

Cristina Moreira Lalau

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE  
ÓXIDO DE COBRE ATRAVÉS DE MACRÓFITAS DA ESPÉCIE  
*Landoltia punctata***

Dissertação submetida ao Programa de  
Pós Graduação em Engenharia  
Ambiental da Universidade Federal de  
Santa Catarina para a obtenção do  
Grau de Mestre em Engenharia  
Ambiental

Orientador: Prof. Dr. William Gerson  
Matias

Coorientador: Dr. Rodrigo de Almeida  
Mohedano

Florianópolis  
2014

Lalau, Cristina Moreira

Avaliação da toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre através de macrófitas da espécie *Landoltia punctata* / Cristina Moreira Lalau ; orientador, William Gerson Matias ; coorientador, Rodrigo de Almeida Mohedano. - Florianópolis, SC, 2014.

114 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, . Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia Ambiental. 2. Engenharia Ambiental. 3. *Landoltia punctata*. 4. Nanopartículas de Óxido de Cobre. 5. Avaliação Toxicológica. I. Matias, William Gerson. II. Mohedano, Rodrigo de Almeida. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

**“Avaliação da toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre através de macrófitas da espécie *Landoltia punctata*”**

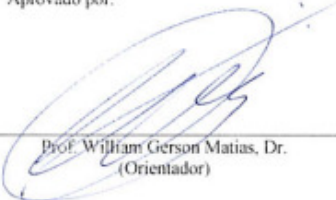
**CRISTINA MOREIRA LALAU**

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós - Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

**MESTRE EM ENGENHARIA AMBIENTAL**

na Área de Engenharia Ambiental.

Aprovado por:



---

Prof. William Gerson Matias, Dr.  
(Orientador)



---

Prof. Paulo Belli Filho, Dr.



---

Prof. Armando Borges de Castilhos Junior, Dr.



---

Prof. Eder Carlos Schimidt, Dr.



---

Prof. Fábio Kummrow, Dr.



---

Prof. William Gerson Matias, Dr.  
(Coordenador)



Dedico esse trabalho aos meus  
queridos pais.



## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por sempre me iluminar em todas as etapas de minha vida.

Aos meus pais Wilson e Kátia, que me repassaram toda a educação e virtudes que foram importantes no meu desenvolvimento pessoal e na conquista de meus objetivos.

Aos meus irmãos e amigos Marcelo, Camila e Maurício, por estarem sempre ao meu lado em todos os momentos de minha vida.

Ao meu orientador Prof. Dr. William Gerson Matias, pela orientação, dedicação e conhecimento repassados para suprir as demandas necessárias para a realização da presente pesquisa.

Ao meu coorientador Rodrigo de Almeida Mohedano, por toda orientação prestada, paciência, dedicação e amizade. Que sempre fez com que eu acreditasse mais no meu potencial tanto para a realização desse trabalho, quanto para a vida inteira.

A toda a equipe do LABTOX (Laboratório de Toxicologia Ambiental – ENS - UFSC) e ao LAMAR (Laboratório de Biologia Celular Vegetal – BEG - UFSC) e ao LCME (Laboratório de Microscopia Eletrônica - UFSC) pelo todo auxílio prestado no decorrer do processo de elaboração do trabalho.

A equipe do CICLOG (Grupo de Pesquisa em Avaliação do Ciclo de Vida) e ao professor Sebastião Roberto Soares por disponibilizar a sala para que o estudo se realizasse.

Às minhas melhores amigas Renata, e Amanda Stiz de Carvalho que cresceu ao meu lado e proporcionou momentos de descontração e lazer, que também foram importantes no período de elaboração do trabalho.

À Sandra Ramos, Nathália Battistella, pela parceria desde o ingresso no PPGEA e no decorrer da realização do trabalho. Amizades valiosas que levo para vida.

À Ana Letícia, Cristina Henning da Costa, Bianca Oscar, Rodrigo Puerar, Fernando Salum e José amizades valiosas que conquistei ao longo do desenvolvimento do trabalho e levarei para a vida, pois sempre me ajudaram e compartilharam bons e maus momentos junto a mim.

Aos membros da banca Prof. Dr. Armando Borges de Castilhos, Dr. Éder Carlos Schimidt, Prof. Dr. Fábio Kummrow e Prof. Dr. Paulo Belli Filho por terem se disposto a conhecer e avaliar o meu trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao (CNPq) por disponibilizar todos os subsídios necessários para que a pesquisa se desenvolvesse.





“Quando descobrimos que absolutamente nada é definitivo, inclusive a vida, compreendemos a inutilidade do orgulho, a tolice das disputas, a estupidez da ganância e a incoerência das tolas mágoas.”

(Autor desconhecido)



## RESUMO

O uso e aplicabilidade das nanopartículas de óxido de cobre (NPCuO) tem aumentado consideravelmente nos dias atuais principalmente no campo da ciência e das indústrias. A NPCuO é bastante utilizada principalmente como componente em tinta anti-incrustante de embarcações. Embora se verifique uma utilização crescente desta partícula, estudos desenvolvidos para avaliar seus potenciais impactos ao meio ambiente ainda são escassos. Assim sendo o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos da NPCuO utilizando macrófitas aquáticas da espécie *Landoltia punctata* como organismo-teste. A metodologia utilizada para os ensaios teve como base as normatizações ISO 20079 e da OECD 221, porém com adaptações. Com o objetivo de avaliar a estabilidade, tamanho e forma da NPCuO foram realizados procedimentos para a sua caracterização através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), análise de área superficial e análise do potencial Zeta. O delineamento experimental se deu pela exposição do organismo-teste a três diferentes concentrações da NPCuO, além do grupo controle, sendo 0,1, 1,0 e 10,0 g.L<sup>-1</sup>. Cada tratamento se deu em seis repetições totalizando 24 unidades experimentais utilizadas em testes com duração de sete dias. No ensaio foi avaliada a taxa de crescimento, alterações na organização ultraestrutural e morfológica e, conteúdo de pigmentos fotossintetizantes. Além dos procedimentos normatizados foram realizadas análises microscópicas para avaliar possíveis alterações citológicas após a exposição. Diferentemente do esperado não foram observados efeitos significativos  $p < 0,05$  na taxa de crescimento dos organismos expostos as diferentes concentrações. Essa premissa é comprovada ao se verificar no máximo a CE<sub>20</sub> na máxima concentração de NPCuO. Os danos sobre a ultraestrutura e conteúdo de pigmentos fotossintetizantes foram bastante expressivos e não foram encontradas nanopartículas no interior das macrófitas durante a microscopia. Isto remete a hipótese de que com o aumento do período de exposição os efeitos de inibição de crescimento poderiam aumentar. O acúmulo de Cu<sup>2+</sup> pela planta denota que a toxicidade pode ter sido provocada pelos íons liberados na amostra. A bioacumulação apresentada pela planta pode provocar efeitos tóxicos nos níveis mais altos da cadeia trófica indicando a necessidade de avaliar a bioamplificação dos efeitos dos íons da NPCuO.

**Palavras-chave:** Lemna *Landoltia punctata* 1. Teste Toxicológico 2. Nanopartícula de óxido de cobre 3.

## ABSTRACT

The use and applicability of copper oxide nanoparticles (NPCuO) has increased substantially today mainly in the fields of scientific and industry. The NPCuO is widely used mostly as a component of antifouling paints in ships. Although there is an increasing use of this particle, studies developed to evaluate the potential environmental impacts are scarce. Thus the present study has aimed to evaluate the toxic effects of NPCuO on the duckweed *Landoltia punctata* sp. The test methodology used was OECD and ISO/DIS 20079 normalizations with some adaptations. For a better understanding of the effects and to complement this research, microscopic analysis was done to assess the physiological implications inside the cells of *L. punctata* and at the same time the uptake of copper ions by the duckweed. Also the characterization of the nanoparticle in this study by Transmission Electronic Microscopy (TEM), superficial area analysis and Zeta potential analysis was done. The experimental procedure was by exposure of the test-organism to three different concentration of NPCuO, above the control group, being 0.1, 1.0 and 10.0 g.L<sup>-1</sup>. Each treatment was done in six replicates totaling 24 experimental units used in assay with lasting seven days. In the test the growth rate, morphological and cytological alterations and photosynthetic pigments were evaluated. In addition to the standardized procedures microscopic analyzes were performed to assess possible cytological changes after exposure. Contrary to expected results haven't been observed meaning effects  $p < 0,05$  in the growth rate of organisms exposed to concentrations of nanoparticle. This fact is proven EC<sub>20</sub> in at most a very high concentration of NPCuO. The damage on the morphology and photosynthetic material were quite significant and the nanoparticles were not observed in the cells during the microscopy. This leads to the conclusion that with the increase of the exposure period the growth inhibitory effects could increase. The accumulation of Cu<sup>2+</sup> by the plant indicates that toxicity can be caused by ions released in the sample. The bioaccumulation presented by the plant can cause toxic effects on higher trophic levels indicating the need to evaluate the effects of biomagnifications of ions NPCuO..

**Keywords:** Duckweed *Landoltia punctata* 1. Toxicological Assay 2. Copper oxide nanoparticle 3.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Dimensões de alguns elementos em suas várias escalas.....	7
Figura 2: Principais processos de alteração morfológica das nanopartículas no ambiente .....	16
Figura 3: Aspecto da distribuição de uma população de macrófitas lemnáceas.	24
Figura 4: Distribuição geográfica em que há ocorrência de lemnas. Locais com coloração vermelha são onde existe as mais diversas espécies desse organismo. ....	25
Figura 5: Fluxograma resumo da metodologia do trabalho. ....	29
Figura 6: Esquema da estrutura piloto montada para o desenvolvimento da cultura e realização de testes com as lemnas. ....	30
Figura 7: Estrutura laboratorial para o cultivo das lemnas.....	31
Figura 8: Estrutura laboratorial para teste com as macrófitas <i>Landoltia punctata</i> . ....	31
Figura 9: Imagem do sonicador UNIQUE – 100W. ....	35
Figura 10: Microscópio eletrônico de transmissão. ....	36
Figura 11: Equipamento zetasizer nano ZS. ....	37
Figura 12: Representação das unidades experimentais utilizadas para o procedimento de ensaio de toxicidade .....	38
Figura 13: Aparelho de espectrometria de absorção atômica.....	44
Figura 14: Gráfico com o comportamento das curvas de crescimento das lemnas referente ao monitoramento de dezembro de 2012. ....	48
Figura 15: Imagens da nanopartícula de óxido de cobre, diluídas em duas soluções diferentes, obtidos por microscopia de transmissão eletrônica (MET). ....	49
Figura 16: Curva resposta da taxa inibição de crescimento da planta com o aumento das concentrações de NPCuO. ....	51
Figura 17: Detalhe das lemnas após o período de sete dias de exposição a NPCuO (controle e tratamentos).....	53
Figura 18: Microscopia de luz das secções transversais das frondes expostas a NPCuO. As secções foram coradas com PAS (Periodic acid-Schiff).....	55
Figura 19: Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Micrografias das frondes após sete dias de exposição à NPCuO.....	56
Figura 20: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) imagens micrográficas da <i>L. Landoltia punctata</i> após sete dias de exposição a NPCuO. ....	58
Figura 21: Avaliação dos efeitos da NPCuO sobre a <i>L. Landoltia punctata</i> com base no parâmetro de peso úmido (PU). Média $\pm$ DP n = 3. As letras indicam as diferenças significativas de acordo com one-way Anova e um posterior teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). ....	62
Figura 22: Avaliação dos efeitos da NPCuO sobre a <i>L. Landoltia punctata</i> com base no parâmetro de peso seco (PS). Média $\pm$ DP n = 3. As letras indicam as diferenças significativas de acordo com one-way Anova e um posterior teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). ....	63





## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Produtos de nanotecnologia produzidos no Brasil. ....	10
Tabela 2: Conjunto de técnicas de caracterização aplicável a sistemas de partículas menores que 100nm.....	18
Tabela 3: Meio de Cultura utilizado para os ensaios toxicológicos com lemna.	32
Tabela 4: Monitoramento do crescimento das frondes no decorrer das três primeiras semanas de dezembro de 2012.....	47
Tabela 5: Resultados obtidos por análise por MET. ....	48
Tabela 6: Valores do potencial Zeta das amostras estudadas. Média $\pm$ DP (n = 3). As letras indicam as diferenças significativas de acordo com one-way Anova e um posterior teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). ....	49
Tabela 7: Valores de taxa de crescimento da <i>L. Ladolia punctata</i> após o período de exposição a NPCuO. Média $\pm$ DP (n = 6). As letras indicam as diferenças significativas de acordo com one-way Anova e um posterior teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). ....	50
Tabela 8: Conteúdo de pigmento fotossintético ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ PS) da lemna após sete dias de exposição a NPCuO. Média $\pm$ DV (n = 8). As letras indicam a significancia de acordo com <i>one way</i> ANOVA e posterior teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ....	53
Tabela 9: Microanálise de raios-X da parede celular após sete dias de exposição das frondes a NPCuO. C, carbono; N, nitrogênio; O, oxigênio; Na, Sódio; Cu, cobre (n=10). O asterístico indicam a presença do elemento. As diferenças significativas estão de acordo com a one-way ANOVA e posterior teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). ....	56
Tabela 10: Resultados da concentração de íons de cobre na solução da amostra somente com água ultrapura, solução controle e os tratamentos da lemna após sete dias de exposição a NPCuO. Média $\pm$ DV (n = 3). As letras indicam a significancia de acordo com <i>one way</i> ANOVA e posterior teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ....	59
Tabela 11: Resultados da concentração de íons de cobre presentes na estrutura das lemnas, solução controle e os tratamentos, após sete dias de exposição a NPCuO. Média $\pm$ DV (n = 3). As letras indicam a significancia de acordo com <i>one way</i> ANOVA e posterior teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). ....	61



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

ABDI – Associação Brasileira de Desenvolvimento Industrial

MCT – Ministério da Ciência e Tecnologia

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

ML – Microscopia de Luz

NM – Nano material

NP – Nanopartícula

NPCuO – Nanopartícula de Óxido de Cobre

O.T. – Organismo-Teste



## SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1 OBJETIVOS.....	5
<b>1.1.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>5</b>
<b>1.1.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>5</b>
<b>2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>7</b>
2.1HISTÓRICO E CONTEXTO DA NANOTECNOLOGIA.....	7
2.2USO E IMPORTÂNCIA DAS NANOPARTÍCULAS.....	8
2.3NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE.....	10
2.4POSSÍVEIS IMPACTOS PROVOCADOS PELAS NPCUO.....	11
2.5IMPORTÂNCIA DOS TESTES TOXICOLÓGICOS.....	12
<b>2.5.1.Caracterização de amostras contendo nanopartículas de Óxido de Cobre para uso em Avaliações Toxicológicas</b> .....	<b>16</b>
2.6CRITÉRIOS PARA A SELEÇÃO DE UM ORGANISMO-TESTE.....	21
2.7AS LEMNAS.....	23
<b>2.7.1.Aspectos que possibilitam o emprego das lemnas como organismo-teste.</b> .....	<b>25</b>
<b>2.7.2.Normatizações de teste toxicológico com lemnas</b> .....	<b>27</b>
<b>3.METODOLOGIA</b> .....	<b>29</b>
3.1FLUXOGRAMA GERAL DA METODOLOGIA.....	29
3.2ESTABELECIMENTO DA PRÉ-CULTURA.....	31
3.3SÍNTESE DA NPCUO.....	33
3.4PROCESSO DE CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE COBRE.....	34
<b>3.4.1Caracterização por microscopia eletrônica de transmissão (MET)</b>	<b>34</b>
<b>3.4.2Análise do potencial zeta</b> .....	<b>36</b>
<b>3.4.3Análise da área superficial</b> .....	<b>37</b>
3.5ANÁLISE DE TOXICIDADE.....	37
3.6AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS.....	41
<b>3.6.1.Microscopia de luz e histoquímica</b> .....	<b>41</b>
<b>3.6.2.Microscopia eletrônica de transmissão</b> .....	<b>42</b>
<b>3.6.3.Microscopia eletrônica de varredura</b> .....	<b>42</b>
3.7ANÁLISE DOS PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES.....	43
<b>3.7.1.Clorofila a, b e total</b> .....	<b>43</b>
<b>3.7.2.Carotenóides totais</b> .....	<b>43</b>
3.8QUANTIFICAÇÃO DOS ÍONS DE COBRE, PESO SECO E PESO ÚMIDO.....	44
3.9ANÁLISE ESTATÍSTICA DE TODOS OS PARÂMETROS AVALIADOS.....	45
<b>4.RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>47</b>
4.1TAXA DE CRESCIMENTO.....	47
<b>4.1.1.Pré-cultura de lemna <i>Landoltia punctata</i></b> .....	<b>47</b>

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	48
4.2.1. Avaliação por microscopia eletrônica de transmissão .....	48
4.2.2. Potencial zeta .....	49
4.2.3. Área Superficial .....	50
4.3 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA .....	50
4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS .....	52
4.4.1. Análise de pigmentos fotossintetizantes. ....	52
4.5 ANÁLISES POR MICROSCOPIAS .....	53
4.5.1. Observação através de microscopia de luz e histoquímica .....	54
4.5.2. Microscopia eletrônica de varredura .....	55
4.5.3. Microscopia eletrônica de transmissão .....	57
4.6 QUANTIFICAÇÃO DOS ÍONS DE COBRE .....	59
5. CONCLUSÃO .....	64
6. RECOMENDAÇÕES .....	66
REFERÊNCIAS .....	67
APÊNDICE I .....	83
LAUDO 1 .....	85
LAUDO 2 .....	86
LAUDO 3 .....	87
LAUDO 4 .....	88
ANEXO I .....	91

## 1. INTRODUÇÃO

A ciência da nanotecnologia vem ganhando espaço no campo de inovações e aprimoramento de novas tecnologias. Seu conceito relaciona-se ao estudo da manipulação da matéria em uma escala atômica e molecular (em escala “nano” prefixo esse que designa  $10^9$  m assim como micro  $10^{-6}$  e mili  $10^{-3}$ ) e, desse processo, gerar produtos e componentes nas mais diversas áreas de pesquisa. Pode também ser conceituada como uma ciência multidisciplinar que envolve a criação e utilização de materiais, sistemas e dispositivos em escala nanométrica (variação de tamanho de 1 a 100 nm) (ZHA et. al., 2007). Complementando tal premissa Martins, (2009) conclui que na nanotecnologia:

[...] o tamanho da partícula é de suma importância, pois modifica a natureza das interações das forças entre as moléculas do material e, conseqüentemente, altera os impactos que estes processos ou produtos nanotecnológicos têm junto do meio ambiente, a saúde humana e a sociedade como um todo.

O marco inicial da nanotecnologia se consolidou em 1959, na reunião Anual da Sociedade Americana de Física. Nesse evento o físico norte americano Richard Feynman proferiu as possibilidades, vantagens e mudanças com a obtenção de materiais em nanoescala. No entanto essa ciência se popularizou no decorrer do ano de 1980, quando o cientista Eric Drexler do Instituto Foresight, mencionou a construção de máquinas em escala molecular, contendo apenas alguns nanômetros de tamanho tais como braços de robôs, motores e computadores (SILVA, 2011).

Com grande participação no campo da nanociência, a síntese e utilização de nanopartículas (NP) vêm ganhando espaço em muitos setores tecnológicos. Conceitualmente as NPs são definidas como porções, de tamanho nanométrico, provenientes de um material específico em maior escala. Sendo que essas porções terão características diferentes do material original de dimensões superiores. Sua aplicabilidade é observada em vários campos tais como: catalizadores na química, medicamentos, pontos quânticos em \*nanoeletrônicos e \*\*partículas nanomagnéticas nas ciências de materiais. Além disso, as nanopartículas já são utilizadas na composição

\*Dispositivos elétricos fabricados e operados em escala nano.

\*\* Materiais em escala nano que possuem propriedades magnéticas, geralmente utilizada em uma das áreas de pesquisa da física (nanomagnetismo)

vestuário, equipamentos esportivos, conversores catalíticos de automóveis, colagem dental, produtos de limpeza, e curativos para feridas. Além dos usos já consolidados são muitos os campos de possíveis aplicações da nanotecnologia para um futuro próximo, como por exemplo, em nanomedicina, remediação ambiental, e no imageamento de células (CROSERÁ et al., 2009). Apesar de apresentar aplicabilidades e benefícios descritos anteriormente, não se devem subestimar seus potenciais danos ao meio ambiente.

Algumas propriedades dos nanomateriais, como a biodisponibilidade, biodegradabilidade e toxicidade são ainda pouco conhecidas. No entanto essas partículas, devido as suas características físico-químicas, podem ser transportadas no meio ambiente ou acumuladas ao longo da cadeia alimentar, interferindo nos processos biológicos (QUINA, 2004). Conclusivamente, nanopartículas podem ser úteis, mas também podem desencadear impactos negativos ainda desconhecidos de acordo com a dose ou a superfície de contato que possuem (SANTOS, 2010).

Cada tipo de composto químico que é reduzido à escala nano apresenta características específicas que possibilitam diferentes usos quando comparado com a mesma substância em escalas maiores. Esse fato se aplica às nanopartículas de óxido de cobre (NPCuO), alvo do presente estudo.

Aplicação de NPCuO tem ganhado espaço de forma crescente na indústria tecnológica. Sendo um exemplo o aumento do desempenho da produção de hidrogênio, através da decomposição da água, com o uso de energia solar baseada em foto eletroquímica. As nanopartículas de óxido de cobre aumentam a eficiência desse tipo de célula devido as suas propriedades ópticas e elétricas específicas. (CHIANG et al., 2011). Ainda as NPCuO semicondutoras são promissoras no que diz respeito ao seu uso em dispositivos eletrônicos e óptico eletrônicos em escala nano (CHIANG; AROH; EHRMAN, 2012).

A NPCuO é usualmente utilizada como tinta anti-incrustante em barcos, navios entre outros materiais que necessitam permanecer sob a água. No entanto, o risco eminente de contaminação dos ecossistemas aquáticos é desconhecido (PERREAULT et al., 2010).

Embora as nanopartículas NPCuO mostrem resultados favoráveis em relação ao desenvolvimento tecnológico, processos de produção e, em pesquisas voltadas para a área da saúde, ainda são pouco expressivos estudos referentes aos seus efeitos nocivos tanto ao homem quanto para o meio ambiente. Neste contexto, a nanotoxicologia surge como uma ciência que busca desenvolver e aplicar métodos para avaliar os efeitos



tóxicos das nanopartículas nos ecossistemas e dar subsídios para uma gestão consciente desta nova tecnologia. Estes estudos baseiam-se, geralmente, na exposição de organismos-testes aos agentes tóxicos e na observação das alterações metabólicas e morfológicas causadas. Assim a seleção do organismo teste a ser utilizado é uma etapa importante e requer uma série de requisitos como a sensibilidade e posição na cadeia trófica, por exemplo.

No decorrer dos últimos anos vem se ampliando, estudos nos quais as substâncias tóxicas presentes no meio aquático são avaliadas a partir dos efeitos provocados sobre as macrófitas lemnáceas. Essas plantas vasculares, principalmente das espécies *Lemna gibba* e *Lemna minor*, vêm sendo amplamente estudadas e são objetos de normatizações de testes de toxicidade (OECD, 2002). As plantas desse grupo vegetal, conhecidas popularmente como lemnas são as principais plantas utilizadas em experimentos de morfogenética, toxicologia e ensaios relacionados à fisiologia, devido as suas características de se propagarem rapidamente em pouco espaço (POTT, 2002). As características que qualificam essas macrófitas aquáticas como organismo-teste, preenchem diversos requisitos exigidos pelas normatizações de testes toxicológicos, tais como:

- Possuem a maior taxa de crescimento entre os vegetais superiores;
- Dispõem de alta sensibilidade a certos compostos tais como herbicidas, por exemplo,
- Expressarem respostas rápidas de toxicidade aos testes,
- Serem de fácil manejo e reprodução em laboratório,
- Apresentarem nível de importância dentro da cadeia trófica.

Também já são utilizadas em testes de toxicidade com nanopartículas. Perreault et al., (2010), por exemplo, avaliou em sua pesquisa a toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre (NPCuO) através da inibição no processo de fotossíntese das lemnas. Seus resultados mostraram que as NPCuO inibem o transporte de elétrons associados aos rendimentos quânticos e operacionais em etapas do desenvolvimento da fotossíntese resultando em uma forte inibição na ação fotossintética da planta com conseqüente redução de sua taxa de crescimento.

A necessidade de examinar os possíveis efeitos tóxicos da NPCuO se justifica pela mesma apresentar tamanho consideravelmente diminuto, podendo penetrar facilmente em uma variedade de superfícies e, por possuir reatividade quando em solução. Deste modo, o presente

estudo visa avaliar possível efeito agudo dessa nanopartícula em macrófitas lemnaáceas da espécie *Landoltia punctata* verificando possíveis efeitos morfológicos, alterações celulares e de pigmentos fotossintetizantes.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre utilizando a macrófita *Landoltia punctata* como organismo-teste.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar físico-quimicamente a nanopartícula de Óxido de Cobre obtida para estudo;
- Determinar o nível de toxicidade das nanopartículas de Óxido de Cobre por meio de teste de toxicidade aguda sobre as macrófitas *Landoltia punctata*;
- Avaliar os efeitos tóxicos das NPCuO sobre o organismo-teste através de alterações morfológicas, na ultraestrutura;
- E quantificar o conteúdo de pigmentos fotossintetizantes.

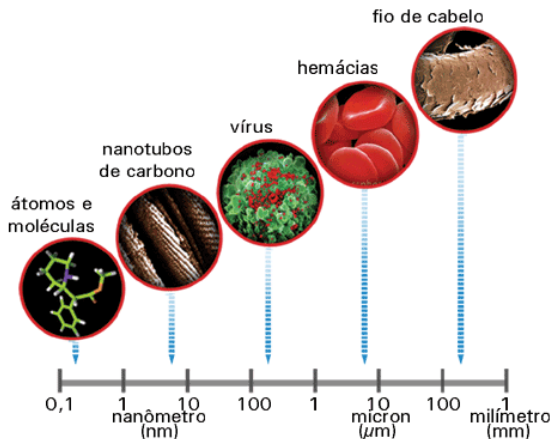


## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 HISTÓRICO E CONTEXTO DA NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é conceituada como o ato de manipular partículas em uma faixa de tamanho menor que 100 nanômetros (WEXLER, 2009). Realizando um breve comparativo com relação aos tamanhos dos materiais é possível observar que a dimensão de um fio de cabelo pode medir 100.000 nm, a das hemácias é na faixa de 10.000 nm, das moléculas de DNA situa-se na escala de 100 nm pouco menos que o tamanho de um vírus e os nanotubos de carbono possuem um diâmetro na faixa de 10 nm (TOMA, 2004). Esse comparativo pode ser visualizado a seguir (Figura 1).

Figura 1: Dimensões de alguns elementos em suas várias escalas.



Fonte: TOMA, (2007).

O desenvolvimento de pesquisas voltadas ao ramo da nanotecnologia vem sendo cada vez mais expressivo no mundo atual. Inclusive os nanomateriais já são utilizados em centenas de produtos tais como protetores solares, cosméticos, têxteis, equipamentos desportivos, entre outros. Nanotecnologia também está sendo desenvolvida para utilização na fabricação de remédios, biossensores e outras aplicações biomédicas. Além de estarem sendo desenvolvidas para utilização em

aplicações ambientais como limpeza de poluentes, por exemplo, (WEXLER, 2009).

O marco da nanotecnologia foi a palestra realizada por Richard Feynman, em 1959 na qual a possibilidade teórica de formas extremas de miniaturização foi enfatizada (RICHARD, 1992). A segunda menção da criação da nanotecnologia tem sua origem em um artigo apresentado por Norio Taniguchi em 1974 para a Sociedade Japonesa de Engenharia de Precisão, na qual, corroborando com a sabedoria "popular", o termo nanotecnologia foi cunhado (PARDO-GUERRA, 2011).

Em 1981, Gerd Binnig e Heinrich Rohrer desenvolveram o microscópio de tunelamento em laboratórios da International Business Machines (IBM) na Suíça. Esta ferramenta fornecida por um avanço revolucionário que permite aos cientistas imagem a posição dos átomos individuais em superfícies. Ainda Binnig e Rohrer ganharam o Prêmio Nobel em 1986 e deu origem a uma grande variedade de ferramentas de verificação de sonda para observações em nanoescala (PICRAUX, 2012).

Já em 1990 Donald Eigler reproduziu as letras do logotipo de sua empresa, a IBM, movendo 35 átomos de xenônio em seu lugar sobre uma superfície de níquel. Esta manifestação chamou a atenção do público, porque mostrou a precisão das ferramentas emergentes em nanoescala (PICRAUX, 2012).

Em 1991, a manipulação de átomos de carbono, dispostas sob a forma de um tubo, possibilitou a criação do primeiro nanotubo seis vezes mais leve do que o aço, porém 100 vezes mais forte (BRAR et al., 2009).

Essa ciência vem avançando rapidamente, com mais de 1000 nanoprodutos já existentes no mercado sendo crescente o uso das nanopartículas para propósitos diversos.

## 2.2 USO E IMPORTÂNCIA DAS NANOPARTÍCULAS

A nanotecnologia tornou-se uma indústria em rápido crescimento, com um vasto número de aplicações potenciais, tais como cosméticos, eletrônicos, tintas, dispositivos médicos, embalagens de alimentos, catalisadores, antimicrobianos, tecidos para vestuário, membranas de tratamento de água, etc (JO et al., 2012).

Inclusive as nanopartículas vêm sendo pesquisadas para usos na tecnologia sob as mais amplas categorias de carbono, semicondutores,

metálicos, oxidantes–hidroxidantes, fosfatos (GÚZMAN; TAYLOR; BANFIELD, 2006). Dentre as diversas indústrias que tem uso de nanopartículas em grande escala destacam-se: fabricantes de tintas, revestimentos, cosméticos, catalisadores, polímeros compósitos (AITKEN et al., 2006). Também as propriedades das nanopartículas podem vir a influenciar nas interações entre sistemas biológicos (DHAWAN; SHARMA; PARMAR, 2009). Devido a isso as mesmas também vêm sendo incorporadas no campo da medicina. O seu uso em procedimentos médicos se destaca, tais como, ferramentas de imagem, agentes de fototerapia e portadores do gene (VERMA et al., 2008). Ainda vem sendo utilizada na elaboração de remédios, genes, e, auxílio em diagnósticos (SAHOO; PARVEEN; PANDA, 2006).

No ano de 2005, por exemplo, o Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos investiu um total de 114, 3 milhões de dólares ao longo de cinco anos para o programa de aliança para nanotecnologia do câncer, dessa forma, muitas pesquisas e o desenvolvimento é progressivo nas áreas de diagnóstico de câncer, dispositivos, biossensores e microfluidos (KIM, 2006). Ainda, se tratando de termos econômicos:

O mercado total de produtos que incorporam nanotecnologias (incluindo semicondutores e eletrônicos) atingiu US\$ 135 bilhões em 2007, devendo alcançar US\$ 693 bilhões até o final de 2012 e cerca de US\$ 2,95 trilhões em 2015. Excluindo-se os semicondutores e eletrônicos, o mercado global de produtos que incorporam nanotecnologias chegou a US\$ 83 bilhões em 2007, devendo alcançar US\$ 263 bilhões em 2012 e US\$ 1,5 trilhões em 2015 (ABDI, 2010).

O Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) deverá investir até 2013, R\$ 110 milhões na área de nanotecnologia, com o objetivo de apoiar empresas e laboratórios que atuam no setor (ABDI, 2010). Só no ano de 2005 o total de investimento global em nanotecnologia foi em torno de dez bilhões de dólares (HARRISON, 2007).

A seguir será apresentada (Tabela 1) a relação dos produtos de nanotecnologia desenvolvidos no Brasil juntamente com as respectivas empresas, conforme divulgado pelo MCT em 2007.

Tabela 1: Produtos de nanotecnologia produzidos no Brasil.

<b>Produto</b>	<b>Empresa</b>
Língua Eletrônica	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA)
Grafite	Faber Castell
n-Domp	Ponto Quântico
Biphor	Bunge
Prótese Arterial	Nano Endolumial
True Life Silpure	Diklatex
Secador de Cabelos	Nanox/TAISS
Sistema de Liberação Controlada de Medicamentos	Nanocore
Taubarez T 940	Indústrias Químicas de Taubaté
Revestimentos	Nanox Tecnologia S.A.
Vitactive Nanoserum Antissinais	O Boticário
Cvdntus	CVD
Nanocompósitos de Polipireno e Polietileno	Braskem

Fonte: Modificado de MCT, (2007).

Teoricamente as nanopartículas podem ser produzidas a partir de qualquer produto químico, entretanto maior parte das partículas de tamanho nano atualmente são sintetizadas com o uso de metais de transição, de silício, de carbono e óxidos metálicos (DROBNE, 2007). Sendo um exemplo de nanopartículas de óxidos metálicos a NPCuO.

### 2.3 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE

Atualmente nanoestruturas de materiais com base de cobre, incluindo o óxido de cobre, vêm sendo amplamente utilizadas nas mais diversas áreas. Esse tipo de nanopartícula tem sua importância não somente no campo científico, mas também na indústria devido a sua aplicação em dispositivos eletrônicos, tais como: placas de circuito impressos e condensadores multicamadas de cerâmica (SAITO et al., 2011).

As nanopartículas de Óxido de Cobre também são utilizadas como um dos componentes de tintas anti-incrustantes de embarcações (PERREAULT et al., 2010; ALMEIDA, DIAMANTINO e SOUSA, 2007). Também as NPCuO têm potencial para substituir os catalisadores de metais nobres para a oxidação de monóxido de carbono (ZHOU et



al., 2006). White et al. (2006), mencionam, com base nos resultados obtidos em seus estudos, que a cinética de oxi-redução de nanopartículas de óxido de cobre se mostraram favoráveis no que diz respeito a redução a emissão de gases tóxicos de escape de motores automotivos. Ainda a suspensão de nanopartículas CuO (nanofluido) possui uma excelente condutividade térmica podendo ser utilizada como um fluido de transferência de calor em máquinas-ferramentas (CHIANG et al., 2011).

No entanto, o rápido crescimento do domínio e uso da nanotecnologia pode propiciar a contaminação do ambiente por poluentes nanométricos tais como nanopartículas metálicas que são as comumente utilizadas em larga escala em aplicações industriais (BRAR et al., 2009). Dessa forma, apesar de a NPCuO já ser amplamente utilizada para diversos fins, estudos voltados aos seus efeitos nocivos ainda são pouco comuns.

## 2.4 POSSÍVEIS IMPACTOS PROVOCADOS PELAS NPCuO

Apesar de as nanopartículas se mostrarem benéficas nos mais diversos campos em que são utilizadas, há também crescente preocupação nos riscos que podem ser gerados com a sua disposição no ambiente. Devido ao seu tamanho extremamente pequeno, os nanomateriais (NM) possuem área superficial extremamente elevada em relação ao volume fato que os torna altamente reativos (ARORA, RAJWADE E PAKNIKAR, 2011). Sob a forma de resíduos industriais e domésticos as nanopartículas de óxido de metal tendem a serem depositadas em corpos d'água naturais (ARUOJA et al., 2008). Ademais, por possuir tamanho nano, proporcionam facilidade de dispersão no ar e também de penetração em variados tipos de superfícies.

Dentre as nanopartículas metálicas as NPCuO também podem apresentar efeitos nocivos quando dispostas no ambiente. Recentemente, vários estudos têm demonstrado que as nanopartículas de CuO apresentam uma toxicidade relativamente elevada para *Daphnia magna* devido aos íons (por exemplo, íons  $\text{Cu}^{2+}$ ) liberados pela da superfície das nanopartículas (HEINLAAN et al., 2011). KARLSSON et al., (2008), por exemplo, investigaram e compararam os efeitos tóxicos e capacidade de danos ao DNA e estresse oxidativo de diferentes nanopartículas e nanotubos (CuO,  $\text{TiO}_2$ , ZnO,  $\text{CuZnFe}_2\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{Fe}_2\text{O}_3$  comparada com NPs de carbono e nanotubos de carbono multicamadas),

seus resultados mostraram que toxicidade *in vitro* de nanopartículas de CuO se destacaram dentre os outros elementos.

Já Perreault et al., (2012), observaram maior toxicidade dos polímeros revestidos com nanopartículas de óxido de cobre sobre as algas da espécie *Chlamydomonas reinhardtii*.

Ainda nos estudos realizados por Fahmy e Cormier (2009), em que foi avaliado o impacto de poluentes metálicos sobre o sistema respiratório por meio do estresse oxidativo gerado em células epiteliais (HEp – 2), as nanopartículas de CuO induziram a maior quantidade de citotoxicidade em relação à dose-dependente enquanto os outros metais (SiO<sub>2</sub> e Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) não apresentaram efeitos tóxicos para a célula HEp – 2 mesmo doses elevadas (400 lg/cm<sup>2</sup>).

Jo et al., (2012), observaram que toxicidade reproduzida pelo organismo *Daphnia magna* das nanopartículas de óxido de cobre é ocasionada principalmente devido a sua associação com Cu dissolvido. Já Rossetto (2012) observou que a nanopartícula de óxido de cobre, por ter maior área superficial que a micropartícula, se mostrou mais tóxica. Isso pelo fato de a NPCuO apresentar maior área superficial, maior instabilidade, menor tamanho e maior a liberação de íons. Nesse estudo ainda foi observado através dos dados obtidos das análises por MET, MEV e potencial zeta, que a NPCuO quando em contato com o meio diluente tende a se aglomerar. Com isso a autora concluiu que o meio diluente pode vir a influenciar diretamente o estado de aglomeração das NP devido a sua diferente composição química e diferentes valores de pH, o que pode influenciar no nível de efeito tóxico.

Contudo apesar de a caracterização da nanopartícula ser um fator importante para elucidar a presente pesquisa para se obter um melhor entendimento dos efeitos provocados pelas nanopartículas de óxido de cobre também se faz importante o embasamento teórico de conceitos e elementos relacionados às avaliações de toxicidade.

## 2.5 IMPORTÂNCIA DOS TESTES TOXICOLÓGICOS

Atualmente ensaios toxicológicos são realizados com o intuito de observar os efeitos tóxicos que uma substância pode proporcionar, ou não, a um organismo, e, caso apresente efeitos nocivos, conferir o nível da toxicidade que a mesma oferece (MATIAS, 2011). Pelo fato de essa metodologia ter relativa importância dentro do campo das avaliações e diagnósticos ambientais e proporcionar, de maneira representativa, o

valor da concentração química dos componentes que podem ser prejudiciais aos ecossistemas, a mesma já é requisitada até mesmo na legislação ambiental (CONAMA 357 e 430).

Os parâmetros de qualidade ambiental exigidos pela legislação brasileira encontram-se descritos na Resolução do CONAMA 357, (2005), dentre os quais os efeitos tóxicos relativos à determinada substância também são levados em consideração.

Art. 34. Os efluentes de qualquer fonte poluidora somente poderão ser lançados, direta ou indiretamente, nos corpos de água desde que obedeçam as condições e padrões previstos neste artigo, resguardadas outras exigências cabíveis:

§ 1o O efluente não deverá causar ou possuir potencial para causar efeitos tóxicos aos organismos aquáticos no corpo receptor, de acordo com os critérios de toxicidade estabelecidos pelo órgão ambiental competente.

§ 2o Os critérios de toxicidade previstos no § 1o devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos padronizados, utilizando organismos aquáticos, e realizados no efluente (RESOLUÇÃO CONAMA nº357, 2005, p.279).

Esse ensaio também é requerido na Resolução CONAMA nº 430 que é complemento da Resolução CONAMA 357:

§ 1 o Os critérios de ecotoxicidade previstos no caput deste artigo devem se basear em resultados de ensaios ecotoxicológicos aceitos pelo órgão ambiental, realizados no efluente, utilizando organismos aquáticos de pelo menos dois níveis tróficos diferentes.

(RESOLUÇÃO CONAMA nº430, 2011, p.05).

Dessa forma em alguns momentos para avaliar a toxicidade de certa substância sobre os organismos existentes no meio aquático, por exemplo, ensaios em que são utilizados seres vivos como organismo-teste são necessários (RUNBINGER, 2009).

Também convém mencionar que

A decisão por um programa de testes de toxicidade aquática visa corrigir as limitações

encontradas nas análises químicas ambientais cujas concentrações menores que os limites de detecção dos métodos analíticos, ou difíceis de serem analisadas, podem apresentar-se como um perigo potencial para organismos aquáticos. (MESSIAS, 2008, p.15).

As finalidades das análises toxicológicas são as de examinar em qual dimensão as substâncias químicas (isoladas ou misturadas) manifestam seus efeitos e o quanto são nocivas para o ser vivo (KNIE & LOPES, 2004). Princípio esse que consiste em um método de observação no qual são identificados os principais mecanismos que contribuem para a degradação do meio ambiente e da cadeia alimentar (LALAU, 2010).

De acordo com Matias, (2011), a toxicologia é definida como uma ciência com caráter interdisciplinar que visa avaliar os efeitos nocivos proporcionados aos seres vivos por meio da avaliação dos mecanismos de ação tóxica em escala molecular, celular e de organismos inteiros.

Existem dois ensaios de toxicidade mais comumente aplicados que são classificados conforme a manifestação dos efeitos em relação ao tempo de exposição:

- Testes agudos: Que permitem identificar os efeitos imediatos de caráter irreparável provocado ao organismo quando em contato com a substância testada (KNIE & LOPES, 2004), cuja resposta mais comum é a morte (FUZINATTO, 2009).
- Testes crônicos: São testes nos quais os efeitos subletais provocados nos organismos testados poderão atingir seu desenvolvimento e seu ciclo reprodutivo (FUZINATTO, 2009).

Esses tipos de testes (agudos e crônicos) permitem identificar a toxicidade de um agente químico através dos resultados obtidos no teste possibilitando conhecer uma concentração confiável desse agente que possa ser lançada no meio ambiente com risco consideravelmente baixo (FINKLER, 2002).

No entanto esses resultados deverão ser representativos, coerentes e de qualidade estatística, e, para tanto, uma análise mais aprofundada é necessária. Dessa forma o ideal é que essas respostas sejam apresentadas graficamente e também através de tabelas com os respectivos desvios padrão e valores médios, utilizando grandezas estatísticas adequadas. Procedimento esse que permite uma melhor visualização dos resultados

e oferece um melhor entendimento do comportamento da amostra sobre o organismo-teste durante a duração do ensaio (KNIE & LOPES, 2004).

Assim recomenda-se que pelo menos cinco concentrações de amostras sejam testadas de modo que ao menos duas apresentem mais de 50% de efeito, e esses valores devem estar entre 20% e 80% do efeito. Com base nessa premissa Knie & Lopes, (2004) designa termos utilizados dentro da ciência da toxicologia para quantificar o nível de toxicidade da substância analisada:

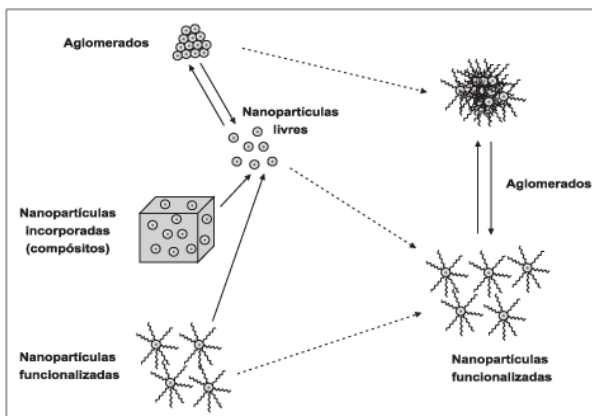
- CEO: Concentração de efeito observado – Menor concentração do agente tóxico na qual o efeito é observado no decorrer do período de teste;
- CE<sub>20</sub>: Concentração efetiva média – Concentração que causa efeito agudo (tal como imobilidade) em 20% dos organismos nas condições e período de teste sendo esta calculada estatisticamente;
- CE<sub>50</sub>: Concentração efetiva média – Concentração que causa efeito agudo (tal como imobilidade) em 50% dos organismos nas condições e período de teste sendo esta calculada estatisticamente;
- CE<sub>100</sub>: Menor concentração que causa efeito a 100% dos organismos, sendo que esses valores não entram no cálculo, pois não refletem de maneira precisa o efeito zero ou o efeito 100%;
- CL<sub>50</sub>: Concentração letal média – Concentração da amostra que causa a mortalidade de 50% dos organismos nas condições e período de teste sendo esta calculada estatisticamente;
- CENO: Concentração de efeito não observado – maior concentração da amostra que não causa efeito deletério estatisticamente significativo nos organismos nas condições e período de teste.

Embora haja termos e metodologias da toxicologia que auxiliam a quantificar os efeitos nocivos das substâncias avaliadas, quando se trata de nanopartículas, para se obter uma melhor compreensão dos mecanismos de ação tóxica, existe a necessidade de se avaliar outros aspectos relevantes. A caracterização das nanopartículas é fundamental nesse processo visto que peculiaridades tais como tamanho, área superficial, forma, característica química, distribuição, solubilidade, química da superfície, entre outros podem também proporcionar efeitos deletérios.

### 2.5.1. Caracterização de amostras contendo nanopartículas de Óxido de Cobre para uso em Avaliações Toxicológicas

De forma a facilitar e tornar clara a identificação dos elementos que proporcionaram os efeitos nocivos da NPCuO é fundamental a realização da sua caracterização. As formas nas quais as nanopartículas podem se apresentar posteriormente ao contato com organismos vivos ou com o meio ambiente e na sua forma livre ou em aglomerados são fatores importantes a serem levados em consideração no processo de toxicidade. Visto que esse se trata de um processo dinâmico que também pode ser acompanhado pela funcionalização da superfície das nanopartículas por diferentes grupamentos químicos presentes no meio, como ácidos húmico e fúlvico (Figura 2) (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010).

Figura 2: Principais processos de alteração morfológica das nanopartículas no ambiente



Fonte: PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, (2010).

O tamanho hidrodinâmico e a alteração da superfície das nanopartículas dispersas pode ter um efeito dramático relacionado à forma na qual o organismo responde após a exposição por isso à importância de essas soluções serem adequadamente caracterizadas (JIANG; OBERDÖSTER; BISWAS, 2008). O volume das nanopartículas rege as interações entre os sistemas biológicos incluindo absorção, distribuição, metabolismo e excreção (RENWICK; DONALDSON; CLOUTER, 2001; BORM et al., 2006; CHOI et al., 2007). Assim sendo o conhecimento dos parâmetros de controle de estado de dispersão terá implicações significativas na preparação de

amostras para estudos toxicológicos e interpretação da resposta biológica (JIANG; OBERDÖSTER; BISWAS, 2008). Para tanto é a aplicação de técnicas adequadas para a realização da caracterização das amostras são necessárias (Tabela 2) para se obter uma boa confiabilidade dos resultados.

Tabela 2: Conjunto de técnicas de caracterização aplicável a sistemas de partículas menores que 100nm.

<b>Conjunto de Técnicas de Análise de Partículas Aplicáveis para Sistemas de Partículas com Tamanho &lt;100nm</b>					
Técnica	Taxa de Tamanho Nominal da NP	Vantagens	Desvantagens	Dosagem	
				Fluido biológico em suspensão	Em Aerosol
Varredura de luz dinâmica	4nm-6 $\mu$ m	Conjunto de métodos que também pode ser usado para o potencial zeta	Menos confiável para ampla distribuição de tamanho.	Sim	Talvez
Sedimentação por centrifugação	5nm-10 $\mu$ m	Bom para amplas distribuições de tamanho	Processo Maçante.	Sim	Não
Difração por laser/ Varredura de luz estática	40nm-3 $\mu$ m	Bom para amplas distribuições de tamanho- Amplo intervalo dinâmico- medidas secas ou úmidas	Assume partículas esféricas-efeitos de forma desconhecida.	Sim	Sim
Baixa pressão de impacto e Baixa pressão de impacto elétrica	20nm-10 $\mu$ m	Medidas aerodinâmicas de diâmetro	Técnica seca e a pressão baixa, pequenos tamanhos de amostras.	Não	Sim
Varredura/análise diferencial de mobilidade	2nm-2 $\mu$ m	Bom para distribuição de tamanho	Técnica seca e a pressão baixa, pequenos tamanhos de amostras.	Não	Sim



**Conjunto de Técnicas de Análise de Partículas Aplicáveis para Sistemas de Partículas com Tamanho <100nm**

Fracionamento de fluxo de área	2nm-200µm	Boa resolução das distribuições de tamanho	Devem ser usadas em conjunto com outras técnicas	Sim	Não
Cromatografia de exclusão de tamanho	1nm-2µm	Boa resolução para pequeno volume de amostra	Lenta e necessita de boa calibração	Sim	Não
Técnicas acústicas	20nm-10µm	Bom para sistemas concentrados	Requer alta concentração e tem baixa resolução	Sim	Não
Microscopia Eletrônica	0.3nm-vários microns	Boa resolução e imagem	Artefatos de preparação da amostra e vácuo	Possível com técnicas-crio	Não
Espectroscopia de tempo de fuga de massa	1nm-3µm	Pode ser usado com laser separador para análise de composição de partícula química	Caro, dificuldade de amostragem, múltiplos detectores necessários para a série completa.	Não	Sim
Microscopia de força atômica	5nm-vários microns	Boa resolução e imagem em 3D (úmido ou seco)	Pode somente se visualizar a superfície	Talvez	Não
Área superficial específica (BET, titulação, difusão de carga).	5nm-vários microns	Simple e aplicável à maioria dos sistemas	O tamanho das partículas é calculado com base no pressuposto de monodisperso esférico sem porosidade	Somente por técnica de titulação	Sim (por alteração de difusão)

Fonte: Modificado de Power et al., (2006).

Dentre as técnicas de caracterização de amostras existentes, para avaliação toxicológica, as análises mais comuns na avaliação de meios contendo nanopartículas de Óxido de Cobre são:

- Microscopia eletrônica de transmissão (MET): Procedimento que permite observar o tamanho, a morfologia e composição das nanopartículas através de um microscópio eletrônico de alta resolução;
- Análise Brunau–Emmet–Teller (BET): Esse método é empregado para mensurar a área superficial da nanopartícula, cujo processo consiste na adsorção de moléculas de gás azoto em uma superfície sólida, que, por sua vez, permite a medição da área superficial de um material (REN et al., 2009);
- Difração de raio X: É usualmente utilizada para determinar a estrutura cristalina e investigar a estrutura fina do material. Técnica, esse que permite a coleta de informações de qualitativas e quantitativas a respeito do material observado além de permitir distinguir os diferentes estados de ordenamento da matéria (ALMEIDA, 2010); e:
- Potencial zeta: mede o plano de cisalhamento (chamado potencial zeta), seu valor está intimamente relacionado com a estabilidade da suspensão e morfologia da superfície das partículas. Por isso, é amplamente utilizada nos estudos de estabilidade do produto e na investigação da superfície de adsorção (XU, 2007). Ainda, se tratando do potencial zeta conforme Rossetto, (2012):

...a estabilidade de uma suspensão depende da quantidade de interações das NP, que resultam tantos das forças atrativas (forças de Van der Waals) como das repulsivas (eletrostática). Esta carga superficial afeta a distribuição de íons da solução na sua vizinhança que por sua vez leva ao aumento da concentração de contra íons à sua volta, formando uma dupla camada elétrica. O Pz é o potencial eletrocinético dos íons e moléculas do diluente incluso no plano de cisalhamento quando submetidos a um potencial elétrico. Em geral, suspensões com partículas de Pz alto (valor absoluto) são consideradas mais estáveis, enquanto que partículas com valor menor tendem

a se aglomerarem e coagularem, tornando-se mais instável.

Ainda, alguns estudos já vêm levantando a hipótese da possível toxicidade gerada pelos íons de cobre liberados na solução contendo nanopartículas (BLINOVA et al., 2010; ARUOJA et al., 2008). Já Perreault et al., 2010, observou nos resultados de seus estudos que o principal efeito tóxico foi provocado pelas NPs e não pelos íons de cobre. Levando-se em conta essas questões, a quantificação dos íons de cobre existentes na solução também será analisada no presente trabalho para posterior verificação do seu potencial tóxico.

## 2.6 CRITÉRIOS PARA A SELEÇÃO DE UM ORGANISMO-TESTE

Ainda que os testes toxicológicos sejam considerados uma das principais ferramentas dentro do âmbito de análise ambiental, verifica-se que nem todos os efeitos provocados no organismo poderão ser utilizados. Dessa forma existe a necessidade de que o organismo a ser testado atenda aos requisitos e critérios de seleção do organismo – teste sendo esses: disponibilidade e abundância do organismo no ambiente, facilidade no cultivo em laboratório, conhecimento da biologia da espécie. E, além disso, de preferência, que as espécies sejam sensíveis e nativas do local de desenvolvimento do teste (BOHRER, 1995).

Dentre as condições padronizadas para a seleção do organismo teste, utilizado em ensaios toxicológicos, a sensibilidade é o principal fator levado em consideração. Existe a necessidade de que o organismo apresente relativo grau de sensibilidade a uma variedade de agentes químicos, sendo o ideal que a sensibilidade seja relativamente constante de forma a possibilitar resultados precisos e com alto grau de confiabilidade.

Dessa forma, um conhecimento prévio das características biológicas da espécie é necessário, tanto para o cultivo quanto para a reprodução do teste, sendo essas: comportamento, reprodução, hábitos alimentares, fisiologia. A utilização de espécies de pequeno porte e ciclo de vida não muito longo se mostra ideal aos estudos ecotoxicológicos em laboratório (DOMINGUES E BERTOLETTI, 2006). Ainda:

Bioensaios com indicadores de ciclo de vida curtos são de interesse em todas as perspectivas

ecológicas, particularmente quando testam amostras instáveis como efluentes. Existem diversos seres que podem ser utilizados como bioindicadores, sendo que a fácil manipulação e a rapidez na realização de um ensaio são pontos chave para sua aplicação principalmente no âmbito de mercado (RUNBINGER, 2009, p.24).

Para Knie & Lopes, (2004), através de um consenso de pesquisas de maior parte dos laboratórios de ecotoxicologia espalhados pelo mundo os critérios decisivos para a seleção de um organismo – teste foram, principalmente, boas práticas com o seu manuseio, o seu grau de importância na cadeia alimentar, bem como sua ampla disseminação e fácil disponibilidade. Embora haja essa multiplicidade de critérios de seleção observa-se que:

Na toxicologia a espécie de escolha não é necessariamente aquela que apresenta mais semelhanças com o homem, mas será aquela que permitirá melhor evidenciar o tipo de efeito toxicológico pesquisado (melhor sensibilidade) (MATIAS, 2011, p. 02).

Corroborando com a premissa, ainda, é fundamental que o organismo testado tenha considerável representatividade dentro da cadeia trófica.

Rand e Petrocelli, (1985), além de confirmar o critério de o organismo ser de fácil manipulação laboratorial também fortalece que é fundamental a sua representatividade em relação a um determinado grupo de importância ecológica. Também, o organismo deve gerar populações uniformes e ser pertencente a uma família que faça parte da cadeia alimentar do ser humano.

A partir dessa perspectiva as macrófitas lemnáceas serão utilizadas nos ensaios, tanto por contemplar o fator anteriormente descrito, quanto por ser um organismo de fácil cultivo, ter crescimento rápido, ser extremamente sensível à exposição de agentes tóxicos e por já ter sido utilizada para testar a toxicidade de nanopartículas mostrando-se eficiente.

## 2.7 AS LEMNAS

A expressão “*Lemna*” designa um gênero de plantas da subfamília *Lemnoideae* (Antiga família *Lemnaceae*), e a proposição *limnus*, com origem no latim, significa lago, relacionando essas macrófitas ao seu habitat natural (SKILLICORN; SPIRA; JOURNEY, 1993). A taxonomia deste grupo de plantas vasculares causa controvérsias entre pesquisadores e tem sofrido mudanças nos últimos anos. Segundo o APGIII (Angiosperm Phylogeny Group III), a subfamília *Lemnoideae* pertencente à família Aráceae, é composta por cinco gêneros (*Landoltia*, *Lemna*, *Spirodela*, *Wolffia* e *Wolffiella*) com cerca de 40 espécies, sendo todas de hábitos aquáticos (STEVENS, 2014). Devido ao tamanho diminuto e a rara visualização de flores, a identificação das espécies é de difícil determinação e até mesmo atribuição de uma nomenclatura popular é rara no Brasil. Deste modo, pesquisadores brasileiros tentam levar o nome *lemna* para uma nomenclatura mais popular e usual, em que o termo *lemna*, grafado com letra minúscula e não seguido de “SP” seria uma nomenclatura popular para todas as espécies deste grupo. Conforme Mohedano, (2010, p.54):

Popularmente, no Brasil, estes vegetais podem ter denominações como lentilha d’água ou marrequinha, porém nota-se que em algumas regiões de Santa Catarina as populações campesinas não atribuem nenhum nome específico, apesar de conhecê-las. Muitas vezes, às chamam apenas de *alguinha*. Em inglês, o termo *duckweed* é bem difundido para designar os vegetais deste grupo, sendo encontrado em muitos trabalhos científicos.

Dessa forma, no presente estudo o termo “*lemna*” será empregado diversas vezes, desconsiderando as regras de nomenclatura científica, em que o nome de um gênero deve estar sublinhado, ou em itálico, seguido de “*sp*”.

Dentro da cadeia trófica as *lemnas* são produtores primários, servindo de alimento para pequenos animais, peixes e aves aquáticas. A seguir encontra-se descrita a sua atual classificação taxonômica:

Reino: *Plantae*

Divisão: *Angiospermae*

Classe: Monocotyledoneae

Ordem: Arales

Família: Araceae (Lemnaceae)

Sub-família: *Lemnoideae*

Atualmente existem 5 gêneros: *Lemna*, *Wolffia*, *Landoltia*, *Spirodela* e *Wolffiella* (POTT et al., 2002) e aproximadamente 40 espécies (SKILLICORN; SPIRA; JOURNEY, 1993).

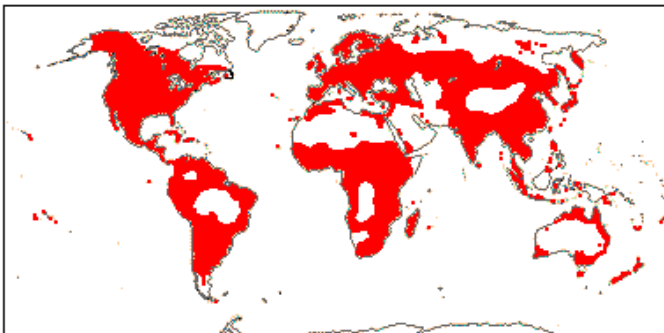
Essas macrófitas já vêm sendo objeto de pesquisas desde o século XIX proporcionando importantes contribuições para o meio científico (HEGELMAIER, 1868;). As lemnas são as menores angiospermas do mundo, de forma que alguns indivíduos podem atingir uma largura de apenas 0,3 mm na fase adulta (CROSS, 2013; LANDOLT, 1986) (Figura 3). Essas plantas crescem flutuando em ambientes lênticos de água doce ao redor do mundo, exceto em regiões permanentemente congeladas, como nos polos e picos montanhosos (Figura 4).

Figura 3: Aspecto da distribuição de uma população de macrófitas lemnaáceas.



Fonte: Autora, (2014).

Figura 4: Distribuição geográfica em que há ocorrência de lemnas. Locais com coloração vermelha são onde existe as mais diversas espécies desse organismo.



Fonte: STEVENS, (2014).

Possuem fundamental importância dentro da cadeia trófica dos ecossistemas em que habitam por fixar o carbono atmosférico dissolvido e produzir biomassa de excelente qualidade nutricional (ORON et al., 1994). Servem como uma importante fonte de alimento para os pássaros aquáticos, peixes e anfíbios (DROST, MATZKE, BACKHAUS, 2006). Essas macrófitas também já vêm sendo utilizadas em áreas de pesquisa voltadas ao tratamento de efluentes, remediação de ambientes poluídos e remoção de metais (SHARMA; GAUR, 1994; AXTELL; STERNBERG; CLAUSSEN, 2003; YILMAZ, 2006; KHELLAF; ZERDAOUI, 2010; GE et al., 2012; MOHEDANO et al., 2012; VERMA; SUTHAR, 2013). Sendo as lemnas empregadas para tais finalidades o homem acaba contribuindo para a sua propagação.

### **2.7.1. Aspectos que possibilitam o emprego das lemnas como organismo-teste.**

De acordo com as características descritas no item anterior observa-se que as macrófitas lemnáceas preenchem os principais requisitos solicitados para ser empregada como organismo-teste. Essas macrófitas são uma espécie atrativa para teste de toxicidade, não somente por causa das suas importantes funções ecológicas e ocorrência cosmopolita, mas também por serem de fácil manuseio e cultivo, por ter elevada taxa de crescimento em condições de laboratório e serem sensíveis a diferentes poluentes (DROST, MATZKE, BACKHAUS, 2006). E ainda por atenderem as condições de:

- Possuírem a maior taxa de crescimento entre os vegetais superiores;

- Demonstrarem alta sensibilidade, por apresentarem respostas rápidas de toxicidade aos testes.

De acordo com Wang, (1986), as lemnas são potencialmente adequadas para o uso em testes de toxicidade de poluição por herbicida no ambiente aquático, poluição de rios e lagos, toxicidade de sedimentos e similares. Inclusive, bioensaios com lemnas já vem sendo utilizado principalmente em ecotoxicologia para avaliar a fitotoxicidade de xenobióticos (ALIFERIS et al., 2009). São preferencialmente utilizadas em ensaios por serem facilmente cultivadas meio nutritivo definido (SHI et al., 2011). Assim as lemnas (*Lemnaceae*) possuem propriedades (pequeno tamanho, taxa de crescimento elevada e propagação vegetativa), que os tornam um excelente modelo toxicológico (NAUMANN, EBERIUS, APPENROTH, 2007).

Enfim, suas características favorecem seu uso como organismo teste em avaliações toxicológicas tanto que as mesmas já vêm sendo utilizadas para esse fim em diversos trabalhos (DROST, MATZKE, BACKHAUS, 2006; SPULLER, WEIGAND, MARB, 2006; HOU et al., 2007; NAUMANN, EBERIUS, APPENROTH, 2007; PERREAULT et al., 2010; RADIC et al., 2010; MARCHAND et al., 2011;).

Apesar de a planta ter pequenas dimensões, suas frondes são suficientemente grandes podendo contabilizadas a olho nu o que facilita a frequência de medições de padrões de crescimento (DROST, MATZKE, BACKHAUS, 2006).

Os organismos-teste mais comumente utilizados em avaliações da toxicidade de efluente industriais, por exemplo, são as algas verdes unicelulares, microcrustáceos *daphnia* e *ceriodaphnia* sp., peixes e bactérias (RUNBINGER, 2009).

Segundo Newman, (1998) citado por Boudreau et al., (2003), a *Lemna gibba* é a mais sensível, dentre outros organismos aquáticos, se tratando dos efeitos adversos de toxicidade, isso pelo fato de este organismo desempenhar funções importantes na biota aquática de água doce tal como a ciclagem de nutrientes e a transferência de energia para os maiores níveis da cadeia trófica.

Estudos indicam que as lemnas já são aptas a serem utilizadas para fins de teste de toxicidade, tanto que a *Lemna gibba* e *Lemna minor* já vêm sendo recomendadas como espécies utilizadas em normatizações de testes (WANG, 1989).

Apesar de se mostrarem vantajosas para esse fim, ainda não existe uma normatização Brasileira para o uso destes organismos em testes de toxicidade.



### **2.7.2. Normatizações de teste toxicológico com lemnas**

Os testes de toxicidade após consolidados, com os seus correspondentes organismos teste, são padronizados em seus respectivos países de origem e inseridos em documento normativo para posterior padronização internacional pela OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) e pela ISO (International Organization for Standardization), por exemplo (KNIE & LOPES, 2004). Nesse sentido os ensaios de toxicidade com o uso de macrófitas lemnáceas já vem sendo objetos de normatizações em vários países do mundo: AFNOR, (1996); ASTM, (1991); SIS, (1995); APHA, (1992). Dentre os testes já normatizados, se tratando do uso de plantas superiores, esses são preferencialmente aplicados na observação dos efeitos adversos provocados por produtos químicos (OECD 221, 2002) e águas residuárias (ISO/DIS 20079, 2004). Sendo que para tanto é fundamental que as condições ambientes requeridas para a sobrevivência das lemnáceas estejam favoráveis para o ideal desenvolvimento das mesmas e para que se encontre êxito nos resultados e procedimentos do teste. Pois dependendo das condições de cultivo elas podem se multiplicar mais rapidamente favorecendo a metodologia de ensaio toxicológico. As lemnas cultivadas em laboratório podem crescer indefinidamente desde que nutrientes, luz e água são fornecidos, produzindo assim um número ilimitado dessas macrófitas para uso imediato em testes (WANG, 1989). A temperatura também é um fator importante para o desenvolvimento da lemna, visto que esse é um importante parâmetro para que a lemna realize as atividades fotossintéticas para o seu desenvolvimento.

Tendo em vista esses fatores às normatizações mais frequentemente utilizadas em pesquisas relacionadas a ensaios de toxicidade com lemnas, OECD 221, (2002) e ISO DIS 20079, (2004), preconizam que o teste de toxicidade tem duração de sete dias de exposição do organismo teste ao agente tóxico, sendo o organismo cultivado em laboratório sob condições de pH, luminosidade e temperatura controladas. Os resultados coletados se baseiam na taxa de inibição de crescimento provocada pelo agente tóxico a que as macrófitas foram expostas. Usualmente nos ensaios, em que é utilizada a normatização ISO/DIS 20079, são desenvolvidos testes comparativos entre diferentes padrões de soluções (contaminadas e não contaminadas) e é feita uma análise dos efeitos finais sobre o crescimento vegetativo da planta. Ainda, para melhor desempenho do teste, sistemas de processamento automático de imagens também são recomendados pela norma ISO/DIS 20079.

Embora as padronizações mais usualmente utilizadas para esse fim sejam as anteriormente citadas, utilizem a inibição na taxa de crescimento através do número de frondes e duração de sete dias, já existem outros métodos de avaliação da inibição de crescimento. Perreault et al. (2010), por exemplo, testou os efeitos da toxicidade das nanopartículas de óxido de cobre sobre a atividade fotossintética das macrófitas lemnáceas, sendo que o ensaio realizado teve os resultados coletados em 0, 24 e 48 horas durante o período total de teste (48 horas). A inibição de crescimento foi avaliada através da análise da inibição da fluorescência da clorofila das plantas expostas.

Já na metodologia descrita por Greenberg, Huang e Dixon, (1992), o teste de toxicidade teve a duração de 10 dias sendo necessária a troca do meio de cultura a cada dois dias de forma que os resultados foram determinados pela avaliação da inibição de crescimento baseada na contagem das frondes ao final do ensaio.

Wang, (1986), utilizou 40 frondes para a realização do ensaio e a duração total do teste foi de quatro dias, sendo o experimento conduzido de 3 e 6 duplicatas o que totalizou 720 frondes e 1440 frondes respectivamente.

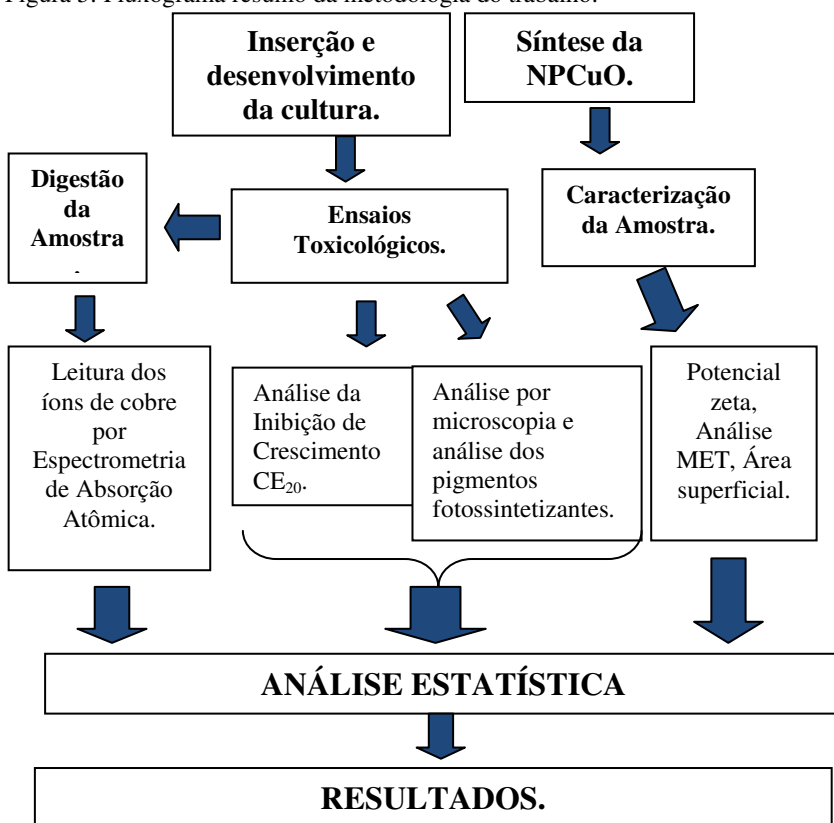
Embora existam inúmeros autores que desenvolvem diferentes metodologias de teste, para a elaboração do presente trabalho foram utilizadas as padronizadas nas normatizações ISO/DIS 20079, (2004) e OECD (2002). Sendo que essas normas foram adaptadas para o desenvolvimento da macrófita lemnácea da espécie *Landoltia punctata*.

### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 FLUXOGRAMA GERAL DA METODOLOGIA

Para um melhor entendimento dos procedimentos realizados durante a pesquisa será apresentado um fluxograma com o resumo geral de toda a metodologia. Posteriormente os referidos procedimentos serão descritos de forma detalhada (Figura 5).

Figura 5: Fluxograma resumo da metodologia do trabalho.

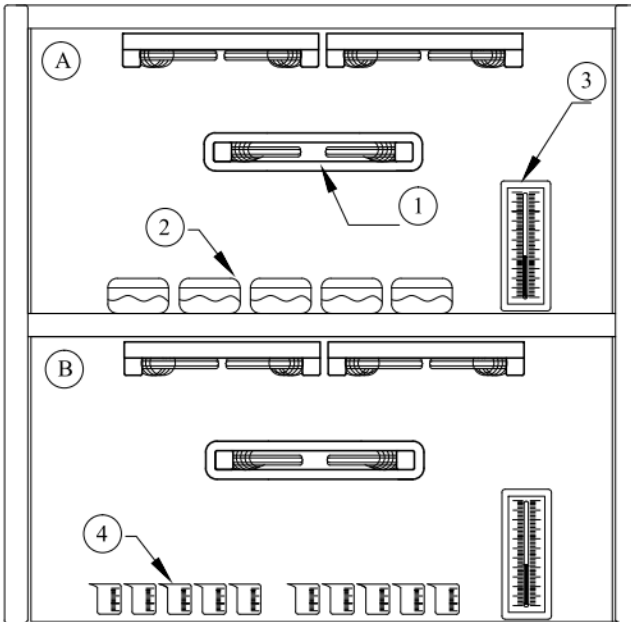


Fonte: Autora.

Para o desenvolvimento dos testes foi necessário construir uma estrutura laboratorial que atendesse as condições da normatização ISO 20079. A estrutura em questão foi montada no Laboratório de

Toxicologia Ambiental LABTOX – ENS – UFSC e contou com o uso de: seis lâmpadas fluorescentes de 25 Watts, recobrimento das paredes laterais com papel laminado e um termômetro para aferição da temperatura (Figuras 7 e 8). Posteriormente as lemnas foram alocadas em recipientes adequados para o cultivo e desenvolvimento do teste (Figuras 6, 7 e 8).

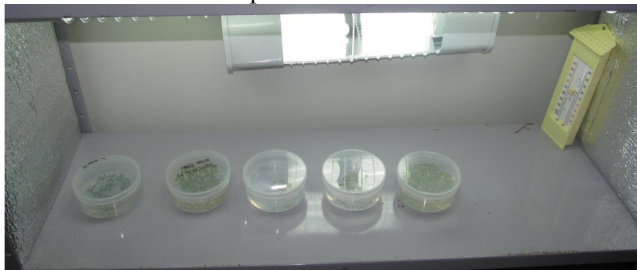
Figura 6: Esquema da estrutura piloto montada para o desenvolvimento da cultura e realização de testes com as lemnas.



Fonte: Autora.

Legenda: A) – Local em que será realizado o cultivo das lemnas, B) – Local em que serão desenvolvidos os testes de toxicidade, 1) Lâmpadas incandescentes de 25 Watts, 2) Recipientes para alocar as lemnas durante o cultivo, 3) Termômetro para controle da temperatura, 4) Becker para alocar as lemnas durante o teste.

Figura 7: Estrutura laboratorial para o cultivo das lemnas.



Fonte: Autora.

Figura 8: Estrutura laboratorial para teste com as macrófitas *Landoltia punctata*.



Fonte: Autora.

Com a estrutura concluída foram realizadas as outras etapas do experimento cujo detalhamento é apresentado na sequência.

### 3.2 ESTABELECIMENTO DA PRÉ-CULTURA

Para a realização do presente estudo foi necessário inserir no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) uma cultura de lemnas. Para isso foi necessário estabelecer uma pré-cultura da planta para ser utilizada posteriormente no ensaio. Estabelecer uma pré-cultura trata-se de manter um estoque de organismos sob as condições ambientes de teste a fim de suprir as suas demandas. Para tanto foi necessária a adaptação das lemnas retiradas do meio natural para as condições padrão de laboratório. Assim sendo foram coletados inoculos da espécie *Landoltia punctata*, oriundos de lagoas de cultivo expostas às condições climáticas naturais. Essas plantas eram utilizadas em experimentos conduzidos no Laboratório de Efluentes Líquidos e

Gasosos (LABEFLU) do ENS/UFSC. Posteriormente esses organismos foram imersos em uma solução contendo 0,5% de hipoclorito de sódio e água destilada permanecendo por 4 minutos para a sua desinfecção. Após esse processo as macrófitas foram lavadas duas vezes com água destilada. Em seguida foram alocadas, juntamente com o meio de cultura, em recipientes plásticos específicos para cultivo (volume de aproximadamente 100mL e com uma profundidade de pelo menos três centímetros). Os recipientes eram fechados para evitar qualquer tipo de contaminação (Figura 7). O meio de cultura utilizado consta na normatização da OECD (2002), cujas soluções estoque foram elaboradas com os sais designados a seguir (Tabela 3). Pelo fato de as condições de cultivo recomendadas pela ISO DIS 20079 e OECD (2004), estabelecer o uso da lemna da espécie *minor*, foram necessárias algumas adaptações para a macrófita lemnácea da espécie *L. punctata*, sendo essas a autoclavagem e 24 horas de aeração do meio (inserção de oxigênio (O<sub>2</sub>)).

**Tabela 3:** Meio de Cultura utilizado para os ensaios toxicológicos com lemna.

Substâncias	Concentrações (g.L <sup>-1</sup> )	Soluções Estoque
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	15	II
NaNO <sub>3</sub>	8,5	I
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	7,2	III
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	4,0	IV
KH <sub>2</sub> PO <sub>3</sub>	1,34	I
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,0	V
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,2	V
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,010	V
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,050	V
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,005	V
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,010	V
Na <sub>2</sub> EDTA	0,28	VI
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,168	VI

Fonte: Modificado de OECD 221, (2002).

Na sequência os volumes pré-determinados das soluções estoque para a realização do meio de cultura (conforme a normatização ISO DIS 20079) foram misturados a 900 mL de água destilada. Posterior a esse processo foi feita a correção de seu pH para  $6,5 \pm 0,2$  (OECD, 2002). Prosseguiu-se completando o volume com 1 litro de água destilada de forma a atender aos requisitos da referida norma.

As plantas foram mantidas em uma sala climatizada com temperatura controlada de 24°C ( $\pm$  2°C), sob a luminosidade de seis lâmpadas fluorescentes de 25W totalizando uma radiação de aproximadamente 8.800 lux. O total de fotoperíodo foi de 12. A troca do meio de cultura era realizada duas vezes por semana. Nesse processo as lemnas danificadas eram descartadas, mantendo-se apenas aquelas com aspecto mais saudável (OECD, 2002). O número de frondes era contabilizado diariamente juntamente com registros fotográficos. Para serem utilizadas no teste toxicológico as *L. punctata* atenderam aos seguintes critérios de saúde:

- Crescimento próximo ao exponencial;
- O número de frondes na pré-cultura aumentou aproximadamente sete vezes ao final de sete dias;
- A cultura consistiu em colônias de rápido crescimento, jovens, com coloração verde sem lesões visíveis (tais como clorose e necrose);
- Não foi observada a ocorrência de vasta quantidade de frondes isoladas o que caracteriza estresse.

Com os requisitos atendidos, as plantas permaneceram por um período de um mês de adaptação para posteriormente serem utilizadas no teste. Assim prosseguiram os procedimentos do ensaio.

### 3.3 SINTESE DA NPCuO

A síntese das nanopartículas de óxido de cobre consistiu na aplicação do método de decomposição térmica (DAS et al., 2013) com algumas alterações. O precursor foi sintetizado através da adição de uma solução de 0,6M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> em 100 mL de uma solução de 0,5M de CuSO<sub>4</sub> e ultrassônico sob temperatura de 60°C por um período de 1 hora. O produto que precipitou foi centrifugado e lavado diversas vezes para a remoção das impurezas contidas no material. Posteriormente a porção do material que precipitou foi seco sob temperatura de 70°C por um período de 12 horas. Sendo, ao final, o material resultante calcinado a 600°C por 2 horas.

### 3.4 PROCESSO DE CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE COBRE

As nanopartículas de Óxido de Cobre utilizadas no estudo foram as sintetizadas no LABTOX – ENS – UFSC.

A caracterização das soluções de nanopartículas de óxido de cobre utilizadas nos testes foi necessária para uma melhor compreensão do comportamento físico – químico resultante da interação entre essas e o meio de cultura das lemnas. Ademais o processo foi importante na avaliação e observação do tamanho da nanopartícula e dos possíveis aglomerados formados. A caracterização das suspensões, desempenhada no presente estudo foi realizada pelos seguintes processos:

- Observação dos aglomerados e do tamanho das nanopartículas em suspensão por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET),
- Observação da Área Superficial da NPCuO por Análise Brunau-Emmet-Teller (BET) com o equipamento de análise NOVA,
- Análise do Potencial Zeta pelo equipamento *Zetasizer Nano ZS*.

Seguindo alguns dos procedimentos padronizados pela normatização ISO/TR 13014:2012.

#### 3.4.1 Caracterização por microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Neste procedimento as soluções avaliadas foram a nanopartícula foi diluída nas seguintes soluções meio de cultura das lemnas (pH=6,5) e água ultrapura (pH =7). A concentração mãe de foi de 0,4 g.L<sup>-1</sup> de NPCuO em cada uma das soluções para adquirir uma melhor visualização da nanopartícula, visto que a altas concentrações a grade de carbono absorvia excesso de nanopartículas dificultando a sua observação.

Para a realização da análise das amostras por microscopia eletrônica de transmissão foi necessário primeiramente preparar a amostra e a grade de carbono em que o material foi inserido. Para tanto as suspensões foram preparadas e ultrasonicadas a partir de um Desruptor de Células – Ultrassônico (sonicador). As amostras foram alocadas sobre um agitador magnético no interior do equipamento ultrassônico e sonicadas por um período de 30 minutos. Esse desruptor



ultrassônico (UNIQUE – 100W) trabalhou a potência máxima de 60% (Figura 9).

Figura 9: Imagem do sonicador UNIQUE – 100W.



Fonte: Autora.

Na sequencia foram gotejadas sobre uma grade de carbono – Cu (300 meshes). Posteriormente passaram pelo processo de secagem em um dissecador a vácuo permanecendo por um período de 24 horas. A quantificação dos diâmetros dos aglomerados de NPCuO nas soluções foi realizada com o uso do *software imageJ*. Para a análise foi utilizado o microscópio eletrônico de transmissão MET (JEM-1011) (Figura 10), localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

Figura 10: Microscópio eletrônico de transmissão.



Fonte: LCME – UFSC, (2013).

### 3.4.2 Análise do potencial zeta

A verificação do potencial Zeta da solução cuja realização contou com o apoio do Laboratório de Catálise Biomimétrica (LaCBio) pertencente ao departamento de química da Universidade Federal de Santa Catarina.

As nanopartículas, como todas as partículas em geral, adquirem carga elétrica em sua superfície quando em solução. Essas são geradas a partir da teoria do DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) que propõe a força proveniente das superfícies carregadas quando em processo de interação com o meio líquido (ROSSETTO, 2012). Esse fundamento define que a estabilidade de uma suspensão é dependente do número de interações que resultam tanto das forças de *Van der Waals* como das eletrostáticas. Sendo assim o potencial Zeta trata-se do potencial eletrocinético das moléculas e íons do diluente incluso em seu plano de cisalhamento quando sob ação de um potencial elétrico.

De acordo com o exposto anteriormente a análise possibilitou determinar o quão estável era a suspensão a partir do potencial zeta e observar os tamanhos dos aglomerados formados na solução. Assim o preparo da amostra consistiu no mesmo procedimento realizado para a análise por MET. Sendo que ao final realizou-se uma diluição de 10 vezes da solução resultante.

Por intermédio dessa análise foi possível observar a estabilidade da amostra contendo a solução mãe de NPCuO. Os valores de Potencial Zeta foram apreciados com o uso do equipamento *Zetasizer Nano ZS* (Figura 11). Na qual foram analisadas duas amostras, uma solução com o meio de cultura e as NPCuO e outra solução contendo a NPCuO e água ultrapura. Os resultados foram obtidos da média dos potenciais observados em três leituras pelo equipamento *Zetasizer*.

Figura 11: Equipamento zetasizer nano ZS.



Fonte: LACBIO EQA – UFSC.

### 3.4.3 Análise da área superficial

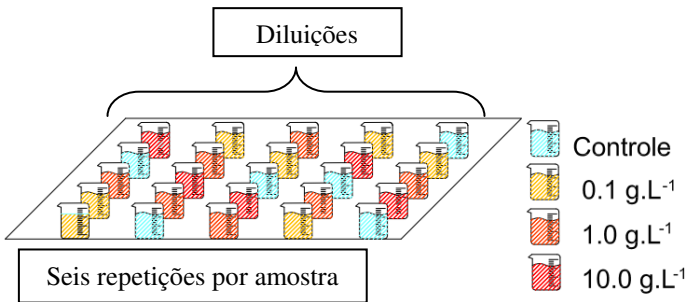
O procedimento para a observação da área superficial da nanopartícula no estado seco (em pó) foi realizada por Análise Brunau–Emmet–Teller (BET) no laboratório de materiais elétricos (LaMaTe). Esse aparelho está localizado no Departamento de Engenharia Elétrica situado nas imediações da UFSC. As amostras de NPCuO foram preparadas a uma temperatura de 150°C a vácuo. O tempo de reação foi de uma hora comum total de 14 pontos ( $p\ p^{\circ}$ ), 7 de adsorção e 7 de dessorção, por meio de injeção de nitrogênio líquido. A área superficial específica foi calculada através do software do equipamento por meio da equação BET. Esse processo foi realizado com o auxílio do equipamento *NOVA Surface Area Analyzer* (Quantachrome Instruments).

## 3.5 ENSAIO DE TOXICIDADE

O teste de toxicidade foi realizado de acordo com os procedimentos padronizados pela normatização ISO/DIS 20079 e OECD (2004) (ANEXO 01) cabendo algumas adaptações eventuais. As

condições ambientais de luminosidade, temperatura, pH, permaneceram as mesmas da pré-cultura. O procedimento de teste consistiu no inóculo do organismo-teste em concentrações de 0,1, 1,0 e 10,0 g.L<sup>-1</sup> que partiram de diluições de uma solução mãe de 20 g.L<sup>-1</sup> de NPCuO. A nanopartícula de óxido de cobre utilizada foi a sintetizada pelo LABTOX – ENS – UFSC. Sendo que uma das amostras foi o controle negativo (sem a substância tóxica) para possibilitar a comparação dos efeitos e cálculo da CE<sub>20</sub>. O organismo permaneceu exposto à substância testada por um período total de sete dias. Sendo que cada amostra foi replicada seis vezes para a obtenção de melhor precisão estatística dos resultados. Em cada amostra foram inseridos um total de 10 frondes saudáveis *L. punctata* formado de colônias de 2 e 3 frondes e os frascos contendo o organismo foram dispostos de forma randômica (Figura 12).

Figura 12: Representação das unidades experimentais utilizadas para o procedimento de ensaio de toxicidade



Fonte: Autora.

Posteriormente foi realizada a análise dos possíveis efeitos provocados pelas nanopartículas de Óxido de Cobre sobre a macrófita. Sendo o foco principal o efeito relativo à inibição da taxa de crescimento da planta.

#### *Preparação da amostra*

Referente às primeiras concentrações que foram escolhidas, essas estavam no limiar conforme a concentração que causa maior efeito, e, inibição em 50% dos organismos EC<sub>50</sub> de acordo com estudos de Perreault, Samadani e Dewez (2013) e Shi et al. (2011), respectivamente (0,032 g.L<sup>-1</sup> e 0,8mg.L<sup>-1</sup> respectivamente). Porém depois de uma bateria

de testes foi possível verificar que nesse limiar de concentração de NPCuO não provocava efeito. Dessa forma, após uma bateria de testes aumentando a concentração de nanopartícula de óxido de cobre nas soluções, foram definidas as concentrações que fariam maior efeito. Sendo essas 0.1; 1.0 e 10.0 g.L<sup>-1</sup> de NPCuO.

#### *Metodologia de monitoramento do teste*

Coletadas e escolhidas as colônias que apresentaram aspecto mais saudável foi necessário manter um controle referente à quantificação das frondes no decorrer do período do teste. Esse número foi quantificado e registrado para posterior cálculo da taxa de inibição de crescimento. Primeiramente foram realizados testes com a substância referência da norma (KCl) até que se encontrasse o CE<sub>50</sub> padronizado pela ISO 20079 para se certificar que a sensibilidade do organismo estava adequada para prosseguir com o procedimento de teste. Posteriormente, e, antes da coleta dos resultados finais, foi realizada uma bateria de testes preliminares até que se encontrasse um CE<sub>20</sub> referente à quantidade de frondes constante em cada um dos tratamentos. Outros parâmetros de observação ainda foram levados em conta no procedimento de teste tais como peso seco e peso úmido da planta.

#### *Determinação do número de frondes*

O monitoramento do teste, para a verificação dos efeitos tóxicos se deu através da determinação das taxas de crescimento, dos pigmentos fotossintetizantes e de alterações citológicas. Para avaliar a inibição de crescimento as frondes foram contabilizadas no início do experimento (t=0) bem como no decorrer dos sete dias de observação (t=7), sendo que nesse processo foram contabilizadas todas as frondes visíveis. Concluído o procedimento foi iniciada a estimativa das concentrações que resultaram na inibição de crescimento da macrófita.

#### *Cálculo da taxa de crescimento, valores de inibição e CE<sub>20</sub>*

Em posse dos valores dos parâmetros de números de frondes (valores esses obtidos no início e no final do teste), foi calculada a taxa de crescimento por dia, através dos procedimentos recomendados pela normatização da ISO/DIS 20079 (2004) (Equação 1).

$$r_{(i-j)} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t_j - t_i} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde:

- $r_{(i-j)}$  : Taxa média de crescimento específico do momento  $i$  para o  $j$ ;
- $N_i$  : Número de frondes observados nas amostras teste ou controle ao início do teste;
- $N_j$  : Número de frondes observados nas amostras teste ou controle ao final do teste;
- $t_i$  : Tempo do momento do início do período de teste;
- $t_j$  : Tempo do momento do fim do período de teste.

A taxa de crescimento foi estimada para cada uma das replicações de cada amostra separadamente. Ao final a percentagem de inibição de crescimento das amostras testadas foi estimada pela taxa de crescimento média dos grupos controle e tratamento. Esses valores foram inseridos na Equação 2 (abaixo) de inibição de crescimento, e, com esses valores foi elaborado o gráfico de inibição de crescimento e geradas as curvas da concentração resposta.

$$\%I_r = \frac{r_c - r_T}{r_c} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

- $\%I_r$  : Percentual de inibição da taxa média de crescimento;
- $r_c$  : Valor da média da taxa de crescimento da amostra controle;
- $r_T$  : Valor da média da taxa de crescimento da amostra exposta a NPCuO.

#### *Elaboração das curvas de concentração resposta*

Com os valores dos percentuais de inibição de crescimento foi elaborado o gráfico que relacionou:

- $\%I_r$  X concentração (inibição de crescimento).

A partir das curvas resultantes do gráfico elaborado, foram estimados os valores de  $CE_{20}$  com o método matemático de regressão não linear.

#### *Estimativa dos valores de $CE_{20}$*

O valor de  $CE_{20}$  foi estimado através do método de regressão não linear da curva de concentração-resposta construída com o uso do software *Statistica* (versão 10, 2011). Procedimento realizado conforme

o requerido em norma (ISO 20079 e OECD 221). As taxas de crescimento utilizadas para o cálculo de inibição foram as médias de seis amostras controle e amostras teste. Sendo essas seis amostras retiradas da relação da realização de três experimentos independentes (n=6). Os erros indicados foram erros padrão da média ou percentagem do intervalo de confiança de nível 95%. A percentagem de inibição de crescimento para cada concentração teste foi calculada da taxa média de crescimento dos grupos controles dos grupos tratamento.

#### *Análise estatística*

Os experimentos foram realizados com um total de seis réplicas para todas as amostras. As médias e os desvios padrão foram estimados para cada tratamento. As diferenças significativas foram determinadas com o uso da análise de variância pelo *one way* ANOVA e posterior teste de Tukey.

### 3.6 AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS

Com o intuito de compreender melhor os motivos que induziram a inibição de crescimento da planta com base no número de frondes, foi realizado um estudo das alterações ultraestruturais e morfológicas da planta. Para tanto se utilizou os processos de microscopia, no qual foi possível visualizar os danos provocados na macrófita.

#### **3.6.1. Microscopia de luz e histoquímica**

Com o objetivo de verificar possíveis alterações nas plantas expostas às NPCuO realizou-se diversas avaliações por métodos de microscopia óptica. A realização das análises citoquímicas e morfológicas contou inicialmente com o procedimento de corte das frondes das plantas submetidas ao teste em fragmentos de aproximadamente 5mm. Posteriormente essas amostras foram fixadas em uma solução de paraformaldeído 2.5% em tampão fosfato 0.1M, pH 7.2, *overnight* (SCHIMIDT et al., 2009). As amostras após serem fixadas foram lavadas duas vezes com tampão fosfato, sob temperatura ambiente, por um período de 10 minutos (BOUZON, 1993). Posteriormente as amostras foram desidratadas em séries de concentrações crescentes de etanol. A infiltração preliminar do material contou com historesina glicolmetacrilato (GMA) 1:1 em álcool 100% e posteriormente infiltrou-se resina pura (Leica Historesin, Heidelberg,

Alemanha). Posterior ao processo de polimerização as amostras foram seccionadas em um micrótomo manual de parafina (Leica RM 2135), sendo que a secção foi realizada com navalha de tungstênio e os cortes resultantes tinham a espessura de 5µm. As secções resultantes foram coradas com diferentes testes citoquímicos (citados a seguir) e observadas com auxílio de um microscópio Epifluorescent (Olympus BX 41). Sendo esse equipado com o sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, EUA).

#### *Testes citoquímicos*

As secções das amostras controle e tratamentos da macrófita lemnáceas foram coradas com os reagentes:

- Ácido Periódico de Schiff (PAS), que foi utilizado a fim de identificar a presença de polissacarídeos neutros (amido e celulose) (GAHAN, 1984);

Na sequencia continuaram os procedimentos para preparo das amostras para serem analisadas por microscopia eletrônica de transmissão.

### **3.6.2. Microscopia eletrônica de transmissão**

Para a análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET) as amostras de lemnas, com aproximadamente 5mm oriundas do grupo controle e dos tratamentos, foram fixadas em uma solução de glutaraldeído 2.5%, sacarose 2.0%, tamponadas com cacodilato 0.1 M (pH 7.2), pós fixadas em 1% tetróxido de ósmio por 4 horas e desidratadas em uma série de concentrações crescentes de acetona (SCHMIDT et al., 2009). Posterior à desidratação o material foi infiltrado em resina Spurr (SPURR, 1969). Em seguida as secções ultrafinas foram constatadas com acetato de uranila e citrato de chumbo conforme os procedimentos descritos por Reynolds (1963). As amostras foram analisadas e registradas através de fotos em um microscópio eletrônico de transmissão modelo Jeol (JEM) 1011 (JEOL Ltd., Tóquio, Japão, a 80kV), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – (LCME) da UFSC.

Ao final, prosseguiu-se então com os procedimentos necessários para o preparo das amostras para observação por microscopia eletrônica de varredura.

### **3.6.3. Microscopia eletrônica de varredura**

Para a análise das amostras por microscopia eletrônica de varredura (MEV) as amostras foram processadas e fixadas com a mesma



metodologia utilizada para análise MET. Contudo a desidratação foi realizada em séries etanólicas e secas em ponto crítico EM-CPD-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha). Posteriormente os materiais foram aderidos a um suporte metálico e metalizados (Metalizador Blatec, CED 030) com ouro. Subsequentemente as amostras foram observadas e registradas com foto em MEV JEol 6390 LV (JEOL Ltd., Tokio, Japão, a 20kV) no LCME – UFSC.

A análise dos elementos químicos existentes em cada uma das amostras foi realizada com o uso do MEV (NORAN System 7) acoplado a uma energia dispersiva espectrométrica de raio X (MEV-EDX). Essa apreciação foi efetuada para observar qualquer alteração (ou produção) dos elementos químicos existentes nas paredes celulares das plantas devido a exposição à NPCuO.

### 3.7 ANÁLISE DOS PIGMENTOS FOTOSSINTETIZANTES.

#### 3.7.1. Clorofila *a*, *b* e total

Os pigmentos fotossintéticos da lemna foram analisados do peso úmido (PU) das amostras coletadas imediatamente após o término do período de exposição (sete dias). Em seguida congeladas em nitrogênio líquido e, posteriormente, mantidas a temperatura de 40°C até estar pronta para o uso.

Clorofila *a*, *b* e total, foram extraídas de aproximadamente 0.500 g de peso úmido (n=8) em 3 mL de dimetilsulfoxido (DMSO, Merck, Darmstadt, FRG) a temperatura de 40°C durante 30 minutos com o uso de um homogeneizador de tecido de vidro (Hiscox and Israelstam 1979; Schmidt et al. 2010a). O cálculo e quantificação dos pigmentos foram realizados espectrofotometricamente de acordo com Wellburn (1994).

#### 3.7.2. Carotenóides totais

Os carotenóides totais foram extraídos por extração exaustiva de 0.500 g de peso úmido de amostra (n=8) inserida em 3 mL de metanol puro (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O extrato metanólico bruto foi evaporado a fim de concentrar os extratos. A absorbância específica foi determinada com uma microplaca espectrométrica Tecan (Infinite® M200 PRO, Männedorf, Switzerland) a 450 nm. A concentração total de carotenóides foi calculada com base na norma da curva  $\beta$ -carotene (1 - 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ;  $y = 0.00365x$ ;  $r^2 = 0.999$ ).

### 3.8 QUANTIFICAÇÃO DOS ÍONS DE COBRE, PESO SECO E PESO ÚMIDO.

Com o intuito de avaliar a absorção de cobre pelas lemnas durante os testes e conseqüentemente a bioacumulação deste metal foram realizadas análises para a sua quantificação. Assim os íons de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) foram analisados e quantificados pelo método de Espectrometria de Absorção Atômica Forno de Grafite (FGAAS) e por Espectrometria de Absorção Atômica por Chama (FAAS), cujo equipamento (Figura 13) está incorporado ao Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA) no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental localizado na UFSC.

Figura 13: Aparelho de espectrometria de absorção atômica.



Fonte: RESTREPO, (2013).

O processo para determinação dos íons de cobre totais na biomassa foi desenvolvido segundo a metodologia descrita por Perreault, Samadani e Dewez (2013). Essa metodologia consistiu na coleta de 20 frondes da macrófita provenientes de cada uma das amostras ao final do período de teste. Posterior à coleta as plantas foram lavadas três vezes com 10 mM de EDTA. Na sequência os tubos de vidro, previamente lavados com ácido utilizados para alocar as macrófitas, foram pesados vazios. Imediatamente após a pesagem as plantas foram alocadas nos referidos tubos. Após os tubos com as macrófitas foram inseridos na estufa para secagem a uma temperatura

constante de 105°C. Já secos os tubos foram pesados novamente e o peso seco (PS) do tubo foi subtraído do peso seco da biomassa da planta. Em seguida da pesagem do PS foram adicionados a amostra 2 mL de HNO<sub>3</sub> e 0.25 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e submetidos a temperatura de 120°C *overday* para digestão. As amostras foram posteriormente diluídas para 10% de HNO<sub>3</sub> com água ultrapura. Ao final o cobre total existente em cada uma das amostras foi determinado por espectroscopia de absorção atômica forno de grafite. As concentrações de cobre foram expressas como miligrama de cobre por miligrama de peso seco da planta.

O peso úmido foi quantificado coletando-se as lemnas ao final de sete dias de teste. Posterior à coleta foi quantificado o peso úmido (PU) das plantas. Para a determinação do peso úmido realizou-se a secagem da superfície de um total de 33 lemnas de cada tratamento em toalhas de papel para posterior pesagem.

O procedimento seguinte consistiu na quantificação dos íons de cobre totais existentes nas soluções com a NPCuO diluída, cuja leitura foi realizada no espectrômetro de absorção atômica por chama. Processo esse realizado para um melhor entendimento dos efeitos tóxicos. Para tanto foi utilizada a Metodologia padronizada pelo EPA que se refere à digestão para absorção atômica de chama n° 3010A (USEPA,2007).

### 3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DE TODOS OS PARÂMETROS AVALIADOS.

Todas as análises foram realizadas com o software *Statistica* (versão10, 2011) através da realização do teste de Tukey *one way* ANOVA, com os valores com  $p < 0.05$  considerados significativos.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 TAXA DE CRESCIMENTO

#### 4.1.1. Pré-cultura de lemna *Landoltia punctata*

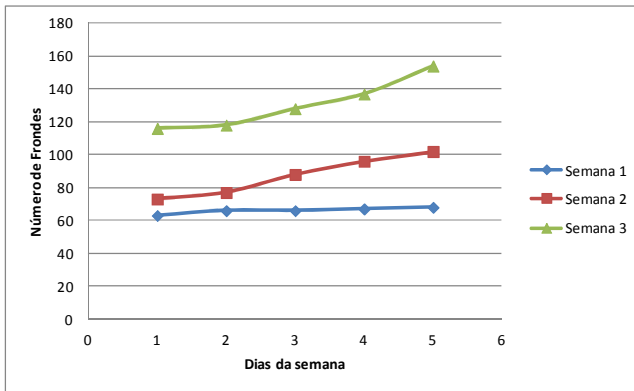
Observou-se, durante o estabelecimento da pré-cultura que as condições de cultivo favoreceram o desenvolvimento organismos indesejados, ou seja, contaminações por fungos ou microalgas. E essas contaminações poderiam vir a prejudicar a confiabilidade dos resultados provenientes do ensaio. Sendo assim foi necessária a sua total remoção para o estabelecimento de uma cultura axênica. Após observar que temperaturas mais altas, ocasionadas pelas lâmpadas, favoreciam ainda mais o surgimento desses organismos. Dessa forma esse parâmetro foi constantemente monitorado com o intuito de inibir o crescimento desses organismos. A premissa também motivou a realização do processo de desinfecção das lemnas durante a troca do meio de cultura além de diversas medidas de assepsia, como autoclavagem de todos os materiais e limpeza da bancada com hipoclorito de sódio. Após o aprimoramento dos procedimentos constatou-se a ausência de contaminações, permitindo a continuidade dos testes.

Com os requisitos estabelecidos pela normatização ISO 20079 atendidos (demonstrados na Tabela 4 e Figura 14), a cultura já estava apta para ser utilizada nas avaliações toxicológicas. Na Figura 14, correspondente a um dos meses de monitoramento do crescimento, observa-se que a curva acende gradativamente no decorrer das semanas. Fator esse que corrobora com os requisitos recomendados pela normatização para a aplicação do ensaio toxicológico.

Tabela 4: Monitoramento do crescimento das frondes no decorrer das três primeiras semanas de dezembro de 2012.

Semanas	segunda	terça	quarta	quinta	sexta
1ª	63 frondes	66 frondes	66 frondes	67 frondes	68 frondes
2ª	73 frondes	77 frondes	88 frondes	96 frondes	102 frondes
3ª	116 frondes	118 frondes	128 frondes	137 frondes	154 frondes

Figura 14: Gráfico com o comportamento das curvas de crescimento das lemnas referente ao monitoramento de dezembro de 2012.



Fonte: Autora.

## 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

### 4.2.1. Avaliação por microscopia eletrônica de transmissão

Conforme Rossetto (2012), a nanopartícula quando em contato com um meio diluente (água ultrapura, por exemplo) tende a formar aglomerados. Esses, em geral, ocorrem devido as suas grandes áreas superficiais e reatividade.

Levando em consideração a premissa, nota-se que nas figuras 15c e 15d, em que a NPCuO foi diluída no meio de cultura das lemnas os aglomerados apresentaram diâmetro médio na faixa de 400 a 500nm. Já na imagem 15a e 15d, em que a NP foi diluída em água ultrapura os aglomerados formados apresentaram diâmetro médio entre 600 e 700nm (Tabela 5).

Tabela 5: Resultados obtidos por análise por MET.

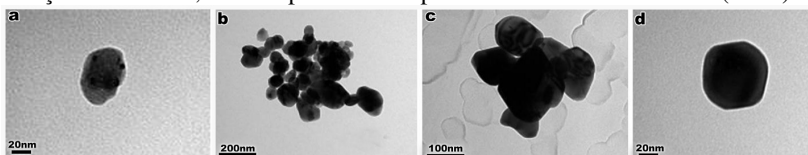
Amostras	Aglomerados (nm)	Partículas (nm)
CuO-NP + Meio de cultura	400-500	60-70
CuO-NP + Água ultrapura	600-700	50-40 <sup>b</sup>

O resultado encontrado pode estar relacionado ao fato de os diluentes apresentarem valores de pH diferentes. Ademais, na composição do meio de cultura existem diferentes reagentes que podem

ter influenciado no tamanho e na união das nanopartículas em solução. Conforme os resultados a nanopartícula indicou boa dispersão em suspensão. As partículas apresentaram tamanho significativamente superior (até seis vezes maior) à faixa de tamanho que são comumente descrita nos trabalhos (ZHA et. al., 2007; WEXLER, 2009).

Devido ao grande tamanho e alta densidade, observou-se que as nanopartículas sedimentavam e se aglomeraram no fundo do recipiente de ensaio após aproximadamente 15 minutos do início do teste.

Figura 15: Imagens da nanopartícula de óxido de cobre, diluídas em duas soluções diferentes, obtidos por microscopia de transmissão eletrônica (MET).



Fonte: Autora. Legenda: Letras (a) e (b) estão relacionadas a NPCuO diluída em água ultrapura (pH=7) e as letras (c) e (d) se referem a nanopartícula de óxido de cobre diluída no meio de cultura (pH=6,5).

#### 4.2.2. Potencial zeta

Através dessa análise foi possível determinar a estabilidade das soluções e o tamanho dos aglomerados identificados nas amostras.

Referente aos valores do Potencial Zeta encontrados para as duas amostras (Tabela 6, APÊNDICE I), esses indicam que a amostra mais estável é a da NPCuO diluída no meio de cultura.

Tabela 6: Valores do potencial Zeta das amostras estudadas. Média  $\pm$  DP (n = 3). As letras indicam as diferenças significativas de acordo com one-way Anova e um posterior teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Soluções	Potencial zeta(mV)
CuO-NP + Meio de cultura	-20.4 $\pm$ 0.35 <sup>a</sup>
CuO-NP + Água ultrapura	-12.7 $\pm$ 1.12 <sup>b</sup>

Para esta análise considera-se o valor mais afastado de zero como sendo o mais estável ou com maior carga. Os referidos laudos resultantes desta análise encontram-se no apêndice A do presente trabalho. O valor encontrado do potencial zeta para a amostra “meio de cultura lemna + NPCuO” corrobora com resultado encontrado por Perreault, Samadani e Dewez (2013), que foi de -39,7  $\pm$  3.8 mV em um

meio de cultura cujos componentes foram os mesmos utilizados no meio de cultura do presente estudo.

### 4.2.3. Área Superficial

A área superficial encontrada da nanopartícula em estudo foi de  $10,45 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . O valor de nanopartícula encontrado é muito relativamente inferior ao geralmente encontrado na bibliografia estudada. Esse pode justificar a causa do uso de maior quantidade de NP para se observar os efeitos tóxicos no presente estudo. Shi et al., (2011), por exemplo, encontrou uma área superficial de NPCuO no valor de  $141,1 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ . No entanto a metodologia de síntese do autor descrito foi diferenciada da do presente estudo. A metodologia de síntese pode influenciar no tamanho característico da nanopartícula, mesmo que sendo o mesmo metal.

## 4.3 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA

Em relação à avaliação da taxa de crescimento como indicador de toxicidade, as NPCuO conferiram um efeito tóxico relativamente baixo sobre os organismos-teste expostos. Contudo, esta taxa apresentou diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos e o grupo controle. As taxas de crescimento com base no número de frondes (NF) são apresentadas na Tabela 6.

Tabela 7: Valores de taxa de crescimento da *L. Ladoltia punctata* após o período de exposição a NPCuO. Média  $\pm$  DP (n = 6). As letras indicam as diferenças significativas de acordo com one-way Anova e um posterior teste de Tukey ( $p \leq 0,05$ ).

Parâmetro	Controle	0.1 g L <sup>-1</sup>	1 g L <sup>-1</sup>	10 g L <sup>-1</sup>
Taxa de Cresc. (r)	0.16 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	0.12 $\pm$ 0.01 <sup>b,c</sup>	0.13 $\pm$ 0.01 <sup>a,b</sup>	0.09 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>

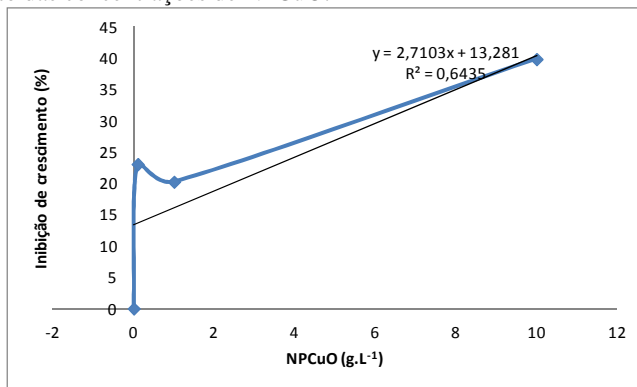
Os parâmetros foram quantificados no início (t=0 d) e fim do teste (t=7 d). Os resultados encontrados foram diferentes do esperado. Fator esse que pode ser atribuído ao fato de as nanopartículas utilizadas apresentarem tamanho elevado e rápida sedimentação. Pelo fato de a lemna ser uma macrófita aquática e flutuante, a planta se encontrava na superfície das amostras o que dificultou o contato com a NP. Essa premissa pode ser comprovada nas análises de microscopia (item 4.5) em que e não foi visualizada nanopartículas no interior da planta. Os resultados apresentaram concentrações superiores a resultados já



encontrados em outros estudos no qual foi utilizada a mesma espécie de macrófita e mesma NP (SHI et al., 2011) que uma concentração de efeito no limiar de concentração de  $2,0 \text{ mg.L}^{-1}$ . Outros autores que pesquisaram lemnas de diferentes espécies e com diferentes nanopartículas obtiveram efeitos com concentrações bastante abaixo que a do presente estudo. Gubbins, Batty e Lead (2011), por exemplo, verificou a redução do crescimento da lemna da espécie *minor* decair a metade quando exposta a uma concentração de  $160 \mu\text{g.L}^{-1}$  de nanopartícula de prata comparando com as concentrações de  $0\text{-}40 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

O valor de  $CE_{20}$  encontrado foi de  $0,085 \text{ g.L}^{-1}$ , contudo a maior inibição de crescimento de  $39,9\%$  pode ser visualizada na solução com maior concentração de NPCuO ( $10,0 \text{ g.L}^{-1}$ ). Através desse resultado também foi possível visualizar que até a concentração de  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  a inibição de crescimento se deu de forma acelerada (Figura 16). Posteriormente a inibição de crescimento tem uma leve queda, e depois cresce novamente, porém de forma mais lenta. Mostrando que concentrações maiores que  $0,1 \text{ g.L}^{-1}$  a inibição de crescimento ocorreu mais lentamente.

Figura 16: Curva resposta da taxa inibição de crescimento da planta com o aumento das concentrações de NPCuO.



Fonte: Autora.

Em geral, maior parte dos trabalhos, encontram as concentrações das soluções com nanopartícula que inibem  $50\%$  do crescimento da planta. No presente trabalho mesmo  $CE_{50}$  não foi encontrado mesmo a altas concentrações. Shi et al., (2011), por exemplo, encontrou uma  $CE_{50}$  no valor de  $0,8 \text{ mg.L}^{-1}$  trabalhando com a mesma espécie apresentada na presente pesquisa. O valor anteriormente descrito não corrobora com o

presente trabalho que apresentou concentração de efeito superior. Outros estudos voltados à toxicidade de nanopartículas sobre macrófitas lemnáceas de diferentes espécies apresentaram valores de  $CE_{50}$  em valores inferiores ao do presente estudo ( $CE_{50}$  de 139, 5 e  $125,3\mu\text{g.L}^{-1}$  de NPAg para a *L. minor*, GUBBINS; BATTY; LEAD, 2011). Assim sendo o efeito pode ser atribuído ao íon  $\text{Cu}^{2+}$ , isso pelo fato de a nanopartícula sedimentar durante o período de teste e liberar íons de cobre quando em solução e também pelo fato de não ter sido encontrada NP no interior do organismo como será demonstrado nos itens a seguir (itens 4.6 e 4.5 respectivamente).

#### 4.4 QUANTIFICAÇÃO DOS PIGMENTOS.

##### 4.4.1. Análise de pigmentos fotossintetizantes.

Os valores dos pigmentos fotossintéticos das amostras das frondes das lemnas controle e tratadas com NPCuO são apresentadas na Tabela 8. O conteúdo mais alto de clorofila *a* e *b*, e, clorofila total foi observado na amostra controle. As plantas expostas as concentrações de nanopartícula demonstraram diminuição gradativa dos pigmentos (clorofila *a* e *b*). Esses resultados corroboram com estudos já realizados em que foi observado efeito similar nessa macrófita quando exposta a altas concentrações de cobre (YANKUI et al., 2011).

Verificou-se um decréscimo no conteúdo de carotenoides totais na amostra de concentração de  $10.0\text{ g.L}^{-1}$ , embora nos outros tratamentos o nível desse pigmento tenha aumentado. O decréscimo do conteúdo de carotenoides na concentração mais elevada das amostras teste pode estar relacionado a danos que levaram a limitação das funções vitais da planta.

Elevadas concentrações de cobre causam amarelamento das frondes das lemnas (Shi et al., 2011). No presente estudo verificou-se decréscimo gradativo da concentração do pigmento clorofila das amostras controle para as amostras tratadas. Corroborando com outras pesquisas que também demonstraram perda do conteúdo de clorofila proveniente da exposição da lemna a nanopartículas (PERREAULT et al. 2010, PERREAULT, SAMADANI E DEWEZ 2013; PRASAD et al. 2001).

Com relação ao aumento dos níveis de carotenoides até a concentração de  $1.0\text{ g.L}^{-1}$  de nanopartícula (Tabela 8) pode ser atribuído ao aumento do uso dos mecanismos de proteção do sistema

fotossintético da planta (BIGGS, KOSSUTH, 1980; SCHMIDT, 2011). Fato esse que pode ser observado com as alterações nos tilacóides como será apresentado a seguir (Figura 20).

Tabela 8: Conteúdo de pigmento fotossintético ( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  PS) da lemna após sete dias de exposição a NPCuO. Média  $\pm$  DV (n = 8). As letras indicam a significancia de acordo com *one way* ANOVA e posterior teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Pigmentos	Controle	0.1 g L <sup>-1</sup>	1 g L <sup>-1</sup>	10 g L <sup>-1</sup>
Clorofila a	174,65 $\pm$ 4,3 <sup>a</sup>	115,25 $\pm$ 0,9 <sup>c</sup>	136,81 $\pm$ 2,1 <sup>b</sup>	129,43 $\pm$ 5,3 <sup>d</sup>
Clorofila b	8,62 $\pm$ 5,2 <sup>a</sup>	51,35 $\pm$ 1,7 <sup>c</sup>	60,50 $\pm$ 1,6 <sup>b</sup>	33,84 $\pm$ 2,5 <sup>d</sup>
Clorofila Total	255,27 <sup>a</sup>	166,60 <sup>c</sup>	197,31 <sup>b</sup>	163,27 <sup>c</sup>
Carotenóide total	193,60 $\pm$ 5,2 <sup>c</sup>	268,78 $\pm$ 4,7 <sup>b</sup>	318,24 $\pm$ 3,7 <sup>a</sup>	141,45 $\pm$ 5,1 <sup>c</sup>

Embora não tenha sido observada uma inibição significativa no crescimento dos organismos expostos, quando comparadas ao controle, notou-se perda de coloração entre as amostras. À medida que a concentração da substância testada aumenta maior a perda de cor das frondes da macrófita (Figura 17).

Figura 17: Detalhe das lemnas após o período de sete dias de exposição a NPCuO (controle e tratamentos).



Fonte: Autora. Legenda: **a** Amostra controle; **b** amostra 0,1 g.L<sup>-1</sup> de NPCuO; **c** amostra 1,0 g.L<sup>-1</sup> de NPCuO e **d** amostra 10,0 g.L<sup>-1</sup> de NPCuO.

Nas imagens apresentadas na Figura 17 pode-se observar coloração menos intensa em duas das amostras (imagens b e c) quando comparadas ao controle. Da mesma forma, na imagem d, pode-se notar a perda de coloração conjunta com a quantidade de colônias isoladas o que remete ao estresse ambiental de acordo com as normatizações utilizadas no presente trabalho (ISO DIS 20079, 2004 e da OECD 221, 2002).

#### 4.5 ANÁLISES POR MICROSCOPIAS

#### **4.5.1. Observação através de microscopia de luz e histoquímica.**

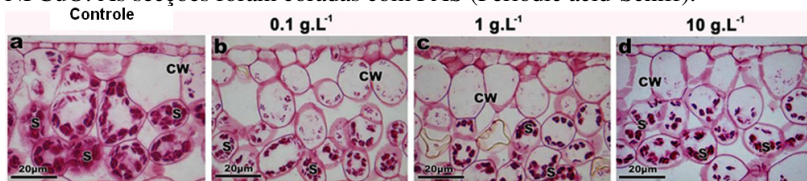
Em geral os produtos da fotossíntese que não são utilizados pelo metabolismo celular são armazenados na forma de grãos de amido no interior das células. Com relação à presença de compostos celulósicos, essa reação é demonstrada pela reação positiva nas regiões da camada de mucilagem e parede celular ao Ácido-Schiff (PAS) (SCHMIDT, 2011). Essa reação possibilitou a análise dos grãos de amido no interior das células das lemnas submetidas ao teste. Sendo essa apreciação realizada por microscopia de luz (Figura 18).

As seções transversais do controle (Figura 18 a) e tratamentos (Figura 18 b-d) das células da lemna mostraram reação positiva do PAS com a parede celular. Isso indica a presença de compostos celulósicos.

No citoplasma das células do controle a reação foi bem expressiva. Sendo possível visualizar a alta densidade e elevado tamanho dos grãos de amido (Figura 18 a). Já as plantas tratadas com NPCuO (Figura 18 b-d) mostraram redução no tamanho e quantidade dos grãos de amido após os sete dias de exposição a NPCuO.

De acordo com Gouveia (2013), o decréscimo de grãos de amido em plantas expostas ao cobre pode estar relacionado a alterações na rota de biossíntese das enzimas de amido do ciclo de Calvin. Processo esse possivelmente ligado à ativação das vias de degradação dessa atividade. Esse fato pode indicar que a exposição à NPCuO afeta o metabolismo celular da planta.

**Figura 18:** Microscopia de luz das secções transversais das frondes expostas a NPCuO. As secções foram coradas com PAS (Periodic acid-Schiff).

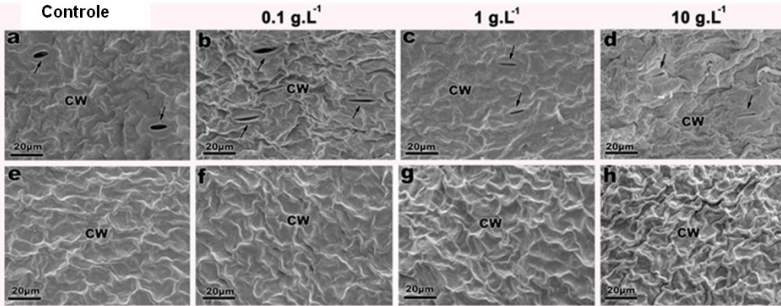


Fonte: Autora. Legenda: **a (Controle)** grãos de amido (S) parede celular (CW). **b (0.1g.L<sup>-1</sup> CuO-NP)**, **c (1.0g.L<sup>-1</sup> CuO-NP)**, **d (10.0g.L<sup>-1</sup> CuO-NP)**.

#### 4.5.2. Microscopia eletrônica de varredura

Através da microscopia eletrônica de varredura da superfície adaxial da amostra controle das *L. punctata*, observou-se a presença de ostíolo e estômatos (Figura 19 a, setas). Ainda se tratando dessa superfície, a topografia da mesma demonstrou ondulações na parede celular indicando superfície com aspecto áspero. As amostras tratadas com NPCuO apresentaram redução na abertura nos estômatos das frondes das lemnas (Figura 19 b-d, setas). A parede celular das células localizada nessa mesma superfície apresentou uma forma irregular. Essa alteração pode ser resultante da absorção dos íons de cobre ( $\text{Cu}^{2+}$ ) liberados com a nanopartícula diluída no meio de cultura (Figura 19 b-d). A parede celular da superfície abaxial da amostra controle também apresentou forma irregular (Figura 19 e). As plantas expostas as concentrações de 0.1 (Figura 19 f) e 1.0 g.L<sup>-1</sup> NPCuO (Figura 19 g) apresentaram alterações pouco expressivas na morfologia. No entanto o tratamento com 10.0 g.L<sup>-1</sup> NPCuO (Figura 19 g) exibiu parede celular notoriamente mais enrugada.

**Figura 19:** Microscopia eletrônica de varredura (MEV). Micrografias das frondes após sete dias de exposição à NPCuO.



Fonte: Autora. Legenda: **a** Detalhe da superfície adaxial do controle e abertura dos estômatos (setas). **b-d** Superfície adaxial das amostras expostas a NPCuO e abertura dos estômatos (setas). **e** Detalhe da superfície abaxial do controle e topografia. **f-h** Topografia das amostras tratadas (NPCuO) mostrando uma superfície irregular após o período de teste.

#### Microanálise de raios-X

Os resultados da microanálise de raio-X das lemnas foi qualitativo (Tabela 9). Quando realizada essa microanálise na superfície da parede celular da amostra controle notou-se diferentes percentagens de alguns elementos tais como carbono, nitrogênio, oxigênio e sódio. Na presente amostra o cobre não foi detectado. Contudo a presença desse metal foi detectada nas amostras tratadas com NPCuO (Tabela 9).

Tabela 9: Microanálise de raios-X da parede celular após sete dias de exposição das frondes a NPCuO. C, carbono; N, nitrogênio; O, oxigênio; Na, Sódio; Cu, cobre (n=10). O asterístico indicam a presença do elemento. As diferenças significativas estão de acordo com a one-way ANOVA e posterior teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Compostos	Controle	0,1 g L <sup>-1</sup> NPCuO	1 g L <sup>-1</sup> NPCuO	10 g L <sup>-1</sup> NPCuO
C	37.6±2.4 <sup>a</sup>	43.6±1.4 <sup>a</sup>	39.7±8.4 <sup>a</sup>	45.5±4.0 <sup>a</sup>
N	32.9±3.4 <sup>a</sup>	31.5±1.6 <sup>a</sup>	34.1±6.9 <sup>a</sup>	29.6±3.4 <sup>a</sup>
O	27.7±1.5 <sup>a</sup>	23.2±1.4 <sup>a</sup>	24.1±0.4 <sup>a</sup>	23.5±0.6 <sup>a</sup>
Na	1.7±0.5 <sup>a</sup>	1.1±0.9 <sup>a</sup>	1.8±0.8 <sup>a</sup>	1.2±0.7 <sup>a</sup>
Cu	n.d.	0.6±0.8 <sup>a</sup>	0.9±0.6 <sup>a</sup>	0.3±0.1 <sup>a</sup>

Na avaliação das plantas expostas a NPCuO através da microanálise por raio X foi possível detectar a presença de cobre. Resultado esse que indica a acumulação desse metal na estrutura da fronde da *L. punctata*. No caso da presente pesquisa não ocorreu diferença significativa entre os elementos químicos analisados nas amostras. Isso mostra que quantidade desses elementos nas plantas não foi afetada após os sete dias de exposição a nanopartícula de óxido de cobre.

Na lemna os estômatos permanecem abertos em quaisquer condições (Haberlandt 1887; Wagner 1973; cit. em Huber e Sankhla; todos cit. em Landolt, Kandeler 1986). No presente estudo foi observado o fechamento dos estômatos à medida que aumentaram as concentrações da substância testada. Nos estudos de Severi and Fornasiero 1982, 1983b, foi observado que o estômato da espécie *L. punctata* fechou durante o déficit de água e após a aplicação de (ABA), inibidores metabólicos ou ionofóros. Fato esse que pode estar relacionado a efeitos sobre a atividade metabólica da planta.

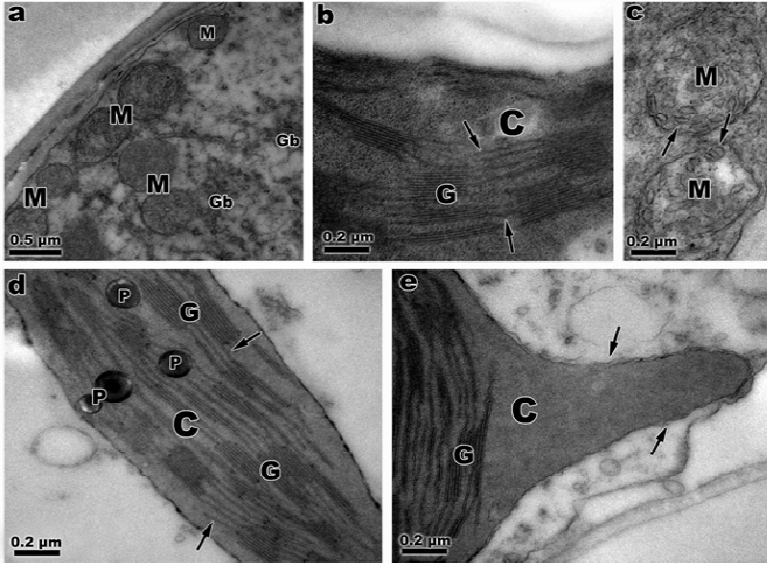
#### **4.5.3. Microscopia eletrônica de transmissão**

Quando observadas por MET, as células das lemnas apresentaram mitocôndrias com as membranas das cristas bem desenvolvidas (Figura 20 a), além de cloroplastos grandes envoltos por uma membrana dupla e com estrutura dos grana e bem desenvolvida (Figura 20 b) e tilacóides do estroma (Figura 20 b, setas). No entanto observa-se que as células das lemnas apresentaram uma leve alteração ultraestrutural após o período de exposição à nanopartícula de óxido de cobre (Figura 20 c-e). As mitocôndrias pareceram estar rompidas e com forma irregular (Figura 20 c). As membranas tilacóidianas não mostraram alterações drásticas em sua estrutura (Figura 20 d), porém houve aumento do número de plastoglôbulos nos cloroplastos (Figura 20 d). Também foi observada a dilatação das membranas tilacóidianas nos cloroplastos das frondes da *L. punctata* tratada com concentração de  $10.0 \text{ g.L}^{-1}$  de NPCuO (Figura 20 e, setas).

Através da análise por microscopia foi possível observar as alterações no interior das estruturas celulares das amostras tratadas com a nanopartícula ao final do período de teste. Pelos resultados anteriormente descritos foi possível observar que a taxa de crescimento pode ser reflexo de problemas metabólicos, visto que o crescimento depende do metabolismo. Também alterações morfo-estruturais das organelas podem vir a afetar o metabolismo. Estudos recentes confirmam que nanopartículas de alguns metais podem afetar a

atividade de organismos fotossintéticos por ação de estresse oxidativo e, consequente degradação das membranas (Shi et al. 2011; Wang et al. 2011b).

**Figura 20:** Microscopia eletrônica de transmissão (MET) imagens micrográficas da *L. Landoltia punctata* após sete dias de exposição a NPCuO.



Fonte: Autora. Legenda: **a (Controle)** Detalhe das células mostrando o mitocôndria com as cristas mitocondriais (M) e corpo de Golgi (Gb). **b (Controle)** Detalhe dos cloroplastos (C) com granum (G) e estroma tilacóides (setas). **c (0.1g.L<sup>-1</sup> CuO-NP)** Mitocôndrias com dilatação das cristas (setas). **d (10.0g.L<sup>-1</sup> CuO-NP)** Detalhe dos cloroplastos mostrando o granum preservado, estroma tilacóides (setas) e aumento do volume do plastoglóbulo (P). Note a dilatação dos cloroplastos (setas).

Os resultados anteriormente descritos, com base na análise por microscopia e análise de pigmentos, contribuíram com a hipótese de que se os testes tivessem um período maior, a taxa de crescimento seria mais consideravelmente afetada. Pois com seus mecanismos vitais em grande parte degradados o desenvolvimento da planta seria fortemente prejudicado. A partir dessa observação sugerem-se estudos em que o ensaio com a nanopartícula venha a ter um período de exposição superior ao da presente pesquisa de forma a elucidar a lacuna observada.



#### 4.6 QUANTIFICAÇÃO DOS ÍONS DE COBRE

A liberação de cobre solúvel da solução de NPCuO foi quantificada por espectrometria de absorção atômica (item 3.7). Esta análise foi realizada uma vez que a liberação dos íons ( $\text{Cu}^{2+}$ ) pode influenciar na toxicidade da nanopartícula. Os valores de  $\text{Cu}^{2+}$  aumentaram com o crescimento das concentrações das soluções tratamento quando comparadas com a amostra controle (Tabela 9).

Tabela 10: Resultados da concentração de íons de cobre na solução da amostra somente com água ultrapura, solução controle e os tratamentos da lemna após sete dias de exposição a NPCuO. Média  $\pm$  DV (n = 3). As letras indicam a significancia de acordo com *one way* ANOVA e posterior teste de Tukey (p<0,05).

Composto	Controle	0,1 gL <sup>-1</sup>	1 gL <sup>-1</sup>	10 gL <sup>-1</sup>
Cu <sup>2+</sup> (mg.L <sup>-1</sup> )	0,017 $\pm$ 0,0 <sup>c</sup>	0,546 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	0,919 $\pm$ 0,3 <sup>d</sup>	1,537 $\pm$ 0,8 <sup>d</sup>

As plantas, em geral, são muito sensíveis à toxicidade do cobre, demonstrando distúrbios metabólicos e inibição de crescimento quando expostas a concentrações desse elemento levemente acima do normal (FERNANDES & HENRIQUES, 1991). Conforme Patsikka et al., (2002), os íons de cobre aumentam a sensibilidade dos níveis de fotoinibição por luz e geram estresse oxidativo por competir com outros metais como micronutrientes essenciais. Em organismos fotossintéticos o estresse oxidativo é o efeito mais expressivo dentre os efeitos tóxicos gerados pela exposição a  $\text{Cu}^{2+}$  (KNAUERT; KNAUER, 2008).

Conforme Taiz & Zeiger, (2002), nas plantas o processo de transporte do fluido da epiderme para a endoderme da raiz pode se efetivar por três tipos de rotas:

- a) Apoplástica: Na qual a água se movimenta pela parede celular sem atravessar qualquer membrana. O apoplasto é o sistema contínuo de paredes celulares e espaços intercelulares nos tecidos vegetais;
- b) Simblástica: A água se movimenta de uma célula a outra através dos plasmodesmas. Essa estrutura conecta os citoplasmas de células vizinhas, contém um diâmetro entre 20 a 60 nm e permite a difusão de água e de pequenas moléculas entre células próximas.
- c) Transmembrana: É aquela seguida pela água que sequencialmente entra em uma célula por um lado, sai pelo

outro lado, entra na próxima célula da série e assim por diante.

A membrana plasmática é formada por uma bicamada fosfolipídica contendo proteínas carregadoras que auxiliam no transporte do soluto para o interior da célula. A espessura média da membrana varia entre 7 e 10 nm. O transporte do soluto se dá através do processo de difusão. Geralmente o soluto é transportado para o interior da célula na sua forma iônica. Inclusive já existem estudos que indicam que a parede celular das células das folhas e da raiz das plantas não absorvem nanopartículas de grandes dimensões. No entanto absorvem o soluto de íons de metal liberados pela nanopartícula quando em solução (PROSEUS; BOYER; 2005; ASLI; NEUMANN, 2009). Os resultados de microscopia eletrônica de transmissão realizada no presente estudo não demonstraram a presença de nanopartículas no interior das células (item 4.5.3).

Assim sendo, os efeitos inibitórios podem ter sido provocados pelos íons de cobre liberados nas amostras com a NPCuO devido a sua rápida aglomeração e sedimentação no meio de cultura. Esta condição pode ter sido favorecida pela faixa de tamanho da NP estudada (consideravelmente maior que a escala nano comumente utilizada, até 100 nanômetros) e densidade do metal como mostraram os resultados de análise MET (item 4.2). Resultados esses que corroboram com Perreault, Samadani e Dewez (2013) que demonstrou a importância da compreensão da estabilidade coloidal e da solubilidade de nanopartículas de óxidos de metal em suspensão para a ecotoxicologia.

### Remoção de cobre pela *L. punctata*

Já a remoção de cobre pela *Landoltia punctata* foi determinada através da análise de cobre total acumulado pela planta (Tabela 11) Sendo essa análise também realizada por espectrometria de absorção atômica.

Tabela 11: Resultados da concentração de íons de cobre presentes na estrutura das lemnas, solução controle e os tratamentos, após sete dias de exposição a NPCuO. Média  $\pm$  DV (n = 3). As letras indicam a significancia de acordo com *one way* ANOVA e posterior teste de Tukey (p<0,05).

Acúmulo de cobre	Controle	0,1 g L <sup>-1</sup>	1 g L <sup>-1</sup>	10 g L <sup>-1</sup>
(mg de íons. mg de lemnas <sup>-1</sup> )	0,02 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 3,5 <sup>a</sup>	0,04 $\pm$ 8,4 <sup>a,b</sup>	0,06 $\pm$ 47,8 <sup>b</sup>

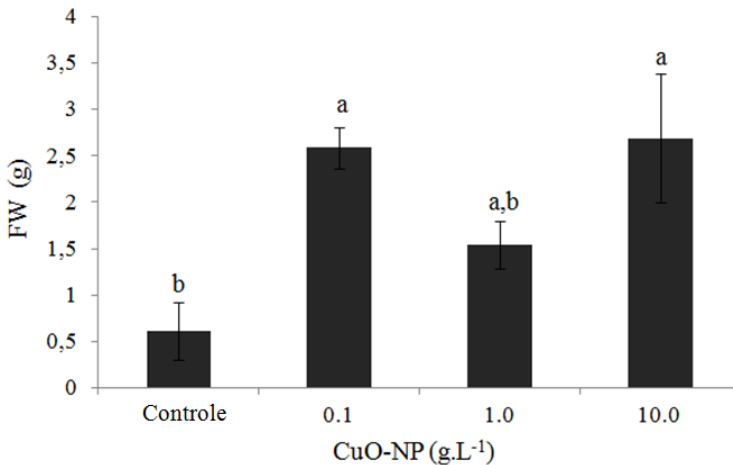
Esse resultado mostra que as lemnas expostas a NPCuO tiveram um aumento na concentração de cobre quando comparada a amostra controle. Essa resposta pode representar acúmulo desse elemento pela lemna durante o teste, visto que essa planta pode bioacumular esse metal. Estudos demonstram que a lemna chega a remover até 26% de cobre de uma solução com concentração de cobre entre 0,1 – 1,0 mg.L<sup>-1</sup> (KHELLAF & ZERDAOUI, 2010). Inclusive essa característica favorece seu uso na remoção de metais como já demonstram alguns estudos (SHARMA & GAUR, 1994; KHELLAF & ZERDAOUI, 2010; AXTELL, STERNBERG, CLAUSSEN, 2003). Embora essa macrófita possa vir a ser utilizada na biorremediação ambiental, o acúmulo de cobre pela planta pode representar riscos toxicológicos para outros organismos pertencentes aos maiores níveis da cadeia trófica. Isso pelo fato de essa macrófita ser bastante disponível no ambiente além de servir de alimento. De acordo com Oron et al., (1994), as lemnas são de fundamental importância na cadeia trófica dos ambientes em que se reproduzem por fixar o carbono atmosférico dissolvido e produzir biomassa de excelente qualidade nutricional. Deste modo, muitos peixes, aves, anfíbios, crustáceos, insetos e moluscos se beneficiam ao dispor deste alimento. Maia et al., (2008), afirma que “As lagoas de lemnas atuam na remoção de algas e geram biomassa rica em proteína, que podem ser utilizadas como ração animal.” Dessa forma, um estudo aprofundado da bioamplificação dentro da cadeia trófica a fim de analisar os efeitos gerados pelo acúmulo de cobre pelas lemnas é de considerável importância dentro do meio científico.

Peso úmido e seco

Referente ao peso úmido e seco das macrófitas ao final do teste foi possível observar um aumento significativo dos tratamentos em relação ao controle (Figura 21 e Figura 22). Esse resultado corrobora com Juhel et al., (2011), que encontrou um aumento significativo da biomassa da *Lemna minor* com o aumento da concentração da nanopartícula de alumínio.

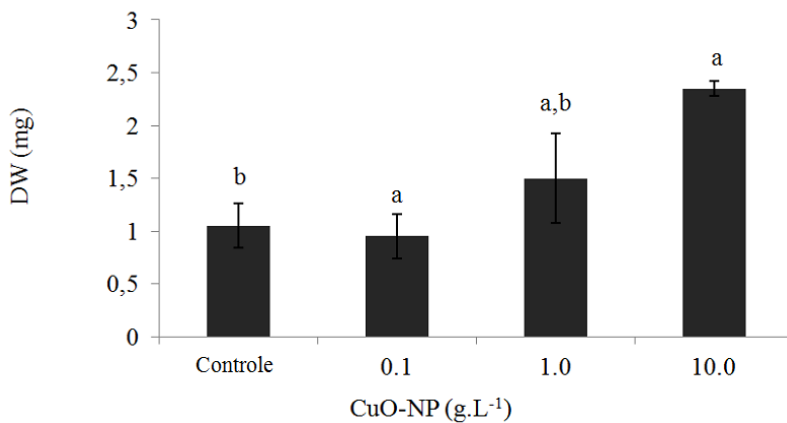
Conforme já descrito anteriormente, no item referente à liberação de íon de cobre pelas NP quando em solução, o acúmulo desses íons levar o organismo ao estresse oxidativo. Outros mecanismos provenientes do excesso de metais pesados em plantas podem incluir a exsudação de substâncias quelantes, a produção intercelular de substâncias quelantes, tais como: ácidos orgânicos e fitoquelatinas e alterações na compartimentalização dos metais na célula (SHAW, 1989). Íons de cobre ainda são responsáveis por muitas alterações nas células das plantas e inibição das atividades enzimáticas (TEISSEIRE & GUY, 2000). Essas alterações podem justificar o aumento de peso na planta conforme os resultados encontrados na presente pesquisa.

**Figura 21:** Avaliação dos efeitos da NPCuO sobre a *L. Landoltia punctata* com base no parâmetro de peso úmido (PU). Média  $\pm$  DP n = 3. As letras indicam as diferenças significativas de acordo com one-way Anova e um posterior teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



Fonte: Autora.

**Figura 22:** Avaliação dos efeitos da NPCuO sobre a *L. Landoltia punctata* com base no parâmetro de peso seco (PS). Média  $\pm$  DP n = 3. As letras indicam as diferenças significativas de acordo com one-way Anova e um posterior teste de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).



Fonte: Autora.

## 5. CONCLUSÃO

A presente pesquisa avaliou os efeitos tóxicos da NPCuO sobre a macrófita lemnácea da espécie local *Landoltia punctata*. Essa análise foi possível através da verificação dos efeitos no crescimento em conjunto com as alterações morfo e citológicas sobre a planta conforme as respostas encontradas através das microscopias e análise de conteúdo fotossintético. Os resultados permitiram descobertas importantes com relação ao estudo realizado.

- Os dados obtidos através da caracterização da nanopartícula utilizada no presente estudo demonstraram que os aglomerados de grandes dimensões formados em conjunto com a alta densidade, característica de metais pesados, facilitou a sedimentação rápida desse elemento durante o teste. Fato esse que pode justificar os resultados de inibição de crescimento da planta ( $CE_{20}$  de  $0,085 \text{ g.L}^{-1}$ ), a não descoberta do valor de  $CE_{50}$ , mesmo a altas concentrações da substância teste, e a verificação de que a nanopartícula não penetrou na macrófita como mostram as imagens obtidas por microscopia. Visto que com o tamanho de nanopartícula encontrado seria possível visualizá-la pela análise por microscopia eletrônica de transmissão. Dessa forma recomenda-se um teste que contenha um controle com uma substância incluindo somente os íons de cobre.
- Mesmo não encontrando o valor de  $CE_{50}$ , notou-se que a inibição de crescimento foi um reflexo de problemas metabólicos provenientes da exposição da planta a NPCuO. Isto devido ao metabolismo ser uma das principais funções vitais para a planta se desenvolver. Esse dano pode ser claramente observado pelos resultados dos níveis de pigmentos (clorofilas *a* e *b* e carotenoides) obtidos e nas alterações morfo e citológicas identificadas, tais como diminuição na abertura dos estômatos, alterações e efeitos nas células. Essas respostas podem ser atribuídas aos efeitos dos íons de cobre liberados pela NPCuO quando em solução e, igualmente, pela dificuldade de a NP ser transportada para o interior da célula pelo mecanismo de permeabilidade seletiva da planta. Os resultados anteriormente descritos reforçam a hipótese de que se os testes durassem mais do que sete dias as taxas de crescimento iriam ser mais fortemente afetadas. Isso pelo fato de que é remota a

possibilidade de que as macrófitas se desenvolvam com esses componentes vitais, anteriormente descritos, degradados.

- Outro resultado de considerável relevância foi a observação do acúmulo de íons de cobre pela *lemna*. O acúmulo desse elemento na macrófita pode representar um risco para o ecossistema uma vez que a *Landoltia punctata* é uma importante fonte de alimento para animais tais como peixes, anfíbios, aves e ainda ser utilizado como ração para suínos. Fato esse que traz a necessidade de avaliar a bioamplificação dos efeitos provenientes dessa bioacumulação com o estudo dos seres pertencentes aos níveis superiores da cadeia trófica cuja alimentação é a planta estudada.

## 6. RECOMENDAÇÕES

Com o intuito de aprimorar e aperfeiçoar os conhecimentos que foram adquiridos na presente pesquisa recomendam-se as seguintes condutas para estudos futuros:

- Realizar o ensaio com um controle positivo contendo somente os íons de cobre de forma a comparar e compreender melhor os efeitos;
- Aumentar o tempo de exposição da lemna a nanopartícula e avaliar os efeitos;
- Analisar a bioamplificação decorrentes da evolução toxicidade para organismos pertencentes aos níveis mais altos dentro da cadeia trófica cuja fonte de nutrição são as lemnas.



## REFERÊNCIAS

AFNOR PT 90-337 (Draft 1996). **Détermination de l'inhibition de croissance de *Lemna minor***.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL - ABDI. **Panorama Nanotecnologia**. Série Cadernos da Indústria ABDI. Brasília, DF, 2010.v.19.

AITKEN, R. J. et al. Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends. **Occupational medicine**, Reino Unido, p. 300-306. 11 dez. 2006. Disponível em: <<http://occmed.oxfordjournals.org/content/56/5/300.short>>. Acesso em: 30 nov. 2012.

ALIFERIS, K. A. et al. *Lemna minor* L. as a model organism for ecotoxicological studies performing H NMR fingerprinting. **Chemosphere**, Canadá, p. 967-973. 13 maio 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653509004792>>. Acesso em: 30 nov. 2012.

ALMEIDA, A. dos S. de. **Obtenção e caracterização de nanocompósitos de poli(l-lactídeo) e nanopartículas de argila sódica, argilas organofílicas e óxidos de sílica**. 2010. 130 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010. Cap. 45.

ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T. C.; SOUSA, O. de. **Marine paints: The particularcase of antifouling paints**. *Progress In Organic Coatings*, Lisboa, v. 59, nº1, p. 2-20. 2007.

APHA (1992) **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 18th edition, Am. Publ. Health Assoc., Washington DC

ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Review Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. **Toxicology and applied pharmacology**, Índia, p. 151-165. 02 dez. 2011.

ARUOJA, V. et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Science of the total**

**environment**, Estônia, p. 1461-1468. 26 nov. 2008. Disponível em: <[http://ac.els-cdn.com/S0048969708010784/1-s2.0-S0048969708010784-main.pdf?\\_tid=22c98d82-4567-11e2-a5c0-0000aab0f01&acdnt=1355432186\\_53ed09136b75993c00df4f6cbf221c0c](http://ac.els-cdn.com/S0048969708010784/1-s2.0-S0048969708010784-main.pdf?_tid=22c98d82-4567-11e2-a5c0-0000aab0f01&acdnt=1355432186_53ed09136b75993c00df4f6cbf221c0c)>. Acesso em: 13 dez. 2012.

ASLI, S; NEUMANN, P. M.. Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport. **Plant cell environ.**. Israel, p. 577-584. 02 fev. 2009.

ASTM, 1991. **Standard guide for conducting static toxicity with *Lemna gibba***. G3. E 14115-91. Annual Book of ASTM standards, vol.1104, American Soc. for Testing and Materials, p. 1334. Philadelphia.

AXTELL, N. R.; STERNBERG, S. P. K.; CLAUSSEN, K. Lead and nickel removal using *Microspora* and *Lemna minor*. **Bioresource technology**, Estados Unidos, p. 41-48. 10 jan. 2003.

BIGGS, R. H.; KOSSUTH, S. V.. Developmental effects of Sandoz 6706 and ultraviolet-B radiation on *Spirodela punctata* and *Lemna minor*. **Plant physiol.** USA, p. 83. 01 out. 1980.

BLINOVA, I. et al. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. **Environmental pollution**, Estônia, p. 41-47. 10 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749109004266>>. Acesso em: 19 dez. 2012.

BOHRER, M. B. **Biomonitoramento das lagoas de tratamento terciário do sistema de tratamento dos efluentes líquidos industriais (SITEL) do pólo petroquímico do sul, Triunfo, RS, através da comunidade zooplanctônica**. 1995. 469p. Tese (Doutorado em Ciências) - UFSCar, São Paulo.1995.

BORM, P. J. A. et al. The potential risks of nano- material: a review carried out for ECETOC. **Part. fibre toxicol.**, p. 11-46. 02 fev. 2006.

BOUDREAU, T. M. et al. Laboratory evaluation of the toxicity of Perfluorooctane Sulfonate (PFOS) on *Selenastrum capricornutum*,

*Chlorella vulgaris*, *Lemna gibba*, *Daphnia magna*, and *Daphnia pulicaria*. **Arch. environ. contam. toxicol.** Canadá, p. 307-313. 17 abr. 2003.

BOUZON, Z. L.. **Aspectos histoquímicos e ultra-estruturais da porção vegetativa e reprodutiva de estiquídios de *Hypnea musciformis* (Gigartinales-Rhodophyta)**. 1993. 66 f. Dissertação (Mestrado) - UFPR, Curitiba, 1993.

BRAR, S. K. et al. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts. **Waste management**, Canadá, p. 504-520. 17 nov. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X09004607>>. Acesso em: 13 dez. 2012.

CHIANG, C.; AROH, K.; EHRMAN, S. H.. Copper oxide nanoparticle made by flame spray pyrolysis for photoelectrochemical water splitting – Part I. CuO nanoparticle preparation. **International journal of hydrogen energy**, USA, p. 4871-4879. 12 mar. 2012.

CHIANG, C. et al. Copper oxide nanoparticle made by flame spray pyrolysis for photoelectrochemical water splitting – Part II. Photoelectrochemical study. **International journal of hydrogen energy**, India, p. 15519-15516. 07 out. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0360319911021525>>. Acesso em: 31 out. 2012.

CHOI, H. S. et al. Renal clearance of quantum dots. **Nature biotechnology**, Estados Unidos, p. 1165-1170. 23 set. 2007. Disponível em: <<http://www.nature.com/nbt/journal/v25/n10/pdf/nbt1340.pdf>>. Acesso em: 03 jan. 2013.

CONAMA, Resolução 357, **Diário oficial da união**, (2005) 259-282.

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim. nova**, São Paulo, p. 1820-1830. 24 set. 2008.

CROSS, J. W.. **The charms of duckweed**: An introduction to the smallest flowering plants. Disponível em:

<<http://www.mobot.org/jwccross/duckweed/duckweed.htm>>. Acesso em: 15 jan. 2013.

CROSERÁ, M. et al. **Nanoparticle dermal absorption and toxicity: a review of the literature**. Itália: Trieste, 2009.

DAS, D. et al.. Synthesis and evaluation of antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles. **Colloids saurf. b. biointerfaces**. EUA, p. 430-433. 01 jan. 2013.

DHAWAN, A.; SHARMA, V.; PARMAR, D. Nanomaterials: A challenge for toxicologists. **Nanotoxicology**, Índia, p. 1-9. 11 jan. 2009. Disponível em: <<http://informahealthcare.com/doi/abs/10.1080/17435390802578595?journalCode=nan>>. Acesso em: 13 dez. 2012.

DOMINGUES, D.F. e BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos Aquáticos. Cap. 7, p: 153-184. 2006. In: ZAGATO, P.A. e BERTOLETTI, E. 2006. **Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações**. ZAGATTO e BERTOLETTI (org.) São Carlos: Rima; 2006.

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

DROST, W.; MATZKE, M.; BACKHAUS, T.. Heavy metal toxicity to Lemna minor: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. **Chemosphere**, Alemanha, p. 36-43. 08 dez. 2006.

EBERIUS, M.. **Duckweed growth inhibition tests and standardization**. LemnaTec GmbH, Würselen, Alemanha, p.1. 14 mar. 2001. Disponível em: <http://www.lemnatec.com/Literatur/LT011.pdf>. Acesso em: 16/09/2012.

FAHMY, B.; CORMIER, S. A.. Copper oxide nanoparticles induce oxidative estresse and cytotoxicity in airway epithelial cells. **Toxicology in vitro**, Estados Unidos, p. 1365-1371. 20 ago. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S088723330900229X>>. Acesso em: 17 dez. 2012

FERNANDES, J. C.; HENRIQUES, F. S.. Biochemical, physiological, and structural effects of excess copper in plants. **The botanical review**. Portugal, p. 246-266. 24 jun. 1991. Disponível em: <[http://download.springer.com/static/pdf/220/art%3A10.1007%2FBF02858564.pdf?auth66=1389354545\\_d8b1a71c482b1b160a1ef9b6152b0831&ext=.pdf](http://download.springer.com/static/pdf/220/art%3A10.1007%2FBF02858564.pdf?auth66=1389354545_d8b1a71c482b1b160a1ef9b6152b0831&ext=.pdf)>. Acesso em: 23 dez. 2013.

FINKLER, R.. **Avaliação do efeito tóxico de líquidos percolados sobre o sistema reprodutivo da *Daphnia magna***. 2002. 105 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

FUZINATTO, C. F. **Avaliação da qualidade da água de rios localizados na ilha de Santa Catarina utilizando parâmetros toxicológicos e o índice de qualidade da água**. 2009. 243 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

GAHAN, E. **Plant histochemistry and cytochemistry: An introduction**. 1984. London: Academic Press.

GE, X. et al. Growing *Lemna minor* in agricultural wastewater and converting the duckweed biomass to ethanol. **Bioresource technology**.. EUA, p. 485-488. 19 ago. 2012.

GORDON, E. M. & Mc CANDLESS, E. L. Ultrastructure and histochemistry of *Chondrus crispus* Stackhouse. In: HARVEY, M. J. & MCLACHLAN, J. (Eds.). 1973. **Chondrus crispus**. Halifax: Nova Scotian Institute of Science, p. 111-133.

GOUVEIA, C.. **Avaliação dos efeitos dos metais pesados cobre e chumbo na bioquímica, na organização celular e na fisiologia da agarófita *Gracilaria dominguenis***. 2013. 50 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013.

GREENBERG, B. M.; HUANG, Xiao-dong; DIXON, D. G.. Applications of the aquatic higher plant *Lemna gibba* for ecotoxicological assessment. **Journal of aquatic ecosystem health**, Canadá, p. 147-155. 24 set. 1992. Disponível em:

<<http://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF00044046>>.  
Acesso em: 23 jan. 2013.

GUBBINS, E. J.; BATTY, L. C.; LEAD, J. R.. Phytotoxicity of silver nanoparticles to *Lemna minor* L. **Environmental pollution**, Inglaterra, p. 1551-1559. 02 mar. 2011.

GÚZMAN, K. A. D.; TAYLOR, M. R.; BANFIELD, J. F. Environmental risks of nanotechnology: national nanotechnology initiative funding, 2000 - 2004. **Environmental science technology**., Califórnia - Usa, p. 1401-1407. 21 jan. 2006.

HARRISON P. **Emerging challenges: nanotechnology and the environment**. GEO Year Book 2007.

HEINLAAN, M. et al. Changes in the *Daphnia magna* midgut upon ingestion of copper oxide nanoparticles: A transmission electron microscopy study. **Water research**, Estônia, p. 179-190. 01 jan. 2011. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135410005907>>. Acesso em: 19 dez. 2012.

HEGELMAIER, F.. **Die lemnaceen**: Eine monographische Untersuchung. Alemanha: Leipzig, 1868.

HISCOX, J. D. & ISRAELSTAM, G. F. A method for the extraction of chlorophyll from leaf tissue without maceration. **Canadian journal botany**, 57: 1332-1334. 1979.

HOU, W. et al. Effects of copper and cadmium on heavy metal polluted waterbody restoration by duckweed (*Lemna minor*). **Plant physiology and biochemistry**, China, p. 62-69. 28 dez. 2006.

ISO/DIS 20079, **Water quality – determination of the toxic effect of water constituents and waste water to duckweed (*Lemna minor*) – Duckweed growth inhibition test**. ISO TC 147/SC 5/WG 5, 2004.

ISO/TR 13014:2012, **Nanotechnologies - Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment**, 2012.

JIANG, J.; OBERDÖRSTER, G.; BISWAS, P.. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **J. nanopart. res.**, Estados Unidos, p. 77-89. 25 jun. 2008.

JO, H. J. et al. Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against *Daphnia magna*: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods. **Journal of hazardous materials**, Coréia, p. 301-308. 27 maio 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389412005699>>. Acesso em: 12 dez. 2012.

JUHEL, G. et al. Alumina nanoparticles enhance growth of *Lemna minor*. **Aquatic toxicology**, Irlanada, p. 328-336. 21 jun. 2011.

KARLSSON, H. L. et al. Copper Oxide Nanoparticles Are Highly Toxic: A Comparison between Metal Oxide Nanoparticles and Carbon Nanotubes. **Chemical research in toxicology**, Suécia, p. 1726-1732. 18 fev. 2008. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/tx800064j>>. Acesso em: 17 dez. 2012.

KHELLAF, N.; ZERDAOUI, M. Growth response of the duckweed *Lemna gibba* L. to copper and nickel phytoaccumulation. **Ecotoxicology**, Algeria, p. 1363-1368. 01 ago. 2010.

KHELLAF, N.; ZERDAOUI, M. Growth, photosynthesis and respiratory response to copper in *Lemna minor*: A potential use of duckweed in biomonitoring. **Iran. journal environ. health**, Algeria, p. 299-306. 20 ago. 2010.

KIM, K. Y. Nanotechnology platforms and physiological challenges for cancer therapeutics. **Nanomedicine**, Wasi[hington, Estados Unidos, p. 103-110. 22 dez. 2006.

KNAUERT, S.; KNAUER, K.. The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae. **Journal of phycology**. Suécia, p. 311-319. 19 mar. 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1529.8817.2008.00471.x/pdf>>. Acesso em: 01 set. 2013.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B.. **Testes toxicológicos - Métodos, técnicas e aplicações**. 2ª Florianópolis: Agência Alemã de Cooperação Técnica - Gtz, 2004. 288 p.

LALAU, C. M.. **Uso de macrófitas lemnáceas como organismo-teste em avaliações toxicológicas**. 2010. 84 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

LANDOLT, E. 1980. Key to the determination of taxa within the family of Lemnaceae. In: E. Landolt, ed., **Biosystematic investigations in the family of duckweeds (Lemnaceae)**. Vol. 1. Veröff. Geobot. Inst. ETH Stiftung Rübel Zürich 70: 13–21.

LANDOLT, E. 1986. Biosystematic investigations in the family of duckweeds (*Lemnaceae*) - **The family of lemnaceae: a monographic study** v.1. Veröff. geobot. Inst., Zürich 71:1-566.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in enzymology**, p. 350-382. 1987. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0076687987480361>>. Acesso em: 28 out. 2012.

LYDDY, R. **Nanotechnology**. In: WEXLER, P.. **Information resources in toxicology**. 4. ed. Seattle, Wa, Usa: Elsevier, 2009. Cap. 36, p. 321-328.

MAIA, I. S. **Avaliação de lagoas de maturação modificadas com presença de suportes e macrófitas da família *Lemnaceae* no tratamento de esgoto doméstico**. 2008. 183 f. Dissertação (Mestrado) – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

MARCHAND, L. et al. Phytotoxicity testing of lysimeter leachates from aided phytostabilized Cu-contaminated soils using duckweed (*Lemna minor* L.). **Science of the total environment**, França, p. 146-153. 13 out. 2011.



MARTINS, P. **Nanotecnologia e meio ambiente para uma sociedade sustentável**. São Paulo: 2009.

MATIAS, W. G. **Apostila de toxicologia ambiental**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. 2011.

MCCULLY, M. E. The histological localization of the structural polysaccharides of seaweeds. 1970. **Annals of the New York academy of sciences**, 175: 702-711.

MCT: **Documento resumo do PNN**. Ministério da Ciência e da Tecnologia. Brasília, nov. 2007.

MESSIAS, T. G. **Influência da toxicidade da água e do sedimento dos rios São Joaquim e Ribeirão Claro na Bacia do Corumbataí**. 2008. 126 f. Dissertação (Mestrado) - Departamento de Centro de Energia Nuclear Na Agricultura, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

MOHEDANO, R. A. **Uso de macrófitas lemnáceas (*Landoltia punctata*) no polimento e valorização do efluente de suinocultura e na fixação de carbono**. 270 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2010.

MOHEDANO, R. A. et al. High nutrient removal rate from swine wastes and protein biomass production by full-scale duckweed ponds. **Bioresource technology**. Florianópolis, p. 98-104. 01 maio 2012.

MURPHY, P. et al. Nanotechnology, Society, and Environment. In: ANDREWS, David L. et al. **Comprehensive nanoscience and technology**. 5. ed. USA: Elsevier, 2011. Cap. 5-15, p. 443-476.

**Nanotechnology and you benefits and applications**. Disponível em: <<http://nano.gov/you/nanotechnology-benefits>>. Acesso em: 25 out. 2012.

NAUMANN, B.; EBERIUS, M.; APPENROTH, K. Growth rate based dose–response relationships and EC-values of ten heavy metals using the duckweed growth inhibition test (ISO 20079) with *Lemna minor* L.

*clone* St. **Journal of plant physiology**, Würselen, Alemanha, p. 1656-1664. 12 out. 2006.

NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, Estados Unidos, p. 622-627. 03 fev. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/311/5761/622.full.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2012.

OECD 221, **Guideline for the testing of chemicals. Revised proposal for a new guideline 221**. *Lemna sp.* Growth Inhibition Test, 2002.

ORON, G. Duckweed culture for wastewater renovation and biomass production. **Agricultural water management**, 26: 27-40.1994.

PARDO-GUERRA, J. P. Mapping emergence across the Atlantic: Some (tentative) lessons on nanotechnology in Latin America. **Elsevier**, Houghton Street Wc2a 2ae, Uk, p. 94-108. 2011.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F.. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Quim. nova**, Campinas, p. 421-430. 21 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v33n2/33.pdf>>. Acesso em: 26 dez. 2012.

PÄTSIKKÄ, E. et al. Excess copper predisposes photosystem II to photoinhibition in vivo by outcompeting iron and causing decrease in leaf chlorophyll1. **Plant physiology**. Eslováquia, p. 1359-1367. 01 jun. 2002.

PERREAULT, F. et al. Evaluation of Copper Oxide Nanoparticles Toxicity Using Chlorophyll *a* Fluorescence Imaging in *Lemna gibba*. **Journal of botany**, Canadá: Montreal, n. p.1-9, 17 ago. 2010.

PERREAULT, F. et al. Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Chemosphere**, Canadá, p. 1388-1394. 23 mar. 2012.

PERREAULT, F.; SAMADANI, M.; DEWEZ, D.. Effect of soluble copper released from copper oxide nanoparticles solubilisation on growth and photosynthetic processes of *Lemna gibba* L. **Nanotoxicology**. Montreal-Canadá, p. 01-09. 22 mar. 2013.

PICRAUX, S. T. **Nanotechnology**. Disponível em:  
<<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/962484/nanotechnology>>  
. Acesso em: 25 out. 2012.

POTT, V. J.. Lemnaceae in: WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G.G.; GIULIETTI, A.M.; MELHEM, T. S.; BITTRICH, V.; KAJMEYAMA (eds.) **Flora fanerogâmica do estado de São Paulo**, vol. 2. São Paulo: FAPESP: HUCITEC, 2002b.

POTT, V. J.; POTT, A. **Potencial de uso das plantas aquáticas na despoluição da água**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2002.

POWERS, K. W. et al. Forum series: Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. Characterization of Nanoscale Particles for Toxicological Evaluation. **Toxicological sciences**, Estados Unidos, p. 292-303. 11 jan. 2006.

PRASAD, M.N.V. et al. Physiological responses of *Lemna trisulca* L. (duckweed) to cadmium and copper bioaccumulation. **Plant science**. Polônia, p. 881-889. 18 jul. 2001.

PROSEUS, T. E.; BOYER, J. S.. Turgor pressure moves polysaccharides into growing cell walls of *Chara corallina*. **Ann bot.** Estados Unidos, p. 967-979. 10 maio 2005.

QUINA, F. H.. Nanotecnologia e o meio ambiente: Perspectivas e riscos. **Quim. nova**, São Paulo, n. , p.1028-1029, 21 out. 2004.

RADIC, S. et al. Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity and genotoxicity. **Ecotoxicology and environmental safety**, Croácia, p. 182-187. 17 jul. 2010.

Disponível em: <[http://ac.els-cdn.com/S014765131000134X/1-s2.0S014765131000134X-main.pdf?\\_tid=14f97bd4-356f11e2be010000aab0f6b&acdnat=1353676378\\_9024aefe792adc0668034708279d13e2](http://ac.els-cdn.com/S014765131000134X/1-s2.0S014765131000134X-main.pdf?_tid=14f97bd4-356f11e2be010000aab0f6b&acdnat=1353676378_9024aefe792adc0668034708279d13e2)>. Acesso em: 23 nov. 2012.

RAND, G.M.; PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic toxicology: methods and applications**, New York: Hemisfere, 665p., 1985.

- REN, G. et al. Characterisation of copper oxide nanoparticles for antimicrobial applications. **International journal of antimicrobial agents**, Reino Unido, p. 587-590. 01 jan. 2009.
- RENWICK, L. C.; DONALDSON, K.; CLOUTER, A.. Impairment of Alveolar Macrophage Phagocytosis by Ultrafine Particles. **Toxicology and applied pharmacology**, Escócia, p. 119-127. 01 jan. 2001.
- RESTREPO, J. J. B. **Determinação da taxa de transferência de elementos-traço de resíduos sólidos urbanos para lixiviado**. 2013. 221 f. Tese (Doutorado) - UFSC, Florianópolis, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/103539/317387.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 10 jun. 2013.
- REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at light pH as an electron opaque stain in electron microscopy. 1963. **Journal cell biology**, 17: 208-212.
- RICHARD, F. There's plenty of room at the bottom. **Journal of microelectromechanical systems**, Nova York, p. 60-66. 01 mar. 1992
- ROSSETTO, A. L. de O. F. **Estudo comparativo entre os efeitos tóxicos agudos e crônicos do óxido de cobre na forma de nanopartícula e micropartícula**. 2012. 123 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.
- RUNBINGER, C. F. **Seleção de métodos biológicos para a avaliação toxicológica de efluentes industriais**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2009.
- SAHOO, S. K.; PARVEEN, S.; PANDA, J. J. The present and future of nanotechnology in human health care. **Nanomedicine**, Índia, p. 20-31. 21 nov. 2006.
- SAITO, G. et al. Synthesis of copper/copper oxide nanoparticles by solution plasma. **Journal of applied physics**, Japão, p. 1-7. 19 jul. 2011.
- SALAMANCA-BUENTELLO, F. et al. Nanotechnology and the Developing World. **Plos medicine**, Toronto - Canadá, p. 383-386. 12 maio 2005. Disponível em:

<<http://www.plosmedicine.org/article/info%3Adoi%2F10.1371%2Fjournal.pmed.0020097>>. Acesso em: 30 out. 2012.

SANTOS, F. F. dos. A encruzilhada da nanotecnologia: Inovação, tecnologia e riscos. **RAC**, Curitiba, n. , p.983-985, 30 set. 2010.

SCHMIDT, E. C.. **Respostas biológicas de macroalgas vermelhas submetidas à radiação ultravioleta-B: Análises bioquímicas, celulares e fisiológicas**. 2011. 180 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia, Departamento de CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

SCHMIDT, E.C., SCARIOT, L.A., ROVER, T. & BOUZON, Z.L. Changes in ultrastructure and histochemistry of two red macroalgae strains of *Kappaphycus alvarezii* Rhodophyta, Gigartinales), as a consequence of ultraviolet B radiation exposure. 2009. **Micron**, 40: 860-869.

SEVERI A., FORNASIERO R. B. Preliminary SEM observations of stomatal apparatus in *Spirodela oligorrhiza* (Kurz) hegelm: in darkness and in light. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Alemanha, p. 400-401. 1982.

SEVERI A., FORNASIERO R. B. Effects of metabolic inhibitors and inophores on the stomatal apparatus in *Spirodela oligorrhiza* (Kurz) hegelm. and *Lemna minor*. **Zeitschrift für Pflanzenphysiologie**, Alemanha, p. 39-46. 1983b.

SHARMA, S. S.; R, J.P. GAUR. Potential of *Lemna polyrrhiza* for removal of heavy metals. **Ecological engineering**, India, p. 37-43. 23 ago. 1994.

SHAW, J. **Heavy metal tolerance in plants**. Estados Unidos: CRC Press, 1989. 355 p.

SHI, J. et al. To duckweeds (*Landoltia punctata*), nanoparticulate copper oxide is more inhibitory than the soluble copper in the bulk solution. **Environmental Pollution**. USA, p. 1277-1282. 17 jan. 2011.

SILVA, C. G. da. **O que é a nanotecnologia?**. Disponível em:  
<<http://www.comciencia.br/reportagens/nanotecnologia/nano10.htm>>.  
Acesso em: 17 out. 2011.

SIS, 1995. Water quality – **Determination of growth inhibition (7-d) *Lemna minor***, Duckweed SS 02 82 13. Swedish Institute of Standards, Stockholm, Sweden.

SKILLICORN, P. W.; SPIRA, W; JOURNEY, W.. **Duckweed aquaculture, a new aquatic farming system for developing countries**. The World Bank, Washington, D.C.1993.

SOUZA, J. P. de. **Toxicidade aguda e risco ambiental do diflubenzorun para *Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* e *Lemna minor* na ausência e presença de sedimento**. 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós Graduação em Aquicultura, Departamento de Aquicultura, Unesp, Jaboticabal - São Paulo, 2008.

SPULLER, Cornelia; WEIGAND, Harald; MARB, Clemens. Trace metal stabilisation in a shooting range soil: Mobility and phytotoxicity. **Journal of hazardous materials**, Alemanha, p. 378-387. 02 jun. 2006.

SPURR, A. R. A low viscosity epoxy resin-embedding medium for electron microscopy. 1969. **Journal ultrastructure research**, 26: 31-43.

STEVENS, P. F.. **Angiosperm phylogeny website**. Disponível em:  
<<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/welcome.html>>.  
Acesso em: 25 jan. 2014.

TAIZ, L.; ZEIGER, E..**Fisiologia Vegetal**. EUA: Artmed, 2002.

TEISSEIRE, H.; GUY, V. Copper-induced changes in antioxidant enzymes activities in fronds of duckweed (*Lemna minor*). **Plant science**. França, p. 65-72. 14 abr.

TOMA, H. E. O mundo nanométrico: a dimensão do novo século. **Editora oficina de textos**, 102 p., 2004.

USEPA. **Acid digestion of aqueous samples and extracts for: METHOD 3010A**. 2007. Disponível em:

<<http://www.epa.gov/osw/hazard/testmethods/sw846/pdfs/3010a.pdf>>. Acesso em: 25 out. 2012.

VERMA, A. et al. Surface-structure-regulated cell-membrane penetration by monolayer-protected nanoparticles. **Nature materials**, Estados Unidos, p. 588-595. 25 ago. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/nmat/journal/v7/n7/pdf/nmat2202.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2012.

VERMA, R.; SUTHAR, S.. Synchronized urban wastewater treatment and biomass production using duckweed *Lemna gibba* L. **Ecological engineering**. India, p. 337-343. 29 dez. 2013.

WANG, W. Toxicity Tests of Aquatic Pollutants by Using Common. **Environmental pollution**, EUA, p. 1-14. 01 jan. 1986.

WANG, W. Literature review on duckweed toxicity testing. **Environmental research**, EUA, p. 7-22. 20 out. 1989.

WANG, Z. et al. Toxicity and internalization of CuO nanoparticles to prokaryotic alga *Microcystis aeruginosa* as affected by dissolved organic matter. **Environ. sci. technol.** China, p. 6032-6040. 15 jul. 2011.

WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophyll *a* and chlorophyll *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. **Journal of plant physiology**, p. 307-313. 1994.

WHITE, B. et al. Complete CO oxidation over Cu<sub>2</sub>O nanoparticles supported on silica gel. **Nano letters**, Estados Unidos, p. 2095-2098. 21 jul. 2006. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/nl061457v>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

WONGPISUTPAISAN, N. et al. Sonochemical synthesis and characterization of copper oxide nanoparticles. **Energy procedia**, Tailândia, p. 404-409. 01 jan. 2011.

WU, Rujun et al. Preparation and characterization of CuO nanoparticles with different morphology through a simple quick-precipitation method

in DMAC–water mixed solvent. **Journal of alloys and compounds**, China, p. 45-49. 27 maio 2010.

XU, R. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement. **Particuology**, Estados Unidos, p. 112-115. 25 dez. 2007. Disponível em:  
<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1674200108000357>>. Acesso em: 24 jan. 2013.

YANKUI, T. et al. Study of duckweed(*Lemna perpusilla Torr.*) for use in phytoremediation of lead-and copper-contaminated water bodies. **Chinese Journal Of Environmental Engineering**. China, p. 2209-2214. 12 out. 2011.

YILMAZ, D. D.. Effects of salinity on growth and nickel accumulation capacity of *Lemna gibba (Lemnaceae)*. **Journal of hazardous materials**. Turquia, p. 74-77. 27 dez. 2006.

ZHA, L. Y. et al. **Chromium nanoparticle exhibits higher absorption efficiency than chromium picolinate and chromium chloride in Caco-2 cell monolayers**. China, 2007.

ZHOU, K. et al. Synthesis, characterization and catalytic properties of CuO nanocrystals with various shapes. **Nanotechnology**, China, p. 3939-3943. 11 jul. 2006. Disponível em:  
<[http://iopscience.iop.org/0957-4484/17/15/055/pdf/nano6\\_15\\_055.pdf](http://iopscience.iop.org/0957-4484/17/15/055/pdf/nano6_15_055.pdf)>. Acesso em: 13 dez. 2012.



**APÊNDICE I**  
**LAUDO DAS ANÁLISES DE POTENCIAL ZETA.**



# LAUDO 1

## SOLUÇÃO DE NPCuO COM O MEIO DE CULTURA

### Zeta Potential Report

v2.2



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

#### Sample Details

Sample Name: Meiolema\_NPCuO 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: willm.matias.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 37	Dispersant RI: 1,330
Date and Time: quinta-feira, 14 de março de 2...	Viscosity (cP): 0,8972
	Dispersant Dielectric Constant: 78,5

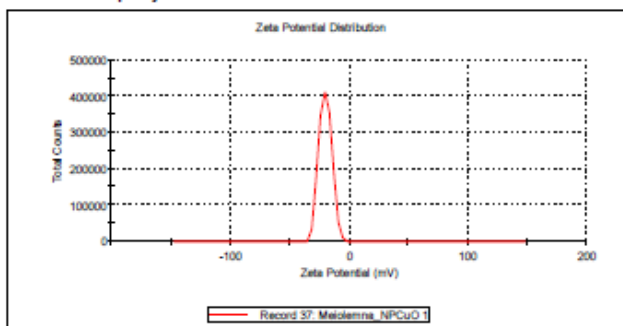
#### System

Temperature (°C): 25,0	Zeta Runs: 12
Count Rate (kops): 218,5	Measurement Position (mm): 2,00
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 7

#### Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -20,2	Peak 1: -20,2	100,0	5,25
Zeta Deviation (mV): 5,25	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,312	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality **Good**



## LAUDO 2

### SOLUÇÃO DE NPCuO COM O MEIO DE CULTURA

#### Zeta Potential Report

v2.2



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

#### Sample Details

Sample Name: MeloIemna\_NPCuO 2

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

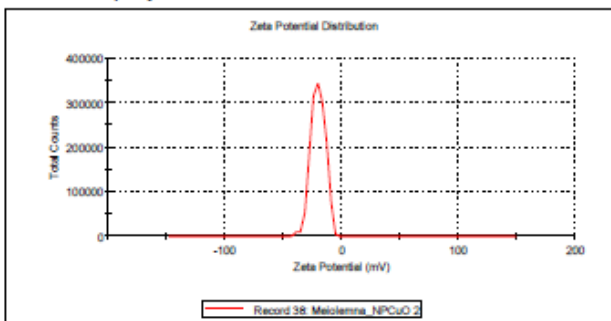
File Name: willim matias.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 38	Dispersant RI: 1,330
Date and Time: quinta-feira, 14 de março de 2...	Viscosity (cP): 0,8872
	Dispersant Dielectric Constant: 78,5

#### System

Temperature (°C): 25,0	Zeta Runs: 12
Count Rate (kopc): 227,1	Measurement Position (mm): 2,00
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 7

#### Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
<b>Zeta Potential (mV): -20,2</b>	Peak 1: -20,2	100,0	6,05
<b>Zeta Deviation (mV): 6,05</b>	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm): 0,318</b>	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality **Good**

# LAUDO 3

## SOLUÇÃO DE NPCuO COM O MEIO DE CULTURA

### Zeta Potential Report

v2.2



Malvern Instruments Ltd. - © Copyright 2008

#### Sample Details

Sample Name: Melolemma\_NPCuO 3

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: willim.mafas.dts      Dispersant Name: Water  
 Record Number: 39      Dispersant RI: 1,330  
 Date and Time: quinta-feira, 14 de março de 2...      Viscosity (cP): 0,8872  
 Dispersant Dielectric Constant: 78,5

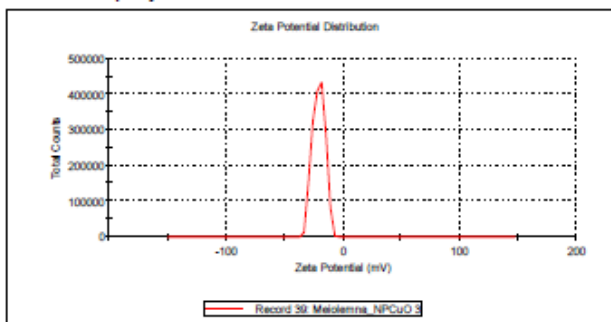
#### System

Temperature (°C): 25,0      Zeta Runs: 12  
 Count Rate (kops): 96,0      Measurement Position (mm): 2,00  
 Cell Description: Clear disposable zeta cell      Attenuator: 7

#### Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -20,8	Peak 1: -20,8	100,0	5,16
Zeta Deviation (mV): 5,16	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,324	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality **Good**



# LAUDO 4

## SOLUÇÃO DE NPCuO COM A ÁGUA ULTRAPURA

### Zeta Potential Report

v2.2



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

#### Sample Details

Sample Name: Aguapultrada\_NPCuO 2

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

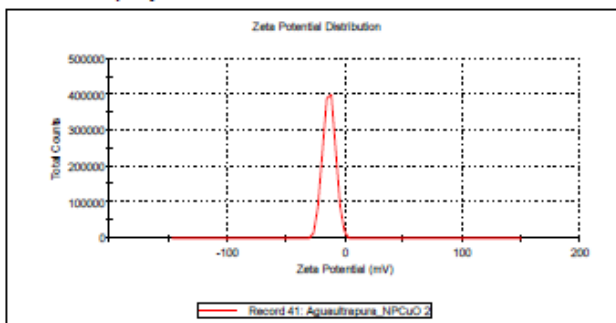
File Name: willm matias.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 41	Dispersant RI: 1,330
Date and Time: quinta-feira, 14 de março de 2013	Viscosity (cP): 0,8872
	Dispersant Dielectric Constant: 78,5

#### System

Temperature (°C): 25,0	Zeta Runs: 12
Count Rate (kops): 94,4	Measurement Position (mm): 2,00
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 7

#### Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -13,5	Peak 1: -13,5	100,0	5,17
Zeta Deviation (mV): 5,17	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
Conductivity (mS/cm): 0,00711	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality **Good**

## LAUDO 5

### SOLUÇÃO DE NPCuO COM A ÁGUA ULTRAPURA

## Zeta Potential Report

v2.2



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

### Sample Details

Sample Name: Aguapultrapura\_NPCuO 3

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

File Name: willm matias.dts

Dispersant Name: Water

Record Number: 42

Dispersant RI: 1,330

Date and Time: quinta-feira, 14 de março de 2...

Viscosity (cP): 0,8872

Dispersant Dielectric Constant: 78,5

### System

Temperature (°C): 25,0

Zeta Runs: 12

Count Rate (kops): 183,0

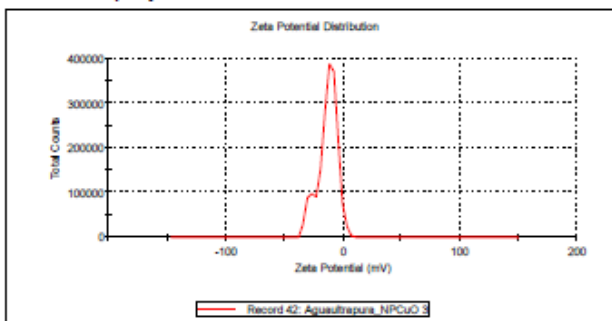
Measurement Position (mm): 2,00

Cell Description: Clear disposable zeta cell

Attenuator: 7

### Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
Zeta Potential (mV): -13,1	Peak 1: -11,0	84,0	5,96
Zeta Deviation (mV): 8,17	Peak 2: -27,3	16,0	3,62
Conductivity (mS/cm): 0,00671	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality **Good**

## LAUDO 6

### SOLUÇÃO DE NPCuO COM A ÁGUA ULTRAPURA

#### Zeta Potential Report

v2.2



Malvern Instruments Ltd - © Copyright 2008

#### Sample Details

Sample Name: Aguautrapura\_NPCuO 1

SOP Name: mansettings.nano

General Notes:

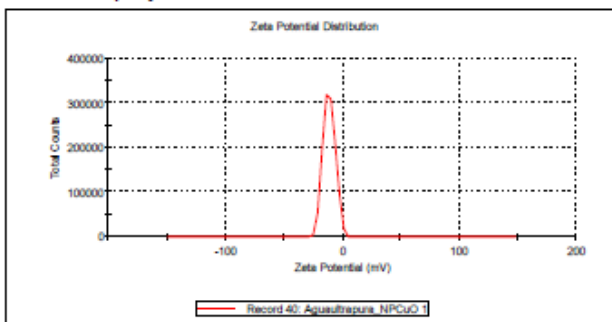
File Name: willim matias.dts	Dispersant Name: Water
Record Number: 40	Dispersant RI: 1,330
Date and Time: quinta-feira, 14 de março de 2...	Viscosity (cP): 0,8872
Dispersant Dielectric Constant: 78,5	

#### System

Temperature (°C): 25,0	Zeta Runs: 12
Count Rate (kopc): 174,4	Measurement Position (mm): 2,00
Cell Description: Clear disposable zeta cell	Attenuator: 7

#### Results

	Mean (mV)	Area (%)	Width (mV)
<b>Zeta Potential (mV): -11,4</b>	Peak 1: -11,4	100,0	5,12
<b>Zeta Deviation (mV): 5,12</b>	Peak 2: 0,00	0,0	0,00
<b>Conductivity (mS/cm): 0,00609</b>	Peak 3: 0,00	0,0	0,00

Result quality **Good**



**ANEXO I**  
**ENDEREÇOS ELETRÔNICOS DAS NORMATIZAÇÕES DE TESTES  
TOXICOLÓGICOS COM LEMNA.**

As normatizações apresentadas neste trabalho podem ser encontradas nos endereços eletrônicos a seguir:

**ISO 20079**

<[http://www.iso.org/iso/iso\\_catalogue/catalogue\\_tc/catalogue\\_detail.htm?csnumber=340](http://www.iso.org/iso/iso_catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=340)>

**OECD**

[http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-221-lemna-sp-growth-inhabitation-test\\_9789264016194-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-221-lemna-sp-growth-inhabitation-test_9789264016194-en)

**Observação:** As normatizações não foram diretamente inseridas no presente trabalho por motivo de estarem sob direitos autorais.