* sob situações de crescimento ideais. Rocha et al. (2014) obtiveram taxa de crescimento de $\sim 0,4$ para *S. quadricauda*; Liu et al. (2010) analisaram o crescimento de *S. obliquuos* e obtiveram taxa de crescimento de $0,70 \text{ d}^{-1}$, enquanto Ho et al. (2014) encontraram um valor de $0,83 \text{ d}^{-1}$ para essa mesma espécie. Considerando que a taxa de crescimento é espécie-específica, tal variação pode ser esperada, mas nossos resultados mostraram que, apesar da taxa de crescimento refle o metabolismo da microalga de modo holístico, esse parâmetro não foi um indicador sensível para avaliar os efeitos do nano-TiO₂, assim como obtido por Kulacki e Cardinale (2012) em que não obtiveram efeitos significativos sobre as taxas de crescimento algal em concentrações ambientais.

De acordo com a literatura, as nanopartículas podem tanto resultar em inibição do crescimento e de aspectos do metabolismo (ARUOJA et al., 2009; HARTMANN et al., 2010; GUBINS et al., 2011; CARDINALE et al., 2012), como também em estímulo dos mesmos (JUHEL et al., 2011; KADAR et al., 2012; FEIZI et al., 2013; SAN et al., 2014). Usando o rendimento quântico máximo do fotossistema II (Φ_M) como resposta à exposição de nanopartículas na macrófita *Lemna minor*, Juhel et al. (2011) detectaram aumento no valor do Φ_M , enquanto Gubbins et al. (2011) obtiveram inibição. Em comum, a maioria desses estudos mostra que, em microalgas, o efeito tóxico de nanopartículas é detectado em concentrações da ordem de 10^{-5} - 10^{-4} mol L⁻¹ (TANG et al. 2013; RÖHDER et al. 2014). Nessas concentrações observa-se, segundo Aruoja et al. (2009), a presença do efeito de agregamento das partículas, o que significa o acréscimo de um fator sem controle do experimentador que, possivelmente, poderá influenciar sobre a toxicidade do material. Observamos aqui que a amplitude de concentração de 10^{-5} - 10^{-4} mol L⁻¹ não é encontrada no ambiente natural. Acrescentamos ainda que são raros os estudos que utilizam concentrações passíveis de serem encontradas no ambiente (vide Tabela 2), onde os efeitos que as nanopartículas exercem são ainda pouco conhecidos.

A redução de 23% no Φ_M para *S. bijugus* exposta à $5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹ de nano-TiO₂, detectada neste estudo, confirma a elevada sensibilidade do Φ_M como parâmetro para a detecção de efeitos tóxicos de diversos agentes (CAMPOSTRINI 1997; JUNEAU 2007; LOMBARDI e MALDONADO 2011; GARRIDO et al., 2013) e concorda com vários outros estudos da literatura. Segundo Juneau et al., (2002) e Lombardi e Maldonado (2011), valores em torno de 0,65 – 0,70 representam microalgas em situações saudáveis, sendo que esses valores foram obtidos tanto para o cultivo controle, quanto para os tratamentos com nano-TiO₂, exceto para a concentração de $5 \cdot 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Nossos resultados discordam dos apresentados em estudo sobre a eficiência fotossintética de *Lemna minor* exposta a nanopartículas de Ag em Gubbins et al. (2011). Os autores mostraram a inibição do Φ_M , sendo a resposta proporcional à dose e tempo de exposição, com maior toxicidade observada quando o organismo foi exposto por mais tempo. Esta pesquisa mostrou adaptação da microalga à presença do nano-TiO₂ que, após 96 h de exposição, recuperou sua capacidade fotossintética, detectada através de aumento do Φ_M , que assumiu valores similares ao do controle. Essa diferença entre os resultados de Gubbins et al., (2011) e os nossos pode ser devida à presença de íons Ag(I) detectados no meio, nos estudos daqueles autores. Outro estudo (NAVARRO et al., 2008a) sobre a toxicidade de nanopartículas de Ag ao

fitoplâncton confirmou a importância dos íons Ag na toxicidade dessas nanopartículas. Similar aos nossos resultados sobre redução da Φ_M em concentração de 5.10^{-6} mol L⁻¹ de nano-TiO₂, Navarro et al. (2008a) obtiveram redução da Φ_M em concentrações de 5.10^{-6} mol L⁻¹ de nano-Ag.

Os resultados deste estudo concordam com os de Tang et al. (2013), com relação à inibição do rendimento quântico, mas não com a concentração em que o efeito foi observado. Tang et al. (2013) expuseram a cianobactéria *Anabaena* sp. à nano-TiO₂ em amplitude de concentração de 1 - 50 mg L⁻¹ ($1,2.10^{-5}$ – $6,3.10^{-4}$ mol L⁻¹) e obtiveram inibição na biomassa e no Φ_M acima de 10 mg L⁻¹ ($1,2.10^{-4}$ mol L⁻¹), mas nenhum efeito foi obtido em concentrações menores. Os nossos resultados mostraram inibição do mesmo parâmetro em concentração cerca de 20 vezes menor do que o obtido pelos autores. Isso pode indicar que Chlorophyceae pode ser um grupo mais sensível às nanopartículas de TiO₂ do que as Cyanophyceae.

Röhder et al. (2014) mostraram que nanopartículas de CeO₂, em amplitude de concentração de 5.10^{-5} – $2,5.10^{-4}$ mol L⁻¹ inibiram o Φ_M em *Chlamydomonas reinhardtii*. Os autores creditaram aos íons de Ce³⁺ a internalização nas células e toxicidade à microalga.

Com base nesses resultados, concluímos que o nano-TiO₂ é capaz de afetar a eficiência fotossintética em microalgas, tal qual o fez com *S. bijugus* em concentrações tão baixas quanto 5.10^{-6} mol L⁻¹, e que devido ao Ti ser considerado elemento inerte, provavelmente a toxicidade exercida está relacionada ao tamanho do material e não a eventuais íons liberados. Entretanto, para ter essa certeza seria necessário uma investigação testando os íons Ti em solução.

A biomassa final, no tratamento 5.10^{-6} mol L⁻¹ nano-TiO₂ deste estudo, mostrou que o crescimento de *S. bijugus* foi inibido em ~ 6 % após 96 h de exposição, enquanto que nas concentrações menores a biomassa em 96 h foi similar à encontrada no controle (ANOVA, p < 0,05). Estes resultados concordam com a maioria dos resultados apresentados na literatura sobre a redução da biomassa de microalgas, mas discordam em relação à concentração em que o efeito foi obtido. Enquanto este estudo foi realizado utilizando concentrações de 5.10^{-9} - 5.10^{-6} mol L⁻¹, na maioria dos estudos apresentados na literatura os autores empregam concentrações maiores e amplitude de concentração que exclui as ambientais (10^{-9} - 10^{-7} mol L⁻¹) estimadas para ambientes aquáticos, segundo Mueller e Nowack (2008).

Estudando os efeitos do nano-TiO₂ em microalgas, Aruoja et al. (2009) mostraram que 5,8 mg L⁻¹ (7.10^{-5} mol L⁻¹) reduziu em 50% a população da Chlorophyceae *Pseudokirchneriella subcapitata*, enquanto que Hartmann et al. (2010) obtiveram o mesmo efeito para a mesma alga em concentrações mais elevadas, de 71,1 mgL⁻¹ (9.10^{-4} mol L⁻¹). A concentração usada por

Arouja et al. (2008) foi 14 vezes maior do que as utilizadas nesta pesquisa, enquanto as de Hartmann et al. (2010) foram 180 vezes maiores do que as nossas. Assim, extrapolamos que a maior inibição observada por esses autores pode ser devido à maior concentração por eles utilizada, o que não é compatível com a realidade.

Enquanto a biomassa de *S. bijugus*, neste estudo, foi reduzida em 6 % em 5.10^{-6} mol L⁻¹ nano-TiO₂, Sadiq et al. (2011) obtiveram inibição de 50 % da biomassa em concentração de 16,1 mg L⁻¹ (2.10^{-4} mol L⁻¹) para culturas de *Scenedesmus* sp.

Em geral, os resultados do presente estudo estão de acordo com os reportados em Kulacki et al. (2012). Os autores analisaram os efeitos de nano-TiO₂ em *S. quadricauda* e observaram que em 10^{-6} mol L⁻¹ de nano-TiO₂, a toxicidade foi baixa e indetectável. Cardinale et al. (2012) estudaram três clorofíceas de água doce, dentre elas a *S. quadricauda* exposta à amplitude de concentração de $6,2.10^{-4}$ a $3,7.10^{-3}$ mol L⁻¹ e obtiveram redução de crescimento para as três espécies, e *S. quadricauda* também apresentou inibição na fotossíntese. Esses resultados sugerem que o nano-TiO₂ pode suprimir o crescimento de microalgas, e que isso pode ser manifestado sob diferentes parâmetros do metabolismo, podendo ou não ser detectado, dependendo da espécie em estudo, da concentração testada e do parâmetro que é usado para a detecção do efeito.

A Análise da viabilidade celular mostrou uma tendência de redução das células vivas quanto maior fosse a concentração de nano-TiO₂ para 96 h de exposição, sendo este efeito significativo apenas nas concentrações de 10^{-8} , 10^{-7} e 5.10^{-6} mol L⁻¹ (ANOVA, $p < 0,05$). Quanto à exposição crônica, os resultados confirmam possível aclimatação dos cultivos às nano-TiO₂. Esta aclimatação pode ter ocorrido tanto como resultado da fisiologia celular, como também por associação das nanopartículas à materiais orgânicos liberados pela microalga. Segundo Thio et al. (2011) a matéria orgânica natural desempenha um papel importante na determinação da mobilidade de nano-TiO₂ em matrizes aquosas naturais. Esse efeito pode ter favorecido a redução de seus efeitos na microalga *S. bijugus* a partir do sexto dia.

Tang e Dobbs (2007) sugerem que medidas de viabilidade celular em algas sob estresse de poluentes podem complementar os resultados da exposição a agentes tóxicos e fornecer um diagnóstico mais realista da exposição, uma vez que medidas de biomassa não diferenciam células vivas de células mortas. Agustí et al. (2006), estudando viabilidade celular em comunidade fitoplanctônica de água doce, inferiram que o método de digestão celular é efetivo em comunidades fitoplanctônicas complexas, pois proporciona uma avaliação da dinâmica populacional, como estrutura, estabilidade e perturbação. A aplicação da viabilidade celular em

estudos toxicológicos vem complementar as informações obtidas e, com isso, tal análise tem sido realizada com maior frequência nos estudos de toxicidade. A quantificação de células vivas e mortas em populações oceânicas naturais mostrou haver indução de morte celular causada por exposição a Cd e Pd, mas não resultou em declínio substancial da população estudada (ECHEVESTE et al., 2010). Utilizando Hg, Cd e Pb em ensaios de toxicidade, Echeveste et al. (2014) analisaram a viabilidade celular e obtiveram elevada variabilidade na sensibilidade do fitoplâncton para os três metais testados. Os autores mostraram que, em alguns casos, o aumento foi moderado ou indetectável, significativo com o aumento das concentrações dos metais, mas também foi observada morte celular em baixas concentrações de metais. O trabalho de Lasternas et al. (2010) mostrou que a viabilidade do fitoplâncton e bacterioplâncton aumentaram conforme aumentou a disponibilidade de fósforo no Mar Mediterrâneo. Esse tipo de análise precisa ser ainda aprimorada, pois, segundo dados da literatura, há muitos problemas relativos ao rompimento da parede celular para a penetração dos corantes ou outros reagentes, fato que poderia levar a resultados não representativos da realidade (ZETSCHE e MEYSMAN, 2012).

Sabe-se que a razão proteínas:carboidratos (P:C) é considerada um indicador do estado fisiológico em microalgas e, segundo Kilham et al. (1997) e Lai et al. (2011), reflete estresse por limitação de nutrientes. A diminuição da razão P:C em função do tempo experimental obtida neste estudo seguiu o padrão usual obtido para cultivos estanques, no qual não há reposição nutricional e não se relacionou à presença de nano-TiO₂. Essa redução concorda com os resultados apresentados em Rocha et al. (2014), que mostraram diminuição da razão P:C com o tempo em cultivos estanques de *Scenedesmus quadricauda*. Entretanto, quando exposta à 5.10⁻⁹ mol L⁻¹ de nano-TiO₂, a menor concentração da nanopartícula testada nesta pesquisa, *S. bijugus* apresentou aumento na razão P:C conforme aumentou o tempo de exposição, sugerindo a ocorrência de um estímulo metabólico que foi confirmado através da maior densidade populacional em 96 h de exposição, na concentração mais baixa (5.10⁻⁹ mol L⁻¹). O aumento da razão P:C deveu-se a redução da síntese protéica e, por tanto, não havia déficit nutricional, mesmo no fim do experimento. Esse estímulo obtido para a concentração mais baixa testada sugere a ocorrência de efeito hormesis, caracterizado por estímulo metabólico em baixa concentração do toxicante, ao contrário da inibição metabólica que ocorre sob exposição a doses maiores (MATTSON, 2008), como no caso do efeito em 5.10⁻⁶ mol L⁻¹.

Nossos resultados mostraram que as nano-TiO₂ exerceram efeito significativo sobre a razão P:C (ANOVA, p < 0,05). A condição saudável do controle é confirmada pelos valores de

rendimento quântico obtidos neste estudo. A composição nutricional de organismos base de cadeia alimentar é importante para os que deles dependem e para o equilíbrio dos ecossistemas aquáticos. O estudo de SOUZA e KELLY (2000) mostrou que a microalga marinha *Tetraselmis suecica*, com altas concentrações de carboidrato, mas baixas de proteínas e lipídios não foi uma dieta nutritiva para larvas do camarão *Penaeus semisulcatus*. Os autores concluíram que isso foi devido à baixa razão P:C, sugerindo que as alterações na dieta dos organismos são transferidas via cadeia alimentar, interferindo no balanço energético dos ecossistemas.

De modo geral, o presente estudo mostrou que, em concentrações ambientalmente relevantes, o nano-TiO₂ causou modificações metabólicas em *S. bijugus*. Em 5.10⁻⁹ mol L⁻¹ houve estímulo metabólico detectado através do aumento da densidade populacional e aumento da razão proteínas:carboidratos, mas em concentração de 5.10⁻⁶ mol L⁻¹ houve inibição, detectada através do rendimento quântico do fotossistema II e redução da densidade populacional. Concluimos que, por serem as microalgas organismos base de cadeias alimentares e fundamentais para o funcionamento e equilíbrio dos ecossistemas aquáticos, o descarte de nano-TiO₂ deve ser mais profundamente avaliado, pois o metabolismo energético desses ambientes pode ser afetado. Deve-se ainda considerar a presença de outras nanopartículas e efeitos aditivos resultantes de possíveis interações com outros elementos presentes no ambiente natural. Reforçamos que mais estudos com nanopartículas em concentrações ambientalmente relevantes devem ser realizados, uma vez que há alterações de propriedades dessas partículas em concentrações elevadas que não representam a realidade ambiental.

7. CONCLUSÕES

- Os parâmetros mais sensíveis para detecção de efeitos dos nanomateriais em *S. bijugus* dentre os analisados nesta pesquisa foram o rendimento fotossintético, a razão P:C e a viabilidade celular;
- Nanopartículas de TiO₂ foram capazes de alterar aspectos do metabolismo como a síntese de carboidratos em *Scenedesmus bijugus* sob concentrações tão baixas quanto 5.10⁻⁹ mol L⁻¹, passível de ser encontrada no ambiente;
- A concentração de 5.10⁻⁶ mol L⁻¹ de nanopartículas de TiO₂ reduziu o rendimento quântico máximo do fotossistema II (Φ_M) em curto tempo de exposição (72 h e 96 h), com recuperação das células após esse período;
- A viabilidade celular foi reduzida com o aumento da concentração de nano-TiO₂ até 96 horas de exposição, mas após esse período foi detectada uma aclimatação celular em todas as concentrações de nano-TiO₂;
- A exposição a concentrações ambientalmente prováveis de nano-TiO₂ alterou a razão proteínas:carboidratos (P:C) em *S. bijugus*.

8. REFERÊNCIAS

AGUSTÍ, S. et al. Cell death in lake phytoplankton communities. *Freshwater Biology*, v.51, p.1496–1506, 2006.

AGUSTÍ, S.; SÁNCHEZ, C. Cell viability in natural phytoplankton communities quantified by a membrane permeability probe. *Limnology Oceanography*. v.47, p.818-828, 2002.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL (ABDI). *Nanotecnologias: subsídios para a problemática dos riscos e regulação*. Brasília, 2011. 52p.

ARUOJA, V. et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, v.407, p.1461-1468. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.10.053, 2009.

ASSIS, L. M. et al. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. *Brazilian Journal of Food Technology*, <http://dx.doi.org/10.1590/S1981-67232012005000004>, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS (ABNT). *NBR12648: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de ensaio com algas (Chlorophyceae)*. Rio de Janeiro, 2005. 24 p.

ASSOCIATION FRANÇAISE NORMALISATION (AFNOR). *Norme expérimentale. T90-304. Essais de seuils Détermination de l'inhibition de *Scenedesmus subspicatus* par une substance*, Paris, France, 1980.

BAKER, T. J.; TYLER, C.R.; GALLOWAY, T. S. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organism. *Environmental Pollution*, v.186, p. 257–271, 2013.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. *Gêneros de algas de águas continentais do Brasil* (chave para identificação e descrição). São Carlos: RiMa, 2005. 508p.

BICUDO, C. E. M.; MENEZES, M. *Gêneros de algas de águas continentais do Brasil*. 2. ed. São Carlos: RiMa, 2006. 502p.

BRADFORD, M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 243-254, 1976.

BRASIL, Anuário Mineral Brasileiro. Departamento Nacional da Produção Mineral, MME, 1972 – Anual. 2010.

BRUNAUER, S. et al. Absorption of gases in multimolecular layers. *Journal of the American Chemical Society*, v.60, p.309-319, 1938.

CAMPOSTRINI, E. Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações práticas. 1997. Disponível em: <

<http://www.researchgate.net/...CLOROFILA.../3deec51d43d08d5be5.pdf>. > Acessado 01 mar. 2014.

CARDINALE, B. J.; BIER, R.; KWAN, C. Effects of TiO₂ nanoparticles on the growth and metabolism of three species of freshwater algae. *Journal of Nanoparticle Research*, doi: 10.1007/s11051-012-0913-6, 2012.

COSTA, L. C.; FERREIRA, A. P.; NEVES, E. B. Aplicação do Sistema de Projeção de Poluição Industrial (Modelo IPPS) na bacia hidrográfica da baía de Sepetiba (Rio de Janeiro, Brasil): estudo de caso. *Cadernos de Saúde Coletiva*, v.19, p.66-73, 2011.

DALAI, S. et al. Cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles and their detoxification in a freshwater system. *Aquatic Toxicology*, v.138, p.139:1-11, 2013.

ECHEVESTE, P. et al. Decrease in the abundance and viability of oceanic phytoplankton due to trace levels of complex mixtures of organic pollutants. *Chemosphere*, v.81, p.161–168, 2010.

ECHEVESTE, P.; SÁNCHEZ, A. T.; AGUSTÍ, S. Tolerance of polar phytoplankton communities to metals. *Environmental Pollution*, v.185, p.188-195, 2014.

ELSAESSER, A.; HOWARD, C. V. Toxicology of nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*.v. 64, p.129-137, 2012.

FAN, W. et al. Nano-TiO₂ enhances the toxicity of copper in natural water to *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, v. 159, p.729-734, 2011.

FEIZI, H. et al. Phytotoxicity and stimulatory impacts of nanosized and bulk titanium dioxide on fennel (*Foeniculum vulgare* Mill). *Chemosphere*, v.91, p.506–511. doi:10.1016/j.chemosphere.2012.12.012, 2013.

FELISBERTO, A. F.; RODRIGUES L.; LEANDRINI, J. A. Chlorococcales registradas na comunidade perifítica, no reservatório de Corumbá, Estado de Goiás, Brasil, antes e após o represamento das águas. *Acta Scientiarum*, Maringá, v. 23, n. 2, p. 275-282, 2001.

FEYNMAN, R. “There is plenty of room at the bottom”: discurso. 1959. *Caltech*. Disponível em:<<http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html>> Acesso em: 23 de maio de 2014.

FORBE, T.; GARCÍA, M.; GONZALEZ, E. Riscos potenciais do nanopartículas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas. v.31, n.4, 2011.

GARRIDO, M. et al. Effects of sample conservation on assessments of the photosynthetic efficiency of phytoplankton using PAM fluorometry. *Deep-Sea Research I*, v.71, p.38-48. doi:10.1016/j.dsr.2012.09.004, 2013.

GORELIK, S. et al. X-ray diffraction and electro-optic analysis of metals. *Metallurgizdat*, p. 256, 1963.

GUBBINS, E. J.; BATTY, L. C; LEAD, J. R. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. *Environmental Pollution* 159(6):1551-9. doi: 10.1016/j.envpol.2011.03.002, 2011.

HANDY, R. D.; OWEN, R.; JONES, E. V. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology* () v. 17, p. 315–325, 2008.

HARTMANN, N. B. et al. Algal testing of titanium dioxide nanoparticles-Testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability. *Toxicology* 296:190-197. doi: 10.1016/j.tox.2009.08.008, 2010.

HASSELOV, M. et al. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, v.17, p.344 – 361, 2008.

HE, D.; DORANTES-ARANDA, J. J.; WAITE, T. D. Silver nanoparticle-Algae Interactions: Oxidative Dissolution, Reactive Oxygen Species Generation and Synergistic Toxic Effects. *Environmental Science & Technology*, v.46, p. 8731-8738, 2012.

HO, S-H. et al. Enhancing lutein productivity of an indigenous microalgae *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies. *Bioresource Technology*, v.152, p.275–282. doi:10.1016/j.biortech.2013.11.031, 2014.

JONER, E. J.; HARTNIK, T.; AMUNDSEN, C. E. Environmental fate and ecotoxicity of engineered nanoparticles. 2008. Disponível em:<<http://www.nanotechia.org/global-news/norwegian-authorities-assess-environmental-fate-an>> Acesso em: 05 de maio 2014.

JUHEL, G. L. et al. Alumina nanoparticles enhance growth of *Lemna minor*. *Aquatic Toxicology* 105(3-4):328-36. doi: 10.1016/j.aquatox.2011.06.019, 2011.

JUNEAU, P.; QIU, B.; DEBLOIS, C. P. Use of chlorophyll fluorescence as a tool for determination of herbicide toxic effect: Review. *Toxicological & Environmental Chemistry*, v.89, p.609-625. doi: 10.1080/02772240701561569, 2007.

JUNEAU, P.; BERDEY, A. E.; POPOVIC, R. PAM fluorometry in the determination of the sensitivity of *Chlorella vulgaris*, *Selenastrum capricornutum*, and *Chlamydomonas reinhardtii* to copper. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, v.42, p.155–164, 2002.

KADAR, E. et al. The effect of engineered nanoparticles on growth and metabolic status of marine microalgae cultures. *Science of the Total Environment*, v. 439, p. 8-17, 2012.

KAEGI, R. et al. Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment. *Environmental Pollution*, v.156, p. 233–239, 2008.

KAMPEL, M. *Estimativa da produção primária e biomassa fitoplanctônica através de sensoriamento remoto da cor do oceano e dados in situ na costa sudeste brasileira*. 2003. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências, área de Oceanografia Biológica) – Instituto Oceanográfico, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

KILHAM, S. et al. Effects of nutrient limitation on biochemical constituents of *Ankistrodesmus falcatus*. *Freshwater Biology*, v.38, p.591– 596, 1997.

KULACKI, K. J. et al. How do stream organisms respond to, and influence, the concentration of titanium dioxide nanoparticles? A mesocosm study with algae and herbivores. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 1, p.2414-2422, 2012.

KULACKI, K. J.; CARDINALE, B. J. Effects of nano-titanium dioxide on freshwater algal population dynamics. *PLoS ONE*, v.7, n.10, e47130 e47130, 2012.

LAI, J. et al. Responses of the growth and biochemical composition of *Prorocentrum donghaiense* to different nitrogen and phosphorus concentrations. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, v.405, p. 6-17, 2011.

LASTERNAS, S.; AGUSTÍ, S.; DUARTE, C. M.. Phyto- and bacterioplankton abundance and viability and their relationship with phosphorus across the Mediterranean Sea *Aquatic Microbial Ecology*, v.60, p.175-191, 2010.

LIU, Y. et al. PSII-efficiency, polysaccharide production, and phenotypic plasticity of *Scenedesmus obliquus* in response to changes in metabolic carbon flux. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.38, p.292–299, 2010.

LIU, D.; WONG, P. T. S.; DUTKA, B. J. Determination of Carbohydrate in Lake Sediment by a modified Phenol-Sulfuric acid method. *Water Research*, v. 7, p. 741-46, 1973.

LOMBARDI, A. T.; MALDONADO, M. T. The effects of copper on the photosynthetic response of *Phaeocystis cordata*. *Photosynthesis Research*, 108, p.77-78, 2011.

LOMBARDI, A. T.; HIDALGO, T. M. R.; VIEIRA, A. A. H.; Copper complexing properties of dissolved organic materials exuded by the freshwater microalgae *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae). *Chemosphere*, V.60, p. 453-459, 2005.

LOMBARDI, A. T.; VIEIRA, A. A. H.; SARTORI, L. A. Muscilaginous capsule adsorption and intracellular uptake of copper by *Kircheriella aperta* (Chlorococcales). *Journal of Phycology*, v. 38, p. 332-337, 2002.

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

MARCONE, G. P. S. 2011. *Avaliação de ecotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio e prata* (Campinas, SP). 207 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

MASCIANGIOLI, T.; ZHANG, W. X. “Environmental technologies at the nanoscale.” *Environmental science & technology*. V. 37, p. 102A-108A, mar. 2003.

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

NAVARRO, E. et al. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environmental Science & Technology*, v. 42, p.8959-8964, 2008a.

NAVARRO, E. et al. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Springer*. v. 17. n. 5. Maio. 2008b.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles. *Environmental Health Perspectives*. v.113, n.7, p.823-839, jul. 2005.

ODUM, E. P.; BARRETT, G. W. *Fundamentos de Ecologia*. 5° ed. São Paulo: Cengage Learning. 2007. 612p.

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

PEREIRA, J. C. *Estudo do comportamento de nanopartículas de dióxido de titânio em diferentes suspensões* (Lisboa, Portugal). 112 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Materiais) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, 2010.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. *Química Nova*. V. 27, n. 6, p.1028-1029, dez. 2004.

QUISPE, N. B. P. Nanociência & nanotecnologia: aplicações dos materiais/biomateriais ativas e inteligentes In: Congresso Nacional de Investigación, I, 2011, Universidad Peruana Unión (Anais) Lima, Peru, Nov. 2011. Disponível em:< <http://papiros.upeu.edu.pe/handle/123456789/150>>. Acesso em: 01 de set. 2012.

RAND, M.G. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment*. 2. ed. Washington: Taylor & Francis. 1995. 1125p.

RAUSCH, T. The estimation of micro-algal protein content and its meaning to the evaluation of algal biomass I. *Hidrobiologia*, v. 78, p. 237–251, 1981.

Rebouças, A.C.; Braga, B.; Tundisi, J.G. *Águas doces no Brasil: capital ecológico, uso e conservação*. In: REBOUÇAS, A. C. *Água doce no mundo e no Brasil*. São Paulo: Escrituras, 2006. p. 1-37.

ROCHA, G. S. et al. Growing *Scenedesmus quadricauda* in used culture media: is it viable? Artigo submetido para publicação (em revisão - *Journal of Applied Phycology*). 2014.

RÖHDER, L. A. et al. Influence of agglomeration of cerium oxide nanoparticles and speciation of cerium (III) on short term effects to the green algae *Chlamydomonas reinhardtii*. *Aquatic Toxicology*, v.152, p.121, 2014.

SADIQ, I. M. et al. Ecotoxicity study of titania (TiO₂) NPs on two microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v.74, p.1180-1187, 2011.

SAN, N. O. et al. Novel one-step synthesis of silica nanoparticles from sugarbeet bagasse by laser ablation and their effects on the growth of freshwater algae culture. *Particuology*. doi:10.1016/j.partic.2013.11.003, 2014.

SANTOS, J. F. Relatório Técnico 36: Perfil do Titânio. Disponível em:< http://www.mme.gov.br/sgm/galerias/arquivos/plano_duo_decenal/a_mineracao_brasileira/P16_RT36Perfil_do_Titxnio.pdf> Acesso em 23 de maio de 2014.

SHANG, L.; NIENHAUS, K.; NIENHAUS, G. U. Engineered nanoparticles interacting with cells: size matters. *Journal of Nanobiotechnology*, v.12, p.5-16, 2014.

SODRÉ, F. F. et al. Origem e destino de interferentes endócrinos em águas naturais. 2007. Disponível em:< <http://lqa.iqm.unicamp.br>> Acessado 15 maio 2014.

SOUZA, F. M. L. D.; KELLY, G. J. Effects of a diet of a nitrogen-limited alga (*Tetraselmis suecica*) on growth, survival and biochemical composition of tiger prawn (*Penaeus semisulcatus*) larvae. *Aquaculture* v.181, p.311-329, 2000.

TANG, Y. et al. Synergistic Effects of Nano-Sized Titanium Dioxide and Zinc on the Photosynthetic Capacity and Survival of *Anabaena* sp. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 4, p.14395-14407, 2013.

TANG, Y. Z.; DOBBS, F. C. Green autofluorescence in Dinoflagellates, Diatoms, and other microalgae and its implications for vital staining and morphological studies. *Applied and Environmental Microbiology*, v.73, p.2306-2313, 2007.

THIO, B. J. R.; ZHOU, D.; KELLER, A. A. Influence of natural organic matter on the aggregation and deposition of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Hazardous Materials*, v.189, p.556-563, 2011.

TOLOCHKO, N. K. History of nanotechnology. *Encyclopedia of Life Support Systems*. [s.d.] Disponível em: < <http://www.eolss.net/Sample-Chapters/C05/E6-152-01.pdf>>. Acesso: 22 de maio de 2014.

TOMA, H. E. *O mundo nanométrico: a dimensão do novo século*. São Paulo: Oficina de textos, 2004. 104 p.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Nanomaterial Case Studies: Nanoscale Titanium Dioxide in Water Treatment and in Topical Sunscreen. United States, 2010. 204 p.

YANG, F. et al. The improvement of spinach growth by nano-anatase TiO₂ treatment is related to nitrogen photoreduction. *Biological Trace Element Research*, v.119, p. 77-88, 2007.

YEUNG, K. L. et al. Reactivity and antimicrobial properties of nanostructured titanium dioxide. *Catalysis Today*, v.143, p. 218-224, 2009.

ZETSCHKE, E-V; MEYSMAN, F. J. R. Dead or alive? Viability assessment of micro- and mesoplankton. *Journal of Plankton Research*, v.34, n.6, p.493-509, 2012.