

Cristina Henning da Costa

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA NANOPARTÍCULA DE
ÓXIDO DE CROMO III ATRAVÉS DE ENSAIOS *IN VIVO* E *IN
VITRO*.**

Tese submetida ao Programa de Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutora em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. William Gerson Matias

Co-orientadora: Dra. Silvia Pedroso Melegari

Florianópolis
2014

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Costa, Cristina Henning da

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE CROMO
III ATRAVÉS DE ENSAIOS IN VIVO E IN VITRO / Cristina
Henning da Costa ; orientador, William Gerson Matias ;
coorientadora, Sílvia Pedroso Melegari. - Florianópolis, SC,
2014.

197 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia Ambiental. 2. Engenharia Ambiental. 3.
Nanotoxicologia Ambiental. 4. Nanopartículas metálicas. 5.
Citotoxicidade. I. Matias, William Gerson . II. Melegari,
Sílvia Pedroso. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental.
IV. Título.

"Avaliação Toxicológica da Nanopartícula de Óxido De Cromo III Através de Ensaios *In Vivo e In Vitro*".

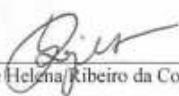
Cristina Henning da Costa

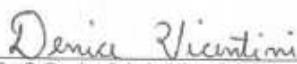
A Tese foi julgada e aprovada pela banca examinadora no Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

DOUTOR EM ENGENHARIA AMBIENTAL

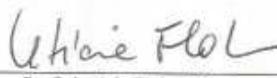
Aprovado por:

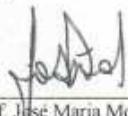
Prof. William Gerson Matias, Dr.
(Orientador)

Prof. Rejane Helena Ribeiro da Costa, Dr.


Prof. Denice Schulz Vicentini, Dr.


Prof. José Bonomi Baruffi, Dr.


Prof. Leticia Flohr, Dr.


Prof. José Maria Monserrat, Dr.


Prof. William Gerson Matias, Dr.
(Coordenador)

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL
OUTUBRO/2014

*Este trabalho é dedicado à minha
família, em especial meus pais Silvio
e Eliana e ao meu marido Luciano.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me conceder paz e força interior para seguir meus caminhos.

Agradeço, de forma muito carinhosa, aos meus pais, pelo incentivo, principalmente emocional, para que eu me dedicasse à pesquisa e construção deste trabalho. Pela paciência e crença absoluta deles na minha capacidade de realização desta tese. Agradeço também às minhas irmãs, Vanessa e Adriana e irmão Marcos, pela amizade e amor e a minha afilhada Isabela, por encher mais o meu coração de amor e ternura.

À minha paixão e também meu marido Luciano, por me compreender, incentivar e nunca me deixar desanimar.

Ao Prof. William Gerson Matias, meu orientador, pela oportunidade e confiança para realizar meu trabalho de tese, pelos seus conhecimentos repassados e orientação para a execução da pesquisa.

À Silvia Pedroso Melegari, pela coorientação, sugestões e ajuda, durante a execução desta pesquisa.

Aos professores(as) José Maria Monserrat, Letícia Flohr, José Bonomi Barufi, Denice Schulz Vicentini e Rejane H. R. da Costa por aceitarem o convite de participar da banca de avaliação e contribuírem para o aprimoramento deste trabalho.

Ao Prof. Radovan Popovic (*in memoriam*) da Universidade de Montreal a Quebec (UQÀM), por ter me recebido durante o estágio Doutorado Sanduíche. Aos colegas François Perreault e Abdallah Oukarroum da UQÀM, pelos conhecimentos repassados em laboratório e pelas correções e sugestões no trabalho escrito.

Aos meus colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental (Labtox), Rodrigo Puerari, Cristiane Fuzzinato, Bianca Oscar e em especial à Ana Letícia Rossetto pelas sugestões e amizade; ao José Julio Barrios, pelo apoio intelectual, “braçal” e por momentos de descontração. Gratidão especial à minha amiga e parceira Cristina Moreira Lalau.

À equipe do LAMAR (Laboratório de Algas Marinhas), pela oportunidade e ajuda no preparo das amostras biológicas para visualização em microscopia de luz e eletrônica, mas em especial ao Eder Carlos Schmidt pela orientação e ajuda no tratamento das imagens, pela cordialidade e por proporcionar bons momentos de risadas.

À Chirle e ao Demétrio, do Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEBs), pelo auxílio técnico para a captura de imagens.

Ao LCME (Laboratório de Microscopia Eletrônica da UFSC), pela cooperação na realização da caracterização via microscopia. Em especial à Eliana (LCME) pelo auxílio técnico durante as análises das amostras biológicas.

Ao LaMaTe (Laboratório de Materiais Elétricos) pela cooperação para a caracterização da área superficial.

Ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. E ao Programa de Pós-Graduação de Engenharia Ambiental (PPGEA).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fomento à pesquisa através da bolsa de estudos. Aos amigos que escutaram minhas dúvidas, minhas lamentações e sempre torceram por mim.

“O cientista não estuda a natureza porque ela é útil; ele a estuda porque se deleita nela, e se deleita nela porque ela é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena ser conhecida, e se não valesse a pena ser conhecida, a vida não valeria a pena ser vivida.”

(Henry Poincaré)

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

(Marthin Luther King)

RESUMO

Diversos setores da indústria estão utilizando nanopartículas (NP) metálicas. Contudo, é difícil prever o comportamento dessas no meio ambiente sem estudos toxicológicos. Dadas às características particulares das NP, como reduzido tamanho, maior área superficial e capacidade de aglomeração/dispersão, estas podem se translocar facilmente pelos compartimentos ambientais potencializando os riscos ao meio ambiente e ao homem. A NP de óxido de cromo III (NP Cr₂O₃) é aplicada na indústria principalmente como pigmentos, catalisadores e material refratário, contudo o seu efeito tóxico aos organismos vivos é pouco conhecido. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da NP Cr₂O₃ na população de algas unicelulares *Chlamydomonas reinhardtii*, bactéria luminescente marinha *Aliivibrio fischeri*, microscrustáceo *Daphnia magna* e investigar o efeito citotóxico, através do ensaio de MTT e lipoperoxidação, sobre células Vero. As *C. reinhardtii* foram expostas às NP Cr₂O₃ para avaliar os efeitos sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), atividade esterase, viabilidade celular e fotossistema II. Para o estudo com *D. magna*, foram realizados teste de toxicidade aguda e crônica. Foram feitos testes de inibição de luminescência com *A. fischeri*, para os tempos de 15 e 30 minutos. As células Vero foram expostas às NP por 24 horas, para observação do efeito citotóxico e quantificação de MDA. Os testes com algas mostraram, em 24 horas, um aumento significativo no nível de ROS para toda a população exposta à NP Cr₂O₃ e CE_{50,24h} de 1,57±0,53 g L⁻¹. *D. magna* mostrou-se sensível à NP Cr₂O₃, apresentando uma CE_{50,48h} de 101,74 mg L⁻¹. Foi observado efeito crônico sobre *D. magna* com valor de CEO de 10 mg L⁻¹ para reprodução e crescimento, e CEO 50mg L⁻¹ para o parâmetro longevidade. A bactéria *A. fischeri* se mostrou menos sensível à NP apresentando valores de CE_{50,15min} de 769,17±19,69 mg L⁻¹ e CE_{50,30min} de 980,00±134,35 mg L⁻¹. Os resultados obtidos nas avaliações toxicológicas com células Vero demonstraram que a NP Cr₂O₃ possui um potencial efeito citotóxico, pois reduz a viabilidade celular das células Vero (CE_{50,24h} = 0,97±0,56 g L⁻¹). Os resultados demonstraram que a NP Cr₂O₃ possui potencial para causar efeito de toxicidade aguda e crônica, bem como alterações a nível celular em organismos de água doce e salgada.

Palavras-chave: Nanopartícula, Óxido de cromo (III), Espécies reativas de oxigênio, *Chlamydomonas reinhardtii*; *Daphnia magna*; *Aliivibrio fischeri*; célula Vero.

ABSTRACT

Metallic nanoparticles (NPs) are being used in several industrial fields. However, the toxicologic studies default hinders the observation of the behavior of these particles on the environment. The intrinsic characteristics of NPs such as: low size, larger surface area and capacity to agglomeration / dispersion, facilitate its displacement through of environmental compartments potentiating the environment and humans risks. Although Chromium (III) oxide nanoparticles (Cr_2O_3 NP) are applied in industry mainly as pigments, catalysts and refractory material forms, studies developed to evaluate its toxic effect on living organisms are scarce. Thus the present study has aimed to evaluate the toxic effects of Cr_2O_3 NP on the unicellular algae population *Chlamydomonas reinhardtii*, the marine luminescent bacteria *Aliivibrio fischeri*, the microcrustacean *Daphnia magna* and to investigate the cytotoxic effect by MTT and lipid peroxidation assay on Vero cells. *C. reinhardtii* were exposed to Cr_2O_3 NP to evaluate its effects on reactive oxygen species (ROS) production, esterase activity, cell viability and photosystem II. *D. magna* were exposed to NPs suspensions to perform acute and chronic toxicity tests. *A. fischeri* was exposed to NPs suspensions at 15 and 30 minutes to perform luminescence inhibition tests. Vero cells were exposed to Cr_2O_3 NPs to a 24h period to observe the cytotoxic effect through the MTT assay and to MDA quantification. The results with algae showed in 24 hours, an significant increase of ROS levels for the entire population exposed to Cr_2O_3 NPs and $\text{EC}_{50,24\text{h}}$ of $1.57 \pm 0.53 \text{ g L}^{-1}$. The *D. magna* was sensitive to Cr_2O_3 NPs, at $\text{EC}_{50,48\text{h}}$ of 101.74 mg L^{-1} . With respect to chronic toxicity, Cr_2O_3 NPs showed a statistically significant effect ($p < 0.05$) on the growth and reproduction parameters ($\text{OEC} = 10 \text{ mg L}^{-1}$). In relationship to *A. fischeri* assay, the results showed less sensitivity to NP demonstrating values of $\text{EC}_{50,15\text{min}} = 769.17 \pm 19.69 \text{ mg L}^{-1}$ and $\text{EC}_{50,30\text{min}} = 980.00 \pm 134.35 \text{ mg L}^{-1}$. The results obtained of Vero cells showed that Cr_2O_3 NPs has the cytotoxic effect potential because it reduces cell viability of Vero cells ($\text{CE}_{50,24\text{h}} = 0.97 \pm 0.56 \text{ g L}^{-1}$). The results showed that the Cr_2O_3 NPs have potential to cause toxic effects (acute and chronic), as well as changes at the cellular level in fresh and salt water organisms.

Keywords: Nanoparticle, Chromium (III) oxide, Reactive oxygen species, Cell viability, *Chlamydomonas reinhardtii*; *Daphnia magna*; *Aliivibrio fischeri*; Vero cell.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- Estrutura cristalina do óxido de cromo III.....	43
Figura 2.2 – Representação esquemática do ciclo de contaminação ambiental por cromo.....	45
Figura 2.3 - Esquema do processo fotossintético.....	62
Figura 2.4 - Estruturação da microalga <i>C. reinhardtii</i>	68
Figura 2.5 - Estruturação celular do microcrustáceo <i>D. magna</i>	69
Figura 2.6 - Estruturação celular da bactéria <i>A. fischeri</i>	71
Figura 3.1- Imagens do teste de toxicidade com <i>C. reinhardtii</i>	77
Figura 3.2 - Histograma de citometria de fluxo mostrando mudança na atividade da esterase da <i>C. reinhardtii</i>	79
Figura 3.3 - Esquema representativo dos testes de toxicidade aguda.....	85
Figura 3.4 - Esquema do teste de toxicidade crônica com <i>D magna</i>	87
Figura 3.5 - Medida do comprimento total de <i>D. magna</i> realizada após 21 dias de teste.	89
Figura 4. 1 - Difratograma da amostra de NP Cr ₂ O ₃ (lote cod. 1001025977).101	
Figura 4.2 - Imagem de micrografia em MET da NP Cr ₂ O ₃ (lote cod. 1000884883) suspensa em meio HSM.....	102
Figura 4.3 - Imagem de micrografia em MET da NP Cr ₂ O ₃ (lote cod. 1001025977) suspensa em diferentes meios diluentes.....	103
Figura 4.4 - Avaliação populacional da densidade celular de algas <i>C. reinhardtii</i> exposta à NP Cr ₂ O ₃ em 24, 48 e 72 h.	105
Figura 4.5 - Imagens de microscópio ótico: interação entre NP Cr ₂ O ₃ e <i>C. reinhardtii</i> em 24 h de exposição.....	107
Figura 4.6 - Micrografias de MET das <i>C. reinhardtii</i> tratadas com NP Cr ₂ O ₃ após 72 h de exposição..	108
Figura 4.7 - Mudanças na atividade da esterase das <i>C. reinhardtii</i> exposta a NP Cr ₂ O ₃	109
Figura 4.8 – Avaliação do estresse oxidativo através da produção de ROS de <i>C. reinhardtii</i> exposta a NP Cr ₂ O ₃ em 24, 48 e 72 h.	111
Figura 4.9 – Níveis de pigmentos fotossintéticos em células de <i>C. reinhardtii</i> após 72 h de exposição à NP Cr ₂ O ₃	113
Figura 4.10 - Alterações na cinética da fluorescência Chl <i>a</i> de <i>C. reinhardtii</i> após 72 h de exposição a NP Cr ₂ O ₃	115
Figura 4.11- Resultado do teste crônico com <i>D. magna</i> exposta a NP Cr ₂ O ₃ para o parâmetro longevidade.....	120
Figura 4.12 - Imagens dos indivíduos <i>D. magna</i> do teste crônico.	121
Figura 4.13 - Imagens das secções transversais dos indivíduos <i>D. magna</i> após período de 48h... ..	123
Figura 4. 14 - Imagens das secções transversais dos indivíduos <i>D. magna</i> após período de 21 dias.....	124
Figura 4. 15 - Imagens de MEV. Micrografias das brânquias de <i>D. magna</i> após 21 dias de exposição à NP Cr ₂ O ₃	125

Figura 4.16 - Eletromicrografia de transmissão dos cortes ultrafinos de <i>D. magna</i> após 48h de exposição à NP Cr ₂ O ₃	127
Figura 4.17 - Eletromicrografias dos cortes ultrafinos de <i>D. magna</i> após 21 dias de exposição à NP Cr ₂ O ₃	129
Figura 4. 18 - Curva de viabilidade celular de células Vero expostas à NP e MP Cr ₂ O ₃	132
Figura A.1– Laudo da área superficial da NP Cr ₂ O ₃ (lote 1001025977). Método BET.	191
Figura A.2 – Espectro EDX (MEV) da amostra <i>D. magna</i> após 21 dias de exposição.....	193
Figura A.3 - Curva de calibração para quantificação da proteína. Método Bradford (1976).....	195
Figura A.4 - Curva de calibração para quantificação do MDA no ensaio de LPO.	197

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 – Parâmetros fotossintéticos obtidos a partir da cinética de fluorescência modulada.	82
Tabela 4. 1 - Valores do D_H e P_z para as NP Cr_2O_3 suspensas em diferentes meios diluentes.	99
Tabela 4.2 - Resultados do teste crônico, para os parâmetros crescimento, reprodução e longevidade, de <i>D. magna</i> expostas à NP Cr_2O_3	119
Tabela 4. 3 - Microanálise de raios-X da região das brânquias após 21 dias de exposição à NP Cr_2O_3 dos organismos <i>D. magna</i>	126
Tabela 4. 4 - Determinação do Cr (VI) pelo método colorimétrico DFC nas suspensões de NP e MP Cr_2O_3	134
Tabela A. 1- Pontos para a construção da curva de calibração BSA.	195
Tabela A. 2 - Dados para a construção da curva de calibração MDA.....	197

LISTA DE QUADROS

Quadro 5.1 – Quadro resumo dos valores de CE_{50} , CEO e CENO obtidos usando diferentes bioensaios.....	138
--	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas
ATP: Trifosfato de Adenosina
AT-O: Azul de Toluidina
BET: Teoria de Brunauer, Emmett e Teller
BSA: Bovine Serum Albumin (Albumina de Soro Bovino)
Bulk: Granel (partículas de maior tamanho)
CAPES: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
Carot: Carotenóides
CE₅₀: Concentração Efetiva que causa efeito em 50% dos organismos expostos.
CENO: Concentração de Efeito Não Observado
CEO: Concentração de Efeito Observado
Cr₂O₃: Óxido de Cromo (III)
CuO: Óxido de Cobre
Chl *a*: Clorofila *a*
Chl *b*: Clorofila *b*
Chl total: Clorofila total
DCF: 2',7'- Diclorofluoresceína
DFC: 1,5 – difenilcarbazida
DLS: Espalhamento Dinâmico de Luz
D_H: Diâmetro Hidrodinâmico
DIN: Deutsches Institut Für Normung (Instituto alemão de Normatização)
DNA: Ácido desoxirribonucleico
DMSO: Dimetil-sulfóxido
DRX: Difração de Raios-X
EDX: Energia Dispersiva de Raios-X
ETR: Taxa de Transporte de Elétrons
F₀: Fluorescência basal emitida pelas antenas quando os centros de reação do fotossistema II de clorofila estão oxidados
F_m: Fluorescência máxima emitida quando os centros de reação do fotossistema II estão reduzidos
F_s: Fluorescência variável medida sob iluminação actínica no estado de equilíbrio
FD: Fator de Diluição
FDA: Fluorescein Diacetate hydrolysis (Diacetato de Fluoresceína)

FSII: Fotossistema II
H₂DCFDA: 2', 7'- dichlorodihydrofluorescein diacetate
HPLC: High Performance Liquid Chromatography (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
HSM: High Salt Medium (Meio de cultura de Alta Salinidade)
ISO: International Organization for Standardization
ICSD: Inorganic Crystal Structure Database
Labtox: Laboratório de Toxicologia Ambiental
LAMAR: Laboratório de Algas Marinhas
LAMATE: Laboratório de Materiais Elétricos
LCME: Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LIMA: Laboratório Integrado do Meio Ambiente
LPO: Lipoperoxidação
MDA: Malondialdeído
Meio ISO: meio diluente de teste *D. magna*
Meio M4: Meio completo de cultivo *D. magna*
MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
ML: Microscopia de Luz
MP: Micropartícula
MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol il-2,5-difeniltetrazólio)
NADP: Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NM: Nanomaterial
NP: Nanopartícula
NP Cr₂O₃: Nanopartícula de Óxido de Cromo (III)
NT: Nanotecnologia
OECD: The Organisation for Economic Co-operation and Development
PAMAM: Poliamidoamina
PBS: Phosphate Buffered Saline – Tampão salino de fosfato
pH: Potencial hidrogeniônico
PQ: Plastoquinona
Pz: Potencial Zeta
Q_A: Quinona A
qN: Queching não-fotoquímico (perda não fotoquímica de fluorescência clorofiliana)
qP: Queching fotoquímico (perda fotoquímica de fluorescência clorofiliana)
RNA: Ácido ribonucleico
RPMI: Roswell Park Memorial Institute (Meio de cultura de células animais)
ROS: Reactive Oxygen Species (Espécie Reativa de Oxigênio)

SDS: Dodecilsulfato de sódio

TBA: Ácido 2-tiobarbitúrico

USEPA: United State Environmental Protection Agency

UV: ultravioleta

vs.: versus

WHO: World Health Organization

WPMN: Working Party on Manufactured Nanomaterials

Φ_{eII} : Rendimento quântico efetivo do FSII

ϕ'_{NO} : Rendimento de dissipação de energia não-fotoquímica não regulada;

ϕ'_{NPQ} : Rendimento de dissipação de energia não-fotoquímica regulada

SUMÁRIO

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	29
1.2 JUSTIFICATIVA.....	32
1.3 HIPÓTESES.....	34
1.4 OBJETIVOS	34
1.4.1 Objetivo Geral.....	34
1.4.2 Objetivos Específicos.....	34
CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	37
2.1 NANOTECNOLOGIA.....	37
2.2 NORMATIZAÇÃO E NANOTECNOLOGIA.....	38
2.3 LEGISLAÇÃO AMBIENTAL E NANOTECNOLOGIA.....	39
2.4 CROMO.....	41
2.4.1 Elemento Cromo e seus principais compostos.....	41
2.4.2 Cromo e a Questão Ambiental.....	44
2.4.3 Toxicidade do Cromo.....	46
2.4.4 NP Cr ₂ O ₃	48
2.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DA NP.....	48
2.5.1 Diâmetro Hidrodinâmico e Potencial Zeta.....	49
2.5.2 Difração de Raios-X (DRX).....	50
2.5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET.....	51
2.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV.....	52
2.5.5 Área Superficial Específica.....	52
2.6 TOXICOLOGIA AMBIENTAL E NANOTOXICOLOGIA.....	54
2.6.1 Teste de Toxicidade Aguda.....	56
2.6.2 Teste de Toxicidade Crônica.....	58
2.6.3 Avaliação do Estresse Oxidativo.....	59
2.6.4 Avaliação da Viabilidade Celular através do Diacetato de Fluoresceína (FDA).....	60
2.6.5 Avaliação da Densidade Celular.....	60
2.6.6 Avaliação da Fluorescência Clorofiliana.....	61
2.7 CITOTOXICIDADE: ENSAIOS IN VITRO.....	64
2.7.1 Citotoxicidade pelo Ensaio do MTT.....	65
2.7.2 Avaliação da Lipoperoxidação pela Dosagem do MDA.....	65
2.8 DEFINIÇÃO DO MODELO BIOLÓGICO.....	66
2.8.1 Microalga verde <i>C. reinhardtii</i>	67
2.8.2 Microcrustáceo <i>D. magna</i>	68
2.8.3 Bactéria <i>A. fischeri</i>	70
2.8.4 Células Vero.....	72
CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS.....	73

3.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA	73
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA NP Cr ₂ O ₃	74
3.2.1 Estabilidade em Suspensão	74
3.2.2 Difração de Raios-X.....	74
3.2.3 Imagens das NP Cr ₂ O ₃ pela MET	75
3.2.4 Área Superficial Específica.....	75
3.3 BIOENSAIO COM ALGA VERDE <i>C. reinhardtii</i>	75
3.3.1 Cultura de <i>C. reinhardtii</i>	75
3.3.2 Exposição da <i>C. reinhardtii</i> à NP Cr ₂ O ₃	76
3.3.3 Densidade Celular	77
3.3.4 Viabilidade Celular (FDA).....	78
3.3.5 Estresse Oxidativo: nível de ROS	79
3.3.6 Dosagem de Pigmentos Fotossintéticos	80
3.3.7 Avaliação do nível de Fluorescência Clorofiliana	81
3.3.8 Análise estatística.....	82
3.3.9 Avaliação Microscópica.....	83
3.4 ENSAIOS DE TOXICIDADE COM <i>D. magna</i>	84
3.4.1 Cultura do microcrustáceo <i>D. magna</i>	84
3.4.2 Ensaio de Toxicidade Aguda.....	84
3.4.3 Ensaio de Toxicidade Crônica.....	86
3.4.4 Avaliação Microscópica.....	90
3.5 ENSAIOS DE TOXICIDADE COM <i>A. fischeri</i>	92
3.6 CITOTOXICIDADE: ENSAIOS IN VITRO	93
3.6.1 Cultura Celular	93
3.6.2 Ensaio MTT: Determinação da CE ₅₀	94
3.6.3 Lipoperoxidação: Extração e Quantificação do MDA	95
3.7 QUANTIFICAÇÃO DE CROMO (VI)	96
CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO	99
4.1 CARACTERIZAÇÃO DA NP Cr ₂ O ₃	99
4.1.1 Potencial Zeta e Diâmetro Hidrodinâmico.....	99
4.1.2 Difração de Raios X (DRX).....	100
4.1.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	102
4.1.4 Área Superficial Específica.....	104
4.2 BIOENSAIO COM ALGA VERDE <i>C. reinhardtii</i>	105
4.2.1 Avaliação da densidade celular	105
4.2.2 Avaliação Microscópica.....	106
4.2.3 Avaliação da viabilidade celular (FDA)	108
4.2.4 Avaliação do estresse oxidativo (ROS).....	110
4.2.5 Dosagem dos Pigmentos Fotossintéticos	112
4.2.6 Avaliação da atividade fotossintética.....	114
4.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE COM <i>D. magna</i>	118

4.3.1 Toxicidade Aguda	118
4.3.2 Toxicidade Crônica	119
4.3.3 Avaliação Microscópica	122
4.3.3.1 Microscopia de luz (ML) e Histoquímica.....	122
4.3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV.....	124
4.3.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET.....	127
4.4 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>A. fischeri</i>	130
4.5 CITOTOXICIDADE: ENSAIOS IN VITRO.....	131
4.5.1 Ensaio MTT: Determinação CE ₅₀	131
4.5.2 Lipoperoxidação: Quantificação do MDA	133
4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CROMO (VI)	133
CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	137
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES.....	139
CAPÍTULO VII – RECOMENDAÇÕES	141
CAPÍTULO VIII - REFERÊNCIAS	143
CAPÍTULO IX – APÊNDICES	191
A1. Laudo da área superficial da NP Cr ₂ O ₃	191
A2. Espectros EDX da superfície da região branquial dos organismos <i>D. magna</i> controle e expostos a NP Cr ₂ O ₃ após 21 dias.	193
A3. Curva de calibração para a quantificação de Proteínas, Método Bradford (1976).....	195
A4. Curva de calibração para a quantificação do malondialdeído	197

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

A nanotecnologia (NT) é um dos ramos da ciência que mais se desenvolve atualmente, abrangendo praticamente todos os setores da indústria e de serviços (PASCHOALINO et al., 2010). Alguns setores que já utilizam materiais nanoestruturados são biotecnologia, indústria farmacêutica e cosmética, eletrônica, alimentícia, medicina, agrícola entre outros (NGÔ & VAN DE VOORDE, 2014).

As nanoestruturas mais estudadas são: os fulerenos, com grande aplicação na medicina como componentes de contrastes e transporte de medicamentos (TROPHE, 2007); os nanotubos de carbono, sendo aplicados na indústria de eletrônicos como condutores ou semicondutores (BIAZI, 2012; MARIANO, 2012; GOUVÊA & MURAD, 2001); nanopartículas (NP) metálicas, tendo aplicações magnéticas, ópticas e eletrônica, como também podem ser aplicadas como pigmentos de corantes e elementos anti-incrustantes em tintas (BESSON et al., 2005; MEDEIROS, 2007; GABBAY et al., 2006); dendrímeros, que tem a função de serem captadores seletivos em produtos cosméticos, como batom e cremes antirrugas, e produtos medicinais e encapsuladores de NP metálicas (CAMINADE & MAJORAL, 2005; NANJWADE et al., 2009; WILCZEWSKA et al., 2012; RAZZINO, 2013) ; as nanoemulsões, aplicada a quase todos os ramos da ciência como sistemas de liberação de determinados elementos; NP poliméricas, que são utilizadas como carreadoras de fármacos, a exemplo as nanocápsulas e nanoesferas (KÜLKAMP et al., 2011).

A NT abre muitas e variadas perspectivas para os diferentes ramos da indústria. Segundo o inventário de produtos de consumo baseados em NT publicado no sítio “*Project on Emerging Nanotechnologies – PEN*” (2014) até outubro de 2013 foram registrados 1.628 produtos introduzidos no mercado que declaram publicamente conter nanotecnologias em suas composições. Isto representa um aumento de 768% em relação ao primeiro inventário publicado em 2006, quando havia 212 produtos comercializados (Project on Emerging Nanotechnologies, 2014). O consumo mundial de nanomateriais foi estimado em cerca de 10,3 milhões de toneladas em 2010 (ABDI, 2010). Isto implica em uma inevitável exposição humana e ambiental aos nanomateriais (NM) já disponíveis aos consumidores (PASCHOALINO et al., 2010).

Com o desenvolvimento rápido da NT, um dos possíveis problemas é a nanopoluição, que é gerada durante a confecção, uso e descarte de NM. Os riscos sobre a saúde humana e ao meio ambiente causados pela exposição aos NM aumentam (CURTIS et al. 2006, HANDY et al., 2008). Apesar dos esforços de diversos países no desenvolvimento da nanotoxicologia, como por exemplo, normas ISO (ISO/TR 16197:2014, ISO/TR 13014:2012, ISO/TS 12901-2:2014), ainda não foi aprovada nenhuma política específica para controlar os efeitos dos NM sobre o meio ambiente e a saúde humana (MOREIRA, 2006; LIN, 2007).

A grande importância dos estudos sobre a toxicologia dos NM está no fato da maioria destes nanopoluentes não existirem naturalmente, mas terem sido sintetizados pelo homem. Em vista disso, os seres vivos provavelmente não terão meios apropriados de lidar com eles, causando danos ainda desconhecidos. Os nanopoluentes podem entrar nas células de seres humanos, animais e plantas mais facilmente, por apresentarem tamanho reduzido. Estes nanopoluentes podem ainda se acumular na cadeia alimentar como muitos contaminantes já conhecidos (FURLANETO, 2011).

A produção e comercialização de um produto sem estudo prévio dos seus efeitos tóxicos traz um grande risco para a saúde humana e o meio ambiente. Este fenômeno é agravado pelo fato de que os NM têm características físicas e químicas diferentes dos compostos convencionais, como o pequeno tamanho de partícula, a forma variada e a elevada área superficial, que aumentam a interação destas com os tecidos biológicos e podem ser responsáveis por efeitos nocivos aos organismos vivos, conforme indícios reportados por estudos toxicológicos com microrganismos, algas, peixes, ratos e células humanas (PASCHOALINO et al., 2010; OBERDÖRSTER et al., 2005).

Esses efeitos são difíceis de prever a partir das propriedades conhecidas da mesma matéria na escala micro e macroscópica, referida como granel (em inglês *bulk*), ou de extrapolações teóricas com base em propriedades atômicas ou moleculares. De acordo com o conhecimento atual, os efeitos tóxicos dos NM dependem da relação entre suas propriedades físicas e químicas, seu transporte biológico, evolução no ambiente, pontos de entrada nos organismos, nos órgãos e células e resposta celular para a exposição. O estudo desses processos é chamado nanotoxicologia.

As NP podem provocar toxicidade por uma ou várias vias, como exemplos, podem causar danos na integridade das membranas e ácidos nucleicos; a oxidação e a desestabilização das proteínas; danos

celulares através da formação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ROS – do inglês *Reactive Oxygen Species*) e interrupção do transporte de elétrons na respiração (BROWN et al., 2001; LIVINGSTONE, 2001; MOORE, 2002; PERKEL, 2004; HOWARD, 2004; NEL et al., 2006).

A nanotoxicologia, através de estudos da interação entre NP e proteínas, mostrou que a estrutura e função destas são influenciadas pela química, dimensão, composição das NP, a estequiometria do complexo (NP-proteína), o sítio de ação da proteína e da natureza da ligação entre as NP e as proteínas (AUBIN-TAM & SCHIFFERLI, 2008). A mudança que a NP provoca na estrutura da proteína afeta sua atividade enzimática (AUBIN-TAM & SCHIFFERLI, 2008; DYAL et al. 2003). Recentemente, Dawson et al. (2009) mostraram que as NP podem alterar as propriedades físico-local dos lipídios membranares.

Os NM estão sendo vistos com grande potencial para trazer benefícios às diversas áreas da indústria e pesquisa e, com isso atraindo rapidamente investimentos de todos os setores para a fabricação de novos materiais em escala nanométrica. Deve-se notar que os NM já estão difundidos pelo planeta, desde alimentos à sistemas de tratamento de ar e água. Contudo, esse rápido crescimento da nanotecnologia também traz desafios em relação à segurança desses novos compostos, tanto à saúde do homem como ao meio ambiente. Poucos dados sobre os NM manufaturados aumentam ainda mais a insegurança em relação à detecção e ao monitoramento da presença e concentrações em matrizes complexas como alimentos, água, sedimentos e solo (ABDI, 2010). Por isso, um dos desafios que as autoridades reguladoras se deparam sobre a nanotecnologia vem da necessidade de garantir a segurança pública, uma vez que os riscos desta nova tecnologia são pouco conhecidos. Além disso, o desenvolvimento não controlado apresenta riscos a curto e longo prazo para a saúde dos seres humanos, animais e do meio ambiente (PASCHOALINO et al., 2010; AOUADA, 2009).

Outra preocupação atual em relação ao potencial toxicológico das NP está no fato de serem produzidos e utilizados em larga escala e o risco de alcançarem os diferentes compartimentos ambientais (atmosfera, águas e solo) tornando-se ambientalmente disponíveis (PASCHOALINO et al., 2010; LYON et al., 2006). Este problema é uma das necessidades prioritárias no campo da nanotoxicologia (MONSERRAT, 2010). Também, deve-se atentar para a falta de técnicas analíticas com sensibilidade suficiente para detectar as NP no ambiente.

Atualmente, os óxidos metálicos têm atraído a atenção devido o interesse da ciência e NT para suas propriedades físicas, principalmente

magnéticas, condutoras e químicas. Entre os vários óxidos de metais de transição, o óxido de crômio ou óxido de cromo III (Cr_2O_3) está sendo amplamente estudado devido a sua natureza de semicondutor (TOBIA et al., 2010; SABYASACHI et al., 2011; GUO et al., 2012). O Cr_2O_3 em sua forma *bulk* possui característica antiferromagnética (até 307 K, à temperatura de Neel), e quando nanoestruturado, mostra propriedades magnéticas (VOLLATH et al., 1996; MAKHLOUF, 2004). Outras aplicações da NP Cr_2O_3 já foram estudadas, como seu uso em dispositivos ópticos e eletrônicos, em reações de catálise, para aumentar a resistência de materiais, e em corantes (CAO et al., 2006; ABU-ZIED, 2000, KITSUNAI et al., 1991; GUPTA et al., 2014).

Esse interesse tecnológico na NP Cr_2O_3 aumenta a necessidade de uma investigação toxicológica, pois são poucos estudos realizados sobre a toxicidade desta NP.

1.2 JUSTIFICATIVA

O rápido desenvolvimento da área de nanotecnologia e a crescente inclusão de NM no mercado consumidor aumenta a preocupação da comunidade sobre esses novos materiais. Estima-se que em 2020 aproximadamente 20% de todos os produtos manufaturados no mundo estarão baseados, de alguma forma, na utilização de Nanotecnologia (OIT, 2010). Isso mostra um grande volume de produtos disponíveis no mercado, e que já possuem NT incorporados, e que no final de suas vidas úteis geralmente serão descartados no meio ambiente.

Poucos investimentos estão sendo feitos na área de controle ambiental para NM, quando comparado aos investimentos em pesquisa e desenvolvimento de NT. Embora estudos de toxicidade dos NM estejam se tornando continuamente disponíveis, não existem dados conclusivos sobre os potenciais riscos causados pela NT sobre o ambiente e a saúde do homem e com relevância para as entidades reguladoras (SEATON et al., 2010; LOURO et al., 2013; DAMASCENO et al., 2013).

No âmbito legal, já é possível identificar trabalhos realizados em nível de regulação de nanomateriais – NANoREG – que é um projeto para entregar as respostas necessárias aos órgãos reguladores e legisladores sobre segurança e saúde ambiental, ligando-os a uma avaliação científica dos dados e métodos de ensaio (NANoREG, 2014). Contudo a ausência de padrões específicos que norteiam o uso e a segurança de NM ainda é realidade no país e mundialmente. Isso torna

necessário constantes estudos investigativos da toxicologia desses NM, para assim fornecerem informações sobre seus reais efeitos.

Diversos estudos já realizados demonstram que vários tipos de nanopartículas, entre elas as metálicas, têm efeitos tóxicos comprovados através ensaios toxicológicos (HANDY & OWEN, 2008; BLINOVA et al., 2010; PEARREAUT et al., 2011; MELEGARI et al., 2013). Entretanto a NP Cr₂O₃ ainda foi pouco investigada quanto aos seus efeitos nocivos à saúde humana e ao meio ambiente, e informações sobre a toxicidade desta NP sobre organismos indicadores como microcrustáceos, bactérias marinhas, algas verdes unicelulares ainda são escassos. Assim, o tema do presente estudo irá contribuir com uma base de dados em relação à toxicologia da NP de cromo III para auxiliar nas tomadas de decisão em relação à Nanotecnologia. Buscaram-se ainda respostas para o mecanismo de internalização e toxicidade das NP Cr₂O₃ pela possível expressão de alterações morfológicas, celulares e subcelulares dessa interação. Utilizaram-se como ferramentas os bioensaios, técnicas de microscopias, citometria de fluxo e quantificação de íons.

Neste contexto o Laboratório de Toxicologia Ambiental (Labtox), do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, vem desenvolvendo estudos toxicológicos de NP desde 2009, sendo que o Labtox possui um histórico de cooperação internacional Brasil-Canadá, financiado pela CAPES e faz parte do projeto “Rede cooperativa de pesquisas em nanotoxicologia aplicada a nanopartículas de interesse da indústria petrolífera e de tintas” cujas instituições envolvidas são UFSC (Florianópolis, Brasil), UQAM (Montreal, Canadá), RICE (Houston, EUA), Boredeaux 2 (Bordeaux, França), UNIFESP (São Paulo, Brasil), UNIVILLE (Joinville, Brasil) e Polinova (Rio de Janeiro, Brasil). Dentre as atividades desenvolvidas, destaca-se a pesquisa realizada por Perreault et al. (2011), que avaliou a toxicidade de NP de ouro em diferentes culturas de células animais. Outro trabalho desenvolvido em parceria com o Labtox foram os estudos realizados por Perreault et al. (2012) e Melegari et al. (2013) que avaliaram a toxicidade da NP de óxido de cobre em alga verde *Chlamydomonas reinhardtii*. Rosseto et al. (2014b) estudaram os efeitos agudos e crônicos da NP e MP de CuO em *Daphnia magna* e *Vibrio fischeri*. Lalau et al. (2014) avaliaram a toxicidade da NP CuO em espécie de macrófita *Landoltia punctata*.

1.3 HIPÓTESES

Considerando o exposto até o momento, algumas hipóteses foram elaboradas acerca da toxicidade da NP Cr₂O₃. Estas hipóteses foram consideradas orientadoras para o desenvolvimento desta tese e são apresentadas a seguir.

Primeira Hipótese:

A NP Cr₂O₃ induz a produção de espécies reativas de oxigênio e pode provocar estresse oxidativo.

Segunda Hipótese:

O tamanho da partícula Cr₂O₃ implica no aumento da toxicidade da substância.

Terceira Hipótese:

Em virtude da maior reatividade das NP metálicas, a NP Cr₂O₃ pode liberar mais íons de cromo que a MP Cr₂O₃.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade da NP Cr₂O₃, através de ensaios toxicológicos e citotoxicológicos.

1.4.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar morfologicamente a NP Cr₂O₃.
- Avaliar o potencial toxicológico da NP Cr₂O₃ sobre o crescimento, viabilidade celular e fotossistema em cultura de algas unicelulares *Chlamydomonas reinhardtii*.
- Avaliar a toxicidade da NP Cr₂O₃ através de ensaios de toxicidade aguda e crônica utilizando microcrustáceo de água doce *Daphnia magna*.
- Avaliar a toxicidade da NP Cr₂O₃ empregando ensaios de toxicidade aguda em bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*.

- Avaliar o efeito citotóxico da NP Cr₂O₃ sobre o crescimento e viabilidade em cultura de células Vero.
- Avaliar o efeito de indução a estresse oxidativo da NP Cr₂O₃ sobre cultura de células Vero, através dos níveis de lipoperoxidação celular.
- Comparar a toxicidade do Cr₂O₃ em tamanho de NP e MP, através de ensaios agudos com organismos *D. magna*, *A. fischeri* e células Vero.

CAPÍTULO II – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia (NT) é baseada no conhecimento e domínio do muito pequeno. O estudo desses materiais com tamanhos diminutos deu origem à nanociência e por consequência a NT. O marco da NT foi em 29 de dezembro de 1959, onde Richard Feynman discursou na reunião anual da Sociedade Americana de Física, sobre as vastas oportunidades presentes nos materiais, quando os mesmos possuem dimensões próximas do nível atômico. O interesse dos materiais nanoestruturados é modificar as propriedades químicas e físicas dos materiais, o que dá uma ampla possibilidade em aplicações tecnológicas. Efeitos da redução de tamanho, mudança de dimensionalidade e da mistura de diferentes elementos químicos estão diretamente relacionados com a ativação e controle das novas propriedades destes compostos (CAMPOS, 2005).

Segundo a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (U.S. Environmental Protection Agency - USEPA), a definição de NT engloba apenas os NM que tenham sido “intencionalmente produzidos”. A NT constitui um campo de pesquisa e desenvolvimento multidisciplinar que envolve a fabricação de novos materiais e novos dispositivos usando ferramentas ou técnicas para estruturar a matéria atômica, molecular e supramolecular. Esse novo conceito de materiais e produtos com estruturas nanométricas são chamados de NM que, por definição, possuem uma de suas dimensões em nanoescala onde o aparecimento de fenômenos que dependem do tamanho com alteração de alguma de suas propriedades, permite novas aplicações (ISO/TC 229, 2005; MOORE, 2006; SMITH et al., 2007; CHEN & SCHLUESNER, 2008). Outro tipo de NM são os nanocompósitos, denominados assim por serem formados pela união de dois ou mais componentes, em que um deles possui dimensões da ordem nanométricas (PONZIO, 2006).

A nanociência é o ramo da ciência que estuda e desenvolve produtos e processos, que possuem pelo menos uma dimensão na escala de nanômetros (DOWLING et al., 2004; WHITESIDES, 2005; LISBOA-FILHO & MONTEIRO, 2013). A nanociência têm beneficiado vários segmentos da indústria, como: alimentício, eletrônico, farmacêutico, biotecnológico, cosmético, médico-hospitalar, agrícola e de segurança nacional (PASCHOALINO et al, 2010; CHEN & SCHLUESNER, 2008).

A NT permite a descoberta de novos e diversos materiais nanoestruturados e que viabilizar produtos finais mais eficientes, leves, adequados e de baixo custo. Assim, o mercado já disponibiliza uma gama de manufaturados que utilizam nanotecnologias. Esses novos insumos trazem implicações tanto ambientais, éticas e jurídicas, mas também sobre a saúde do trabalhador, o qual está em contato direto com esses materiais, seja nos centros de pesquisa e desenvolvimento, nas fábricas, nos institutos tecnológicos ou nas universidades e, também aos consumidores de produtos nanotecnológicos (PASCHOALINO et al, 2010; LENZ & SILVA, 2008).

Apesar do rápido e intenso desenvolvimento de produtos nanoestruturados, a legislação sobre NT, tanto no Brasil como no mundo, está atrasada em relação ao avanço da área. Em termos gerais, as normas de regulamentação exigem que a avaliação de perigo (nocividade intrínseca do material) e avaliação da probabilidade ou duração da exposição se combinem para produzir um dado risco para qualquer população biológica exposta. Contudo, quando não é possível informar os impactos causados por um agente ou material por falta de plena certeza científica, o Princípio da Precaução deve ser adotado. Este, preconiza a necessidade de atuar na redução dos perigos potenciais antes de gerar os danos, tendo em consideração os prováveis custos e benefícios da ação *vs* inação (LOURO et al., 2013).

2.2 NORMATIZAÇÃO E NANOTECNOLOGIA

Devido à falta de harmonização de metodologia científica para aferir os efeitos positivos e negativos da NT, órgãos e agências normalizadoras estão referenciando normas e/ou protocolos para padronizar os dados referentes à caracterização e avaliação do risco de NM.

Em nível internacional a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OCDE) aprovou uma lista de 13 NM comercialmente relevantes. Em 2006, a OCDE criou um Grupo de Trabalho sobre Nanomateriais Manufaturados (WPMN) com o objetivo de aconselhar sobre questões emergentes da ciência e da inovação relacionados com o desenvolvimento e uso da nanotecnologia. As principais iniciativas em relação à normatização de NM são: ISO/TR 12885:2008, que dispõe sobre práticas relevantes em saúde e segurança no ambiente de trabalho para as nanotecnologias; ISO/TR 13121:2011, sobre avaliação de risco de nanomaterial; ISO/TR 13014:2012, que consiste de um relatório técnico preparado pelo comitê técnico ISO 229

e fornece orientação sobre a caracterização físico-química de materiais produzidos em nanoescala para avaliação toxicológica; ISO/TS 12901-1:2012 - Gestão ocupacional de risco aplicado aos nanomateriais artificiais - Parte 1: Princípios e abordagens; ISO/TS 12901-1:2012 - Gestão de risco ocupacional aplicada a nanomateriais artificiais - Parte 2: Utilização do método de controle de bandas; ISO/TR 16197:2014 - Compilação e descrição dos métodos de avaliação toxicológica de nanomateriais manufaturados, o qual fornece informações dos métodos de avaliação toxicológica mais indicados para determinados NM.

2.3 LEGISLAÇÃO AMBIENTAL E NANOTECNOLOGIA

Apesar do rápido e intenso desenvolvimento de produtos nanoestruturados, a legislação sobre NT, tanto no Brasil como no mundo, está atrasada em relação ao avanço da área. Ainda não existe nenhuma legislação específica que estabeleça os limites de segurança das NP no meio ambiente.

No entanto, podem-se citar alguns esforços dos governos e entidades privadas para avaliar os potenciais riscos dos NM na saúde e meio ambiente. Por exemplo, internacionalmente o Conselho da OCDE, através do grupo WPNM estuda as práticas de segurança para NM estabelecidas nos países membros da OCDE e desenvolve metodologias necessárias para avaliação dos riscos desses NM. Órgãos reguladores como a USEPA e a Direção de Proteção a Saúde e do Consumidor e a Comissão Europeia começaram a investigar os potenciais riscos das NP. Outro exemplo é um grupo de peritos da Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura (UNESCO) criado para avaliar os aspectos éticos da NT, e que publicou vários relatórios sobre o assunto.

Um grande avanço na área de legislação/regulação dos NM é o projeto europeu intitulado por NANoREG. Trata-se de um projeto que visa dar suporte técnico e científico para todos os órgãos e agências, internacionais ou nacionais, para a tomada de decisões e regulamentações, elaboração de leis e para todas as outras questões relacionadas à regulamentação e regulação da nanotecnologia. Atualmente, a NANoREG envolve 64 instituições de 16 países europeus, além de Austrália, Canadá, Coreia do Sul, Estados Unidos e Japão (1º Informativo NANoREG, 2014). No dia 26 de agosto de 2014, o Comitê Interministerial de Nanotecnologia (CIN) aprovou a adesão do Brasil ao projeto europeu NANoREG (PORTAL BRASIL, 2014).

É relevante, ainda, citar o princípio 15 da Declaração das Nações Unidas sobre Meio Ambiente e Desenvolvimento (Declaração do Rio de Janeiro 1992, ECO-92), denominado princípio da prevenção, que se institucionalizou no direito ambiental. O princípio orienta que quando presente o perigo de dano grave ou irreversível, a atividade ou substância em questão deverá ser evitada ou rigorosamente controlada. Assim, devem ser observados os riscos desconhecidos da nanotecnologia, sobre a qual ainda não se tem certezas científicas a respeito de seus efeitos no meio ambiente.

No Brasil, o projeto de lei sobre o assunto, o PL-5076/2005, cuja ementa era: "Dispõe sobre a pesquisa e o uso da nanotecnologia no País, cria Comissão Técnica Nacional de Nanosseguurança - CTNano, institui o Fundo de Desenvolvimento de Nanotecnologia - FDNano, e dá outras providências", foi arquivado por se entender que a nanotecnologia faz parte do assunto regulamentado pela Lei 11.105/2005 (BRASIL, 2005), que estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização de atividades que envolvam organismos geneticamente modificados e seus derivados.

Recentemente, o Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), criou em 2013 a Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia (IBN). A IBN é coordenada e gerida por um Comitê Interministerial de Nanotecnologia (CIN), instituído pela Portaria Interministerial nº 510, de 09/07/2012. O CIN tem como objetivo principal assessorar os ministérios na integração da gestão, na coordenação e no aprimoramento das políticas, diretrizes e ações voltadas ao desenvolvimento das nanotecnologias no Brasil. Cabe ao comitê, entre outras atribuições, propor mecanismos de acompanhamento e avaliação de atividades na área, bem como formular recomendações de planos, programas, metas, ações e projetos integrados para a consolidação e a evolução das nanotecnologias no País (PORTAL MCT, 2014).

Porém, em termos de legislação, até o presente momento, aplica-se no país o previsto no texto da Constituição Federal de 1988 (BRASIL, 1988) que em seu artigo 225, reconhece o direito fundamental ao meio ambiente:

“todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao poder público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações”.

Assim, atualmente, para o controle desses novos materiais deve-se proceder com a aplicação da legislação ambiental existente.

2.4 CROMO

2.4.1 Elemento Cromo e seus principais compostos

O cromo é um metal relativamente raro na crosta terrestre (aproximadamente 0,03%), podendo ser encontrado no solo, assim como em gases de vulcões, poeiras e sedimentos. Não é encontrado naturalmente no estado livre, ocorrendo geralmente associado ao ferro, chamado de cromita ($\text{FeO}\cdot\text{Cr}_2\text{O}_3$) e ao chumbo, chamado de crocoíta (PbCrO_4).

O metal cromo é branco, duro e brilhante, possui ponto de fusão $1903 \pm 10^\circ\text{C}$ e ponto de ebulição à 2944°C . É extremamente resistente aos agentes corrosivos normais, não sendo oxidado pelo ar mesmo em presença de umidade. É considerado insolúvel na água, mas solúvel em ácidos fortes. O metal dissolve fácil e prontamente em ácidos minerais oxidantes, como por exemplo, ácidos clorídrico e sulfúrico, mas não em água régia fria (mistura de ácido nítrico e ácido clorídrico) ou ácido nítrico. Em temperaturas elevadas o cromo se une prontamente aos halogênios, enxofre, silício, boro, nitrogênio, carbono e oxigênio. Em temperaturas baixas é bastante resistente (OHLWEILER, 1973; RICHARD & BOURG, 1991).

O cromo (Cr) possui várias relações estequiométricas que dependem do seu estado de oxidação, que varia entre 0 a +6, mas apenas o trivalente (+3) e o hexavalente (+6) são comumente encontrados. O Cr^{2+} oxida rapidamente para Cr^{3+} , e os estados +4 e +5 são encontrados apenas como intermediários na conversão entre os estados +3 e +6.

De acordo com Barros & Souza-Aguiar (2001), o Cr(III) é o estado mais estável do cromo, prevalecendo quando o pH se encontra entre 4,0 e 9,0. As formas e concentrações de Cr(III) no ambiente dependem de propriedades físico-químicas como pH, complexação, redox e adsorção. O Cr(III) forma óxidos altamente insolúveis, hidróxidos e fosfatos, e é adsorvido por partículas em suspensão (MASSCHELEYN et al., 1992). Em águas naturais, as espécies mais comuns são $\text{Cr}(\text{OH})^{2+}$, $\text{Cr}(\text{OH})_2^+$, $\text{Cr}(\text{OH})_3$ (KOTA'S & STASICKA, 2000). A possível complexação do Cr^{3+} por compostos orgânicos, como os ácidos húmicos, torna o cromo (III) menos solúvel e diminui a possibilidade de oxidação e mobilidade no meio (KOTA'S & STASICKA, 2000), já os ácidos fúlvicos formam complexos solúveis

que permitem tanto o transporte como a oxidação do cromo no solo (WITTBRODT & PALMER, 1995). O cromo trivalente também é capaz de se complexar com radicais negativos como hidroxila, nitrato, cloreto, brometo, iodeto, etc (BARROS & SOUSA-AGUIAR, 2001). Os íons cloretos (Cl^-), mesmo em baixas concentrações (0,01 M), são fortes complexantes inorgânicos no ambiente, em especial no ambiente marinho, onde se complexa com metais, gerando espécies metálicas na forma de cloretos (DI TORO et al., 2001; GROSELL et al., 2007). Em soluções, o Cr^{3+} na forma de complexo pentaquomonoclocromato (III) $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_5\text{Cl}^{2-}]$ adquire a solução coloração verde e, quando em forma de tetraquodoclorocromato $[\text{Cr}(\text{H}_2\text{O})_4\text{Cl}]_4$ conferem a solução cor violeta (VOGEL, 1992).

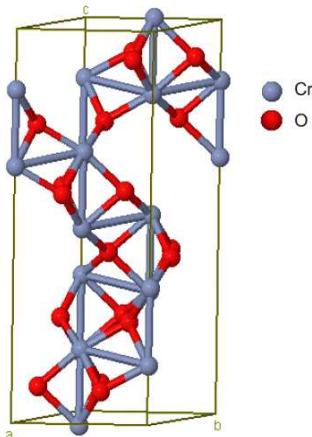
Embora o íon trivalente seja muito estável em soluções ácidas, pode ser oxidado ao hexavalente quando em soluções alcalinas ou na presença de substâncias receptoras de elétrons, fortes oxidantes, como H_2O_2 (PETTINE & MILLERO, 1990; LEE, 2000; SILVA & PEDROZO, 2001). Contudo, a oxidação do cromo trivalente à hexavalente em águas naturais aeradas requer substancial energia devido a diferença de potencial elétrico entre as duas valências (WHO, 1988; ATSDR, 2000). Estudos observaram que em pH acima de 5 o Cr^{3+} é oxidado à Cr^{6+} naturalmente em solos com presença de óxidos de manganês (BARTLETT, 1991; FENDORF & ZASOSKI, 1992; MILACIC & STUPAR, 1995; KOTA'S & STASICKA, 2000; ZANELLO et al., 2009), implicando em um aumento do potencial tóxico e mutagênico para os animais superiores, plantas e microrganismos devido a alta solubilidade e mobilidade da forma hexavalente (CASTILHOS et al., 1999). Contudo, o Cr(VI) é rapidamente reduzido a Cr(III) na presença de substâncias orgânicas, íons sulfetos e ferro (II) em condições anaeróbias, ou outros compostos redutores (doadores de elétrons), precipitando em forma de hidróxidos (KAMALUDEEN et al., 2003).

As características físicas e bioquímicas e os efeitos do cromo dependem dos seus estados de oxidação, pois enquanto o cromo (VI) é tóxico por ser um agente carcinogênico (HOLMES et al., 2008; XIE et al., 2008; PROCTOR et al., 2011), o cromo (III) é considerado um nutriente essencial para o metabolismo animal, incluindo os humanos. A forma trivalente está presente no ar, em alimentos e no sistema biológico, sendo essencial ao homem, participando do metabolismo da glicose, lipídios e proteína (SHRIVASTAVA et al., 2002; ANDERSON, 1997). Em baixas concentrações o cromo pode estimular o crescimento vegetal (TERRY, 1981; BONET et al., 1991; HU et al., 2010). O grupo

de trabalho da Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization* – WHO) (1988) relatou que estudos sobre o homem e animais experimentais comprovaram o papel essencial de cromo trivalente para a manutenção normal do metabolismo da glicose, lipídios e proteínas, sendo que a deficiência de cromo leva ao aumento da glicose no sangue.

O óxido de cromo III (Cr_2O_3), derivado do mineral cromita, é um composto inorgânico, insolúvel em água e naturalmente encontrado no mineral “*eskolaite*”. Apresenta-se como um sólido verde e possui composição elementar de 68,43% de cromo e 31,57% de oxigênio e peso molecular de 151,99 g/mol. Sua densidade é 5,22 g/cm³ (VOGEL, 1981; MASTERTON, 1990; MEDEIROS, 2007). O Cr_2O_3 possui estrutura com base hexagonal (Figura 2.1) compacta de ânions óxidos com dois terços dos buracos octaédricos ocupados por cromo.

Figura 2.1- Estrutura cristalina do óxido de cromo III.



Fonte: Newnham (1962), adaptado por Medeiros (2007).

Por apresentar grande estabilidade, resistência ao desgaste e proteção térmica, as principais aplicações do óxido de cromo III são relacionadas ao fato de este ser um importante material refratário, com ponto de fusão de 2330°C e ebulição 3000°C (PATNAIK, 2003).

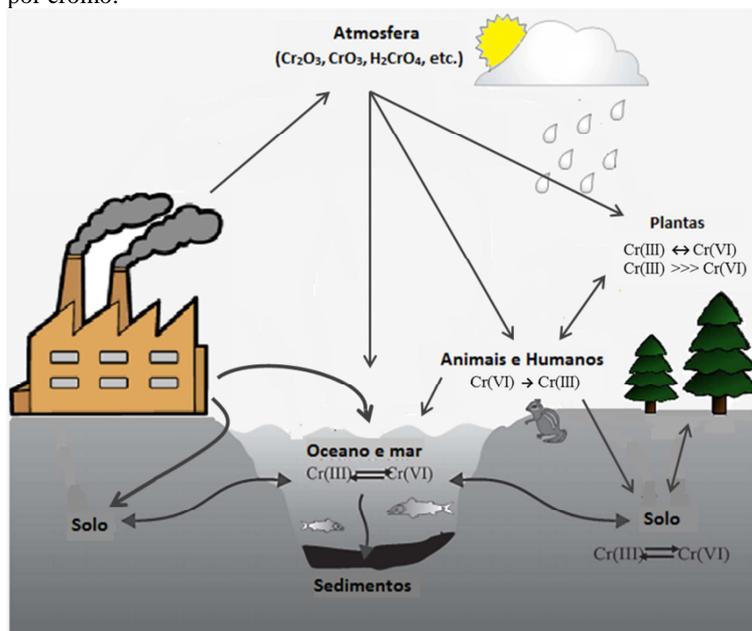
O estado hexavalente do cromo raramente ocorre de forma natural, sendo usualmente originado por fontes antropogênicas. O cromo geralmente está combinado com outros compostos, como o oxigênio, por exemplo, formando o óxido de cromo VI (CrO_3) que é um composto sólido granular de coloração marrom escuro laranja-avermelhado, o qual

é estável puro, porém é um forte oxidante quando misturado com muitas substâncias, tais como o glicerol e o etanol. Possui caráter ácido e dele deriva o ácido crômico, ácido dicrômico ($\text{H}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), ácido tricrômico ($\text{H}_2\text{Cr}_3\text{O}_{10}$) e ácido tetracrômico ($\text{H}_2\text{Cr}_4\text{O}_{13}$). Os sais derivados do cromo IV, especialmente os cromatos, de cor amarelada, e dicromatos, com cor laranja (VOGEL, 1981), são bastante estáveis e importantes para as indústrias. Os compostos de cromo ainda incluem halocromitos, derivados do íon cromilo, CrO_2^{2+} , e peroxocompostos oxidantes (BARROS, 2001).

2.4.2 Cromo e a Questão Ambiental

O cromo é um elemento traço, que apesar de ser considerado um micronutriente para plantas e animais, em concentrações elevadas e no estado de oxidação +6, torna-se um micropoluente. A contaminação ambiental por cromo no mundo se deve principalmente pela eliminação de resíduos de diferentes indústrias com a forma dominante de Cr(III). Contudo, apesar da estabilidade do cromo trivalente, este pode ser oxidado a Cr(VI) em água superficiais, subterrâneas e no solo, como já mencionado anteriormente (ver Figura 2.2). De acordo com Fan & Harding-Barlow (1988), este elemento está presente, na ordem de poucos $\mu\text{g L}^{-1}$, nos compartimentos ambientais (água, ar, solo), plantas, alimentos, animais, incluindo o homem. As quantidades dependem muito da proximidade ou não com áreas industriais (MERTZ, 1969; DAUDT & CANTO, 1995).

Figura 2.2 – Representação esquemática do ciclo de contaminação ambiental por cromo.



Fonte: adaptado de Cieślak–Golonka (1996) e Bielicka et al. (2004).

As maiores fontes de Cr(VI) antropogênicas são atividades das indústrias têxteis, de galvanoplastia, mineração, resíduos sólidos urbanos, fabricação de cimento, baterias, aço inox, cerâmica, atividades de pintura a revólver (*spray*) com tinta à base de cromo e de curtimento de couro (WANG et al., 1999; BOOMINATHAN & DORAN, 2003; SUSSULINI & ARRUDA, 2006).

No Brasil, o curtimento de couro é a mais importante atividade relacionada à contribuição de resíduos de cromo no meio ambiente. Um dos principais problemas ambientais da indústria de couro é a eliminação de resíduos ricos em cromo. Apesar de nestes resíduos prevalecer o cromo trivalente, suas formas facilmente solúveis poderiam ser potencialmente oxidada ao Cr(VI) depois de os resíduos terem sido eliminados no ambiente, principalmente em solos (MILACIC & STUPAR, 1995).

Na indústria, o cromo foi empregado inicialmente como corante em pinturas e no final do século XIX começou a ser utilizado na fabricação de aços inoxidáveis e outras ligas metálicas. Cerca de 85% do cromo consumido é utilizado em ligas metálicas e o restante aplica-se

diretamente como material refratário e na obtenção de diferentes compostos de cromo para a indústria química (RODRIGUES, 2007). Na forma do mineral cromita, é empregado na indústria de refratários para fazer tijolos de fornos metalúrgicos.

No setor industrial, alguns dos compostos mais utilizados são o óxido de cromo VI (CrO_3), altamente tóxico, corrosivo e carcinogênico, geralmente utilizado para preservação da madeira. Este geralmente é utilizado na fabricação de fitas magnéticas, e misturado ao ácido sulfúrico na limpeza de vidrarias laboratorial. O dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), outra fonte de cromo hexavalente, é utilizado como forte agente oxidante e para colorir couros, reativo químico em análises volumétricas ou na limpeza de vidrarias de laboratório. O sulfato crômico ($\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$), devido as suas propriedades é comumente utilizado no curtimento de couro e mordente em tingimento. O óxido de cromo (III) é um pigmento empregado na pintura esmaltada e coloração de vidros e peças cerâmicas (FREITAS, 2006; MEDEIROS, 2007; PASCHOALINO et al., 2010). Embora o Cr(VI) seja tóxico e cancerígeno, sua presença na natureza é rara, pois pode ser facilmente reduzido a cromo(III) (LOSI et al., 1994; MARTINS, 2001; SILVA & PEDROZO, 2001).

2.4.3 Toxicidade do Cromo

O cromo está entre os elementos com maior potencialidade tóxica a diversos organismos (NELLESSEN & FLETCHER, 1993; McBRIDE, 1994; BIANCHIN, 2011) e é considerado pela agência de proteção ambiental americana como um dos poluentes prioritários (BIANCHIN, 2011; USEPA, 2014).

O cromo teve sua ação cancerígena evidenciada em 1948 (CHRISTIANI, 1998; FILHO & KITAMURA, 2006), sendo incluído no grupo 1 dos agentes cancerígenos pelo *International Agency for Research on Cancer* - IARC em 1990 (IARC, 1990). As valências zero ou trivalente do cromo, não se mostraram tóxicas ou carcinogênicas em animais de laboratório. Entretanto, o cromo 6+ apresenta elevada toxicidade e estudos epidemiológicos têm mostrado relação entre a exposição dos trabalhadores da indústria de produção de cromatos e a ocorrência de câncer de pulmão (IARC, 1990; ABREU, 2006).

Os principais efeitos deletérios à saúde humana são danos renais, dermatites e alergias, lesões nasais, úlceras gastroduodenais, conjuntivites crônicas, rinofaringites, além de irritação brônquica, asma e câncer pulmonar; causados por absorção cutânea, (POTGIETER et al.,

2003; HANSON, 2003; ABREU, 2006). A forma de contaminação, dinâmica (absorção, transporte, adsorção), distribuição e eliminação do cromo nos seres humanos e animais é dependente de determinados fatores, tais como, solubilidade, estado de oxidação, tamanho de partícula, e taxa de exposição.

Segundo o grupo de trabalho da WHO (1988), a toxicidade do cromo para a maioria dos microrganismos ocorre geralmente às concentrações de 0,05 a 5 mg kg⁻¹.

Estudos realizados por Nguyen et al. (1999) mostraram que o cromo causou efeitos sobre a sobrevivência do embrião de peixe *Clarias gariepinus* (conhecido como peixe gato africano) em concentrações de 36 mg L⁻¹. E para larvas, em estado inicial, concentrações de 20 mg L⁻¹ provocaram alteração no seu desenvolvimento.

A espécie hexavalente do cromo pode acumular-se no organismo. A Organização Mundial de Saúde (WHO) através do Programa Internacional de Segurança Química (IPCS – do inglês *International Programme on Chemical Safety*) revelou que o Cr⁶⁺ causou vários danos genéticos em testes de mutagenicidade de curto prazo. O estudo revela ainda que doses superiores a 10 mg kg⁻¹ de Cr⁶⁺ são suficientes para afetar o trato gastrointestinal, os rins e o sistema hematológico, e que a dose oral letal para humanos adultos está entre 50 e 70 mg kg⁻¹ de peso corpóreo na forma de cromatos solúveis (WHO, 1988).

Ensaio *in vitro* e *in vivo* em estudos demonstraram que o Cr(VI) induz o estresse oxidativo através do aumento a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando a danos no DNA genômico e deterioração oxidativa dos lipídios e proteínas (BAGCHI et al., 2001; SHRIVASTAVA et al., 2002).

Outro ponto importante que está relacionado à toxicidade é que o cromo hexavalente tem a mesma forma tetraédrica que os íons sulfatos e fosfatos. Em virtude disso a membrana celular não diferencia o Cr⁶⁺ dos íons essenciais, o que permite a sua internalização celular através dos canais iônicos. Quando o íon Cr(VI) entra no citoplasma este reduz ligeiramente à Cr(III), reagindo com ascorbato, glutationa ou cisteína, doadores de elétrons (ATSDR, 2000; SHRIVASTAVA et al., 2002). Então o Cr³⁺ ligado ao peptídeo Glutationa (GSH) forma o grupo Cr-GSH que se difunde para o plasma e liga-se ao DNA por transferência de elétrons, formando complexos Cr-DNA e ligações cruzadas DNA-DNA, podendo causar alterações genéticas (TSOU e YANG, et al., 1996; COTTON & WILKINSON, 1999; STANDEVEN & WETTERHAHN, 1991; ORTEGA et al., 2005; BENITE, 2007;

JOMOVA, et al., 2011). Essa interação entre o cromo e os ácidos nucleicos foi identificada primeiramente por Hermann & Speck em 1954 (FREITAS, 2006). O cromo (VI) ainda altera a função de enzimas, os parâmetros químicos do sangue, reduz a resistência a agentes patogênicos e pode causar inibição da fotossíntese (WHO, 1988). Estudos desenvolvidos com macrófitas e plantas demonstraram que altas concentrações de cromo causaram mudanças estruturais nos cloroplastos, estresse oxidativo e até inibição da fotossíntese (PANDA & CHOUDHURY, 2005; LIMA, 2010).

2.4.4 NP Cr₂O₃

O óxido de cromo III (Cr₂O₃) nanoparticulado possui uma grande variedade de aplicações, podendo ser usado como catalisador em reações de oxidação, hidrogenação e isomeração de olefinas, pigmentos, material refratário, agente de sinterização, revestimentos para proteção térmica e resistência ao desgaste (TONIOLO, 2009; CELLARD et al., 2009; WANG et al., 2012; GUNNEWIEK et al., 2014). Atualmente, a NP Cr₂O₃ é um composto amplamente estudado devido a sua propriedade natural de semicondutor (GUPTA et al., 2014),

As suas aplicações dependem do tamanho das NP. Partículas com tamanhos de aproximadamente 200nm são preferidas para fabricação de pigmentos verdes (BALACHANDRAN et al., 1995), pois além da facilidade de uso e uma ótima relação custo-benefício, possui opacidade elevada, alto poder de cobertura e baixa absorção de óleo. Já partículas com tamanho menor que 50nm podem ser usadas como corantes transparentes e partículas ainda menores são necessárias para melhorar as propriedades de sinterização (MEDEIROS, 2007).

Estudos mostraram que a NP Cr₂O₃ também pode ser usado em reações catalíticas, como por exemplo, do monóxido de carbono, sulfeto de hidrogênio, oxidação do dióxido de enxofre, desidratação e desidrogenação do álcool, síntese de metanol, quebra das duplas ligações nas olefinas, polimerização do etileno e síntese catalítica alternativa de clorofluorcarbono – CFC (UHM et al., 1999; PRADIER et al., 2000; SANTULLI et al., 2011).

2.5 TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO DA NP

Em relação aos materiais nanoestruturados, incluindo as NP, a caracterização se faz importante, pois através da utilização de tais técnicas é possível obter informações complementares sobre

propriedades como forma e distribuição de tamanho, estabilidade em suspensão, composição elementar, propriedades da superfície, que facilitam o entendimento dos efeitos nocivos desses materiais.

Algumas técnicas de caracterização de NP são: medição do Potencial Zeta e Diâmetro Hidrodinâmico; Microscopia Eletrônica de Transmissão, Microscopia Eletrônica de Varredura; Difração de raios-X e área superficial usando o método BET.

2.5.1 Diâmetro Hidrodinâmico e Potencial Zeta

O diâmetro hidrodinâmico (D_H) é uma técnica para determinação do tamanho de NP em suspensão e pode ser determinado através do uso da técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Essa técnica leva em consideração o movimento translacional das partículas em suspensão. Assim, o DLS usa a emissão de um feixe de luz monocromática (laser) sobre a amostra, onde a luz espalhada é captada em um detector gerando gráficos de flutuação de intensidade e distribuição de frequência.

Relacionando os dados do espalhamento com temperatura e viscosidade do solvente pode-se obter o D_H através da equação 1 (MALVERN, 2014).

$$D_H = \frac{K_B T}{3 \pi \eta D} \quad (1)$$

Onde K_B é a constante de Boltzmann, η é a viscosidade do solvente, T é a temperatura e D é o coeficiente de difusão.

A tendência à agregação e sedimentação das NP dispersas, em função do tempo, pode ser observada pela distribuição de tamanho de partículas através do DLS.

Para a avaliação da estabilidade das NP em suspensão, esta pode ser realizada através da medida do potencial Zeta (Pz) (MALVERN, 2014). O Pz relaciona o movimento desordenado e contínuo que corre devido aos choques produzidos pelas moléculas do líquido com as partículas sólidas dispersas, esse evento é conhecido como movimento Browniano (MORO, 2010). O Pz é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento, ou seja, é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a camada estacionária de fluido na superfície da partícula dispersa, refletindo o potencial de superfície das partículas (ORTEGA et al., 1997; METCALF & EDDY, 2003). Seu

valor pode ser influenciado pelo meio de dispersão das partículas, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes na solução diluente (MAGENHEIM & BENITA, 1991; MOSQUEIRA et al., 2000). Quanto maior for o seu valor em módulo, maior será a carga superficial da partícula, conferindo uma maior estabilidade da suspensão, ou seja, maior resistência a agregação. Quando o potencial é baixo, a atração supera a repulsão e as partículas tendem a aproximar-se mais, aumentando a probabilidade de uma colisão, ocorrendo a aglomeração e floculação (METCALF & EDDY, 2003; GOUVÊA & MURAD, 2001; TRINDADE & MANUEL, 2006).

2.5.2 Difração de Raios-X (DRX)

A difração de raios-X (DRX) é um dos métodos mais utilizados e simples para estudar a estrutura interna de materiais cristalinos e consequentemente identificá-los (SCAPIN, 2003; MEDEIROS, 2007, COSTA et al., 2009). Materiais cristalinos exibem um difratograma característico, o que simplificado quer dizer que os materiais podem ser identificados e caracterizados segundo a sua cristalinidade.

Os raios-X são classificados como radiação ionizante e consistem na emissão de ondas eletromagnéticas, sendo da mesma natureza que compõem a luz branca visível. A técnica de DRX consiste em uma radiação monocromática, com feixe paralelo e comprimento de onda λ , direcionada sobre o material a ser caracterizado que, por sua vez, os difrata em determinado ângulo (reflexão de Bragg). A medida desse ângulo de difração pode elucidar a distância dos átomos no cristal, fornecendo a estrutura cristalina. Os raios difratados são detectados e transformados em sinais, representados por um gráfico de intensidade. Esses sinais, em forma de picos, são comparados na literatura a fim de verificar a presença dos sinais desejados e identificar o material (CULLITY, 1978; BANDEIRA, 2011).

Para a determinação do tamanho médio dos cristalitos, foi necessário conhecer o valor de espaçamento interlamelar, que foi obtido através do tratamento matemático e aplicação da Lei de Bragg (equação 2).

$$2d \sin\theta = n\lambda \quad (2)$$

Onde: n = número inteiro
 d = distância entre planos atômicos
 θ = ângulo de incidência em relação ao plano considerado
 λ = é o comprimento de onda da radiação incidente

O tamanho médio do cristalito é dado pela equação de Debye-Sherrer (equação 3).

$$D (\text{Å}) = \frac{k\lambda}{\beta (\text{size}) \cos\theta} \quad (3)$$

Onde: K = fator de forma (constante usualmente 0,9)
 λ = é o comprimento de onda da radiação incidente
 B = largura observada da linha difratada a meia altura do pico, expressa em radianos.

A técnica de DRX mais frequentemente usada é o método dos pó. Nesta técnica, usa-se uma amostra em pó, para que exista uma orientação aleatória de muitos cristais, assegurando assim que algumas das partículas estão orientadas, em relação ao feixe de raios-X, de modo a satisfazer as condições de difração da lei de Bragg, que dá a relação entre as posições angulares dos feixes difratados.

Essa técnica é considerada um ensaio não destrutivo, isto é, não é necessário retirar uma amostra da estrutura ou peça para fazer a quantificação (MEDEIROS, 2007).

2.5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

A MET utiliza uma técnica na qual um feixe de elétrons é emitido em direção a uma amostra ultrafina passando por um conjunto de lentes eletromagnéticas localizadas dentro de uma câmara a vácuo.

Os elétrons transmitidos interagem através da amostra e formam uma imagem que é ampliada e focada em uma faixa útil de aumento de 1.000 a 300.000 vezes o tamanho original (REIMER, 1997).

O microscópio de MET é capaz de exibir imagens a uma resolução significativamente maior em comparação com os microscópios óticos devido ao pequeno comprimento de onda dos elétrons. Tal característica permite ao usuário examinar detalhes ínfimos, até mesmo uma simples coluna de átomos, a qual é dezenas de milhares de vezes menor do que o menor objeto reconhecível em um microscópio ótico. A MET é um dos principais métodos de análise em

uma vasta gama de campos científicos, tanto em ciências físicas quanto biológicas, sendo bastante aplicada em pesquisas sobre o câncer, virologia e na ciência dos materiais, além das pesquisas de poluição, nanotecnologia e semicondutores (MALISKA, 2003; PENNYCOOK et al., 2007).

A coluna do MET deve estar em vácuo para evitar a contaminação da amostra sob o feixe de elétrons, que possuem energia suficiente para atravessar a amostra. O sinal eletrônico transmitido é magnificado por uma série de lentes eletromagnéticas e pode ser observado em duas maneiras, através de difração ou da formação de imagem direta em campo claro (feixe direto não espalhado pela amostra) ou escuro (feixe direto espalhado pela amostra) que são usados para determinar a estrutura cristalográfica e microestrutura, respectivamente, de um material (FERREIRA, 2010).

2.5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura – MEV

A MEV utiliza um tipo de microscópio eletrônico capaz de produzir imagens de alta resolução da estrutura superficial de uma amostra. O microscópio de MEV é um instrumento muito versátil e amplamente utilizado para a análise microestrutural de materiais sólidos. Apesar da complexidade dos mecanismos para a obtenção da imagem, o resultado é uma imagem de muito fácil interpretação (VAN MEERBEEK et al., 2000; MALISKA, 2003; FERREIRA, 2010).

A grande vantagem da MEV em relação ao microscópio ótico é sua alta resolução, com uma faixa de aumento entre 10 a 50.000 vezes. Atualmente existem instrumentos com resolução para partículas na ordem de 1 a 5 nm (10 - 50 Å^o), enquanto que no ótico é de 0,5 µm. Comparado com o MET a grande vantagem do MEV está na facilidade de preparação das amostras (MALISKA, 2003).

A MEV é usualmente utilizada para caracterização de materiais, incluindo NM, por possibilitar elevada profundidade no foco (imagem com aparência tridimensional) e mostrar a estrutura e estequiométrica dos materiais, sendo este último através da técnica de EDX (*Energy Dispersive X-Ray*), disponível no equipamento (MALISKA, 2003).

2.5.5 Área Superficial Específica

A área superficial é considerada uma das medidas fundamentais para discutir sobre as propriedades físico-químicas de um material, pois gera informações, por exemplo, sobre sua atividade e seletividade.

Para partículas sólidas, o método mais usual para medição nesse parâmetro tem sido o método desenvolvido por Brunauer, Emmet e Teller, o qual ficou conhecido como método BET (BRUNAUER et al., 1938). Este método, também conhecido como Teoria de Adsorção Multimolecular, consiste na adsorção física de um gás inerte (por exemplo, o nitrogênio - N₂) a baixas temperaturas, onde esses dados são aplicados em uma sequência de fórmulas do próprio procedimento BET. Assim, a área superficial específica é obtida através da isoterma de adsorção, que relaciona o volume de gás adsorvido em função da pressão relativa. A isoterma de BET utiliza a seguinte equação 4 para representar os dados experimentais (FIGUEIREDO & RIBEIRO, 1989):

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{C \cdot V_m} + \frac{(C-1)P}{C \cdot V_m \cdot P_0} \quad (4)$$

Onde P e P₀ são a pressão medida no estado de equilíbrio e a pressão de saturação inicial do sistema, V é a quantidade de gás adsorvido (por exemplo, em unidades de volume), e V_m corresponde a monocamada de gás adsorvida quando o sólido está completamente recoberto, e C é a constante de BET, deduzida da equação 5 a seguir:

$$C = \exp\left(\frac{E1-EL}{RT}\right) \quad (5)$$

Com o valor de V_m conhecido, calcula-se a área de superfície específica de um material através da equação 6:

$$S = \frac{V_m L_{av} A_{ad}}{M_v} \quad (6)$$

Onde: S é a área de superfície específica.

V_m é o volume de gás adsorvido quando a superfície do sólido está completamente coberta por uma monocamada.

L_{av} é o número de Avogadro (6,02214179x10²³).

A_{ad} é área de seção transversal da uma molécula de adsorbato.

M_v é o volume ocupado por 1 mol da molécula de adsorbato.

2.6 TOXICOLOGIA AMBIENTAL E NANOTOXICOLOGIA

Toxicologia é definida como a ciência que estuda o efeito adverso de poluentes sobre os organismos vivos. Ela tem a finalidade principal de identificar os riscos relacionados à exposição de um poluente e assim possibilitar tomadas de decisão para prevenir o aparecimento destes efeitos, ou seja, estabelecer os limites de lançamento dos poluentes no meio ambiente (CHASIN & PEDROZO, 2003; KNIE, 2004; MATIAS, 1996).

De acordo com Yu (2005) a toxicologia é uma ciência multidisciplinar, que abrange uma vasta área de conhecimento, onde atuam profissionais de diversas formações: Química, Matemática, Biologia, Bioquímica, Pedagogia, Botânica, Ecologia, Geologia, Saúde Pública, Farmacologia, Fisiologia, Alimentos, Genética, Experimental, Estatística e outras áreas. Ela relaciona-se estritamente com essas diversas ciências, pois sem essa inter-relação dos conhecimentos, dificilmente poderá atingir seus objetivos: prevenir, diagnosticar e tratar.

A toxicologia ambiental considera que a sobrevivência humana depende do bem estar de outras espécies e da disponibilidade e qualidade de ar, água, solo e alimentos, se preocupando com o destino dos agentes tóxicos, seus metabólitos e produtos da degradação no ambiente e nas cadeias alimentares sobre os organismos e as populações. De forma geral o termo toxicologia ambiental é utilizado para referir-se ao estudo dos efeitos nocivos ou adversos originados pela exposição de sistemas biológicos aos poluentes, seja de natureza física, química ou biológica.

Por ser uma ciência ampla, a Toxicologia Ambiental se subdivide conforme a necessidade e especificidade do estudo requerido. Assim, com o rápido desenvolvimento industrial e tecnológico (a partir do início do século XX) e conseqüentemente da poluição ambiental vinculada a esta, principalmente aos graves acidentes ambientais decorrentes da época (metade do século XX), fizeram com que se desenvolvessem estudos toxicológicos envolvendo populações e comunidades biológicas e suas interações, dando origem a Ecotoxicologia, o ramo da toxicologia que relaciona os efeitos tóxicos dos poluentes sobre ecossistemas, incluindo o homem, e o estudo dos caminhos de transferência desses xenobióticos e sua interação com o ambiente, onde o primeiro relato do uso desse termo foi por René Truhaut em 1969. (AZEVEDO & CHASIN, 2003; NEWMAN & ZHAO, 2008; KAHRU & DUBOURGUIER, 2010).

Com a mesma preocupação, a Nanotoxicologia surge como uma área dentro da Toxicologia Ambiental pela necessidade específica de avaliar o impacto do uso dos NM, tanto no meio ambiente quanto seus riscos eventuais à saúde humana, assim como explorar as vias de entrada de NP no organismo e estudar os mecanismos moleculares de toxicidade das NP (OBERDÖRSTER, OBERDÖRSTER & OBERDÖRSTER, 2005; FISCHER & CHAN, 2007). Com o desenvolvimento rápido da nanotecnologia, os riscos sobre a saúde humana e ao meio ambiente causados pela exposição aos NM (de fonte antropogênica) aumentam (CURTIS et al., 2006; HANDY et al., 2008). A Nanotoxicologia tem por missão nortear o desenvolvimento seguro e sustentável da Nanotecnologia (ABDI, 2011). Os autores Oberdörster, Oberdörster e Oberdörster (2005) salientam que embora os seres humanos tenham sido expostos às partículas (naturais ou incidentais) de dimensões nanométricas ao longo do tempo, tal exposição veio aumentando drasticamente no decorrer do século passado, devido à presença de NP artificiais ou sintéticas, fabricadas pelo homem, conhecidas como NP engenheiradas.

Os primeiros registros científicos na *Web of Science of Thomson Scientific* sobre estudos da toxicidade de NM foram na década de 1990, onde o trabalho de Oberdörster et al. (1992) investigou o aumento da toxicidade em células pulmonares de ratos expostos à partículas ultrafinas de dióxido de titânio (TiO_2), com aproximadamente 20 nm quando comparado aos expostos as partículas maiores (menor que 200 nm).

Alguns exemplos de estudo sobre a toxicidade de NM são citados abaixo:

- Um estudo publicado em julho de 2004 reporta que fulerenos (C_{60}) podem desencadear danos cerebrais em peixes (OBERDÖRSTER, 2004a).
- Estudo mostrou uma direta relação entre a inalação de NP de TiO_2 , muito utilizadas pelas indústrias alimentícia e cosmética, e o desenvolvimento de câncer do pulmão em ratos (HAMILTON et al, 2009).
- Petković et al. (2011) estudaram os efeitos da NP TiO_2 sobre células de hepatoma humano (HepG2) e demonstraram a relação com a redução do tamanho e forma cristalina com a citotoxicidade e genotoxicidade. As NP de TiO_2 são encontradas em cosméticos, incluindo os protetores solares, em

tintas e também em revestimentos autolimpantes e superfícies bactericidas.

- Srinivas et al (2011) demonstraram que ratos expostos por um período de 4 horas, através de inalação de uma concentração de 641 mg/m^3 de NP de CeO_2 , apresentaram uma indução da citotoxicidade através do estresse oxidativo podendo levar a uma resposta inflamatória crônica.
- Elder et al. (2006) demonstraram que o óxido de manganês nanoparticulado, através de inalação, pode atingir o bulbo olfativo no cérebro frontal de animais experimentais.
- Perreault et al. (2012a) avaliaram a toxicidade *in vitro* da NP de CuO em cultura de células Neuro 2A. Após 24 horas de exposição, a concentração de 400 mg L^{-1} de NP CuO causaram 37 % de inibição na viabilidade celular. Também foi observados danos em nível do DNA das células expostas a essa concentração. Outro estudo realizado por Perreault et al. (2014) avaliaram a toxicidade de NP Au recobertos com PAMAM em diferentes modelos celulares.
- Melegari et al. (2013) avaliaram a toxicidade da NP CuO em alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Os autores demonstraram que a NP CuO se apresentou tóxica à $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, induzindo uma inibição na taxa de crescimento das algas e decréscimo nos níveis de carotenoides.

Outro sistema importante para a contribuição da toxicidade de NM é o mecanismo tipo “Cavalo-de-Tróia”. Essa denominação está ligada ao efeito de NM que facilitam a internalização de poluentes ou partículas que possam facilitar a entrada de NM nas células e compartimentos celulares (LIMBACH et al., 2007; LUBICK, 2008).

2.6.1 Teste de Toxicidade Aguda

Os testes de toxicidade aguda são experimentos laboratoriais, realizados sob condições específicas e controladas, e que visam avaliar a toxicidade de um agente nocivo, sobre uma espécie-teste quando esta é exposta à um curto período de tempo. Seus resultados possibilitam determinar uma concentração confiável da substância química ou efluente para serem lançados ao meio ambiente (RIBO, 1997; RONCO et al., 2004), como também elencar informações sobre o risco ambiental, com o propósito de contribuir na gestão de acidentes ambientais.

O princípio desses ensaios é a exposição dos organismos-testes a diferentes concentrações da amostra com o objetivo de observar e quantificar os efeitos deletérios produzidos sobre eles. Os testes de toxicidade realizados em laboratório não permitem obter uma resposta absoluta sobre o risco que uma determinada amostra apresenta para a população humana, pois os resultados de toxicidade obtidos para os organismos-teste não podem ser extrapolados para os seres humanos (RIBO, 1997; COSTA et al., 2008).

Em geral, são utilizados seres aquáticos como organismo-teste que sejam representativos de um ambiente em estudo. A vantagem do teste agudo refere-se à obtenção de resultados rápidos e reprodutíveis em curvas de concentração-resposta, facilitando a visualização, identificação e estimativa dos efeitos de substâncias químicas na população em estudo (MATIAS, 2010). Neste tipo de teste, os organismos são expostos às concentrações conhecidas de uma amostra durante um determinado período (de 24 a 96 horas). Após a exposição, são avaliados os possíveis efeitos letais causados ao grupo de indivíduos submetidos a tal procedimento.

Os parâmetros avaliados nos testes de toxicidade aguda são a mortalidade, no caso de peixes; imobilidade, no caso de microcrustáceos; e crescimento, no caso de algas (RAND & PETROCELLI, 1985; BRENTANO, 2006; COSTA et al., 2008).

Os resultados da avaliação dos efeitos agudos de substâncias ou efluentes potencialmente tóxicos, através de teste de toxicidade aguda, são fornecidos geralmente através do cálculo da Concentração Letal (CL_{50}) ou a Concentração Efetiva (CE_{50}) a 50% da população em teste. Estes resultados expressam somente uma estimativa da toxicidade aguda global da substância, não podendo ser extrapolados para resultados de toxicidade subaguda e crônica (COSTA et al., 2008; DIN, 1989; ISO, 2012). Assim, os testes de toxicidade aguda oferecem informações que são suficientes para iniciar ações de controle.

Na toxicologia, o organismo-teste escolhido é aquele que representa os diferentes níveis tróficos e melhor evidencia o tipo de efeito toxicológico, ou seja, com melhor sensibilidade, sem necessariamente apresentar mais semelhanças com o homem. Na ecotoxicologia, várias espécies vêm sendo comumente utilizados, dentre os principais grupos de organismos utilizados em bioensaios destacam-se: algas, bactérias, peixes, microcrustáceos e poliquetas para ecotoxicologia aquática e sementes de hortaliças e oligoquetas para ecotoxicologia terrestre (AZEVEDO & CHASIN, 2003; COSTA et al.,

2008; SHAW & CHADWICK, 1998; BURATINI et al., 2004; CHANDRA et al., 2005; MAGALHÃES & FILHO, 2008).

2.6.2 Teste de Toxicidade Crônica

Os testes crônicos são ensaios laboratoriais realizados por um longo tempo de exposição e que possibilitam avaliar os possíveis efeitos adversos de uma amostra sob condições de exposições prolongadas a concentrações sub-letais. O teste crônico expõe o organismo-teste a concentrações não letais do agente potencialmente tóxico, durante parte ou todo seu ciclo de vida, incluindo estágios sensíveis como juventude, crescimento, maturidade sexual e reprodução (RONCO et al., 2004; RAND et al., 1995; ABNT, 2010). Neste tipo de teste avaliam-se efeitos como desenvolvimento, reprodução, crescimento e também alterações morfológicas. O resultado é expresso em Concentração de Efeito Não Observado (CENO), sendo esta a mais alta concentração de uma série, em que o agente testado não provoca efeito quando comparado com o controle; e em Concentração de Efeito Observado (CEO), a mais baixa concentração, de uma série, que causa efeito significativo sobre a população quando comparada ao controle.

O teste crônico é importante para complementar ao teste agudo, pois a ausência de efeito agudo não caracteriza ausência de efeito sobre a biota. Segundo Terra e Feiden (2003) os efeitos tóxicos somente são visíveis quando os poluentes ambientais estão presentes em altas doses. Entretanto, quando eles existem em porções menores seus efeitos podem não ser visíveis em um primeiro momento, mais interferem nas funções fisiológicas, alteram a frequência reprodutiva e/ou a qualidade e quantidade de organismos gerados.

A ação lenta de poluentes sobre a biocenose é um aspecto importante a ser considerado e que hoje já se encontra contemplado em legislação nacional (FUZINATTO, 2009).

No Brasil, os testes crônicos são contemplados na Resolução CONAMA nº 357 (BRASIL, 2005) e exigidos para realização do enquadramento dos corpos hídricos. Para fins de interpretação da resolução, efeito tóxico crônico é definido como os efeitos deletérios aos organismos vivos causados por agentes físicos ou químicos que afetam uma ou várias funções biológicas dos organismos, tais como a reprodução, o crescimento e o comportamento, em um período de exposição que pode abranger a totalidade de seu ciclo de vida ou parte dele.

Apesar de estar contemplado na legislação, não existe uma norma brasileira que oriente os ensaios de toxicidade crônica com *D. magna*, assim, a metodologia para os testes crônicos deste trabalho estão baseados no protocolo da norma americana ISO 10706/2000, que trata da determinação da toxicidade em longo prazo de substâncias sobre *D. magna* e da norma brasileira ABNT NBR 13373/2005, que trata da toxicidade crônica com *Ceriodaphnia dubia*.

2.6.3 Avaliação do Estresse Oxidativo

A ocorrência de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS) é um processo que acontece naturalmente durante o metabolismo celular. Quando encontrado em concentrações habituais, os ROS são importantes para a defesa contra agentes infecciosos, sistemas de sinalização celular, como a ativação da guanilato ciclase com a formação do segundo mensageiro da guanosina monofato cíclica, e indução da divisão celular. Os organismos saudáveis possuem sistemas de controle de ROS, limitando seu aparecimento ou promovendo sua remoção. Porém, sob uma condição onde há um aumento de ROS, o sistema de defesa amplia seu arsenal enzimático e não-enzimático para controlar os níveis intracelulares destas moléculas (VALKO et al., 2006).

A formação de ROS pode ser relacionada com agentes internos (endógena) ou externos (exógenas), estando as fontes endógenas relacionadas com o processo de respiração celular. Mecanismos fisiológicos, como fagocitose de corpos estranhos (infecção microbiana), metabolismo de xenobióticos, hidroxilação de prolina e lisina e oxidação de xantina também estão relacionados à geração endógena de ROS (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; MARIANI, 2008). Os agentes externos que podem induzir a produção de ROS são a radiação solar, os agentes químicos e os metais pesados, que estão frequentemente presentes no ambiente.

Alguns exemplos destas espécies reativas são os radicais superóxido, hidroxila e hidroperoxila (derivada da lipoperoxidação), denominados de radicais livres por apresentarem um elétron livre e desemparelhado.

Em situações em que a quantidade destas espécies reativas ultrapassa a capacidade de defesa antioxidante das células, ocorre o que se chama de estresse oxidativo (MARIANI, 2008; MATIAS, 1999). Esta condição de estresse pode ser resultado também de uma diminuição da

capacidade de defesa celular antioxidante (COSTA & MORADAS-FERREIRA, 2001).

A avaliação do ROS pode ser realizada utilizando o marcador H_2DCFDA . Esse marcador é um composto não-polar que ao entrar nas células sofre uma reação de acetilação para sua forma polar não-fluorescente 2,7- diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFH) (SRIVASTAVA et al., 2009). Quando a formação de ROS é induzida dentro da célula, pelo xenobiótico, o composto H_2DCFDA reage principalmente com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzindo o composto 2,7-diclorofluoresceína (DCF) com uma alta intensidade de fluorescência na cor verde (513 a 530 nm) (HOFFMAN et al., 2008). Essa emissão de fluorescência é convertida em níveis de ROS intracelular.

2.6.4 Avaliação da Viabilidade Celular através do Diacetato de Fluoresceína (FDA)

Para avaliar o efeito de um contaminante sobre o comportamento metabólico de uma cultura de células é necessário avaliar o parâmetro de viabilidade das células em suspensão. A viabilidade celular pode ser quantificada através da atividade da enzima esterase, normalmente determinada utilizando o reagente FDA (do inglês, *Fluorescein diacetate*).

O FDA é um composto apolar permeável à membrana celular e, no interior da célula é decomposto pelas esterases em fluoresceína e acetato, sendo que a fluoresceína absorve a luz no comprimento de onda de 475 nm e emite fluorescência verde em 540 nm. Quando o acetato não está associado à fluoresceína, a molécula é considerada polar. Dessa forma, esse composto não consegue atravessar a membrana naturalmente. As células não viáveis apresentam uma depleção das esterases e com isso tornam-se incapazes de decompor e reter a fluoresceína, não emitindo fluorescência (CANHOTO, 2010). De forma geral, pode-se interpretar que a diminuição da fluorescência indica uma inibição da atividade esterase.

2.6.5 Avaliação da Densidade Celular

Na avaliação da densidade celular, o objetivo é observar o efeito causado por um contaminante sobre o crescimento da cultura celular.

Assim, a densidade celular ou crescimento, consiste em realizar a contagem das células vivas por mililitro presentes no final do tempo de

exposição. Essa contagem pode ser feita em microscópios através de câmaras de contagem de células, ou em equipamentos específicos como citômetros de fluxo ou contadores de células.

2.6.6 Avaliação da Fluorescência Clorofiliana

Os contaminantes ambientais podem afetar o mecanismo da fotossíntese das algas. Esta ação tóxica pode ser avaliada estudando a cinética da fluorescência emitida pelo organismo (JUNEAU & POPOVIC, 1999; LIMA, 2010). A fotossíntese representa um indicador fisiológico quando o metabolismo é alterado por um ou mais fatores de estresse ambiental. Portanto, em um sistema fotossintético, reações luminosas e reações bioquímicas podem ser afetadas por um agente estressante. Quando ocorre a fotoinibição induzida por danos provocados por agentes estressores, verifica-se uma diminuição do rendimento quântico da fotossíntese acompanhando as alterações nas atividades do fotossistema II (FSII). Isso pode levar a alterações na emissão de fluorescência (KRAUSE & WEIS, 1991).

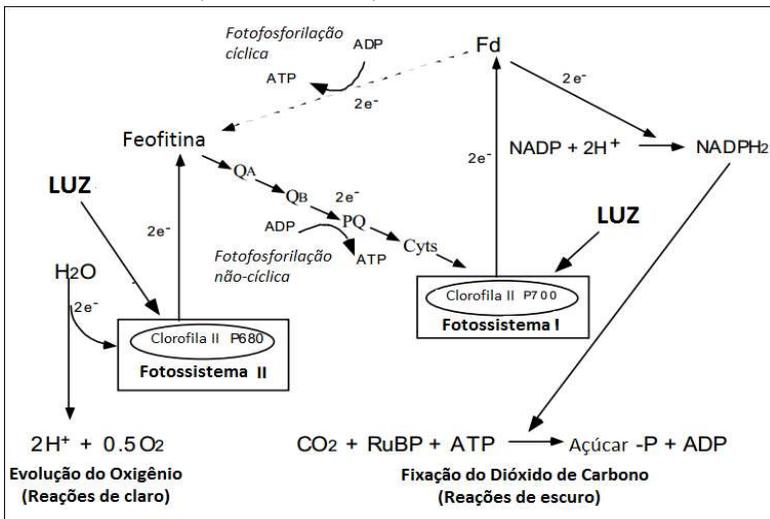
A mudança na atividade fotossintética indica não só a saúde do organismo da planta, mas também os efeitos tóxicos dos poluentes sobre o organismo vegetal após exposição (POPOVIC et al., 2003). A avaliação da fluorescência clorofiliana traz informações sobre o estado do FS II e pode ser usada para medir parâmetros como os rendimentos fotossintéticos, *quenching* fotoquímico e não fotoquímico e transporte de elétrons (JUNEAU & POPOVIC, 1999; LIMA, 2010; PERREAULT et al., 2010).

Os organismos fotossintetizantes usam a luminosidade para oxidar a molécula de água e reduzir o CO₂. Esse processo pode ser dividido em duas fases: a fotoquímica, que ocorre nos tilacóides (membranas internas dos cloroplastos), e a fase bioquímica, que ocorre nos estromas do cloroplasto (FOYER, 1984; VANKOOTEN & SNEL, 1990; ANDERSSON & STYRING, 1992; THORNER, 1996).

Os pigmentos fotossintéticos, clorofila *a* (principal), clorofila *b* (pigmento acessório) e carotenóides, localizados nas membranas dos tilacóides dos cloroplastos, absorvem a energia luminosa que é utilizada no processo fotossintético (Figura 2.6). A energia luminosa (fótons) captada pelas antenas do fotossistema altera o estado desses pigmentos de basal (baixa energia) para estado excitado (alta energia). Essa excitação é temporária (duração de 10⁻⁸ s) e para retornar ao estado basal a molécula de clorofila *a* (Chl *a*) pode dissipar essa energia por três formas (BARUFI, 2010; CAMPOSTRINI, 1997):

- em processos fotoquímicos da fotossíntese (para a produção de ATP -Trifosfato de adenosina). Esta dissipação de energia é denominada como coeficiente de extinção fotoquímica ou *quenching* fotoquímico (qP) causado pela utilização da energia para a redução do NADP. Seus valores indicam a proporção de centros reacionais do FSII que estão abertos (oxidados) (KRAMER et al., 2004) e, decresce na proporção do fechamento dos centros de reação (bloqueio da transferência de Q_A para Q_B) do FSII (SCHREIBER et al., 1986; CAMPOSTRINI, 1997).
- em forma de fluorescência, emitindo radiação na região do visível (vermelho).
- em processos não-fotoquímicos, onde a energia de excitação é dissipada no complexo antena do FSII, principalmente em forma de calor, através de xantofilas e alterações nas antenas do sistema (POGSON & RISSLER, 2000). Esse parâmetro é definido pela redução do rendimento quântico máximo do FSII (BILGER & BJÖRKMAN, 1990). Esta dissipação de energia é denominada por *quenching* não-fotoquímico (qN) ou coeficiente de extinção não-fotoquímica e funcionam como sistema de proteção do FSII contra os fotodanos.

Figura 2.3 - Esquema do processo fotossintético. Abreviações: ADP: adenosina difosfato; ATP: adenosina trifosfato; NADP: Fosfato de dinucleótido nicotinamida adenina; Fd: ferredoxina; RuBP: ribulose bisfosfato.



Fonte: adaptado de CAMPOSTRINI (1997).

Na etapa bioquímica da fotossíntese (processos fotoquímicos) ocorre a conversão da energia luminosa absorvida em energia química. Os fótons (energia luminosa) depois de captados pelas antenas do sistema são transferidos para os centros de reação do FSII. No centro do PSII uma molécula de clorofila *a* denominada de P680 (λ_{max} de 680 nm) torna-se excitada (P680'). Em condições ideais para o processo fotossintético, o elétron doado pela P680' reduz um aceptor primário denominado de feofitina. Esta molécula começa a transferência de elétrons através dos quinonas (Q_A e Q_B), plastoquinona (PQ) e os citocromos (Cyts). Esta transferência está associada com a produção de ATP. Assim, os elétrons são transferidos para o FSI até uma segunda molécula de clorofila *a*, chamada P700 (λ_{max} de 700 nm). Da mesma forma, o P700 absorve a energia luminosa e torna-se excitado (P700'). Então, a P700' reduz a molécula de ferredoxina (Fd), a qual está relacionada com a redução do NADP para NADPH₂. Entretanto, no processo de conversão da energia luminosa em energia química ocorrem perdas, pois nem todos os elétrons das moléculas de clorofila excitada são transferidos para os aceptores. Estas moléculas retornam ao estado inicial sem a produção de ATP e NADPH₂. Ao retornar ao estado inicial, a energia é dissipada (perdida) em forma de calor ou luz (fluorescência) (CAMPOSTRINI, 1997).

A fluorescência que é medida provém quase totalmente das clorofilas associadas ao FSII, sendo um bom indicativo da qualidade do fotossistema. A medição de emissão da fluorescência clorofiliana pode ser realizada *in vivo*, e depende do estado de oxido-redução dos aceptores de elétrons do FS II.

Um dos métodos para avaliação da cinética da fluorescência da clorofila é o método fluorométrico por Pulso de Amplitude Modulada (Imaging-PAM). A partir dessa técnica, os seguintes parâmetros podem ser avaliados (SCHEREIBER et al., 1986; GENTY et al., 1989; ROHACEK & BARTAK, 1999):

- Rendimento Quântico Máximo do FSII (ϕ_m II): mede a capacidade fotoquímica máxima do FSII quando os complexos estão ativos. A faixa normal do F_v/F_m está entre 0,75 – 0,85 e sua diminuição pode indicar uma possível fotoinibição resultante de um dano nos centro reacionais.
- Rendimento Quântico Efetivo do PSII (ϕ_e II): representa a eficiência de captura de energia de excitação pelos centros de

reação oxidados (abertos) do PSII (SCHREIBER et al, 1986) e está relacionada à dissipação da energia termal (não radiativa) no sistema antena (KITAJIMA & BUTLER, 1975; GENTY et al., 1989).

- Rendimento da dissipação de energia não-fotoquímica regulada (ϕ'_{NPQ}): é a dissipação termo regulada de energia relacionada ao qN (KLUGHAMMER & SCHREIBER, 2008).
- Rendimento da dissipação de energia não-fotoquímica não regulada (ϕ'_{NO}): corresponde as perdas de energia por vias não fotoquímicas do FSII, sendo a soma da emissão de fluorescência e dissipação de calor (KAMER et al., 2004; KLUGHAMMER & SCHREIBER, 2008).
- Taxa de transporte de elétrons (ETR): relacionado com a proporção de elétrons usados na etapa fotoquímica (resposta do ϕ_{II}) a determinada densidade de fluxo de fótons (KRALL & EDWARDS, 1992; CAMPOSTRINI, 1997).

2.7 CITOTOXICIDADE: ENSAIOS *IN VITRO*

O uso de animais no desenvolvimento de pesquisas é bastante criticado e vem sendo questionado mediante o desenvolvimento de ensaios *in vitro*. Em 1959, Russel & Burch publicaram o livro “The Principle of Humane Experimental Technique” que definiu o conceito de Redução, Refinamento e Reposição (*Reduction, Refinement and Replacement*) dos ensaios *em vivo*.

Os ensaios *in vitro* vêm sendo empregado como alternativa ao uso de animais em testes de laboratório. Os testes em culturas celulares têm demonstrado grandes vantagens, como boa sensibilidade, rapidez nos resultados e boa reprodutibilidade.

A citotoxicidade é a propriedade que uma substância tem de causar danos a uma célula ou sua estrutura, podendo em casos mais graves, acarretar em morte celular. Esses efeitos podem ser gerados pelo estresse oxidativo causados pelos poluentes ambientais (OAKES & Van DER KRAAK, 2003; ERDTMANN, 2003).

Ensaio citotóxicos podem ser realizados através do ensaio colorimétrico que visam medir a redução brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a um produto insolúvel de cor púrpura, o formazan. Outro teste que pode avaliar a citotoxicidade do agente poluidor é a lipoperoxidação biológica (FLOHR, 2011). A

metilação do DNA, também é considerada uma avaliação da genotoxicidade que indica possíveis alterações epigenéticas.

2.7.1 Citotoxicidade pelo Ensaio do MTT

O ensaio do metil tiazol tetrazólio (MTT) é um modelo baseado na colorimetria e que avalia a viabilidade celular, de forma rápida e objetiva. O princípio deste ensaio é a redução do MTT (um sal de coloração amarela e solúvel em água) ao composto insolúvel em água, o sal formazan (de coloração arroxeada). Essa transformação ocorre nas mitocôndrias de células vivas, sendo um indicativo da atividade mitocondrial e, portanto, da integridade celular. Assim, quando as células são expostas ao reagente MTT, este irá reagir com enzimas denominadas succinato-desidrogenases, presentes exclusivamente em células vivas, e então será quebrado e transformado em um composto de cor violeta, o formazan, indicando assim a atividade da cadeia transportadora de elétrons. Assim, quando as células sofrem algum dano decorrente do contato com o xenobiótico, a atividade metabólica é alterada levando também a uma alteração na produção de elétrons e assim da atividade das desidrogenases mitocondriais, o que diminui ou até anula a redução do MTT à formazan. A quantidade de cristais de formazan produzidos, medidos por espectrofotometria, é diretamente proporcional atividade mitocondrial e viabilidade celular (MOSMANN, 1983, WAN et al., 1994).

O ensaio de MTT originalmente foi utilizado para avaliar a citotoxicidade de fármacos (AYAKI et al., 2010; HORDEGEN et al., 2006; ALLEY et al., 1988), no entanto vem sendo bastante empregado para avaliar a citotoxicidade de efluentes tratados, microcontaminantes (SMITAL et al., 2013) e compostos químicos (HSOUNA et al., 2011, 2006; SAUER, 2014).

2.7.2 Avaliação da Lipoperoxidação pela Dosagem do MDA

Outra forma de se avaliar a citotoxicidade de um poluente é através do processo de lipoperoxidação (LPO).

A lipoperoxidação é uma reação em cadeia, catalisada na maioria dos casos por metais de transição, que pode ser traduzida pelas etapas de iniciação (fase lenta), propagação (fase rápida) e terminação. Segundo Matias e Creppy (1998b) a LPO ou Peroxidação Lipídica caracteriza-se por uma sequência de eventos bioquímicos resultantes da ação dos radicais livres sobre os ácidos graxos poli-insaturados das

membranas celulares. Essa ação oxidativa causa danos na estrutura da membrana, podendo levar a alterações de permeabilidade (aumentando o fluxo de nutrientes e tóxicos), alterações na respiração celular e produção de ATP, falência dos mecanismos de troca de metabólitos, alterações no DNA e, em uma condição extrema, a morte celular (BABER & HARRIS, 1994; BENZIE, 1996; MATIAS & CREPPY, 1998b; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Como consequência da LPO, ocorrem a formação de produtos citotóxicos como o malondialdeído (MDA), acroleína e 4-hydroxynonenal (HNE) (HERSHKO, 1989; CATALA, 2006). O MDA está seguramente relacionado com danos às proteínas (TRAVERSO et al., 2004; FLOHR, 2011).

A LPO também faz parte dos mecanismos que levam ao envelhecimento e ao câncer, e de resposta à toxicidade de xenobióticos (SHAN et al., 1990; FERREIRA & MATSUBARA, 1997).

Em uma avaliação toxicológica, o MDA tem sido utilizado como um biomarcador produzido nesta reação e que pode ser quantificado e usado para avaliação do processo de LPO indicando estresse oxidativo das células expostas ao xenobiótico.

2.8 DEFINIÇÃO DO MODELO BIOLÓGICO

O conhecimento da toxicidade das substâncias poluidoras se obtém através de experimentos em laboratório utilizando modelos biológicos (animais, vegetais ou células), que visam prever o impacto potencial de um xenobiótico (agente tóxico) ao meio ambiente (CHASIN & AZEVEDO, 2003; MATIAS, 2010) ou à saúde humana.

A escolha do modelo biológico como sistema experimental tem influência principal na complexidade e relevância, no sucesso, e na interpretação de um teste de toxicidade. É necessário que a espécie dos organismos-teste ou a linhagem celular sejam sensíveis a uma diversidade de agentes químicos, de maneira que possibilite a obtenção de resultados precisos, garantindo desta forma boa reprodutibilidade dos resultados (RAND, WELLS & McCARTY, 1995; EPA, 2002b; ARAGÃO & ARAÚJO, 2006). Em relação aos organismos-teste, isso reflete também em optar pelo uso de organismos jovens para a realização destes testes. Outros requisitos importantes são a disponibilidade e facilidade de cultivo em laboratório, abundância do organismo no ambiente (para coleta e busca de novas cepas) e também conhecer a biologia da espécie.

Os testes de toxicidade têm sido realizados com uma ampla variedade de espécies representantes de diferentes níveis tróficos. Devido a essa imensa quantidade e diversidade de espécies, a definição do organismo a ser utilizado deve ser baseada em considerações específicas do problema a ser solucionado, pois ainda, não existe uma espécie que atenda a todos estes requisitos, para todos os ecossistemas (RAND, WELLS & McCARTY, 1995).

Os organismos aquáticos são bastante utilizados em virtude dos ecossistemas aquáticos serem os principais receptáculos de contaminantes, seja por lançamento direto de efluentes líquidos nos corpos hídricos, como por meio da transferência de contaminantes emitidos no ar ou depositados nos solos (GHERARDI-GOLDSTEIN et al., 1990; ZAGATTO & BERTOLETTI, 2008). Para a realização de testes de toxicidade utilizando organismos aquáticos vários autores (RAND, WELLS & McCARTY, 1995) sugerem a utilização de no mínimo três espécies representantes do ecossistema aquático: uma espécie de alga (representando os produtores); uma espécie de crustáceo (representando os consumidores primários e/ou secundários) e uma espécie de peixe (representando os consumidores secundários e/ou terciários).

Uma espécie que atende a vários critérios para a seleção de um organismo-teste é o microcrustáceo do gênero *D.magna*. Este organismo tem sido utilizado como organismo-teste em diversas partes do mundo, tendo a sua metodologia de teste padronizada internacionalmente.

Para uma avaliação toxicológica específica os ensaios citotóxicos e genotóxicos são importantes ferramentas para determinar quais os danos que substâncias poluentes podem causar aos modelos biológicos (SILVA, 2003). O uso de linhagens celulares para a avaliação toxicológica *in vitro* é amplamente empregado em Farmacologia e Toxicologia, pois fornecem melhor reprodutividade, resultados confiáveis, rapidez, redução dos custos em relação ao uso de animais. Outra vantagem é a disponibilidade de grande variedade de linhagens celulares (bancos de células), possibilitando avaliação toxicológica em compartimentos-alvo (BROADHEAD et al., 2000; BERNAUER et al., 2005).

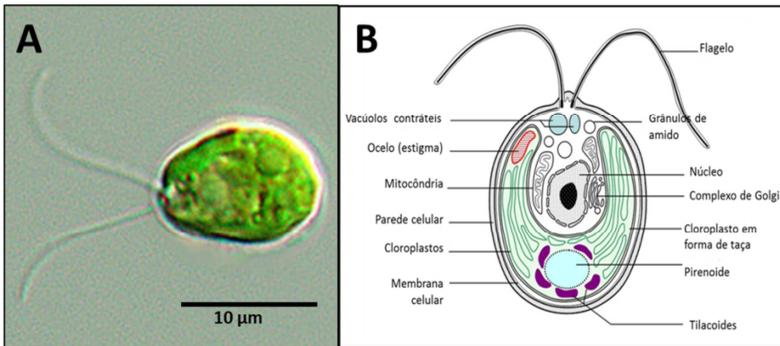
2.8.1 Microalga verde *C. reinhardtii*

As microalgas são organismos de ocorrência abundante requerendo apenas luz e umidade suficientes para sua sobrevivência. Representam o primeiro nível trófico da cadeia alimentar aquática, os

produtores, sendo assim importantes indicadores biológicos em um monitoramento ambiental.

A alga verde *C. reinhardtii* (Clorófita, Volvocida) é uma microalga unicelular com cerca de 10 micrômetros de diâmetro, que possui dois flagelos para sua locomoção (Figura 2.3). Essa espécie é encontrada tanto em água salgada como doce e em solo, podendo ser encontrada em várias regiões geográficas do mundo, até mesmo na Antártica. Elas possuem uma parede celular feita de glicoproteínas ricas em hidroxiprolina, um grande cloroplasto em forma de copo e um grande pirenóide (JAMERS et al, 2009).

Figura 2.4 – Ilustração da microalga *C. reinhardtii*. (A) Imagem das células em cultura, (B) Estruturação celular da *C. reinhardtii*.



Fonte: adaptado do sítio www.sbs.utexas.edu/utex (2012).

Dada a facilidade de cultivo e manutenção em laboratório, estes organismos unicelulares são usados como modelo experimental em áreas como: a genética, a biologia celular e molecular e a fisiologia.

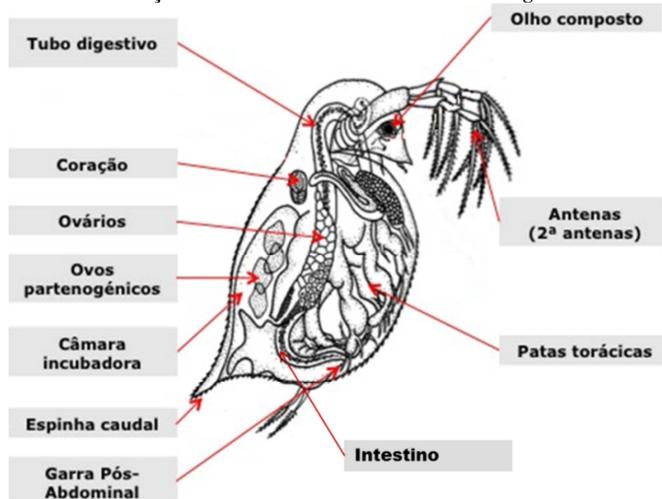
Em laboratório, *C. reinhardtii* são cultivadas em um meio com sais inorgânicos e na presença de luz, usando, assim a fotossíntese para prover energia. Contudo, essas algas podem também crescer em escuridão total, utilizando-se acetato como a fonte de carbono para o catabolismo (LIRA, 2011).

2.8.2 Microcrustáceo *D. magna*

A *D. magna* STRAUS, 1820 (Crustacea, Cladocera), vulgarmente conhecida como pulga d'água, não é naturalmente encontrada no Brasil, pois é um microcrustáceo planctônico de água

doce, sendo encontrada em grande escala em regiões temperadas (hemisfério norte). A *D. magna* possui um comprimento médio de 0,5 mm, na fase juvenil a 5 mm, na fase adulta (KNIE & LOPES, 2004). Sobrevivem em águas com dureza superior a 150 mg/L (CaCO_3), pH entre 6,5 e 9,5 e com oxigênio dissolvido menor que 4 mg/L (USEPA, 2002). Este organismo possui o corpo envolvido por uma carapaça bivalve transparente que termina em um espinho apical, conforme mostrado na Figura 2.4 (FINKLER, 2002).

Figura 2.5 - Estruturação celular do microcrustáceo *D. magna*



Fonte: adaptado do sítio www.7daphnia.blogs.sapo.pt/ (2014).

É um organismo facilmente cultivável em laboratório, e amplamente utilizado em ensaios ecotoxicológicos, principalmente por se tratar de uma espécie sensível a uma grande variedade de agentes nocivos e de manuseio simples. Seus descendentes são geneticamente idênticos, assegurando uniformidade de respostas nos ensaios e seu ciclo de vida é curto, facilitando sua utilização em testes crônicos (KNIE & LOPES, 2004).

Estes microcrustáceos atuam na cadeia alimentar aquática como consumidor primário entre os metazoários, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado, principalmente de microalgas unicelulares e bactérias (KNIE & LOPES, 2004). O tipo de alimento e

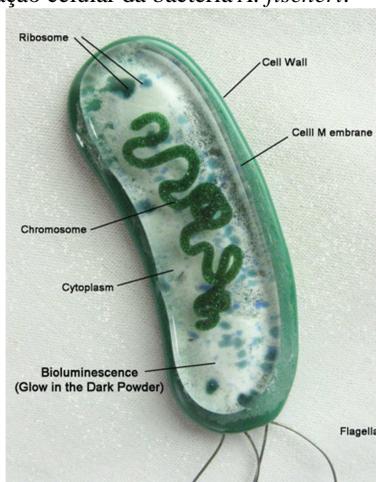
sua abundância afetam a sensibilidade das espécies *Daphnia* aos poluentes e à sua taxa de reprodução (USEPA, 2002).

Os organismos da espécie *D. magna* se reproduzem por partenogênese cíclica, gerando clones próprios. Assim, durante a maior parte do ano, as populações consistem quase inteiramente de fêmeas, sendo o aparecimento de machos mais frequente nas estações da Primavera e Outono ou quando existir algum estresse ambiental, como baixas temperaturas, alta densidade de indivíduos e subsequente acumulação de produtos de excreção, presença de salinidade, escassez de alimento ou ainda interferências antrópicas. O seu ciclo de vida, que compreende a fase do ovo ao adulto, é variável e dura em média cerca de 50 a 60 dias, a 20°C. Seu crescimento, assim como todos os pertencentes ao filo *Arthropoda*, dá-se após a ecdise (muda).

2.8.3 Bactéria *A. fischeri*

As bactérias são organismos microscópicos unicelulares ou pluricelulares, e que possuem uma organização celular simples, apresentando uma parede celular externa, membrana plasmática, DNA circular disperso no citoplasma sem nenhuma separação e ribossomos. São seres procariontes e se reproduzem através da divisão celular simples. O organismo *Aliivibrio fischeri*, anteriormente conhecida como *Vibrio fischeri* é uma bactéria marinha luminescente, possui formato de bastão com comprimento médio de 3 µm. É considerada uma enterobactéria, *gram-negativa*, anaeróbia facultativa e pertencente à família *Vibrionaceae*, que é caracterizada pela cooperação e interação com tecidos de outros animais (FUZINATTO, 2009). A *A. fischeri* é comumente encontrada em águas temperadas e subtropicais, possui flagelos para sua locomoção e pode ser encontrada na forma livre ou em simbiose dentro dos organismos de muitas espécies de mamíferos marinhos, lulas e peixes (NEALSON & HASTINGS, 1979; HARMEL, 2004).

Figura 2.6 - Estruturação celular da bactéria *A. fischeri*.



Fonte: adaptado do sítio www.deviantart.com (2014).

Em condições ambientais favoráveis, *A. fischeri* emite luz naturalmente, necessitando somente de condições de oxigênio acima de 0,5 mg/L (KNIE & LOPES, 2004). A produção de luz, representada de forma resumida na equação 7, depende da reação entre a enzima luciferase e o substrato luciferina.



O mecanismo de emissão de luz inicia-se com a luciferina, na presença de ATP e Mg^{2+} , sendo convertida no complexo luciferil adenilato pela enzima luciferase, liberando pirofosfato livre (PPi). Este complexo, ainda em catálise enzimática, combina-se com o oxigênio molecular (descarboxilação oxidativa) transformando-se em oxiluciferil-adenilato-enzima, eletronicamente excitado. Para retornar ao estado basal de excitação, o complexo se dissocia, formando a enzima luciferase, monofosfato de adenosina, dióxido de carbono (CO_2), oxiluciferina e consequente emissão de fótons de luz (CUNHA et al., 2013; SANTOS et al., 1993).

Como a emissão de luz pela *A. fischeri* utiliza parte da energia obtida no Ciclo de Krebs, ao entrar em contato com alguma substância tóxica que seja capaz de inibir a produção dessa energia, a bactéria cessa ou diminui a produção de luz. Esta diminuição na capacidade de emitir

luz é medida em porcentagem de inibição de luminescência (UMBUZEIRO & RODRIGUES, 2004; FUZINATTO, 2009).

A capacidade de produção da bioluminescência pela *A. fischeri* é utilizada em vários testes de toxicidade para verificar os efeitos toxicológicos de compostos químicos presentes na água, em sedimentos contaminados, efluentes industriais e domésticos, dentre outros.

A bactéria *A. fischeri* é considerada bom indicador de contaminação em ambientes marinhos e por isso são usualmente utilizadas em ensaios de avaliação toxicológica de xenobióticos ou efluente que possam causar algum efeito nocivo ao meio ambiente.

2.8.4 Células Vero

A técnica de cultivo de células foi desenvolvida com o objetivo inicial de estudar o comportamento de células animais fora do organismo, em condições ambientais controladas. O cultivo de células iniciou-se com Harrison, em 1907 e posteriormente com Carrel, em 1912 (FRESHNEY, 2005). Atualmente, essa técnica é importante ferramenta de pesquisas para diversas áreas, como por exemplo, testes de vacinas e avaliação toxicológica de fármacos ou outras substâncias químicas.

Um dos modelos celulares bastantes utilizados é a linhagem de células Vero, que foi estabelecida a partir de células fibroblásticas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto normal por Y. Yasumura e Y. Kawakita da Universidade de Chiba, Japão, em 1962. Esta linhagem celular é utilizada principalmente em estudos de replicação viral, produção de vacinas e ensaios em placas (*in vitro*). A utilização da linhagem de células Vero em avaliação toxicológica é justificada pelo fato de estas células serem provenientes de células do epitélio de rim (de macaco verde), órgão responsável pela eliminação de substâncias exógenas e/ou tóxicas, regulação osmótica e também pela regulação produção de hormônios.

CAPÍTULO III – MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios com microalgas unicelulares *C. reinhardtii* foram realizados na Université du Québec à Montréal – UQÀM, durante o estágio doutoral com bolsa de doutorado sanduíche. A NP Cr₂O₃ utilizada nesses ensaios foi da marca Sigma-Aldrich, lote código 1000884883 (Sigma-Aldrich Chemistry, CHN; diâmetro < 100 nm, pureza: 99%), adquirida pela UQAM.

Os estudos de efeitos tóxicos da NP Cr₂O₃ sobre cultura de células animal, bactéria luminescente e microcrustáceos foram realizados no Laboratório de Toxicologia Ambiental (Labtox) da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC. Para esses ensaios foi adquirido um novo lote da NP Cr₂O₃, código 1001025977, também da marca Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemistry, EUA; diâmetro < 100 nm, pureza: 99%).

Para efeitos de comparação, optou-se em realizar, em paralelo, testes rápidos de avaliação toxicológica com amostra de *bulk* Cr₂O₃, que será denominada neste trabalho como micropartícula (MP) Cr₂O₃, por esta amostra apresentar-se na forma de partículas sólidas com tamanho que variam entre 1 a 1000 µm (Burgess & Hickey, 1994). Os testes escolhidos foram: teste agudo com *D. magna*, teste agudo com *A. fischeri* e ensaio de MTT para avaliação da viabilidade celular com células Vero. O reagente na forma MP de Cr₂O₃ utilizado nos ensaios foi da marca Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Chemistry, EUA, diâmetro: 50µ, pureza: 99%).

3.1 PREPARAÇÃO DA AMOSTRA

Para os ensaios com alga *C. reinhardtii*, as NP Cr₂O₃ foram diluídas no meio de cultura enriquecido com sais, HSM (do inglês *High Salt Medium*), a fim de se obter uma concentração inicial de 10 g L⁻¹. A solução foi então suspensa e homogeneizada utilizando um aparelho ultrassônico com sonda metálica (marca VibraCell, 400W), por 5 minutos em 50 % de sua potência (200W).

Para os testes com *D. magna* as NP Cr₂O₃ foram diluídas nos meios M4 (água de cultivo) e ISO (água de diluição). Para *A. fischeri* as NP foram diluídas no meio salino (dilúente NaCl 2%). As soluções foram suspensas e homogeneizadas com o auxílio de aparelho ultrassônico com sonda metálica (marca QSonica, Sonicator-Q500, 500

W, Newtown, CT06470, U.S.A), por 5 minutos em 50% de sua potência (250W).

Para os testes *in vitro* com células da linhagem Vero a NP Cr₂O₃ foram solubilizadas no meio de cultura RPMI e a solução foi suspensa com auxílio de uma sonda metálica de ultrassom (marca QSonica, Sonicator-Q500, 500 W, Newtown, CT06470, U.S.A), por 5 minutos em 50 % de sua potência (250W). Após a homogeneização da suspensão, a solução permaneceu sobre incidência de luz ultravioleta (UV) por 15 minutos em fluxo laminar.

A amostra MP Cr₂O₃ foi suspensa nos meios dos testes de *D. Magna*, *A. Fischeri* e células Vero. Contudo a suspensão de MP não passou pelo processo de homogeneização com aparelho ultrassônico.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA NP Cr₂O₃

3.2.1 Estabilidade em Suspensão

Para a verificação da estabilidade da solução de NP Cr₂O₃ em suspensão foram realizadas as leituras do D_H e Pz das suspensões nos diferentes meios de teste. As medições foram realizadas no aparelho Zeta Plus (modelo 90/Plus BI-MAS, da Brookhaven Instruments Corporation - BIC), localizado no Laboratório de Espectroscopia do Departamento de Química e Bioquímica da *Université du Québec à Montréal* (UQÀM), e no aparelho Zetasizer Nano ZS localizado no Laboratório de Farmacotécnica e Cosmetologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina.

As suspensões foram preparadas na concentração de 0,1 g L⁻¹ de NP Cr₂O₃ em água ultrapura e meio de cultivo das algas *C. clamydomonas* (meio HSM).

Para a verificação da estabilidade da solução de NP Cr₂O₃ nos meios de cultivo e teste de *D. magna* (M4 e ISO), *A. fischeri* (NaCl 2%) e célula Vero (meio RPMI), foram preparadas suspensões com concentração de 0,1 g L⁻¹ nos respectivos meios diluentes.

3.2.2 Difração de Raios-X

A análise de DRX foi realizada no Laboratório de Caracterização Microestrutural – LCM, do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina.

As amostras de NP Cr₂O₃ foram analisadas em Difrátômetro de raios-X da marca Philips, modelo X'Pert. O ângulo de difração 2θ foi

registrado de 20 a 80° em temperatura ambiente e o tubo utilizado como fonte dos raios- X foi de cobre, CuK α , com $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$. Para a identificação das fases presentes utilizou-se o banco de dados da *Inorganic Crystal Structure Database - ICSD*.

3.2.3 Imagens das NP Cr₂O₃ pela MET

As imagens de MET para caracterização de forma, estado de aglomeração e tamanho das NP Cr₂O₃ foram realizadas nos diferentes meios de culturas dos ensaios utilizados. Após o preparo das suspensões de NP (conforme item 3.1), estas foram gotejadas sobre discos de grades de cobre com 300 *mesh* coberto com filme de carbono e deixados para secar em dessecadores com câmara a vácuo por 24 horas.

As imagens apresentadas foram obtidas com o microscópio FEI Tecnai 12 de voltagem 120 kV equipado com câmara de resolução 13 Mpixel da marca Morada (University of M'Gill, Canadá) e TEM JEM 1011 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan, 100kV), localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica – LCME (UFSC, Brasil).

3.2.4 Área Superficial Específica

A análise da área superficial foi realizada no Laboratório de Materiais Elétricos – LaMatE, do Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina.

Para a análise, a amostra foi resfriada à temperatura de 77 K, sob vácuo, durante uma hora no próprio equipamento e submetidas a ciclos de adsorção e dessorção através da injeção de nitrogênio líquido. Os dados coletados de pressão e volume de gás adsorvido são apresentados na forma de isoterma de BET. A área superficial específica foi calculada pelo software do equipamento através da equação BET.

A amostra de NP Cr₂O₃ foi analisada na forma de pó através do equipamento NOVA® Surface Area Analyzer, modelo NOVA 1200e (Quantachrome Instruments).

3.3 BIOENSAIO COM ALGA VERDE *C. reinhardtii*

3.3.1 Cultura de *C. reinhardtii*

Os ensaios com alga *Chlamydomonas reinhardtii* foram realizados no laboratório de pesquisa do professor Radovan Popovic, do

Departamento de Química e Bioquímica da Université du Québec à Montréal (UQÀM).

A cultura de *C. reinhardtii*, chamada de CC125 – cepa selvagem, foi obtida do *Chlamydomonas* Genetic Center (Duke University, Durham, NC, USA). As células *C. reinhardtii* foram cultivadas em frasco de erlenmeyer com volume de 1000 mL de meio de cultura HSM (HARRIS, 1989), sob iluminação contínua ($100 \mu\text{mol photons m}^{-2} \text{ s}^{-1}$, provenientes de lâmpadas fluorescentes de luz cor branca (Sylvania Grolux F36W; Osramsylvania Ltd., Mississauga, ON, Canadá), e temperatura controlada de $23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ (PERREAULT et al., 2012b). Foi fornecida aeração constante à cultura de algas para garantir concentração adequada e constante de CO_2 no meio na cultura.

3.3.2 Exposição da *C. reinhardtii* à NP Cr_2O_3

As microalgas *C. reinhardtii* foram expostas à NP por um tempo máximo de 72 h. As leituras foram realizadas a cada 24 h de exposição. Para a realização do teste, adotou-se um volume total de 100 mL para cada frasco. Com o objetivo de garantir uma densidade conhecida de algas no início dos testes foi realizada a quantificação de células de *C. reinhardtii* por mililitro de meio. Assim, a densidade inicial de células adotada nos testes foi de $2,5 \times 10^5$ células por mililitro. A contagem celular da cultura de algas foi realizada usando o contador Multisizer Z3 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA).

As concentrações utilizadas inicialmente nos testes foram de 0,01; 0,1; 1,0 e 10 g L^{-1} de NP Cr_2O_3 . Durante o tempo de exposição, as células de *C. reinhardtii* foram mantidas nas mesmas condições de iluminação e temperatura do cultivo. Todos os grupos experimentais foram avaliados em triplicata. Para o controle negativo foi usado a mesma quantidade de células, porém sem a adição da NP. O teste permaneceu sob agitação contínua durante todo o período de exposição.

Na Figura 3.1, é possível visualizar imagens do teste com a *C. reinhardtii* já exposta à NP, sob a mesa agitadora.

Figura 3.1- Imagens do teste de toxicidade com *C. reinhardtii*.



3.3.3 Densidade Celular

A avaliação da densidade celular foi feita através da quantificação do número de células de algas por mililitro no final do período de exposição (72 h). No entanto, a cada 24 horas de exposição foram separadas uma alíquota de 100 μL de volume do tratamento de cada concentração feita e, esta transferida para tubos apropriados para a leitura e esse volume foi diluído em 400 μL de meio HSM. Essa diluição se fez necessária para que a leitura no aparelho fosse possível. Como controle foi utilizado apenas algas e o meio de cultura.

A densidade celular foi medida adicionando no momento da leitura 10 μL de suspensão de microesferas fluorescentes (Fluospheres® carboxilate-modified microbeads 2 μm - Molecular Probes, cat. #F8827) numa concentração conhecida de 70752 microesferas/mL (PERREAULT et al., 2012b). O aparelho utilizado para a leitura foi o citômetro de fluxo FACScan (da marca Becton Dickinson Instruments) equipado com laser de Argônio (488nm) e detectores de dispersão para tamanho e complexidade interna.

O limite do tamanho da citometria foi fixado logo abaixo do tamanho das microesferas. Para cada análise, 10000 eventos foram mensurados, em velocidade alta, em escala linear. Gráficos baseados no tamanho (FSC - *Forward Light Scatter*) e na granulometria (SSC - *Side Light Scatter*) das células de algas foram construídos em função da fluorescência no vermelho (FL3 - Fluorescência Clorofiliana) usando-se janelas discriminatórias para as populações do marcador e das células. Os dados foram analisados usando-se o software Cyflogic 1.2.1. Os resultados foram expressos em células por mililitro.

3.3.4 Viabilidade Celular (FDA)

Para a determinação da viabilidade celular analisou-se como parâmetro a atividade enzimática das esterases pelos níveis de fluoresceína, segundo descrito por Franklin et al. (2001) e Regel et al. (2002).

A solução estoque do marcador FDA foi preparada no escuro usando acetona como diluente, para obter uma concentração final da solução de 10mM. Esse marcador é um composto apolar, que entra na célula de forma passiva, onde é transformado em um composto fluorescente, a fluoresceína, e se acumula no interior das células.

A *C. reinhardtii* foi exposta nos tempos de 24, 48 e 72 h, nas concentrações iniciais de 0,001 a 10 g L⁻¹ de NP Cr₂O₃. Como controle foi utilizado apenas *C. reinhardtii* e o meio de cultura. Tratamentos e controle foram avaliados em duplicatas. Em uma alíquota de 1mL de tratamento, foi adicionado 20 µL da solução estoque do marcador FDA. Após incubação de 15 minutos, a fluorescência da fluoresceína foi medida com um citômetro de fluxo FACScan (Becton Dickinson Instruments) equipado com laser de Argônio (488nm) e detectores de dispersão para tamanho e complexidade interna, avaliando a fluorescência em 530 nm. Para cada análise, 10000 eventos foram adquiridos em velocidade alta em escala linear. Foram gerados histogramas baseados no tamanho (FSC) das células de algas em função da fluorescência no verde (FL1, Fluorescência do Marcador). Os dados foram analisados usando-se o software Cyflogic 1.2.1.

Os dados dos histogramas foram expressos com média da intensidade de fluorescência e os valores médios convertidos através da equação proposta por Reader et al. (1993) (equação 8):

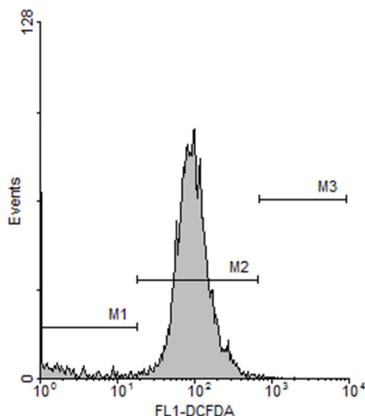
$$\%F = 100 - \left[100 \frac{(F_t - F_c)}{F_c} \right] \quad (8)$$

Onde F_c = a média de fluorescência das células do controle,
 F_t = a média de fluorescência das células do tratamento

Para avaliação destes resultados utilizou a metodologia de tratamento de Franklin et al., (2001). Três estados de atividade foram definidos baseados no histograma de eventos do controle negativo do teste: um estado de baixa atividade, M1, correspondente à atividade esterase das células abaixo do normal, um estado normal, M2, correspondente à distribuição de atividade de uma população sem

tratamento de algas cultivadas em meio HSM e um estado de maior atividade, M3, correspondente a uma atividade esterase acima da faixa normal (Figura 3.2). Os dados foram analisados usando-se o software WinMDI 2.8.

Figura 3.2 - Histograma de citometria de fluxo mostrando mudança na atividade da esterase da *C. reinhardtii*.



3.3.5 Estresse Oxidativo: nível de ROS

Para a avaliação do estresse oxidativo, foi quantificado o nível de ROS intracelular através do marcador 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) (Invitrogen Molecular Probe, Eugene, EUA), de acordo com Knauert & Knauer (2008) e Perreault et al., (2012b). A solução estoque de H_2DCFDA foi preparada no escuro usando etanol, para obter uma concentração final da solução de 10 mM.

Para a determinação do nível de ROS intracelular, as leituras foram feitas em 24, 48 e 72 h de exposição. Uma alíquota de 1mL de cada uma das exposições (incluindo o controle) foi separada a este volume e foi adicionado 20 μ L da solução estoque do marcador H_2DCFDA . As amostras foram incubadas por 15 minutos no escuro e suas fluorescências foram medidas com um citômetro de fluxo FACScan (da marca Becton Dickinson Instruments) equipado com laser de Argônio (488nm) e detectores de dispersão para tamanho e complexidade interna, avaliando a fluorescência em 530nm para

H₂DCFDA (DCF). Para cada análise, 10000 eventos foram adquiridos em velocidade alta em escala linear. Gráficos baseados no tamanho (FSC) das células de algas foram construídos em função da fluorescência no vermelho (FL3 – Fluorescência Clorofiliana). Os dados obtidos foram analisados através do software Cyflogic 1.2.1.

As alterações nos níveis de ROS nos tratamentos com NP foram expressas sempre em comparação ao controle negativo usando a equação 9:

$$\% \text{ de ROS} = 1 + \frac{\text{Média ROS [Tratamento]} - \text{Média ROS [Controle]}}{\text{Média do ROS [Controle]}} \times 100 \quad (9)$$

O valor do percentual relativo de ROS representa o incremento na formação de ROS nos tratamentos com a NP Cr₂O₃ em relação ao controle.

3.3.6 Dosagem de Pigmentos Fotossintéticos

A dosagem de clorofila foi necessária para quantificar o volume de algas necessário para proceder com a avaliação do fotossistema do organismo.

A quantificação dos pigmentos clorofilianos, clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total (clorofila *a* + clorofila *b*) e carotenoides foram realizada após 72h de exposição. Para cada réplica do teste, utilizou-se 2 mL da amostra que foram transferidos para tubos tipo *ependorfs* e centrifugados à 10000 rpm por 10 minutos. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 1mL de metanol, para a extração dos pigmentos. O material permaneceu em banho-maria à 65°C, na ausência de luz branca, por 10 minutos. As absorbâncias foram medidas nos comprimentos de onda de 470; 652,4; 665,2 e 750 nm, de acordo com Lichtenthaler (1987). As seguintes equações foram utilizadas para calcular a clorofila *a*, clorofila *b*, clorofila total e carotenóides (equações 10-13):

$$\text{Clorofila Total } (\mu\text{g/mL}): [24,93 \times (A_{652,4} - A_{750}) + 1,44 \times (A_{665,2} - A_{750})] \times \frac{V_{\text{Metanol}}}{V_{\text{Cultura}}} \quad (10)$$

$$\text{Clorofila a } (\mu\text{g/mL}): [16,72 \times (A_{665,2} - A_{750}) - 9,16 \times (A_{652,4} - A_{750})] \times \frac{V_{\text{Metanol}}}{V_{\text{Cultura}}} \quad (11)$$

$$\text{Clorofila b } (\mu\text{g/mL}): [34,09 \times (A_{652,4} - A_{750}) - 15,28 \times (A_{665,2} - A_{750})] \times \frac{V_{\text{Metanol}}}{V_{\text{Cultura}}} \quad (12)$$

$$\text{Carotenóides } (\mu\text{g/mL}): \left[1000 \times (A_{470} - A_{750}) - \frac{1,63 \times \text{ClorA} - 104,96 \times \text{ClorB}}{221} \right] \times \frac{V_{\text{Metanol}}}{V_{\text{Cultura}}} \quad (13)$$

3.3.7 Avaliação do nível de Fluorescência Clorofiliana

A avaliação da supressão de fluorescência clorofiliana foi mensurada com o objetivo de verificar a atividade do fotossistema II (FSII).

As células de microalga foram expostas às concentrações iniciais de 0,01; 0,1; 1,0 e 10 g L⁻¹ de NP Cr₂O₃ durante um período de 72 h. Após o tempo de exposição, as microalgas do tratamento e do controle foram adaptadas à escuridão por 30 minutos antes da medição, para completa oxidação dos centros de reação, a fim de obter o equilíbrio do FS II. Uma alíquota de 5µg de clorofila total de cada réplica foi filtrada em filtro de fibra de vidro 13mm (Millipore). As algas depositadas nesse filtro foram inseridas no aparelho para leitura onde foram submetidas a irradiações crescentes.

A cinética da fluorescência clorofiliana foi medida com um sistema de fluorímetro (MAXI Imaging-PAM, Walz, Alemanha) de acordo com Rohacek & Bartak (1999) e Perreault et al. (2010). Após adaptação ao escuro (centros de reação abertos) uma luz modulada inicial de baixa intensidade (<1µmol m⁻² s⁻¹) foi aplicada na amostra para medição do F₀. Após, uma segunda luz com cerca de 100 µmol m⁻² s⁻¹, chamada de luz actínica, induz a cinética da curva. Para efetuar as análises dos *quenchings* (dissipações) e do rendimento de fluorescência efetivo, uma luz com elevada intensidade luminosa (5000 µmol m⁻² s⁻¹) foi utilizada para “fechar” os centros de reação (oxidação), e o valor obtido logo após esse pulso de saturação correspondeu ao valor de F_m (CAMPOSTRINI, 1997; PERREAULT et al., 2010).

Os dados F₀, F'0, F_m, F'm foram obtidos na leitura direta do equipamento com a amostra recebendo um determinado fluxo de fótons fotossintéticos, e os parâmetros analisados estão resumidos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Parâmetros fotossintéticos obtidos a partir da cinética de fluorescência modulada.

Parâmetro	Definição	Cálculo	Referência
ϕ_{eII} ($\Delta F/F'_m$)	Rendimento Quântico Efetivo do FSII	$\frac{(F'_m - F_S)}{F'_m}$	Genty et al. (1989)
ϕ'_{NO}	Rendimento de dissipação de energia não-fotoquímica não regulada	$\frac{F}{F_m}$	Hendrickson et al. (2004)
ϕ'_{NPQ}	Rendimento de dissipação de energia não-fotoquímica regulada	$(1 - \phi_{eII}) - \phi'_{NO}$	Kramer et al. (2004)
ETR	Taxa de Transporte de Elétrons	$\phi_{eII} \times PAR \times 0,84 \times 0,5$	Genty et al. (1989)

onde: F_m = fluorescência máxima da alga adaptada ao escuro;
 F'_m = fluorescência máxima após iluminação da alga;
 F_S = fluorescência no estado estacionário;
 PAR = densidade do fluxo de fótons, constante do equipamento (PAR = 146);
 o valor 0,84 corresponde a 84% de luz absorvida;
 o valor 0,5 é o fator de distribuição de energia entre os dois fotossistemas (FSI e FSII) envolvidos na fotorreação.

3.3.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata e a média e o desvio padrão foram estimados para cada tratamento. Diferenças estatísticas, considerando valores de p menor que 0,05, entre os tratamentos e o grupo controle foram determinadas aplicando o teste de análise de variância simples (ANOVA com um fator) utilizando o programa R software (v 3.0.2. R Core Group, 2014). A densidade celular foi avaliada em relação à concentração de NP Cr₂O₃ (curva concentração-dependente) para estimar os valores de CE₅₀ em 24 e 72 h de exposição.

3.3.9 Avaliação Microscópica

Para a avaliação da interação entre a NP Cr₂O₃ e a alga *C. reinhardtii* foram realizadas visualizações em microscópio ótico invertido. As imagens foram obtidas após o tempo de exposição 72 h, das algas do controle e das concentrações de 0,1 e 1,0 g L⁻¹ de NP Cr₂O₃.

As imagens dos tratamentos e do controle foram capturadas utilizando um microscópio ótico Nikon Eclipse TS100, com aumento de 400x e equipado com câmera PixeLINK.

Para avaliação das possíveis alterações ultraestruturais causadas pela penetração da NP Cr₂O₃ pela parede celular, foi necessário fazer a fixação e cortes ultrafinos das células de algas. Assim, procedeu-se com a recuperação das algas, onde 50 mL das suspensões de microalgas controle e tratamentos foram centrifugados. As algas foram separadas das NP através de gradiente decrescente de sacarose (120, 100, 80, 60, 40, e 20%), conforme Eroglu & Melis (2008) e Perreault et al. (2012b), preparado em meio HSM. O gradiente foi preparado em um tubo de vidro para centrifugação inclinado com ângulo de 30°, onde adicionou-se lentamente 3 mL de cada solução de sacarose, resultando em seis camadas de diferentes densidades. O centrifugado (*pellet*) de algas e NP foi adicionado lentamente na primeira camada do gradiente. Os tubos foram centrifugados a 1.000 rpm durante 20 minutos em uma centrífuga *swing-bucket* 5810R (Eppendorf, Canada). Após esse processo, as algas estavam separadas das NP Cr₂O₃, e foram recuperadas com pipeta de vidro tipo Pasteur.

Em seguida, as células foram fixadas com 500 µL de tampão de fixação (2,5 % glutaraldeído em 0,1 M de tampão de lavagem) e permaneceram nessa solução a 4°C, durante a noite. Em seguida lavadas com solução tampão de lavagem (0,1 M cacodilato, 0,1% CaCl₂, pH 7,2) por três vezes 10 minutos cada. Após a lavagem, as células foram coradas com tetróxido de ósmio (1% OsO₄, 1,5% KFeCN em água) e deixadas sobre agitação por rotação por 2 horas. Em seguida, as células foram novamente lavadas com solução tampão fosfato pH 7,2 e desidratadas com um gradiente crescente de acetona (30, 50, 70, 80, 90 e 100% acetona), três vezes por 10 minutos em cada solução. Procedeu-se com a infiltração da resina epon preparado em acetona nas seguintes proporções: 1:1 (durante a noite); 2:1 (4h); 3:1 (durante a noite). Em seguida, o *pellet* foi colocado em epon puro, onde permaneceu por 4h sob vácuo e após aquecido à 58°C por 48h. Foram feitos cortes de 600nm de espessura com o auxílio de lâmina de diamante e estes foram depositados sobre grelha de ouro para posterior captura de imagens em

um Microscópio Eletrônico de Transmissão (TEM - FEI Tecnai 12 120 kV).

3.4 ENSAIOS DE TOXICIDADE COM *D. magna*

3.4.1 Cultura do microcrustáceo *D. magna*

Os organismos jovens (neonatos) de *D. magna*, utilizados na realização dos bioensaios, foram provenientes do cultivo do Laboratório de Toxicologia Ambiental (Labtox) – ENS/UFSC. O cultivo dessa espécie é realizado segundo as normas ISO 6341 (2012), DIN 38412 (1989) e NBR 12713 (2009).

O cultivo dos organismos é realizado em recipientes de vidro com capacidade de 2000 ml contendo água reconstituída como meio de cultivo (M4), meio utilizado para crescimento dos organismos. Uma população de 30 a 35 indivíduos fêmeas foi colocada em um volume de 1500 mL de meio M4, e mantida em ambiente com temperatura controlada a $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e com fotoperíodo de 16 horas de luz, condições obtidas com o uso de uma estufa incubadora. Os organismos são alimentados diariamente com cultura de alga verde *Scenedesmus subspicatus* (ISO, 1989). A renovação do meio foi realizada três vezes por semana, onde se faz o controle do número de organismos adultos e higienização dos recipientes.

Periodicamente são realizados testes de sensibilidade com a substância de referência dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), como prescreve as normas NBR 12713 (ABNT, 2009) e ISO 6341 (ISO, 2012), para avaliar a sensibilidade dos organismos, sendo que os valores da $\text{CE}_{50,24\text{h}}$ devem estar entre 0,6 – 1,7 mg/L para assegurar a qualificação do cultivo no padrão internacional e garantir a validação dos testes realizados conforme (ABNT, 2009; FINKLER, 2002).

3.4.2 Ensaios de Toxicidade Aguda

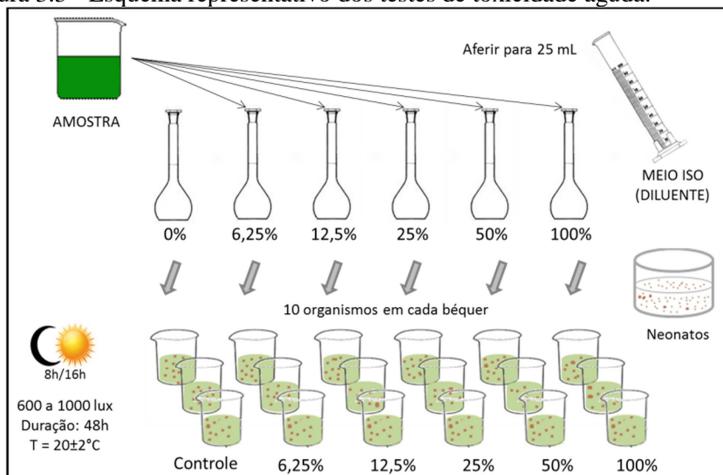
A metodologia para realização dos testes de toxicidade aguda seguiu a NBR 12.713 (2010). As amostras foram avaliadas baseando-se na exposição de neonatos de *D. magna* de 2 a 26 horas de idade, em diferentes diluições da amostra, por um período de 48 h de exposição. As diluições foram preparadas com precisão volumétrica a partir de uma solução-mãe com concentração de 10 g L^{-1} .

Para o grupo controle, foi utilizado somente a água de diluição, conhecido como meio ISO, descrito na norma ISO 6341 (ISO, 2012).

Este meio foi preparado conforme norma e permaneceu aerando por 24 horas. O grupo controle tem a função de validar o teste agudo, não sendo permitidos valores de organismos imóveis neste grupo acima de 10%.

As soluções-teste eram preparadas com precisão volumétrica e dispostas em béqueres de 50mL, colocando-se 25 mL de solução-teste em cada e disposto 10 organismos por béquer. Cada grupo experimental foi feito em triplicata, totalizando 30 organismos por diluição. Os béqueres com a solução-teste e os organismos foram acondicionados em um recipiente de plástico com tampa e levados para a incubadora de testes, com controle de temperatura entre 18°C e 22°C, sem alimentação e com fotoperíodo de 16 horas. A metodologia do teste de toxicidade aguda está ilustrada na Figura 3.3.

Figura 3.3 - Esquema representativo dos testes de toxicidade aguda.



Para efeitos de comparação, optou-se em realizar um teste com amostra de MP Cr₂O₃ em paralelo, sob as mesmas condições de ensaio realizado para a NP.

A leitura foi realizada após o período de exposição (48 h) observando-se o número de indivíduos imóveis por concentração e a partir destes valores, calculou-se a porcentagem de imobilidade. Essa porcentagem é expressa em Concentração Efetiva Mediana - CE_{50,48h}, que corresponde à concentração da amostra no início do ensaio, que causa efeito agudo (imobilidade) a 50% dos organismos expostos em 48 h e Fator de Diluição (FD), que representa a primeira de uma série de

diluições de uma amostra no qual não mais se observa efeitos tóxicos agudos aos organismos-teste (ABNT, 2010; FLOHR et al, 2005; BARROS & DAVINO, 2003)

A $CE_{50,48h}$ foi calculada utilizando-se os métodos estatísticos Probit Method (WEBER, 1993) para dados paramétricos e Trimmed Sperman-Karber Method para dados não paramétricos.

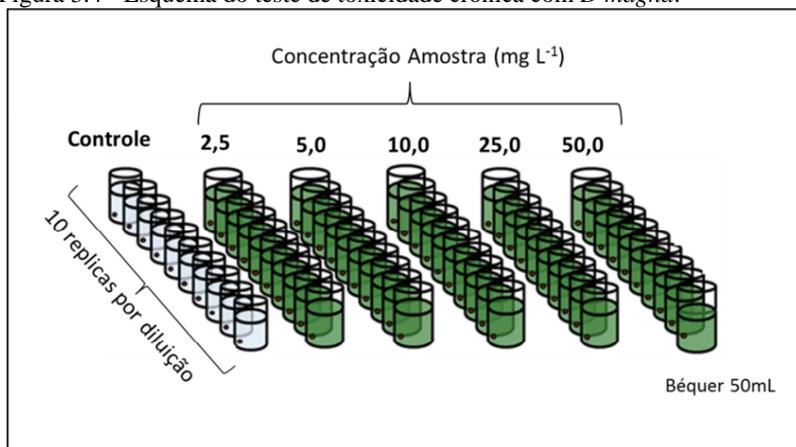
3.4.3 Ensaios de Toxicidade Crônica

Nos estudos de toxicidade crônica verifica-se o comportamento de *D. magna* por um período de 21 dias, para determinar os efeitos causados pelo agente tóxico sobre o organismo. Este tipo de teste permite avaliar os efeitos subletais, estimando as concentrações do agente tóxico.

O teste crônico foi baseado na metodologia proposta na norma ISO 10706 (ISO, 2000) e Bianchini & Wood (2002), com algumas modificações. A metodologia deste teste baseia-se na exposição de neonatos (filhotes com idade entre 2 e 26 horas) gerados a partir da quarta postura de fêmeas não expostas anteriormente ao agente agressivo. Assim, eles são mantidos no meio contaminado por um período correspondente a uma parcela significativa ao seu ciclo de vida – em torno de 1/3 do ciclo vital, sendo possível observar a longevidade, o crescimento e maturação dentre outros parâmetros.

Para este teste foram realizadas cinco diluições da amostra, mais um controle negativo, constituído somente de meio de cultivo (M4). As diluições realizadas foram correspondentes as concentrações de 2,5 mg L⁻¹; 5,0 mg L⁻¹; 10 mg L⁻¹; 25 mg L⁻¹ e 50 mg L⁻¹ de NP Cr₂O₃. A Figura 3.4 possibilita a visualização esquemática do teste de toxicidade crônica.

Figura 3.4 - Esquema do teste de toxicidade crônica com *D magna*.



Na realização do teste crônico, as soluções-teste (diluições) foram preparadas utilizando-se o meio de cultura completo M4 como diluente. Cada diluição foi preparada com precisão volumétrica com o auxílio de uma proveta de 500 mL. Assim, as soluções-teste foram preparadas no momento da exposição do organismo, utilizando as devidas proporções de amostra e água reconstituída (meio M4). Após o preparo, a solução foi então dividida em 10 béqueres de vidro com capacidade de 50 mL cada. Cada béquer recebeu uma alíquota de 45 ml da solução-teste e um indivíduo jovem (neonato) de *D. magna* e foi coberto com filme de PVC para evitar a evaporação e contaminação do teste com possíveis resíduos suspensos no ar. Portanto, para cada grupo experimento foi realizado 10 réplicas.

Os testes de toxicidade crônica com *D. magna* foram mantidos em condições ambientais controladas, as mesmas do cultivo do organismo, ou seja, temperatura ambiente de ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e luminosidade difusa (fotoperíodo de 16 horas). A alimentação foi fornecida diariamente, sendo à base de alga clorofícea *Scenedesmus subspicatus*, cultivada em laboratório.

Durante o teste, os organismos foram acompanhados diariamente nas duas primeiras semanas, e após este período, as observações foram feitas três vezes por semana, intercalando os dias: nas segundas, quartas e sextas-feiras. Foram observadas e registradas a sobrevivência e o número de jovens gerados por fêmea. Por se tratar de um teste semi-estático, nos dias de leitura também se realizava a renovação da solução-teste, ou seja, troca do meio. Na manutenção, foi

realizada a substituição da solução-teste antiga por uma nova, sempre preparada antes da exposição. Teve-se o cuidado de a nova solução estar em uma temperatura similar a anterior ($20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) no momento da transferência dos organismos.

Na realização da troca da solução-teste, os organismos adultos foram retirados do béquer, acondicionadas temporariamente em um recipiente livre de contaminação contendo M4. Os neonatos foram contados e registrados. Os organismos jovens encontrados mortos não foram contabilizados. Após, os jovens foram descartados, juntamente com a solução-teste antiga do béquer. Em seguida, procedeu-se com a higienização do béquer, utilizando um pedaço de algodão ou gaze para a remoção de impurezas presentes na parede interna do recipiente e lavou-se o mesmo com água destilada. O béquer já higienizado recebeu nova alíquota de 45 mL de solução-teste e então se devolveu o organismo adulto ao recipiente contendo a nova solução-teste.

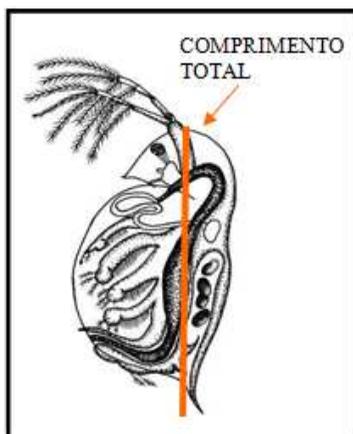
3.4.3.1 Parâmetros analisados durante o teste crônico

Para a avaliação das amostras testadas, três parâmetros foram analisados na execução do teste: longevidade, crescimento e fecundidade.

A longevidade corresponde ao tempo de vida de um organismo sob um determinado conjunto de condições de desenvolvimento. Nos testes de toxicidade crônicos realizados, esse parâmetro foi obtido através do acompanhamento da sobrevivência dos organismos-teste até a finalização do teste (21 dias após o início dos mesmos). Este valor foi expresso em número de organismos sobreviventes após 21 dias.

O crescimento é avaliado através de uma variação de uma dimensão do indivíduo, que pode ser pelo crescimento total ou peso, em função da idade. Neste estudo, foi adotada a medição do comprimento, que foi realizada ao final dos 21 dias de teste com a utilização de uma lupa de aumento de 40 vezes e uma lâmina com escala milimetrada. Para a medição do comprimento, foi considerado o comprimento da cabeça até o final da carapaça, compreendendo o espinho apical (Figura 3.5). A medida de eventuais machos presentes nos testes não foram contabilizados para geração das médias de crescimento devido ao dimorfismo sexual.

Figura 3.5 - Medida do comprimento total de *D. magna* realizada após 21 dias de teste.



Fonte: adaptado de Brentano & Lobo (2003).

A fecundidade foi avaliada através da contagem dos filhotes gerados por réplica no período de duração do teste (21 dias). Para a avaliação da fecundidade foi calculado a média de filhotes por réplica considerando o número de posturas da cada réplica (Equação 14):

$$\text{Média de filhotes por réplica} = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ total de filhotes}}{\text{n}^{\circ} \text{ de posturas}} \quad (14)$$

Caso houvesse morte do indivíduo adulto em um período anterior ao 18º dia de teste, os filhotes produzidos por esta são excluídos do somatório. Entretanto, se o organismo adulto morrer entre o 18º e 21º dias de teste, os filhotes postulados por esta entram no somatório total de filhotes em virtude de que a reprodução, após o 18º dia de teste, é bastante flutuante e a ausência de filhotes neste período não ocasionará interferência nos dados levantados (ISO 10706, 2000). No caso de existir um macho entre os organismos-teste adultos que estão sendo testados, deve-se usá-lo como dado para avaliação da longevidade, mas não poderá entrar nos dados de crescimento e fecundidade (BRENTANO, 2006).

Para o cálculo da média de filhotes por diluição, foi aplicada a seguinte equação (15):

$$\text{Média de filhotes por diluição} = \frac{\text{Σ média de filhotes por réplica}}{\text{nº de réplicas}} \quad (15)$$

3.4.3.2 Determinação dos resultados do teste de toxicidade crônica

Os dados obtidos para os parâmetros da longevidade, fecundidade e crescimento obtidos nas diferentes diluições foram comparados com os resultados obtido no grupo controle. Os resultados foram analisados estatisticamente de acordo com a recomendação da EPA 821-R-02-013 (EPA, 2002), empregando o teste de Dunnett, quando o número de réplicas entre os grupos experimentais (controle e diluições) foi similar, e o teste Dunnett com ajuste de Bonferroni, quando o número de réplicas não foi o mesmo para todos os tratamentos. Estes testes foram executados utilizando o software Dunnett Program versão 1.5 (EPA, 2008). Os tratamentos foram comparados com o grupo controle a fim de verificar as concentrações que apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$).

A menor concentração em que esta diferença excede este valor é considerada como CEO. Determinada a CEO é possível determinar a CENO como sendo a maior concentração testada da amostra que não causa efeito deletério estatisticamente significativo aos organismos, ou seja, a concentração inferior a CEO (ABNT, 2010; FUZINATTO, 2009).

3.4.4 Avaliação Microscópica

Para avaliação de possíveis alterações ultraestruturais causadas pela internalização da NP Cr₂O₃, foi necessário fazer a fixação e corte ultrafinos dos organismos expostos à NP Cr₂O₃. Optou-se em realizar a avaliação microscópica para amostras de *D. magna* expostas às concentrações subletais de 25 e 50 mg L⁻¹ NP Cr₂O₃ para exposição por 48 horas e *D. magna* expostas às concentrações subcrônicas de 0,5; 1,0 e 2,0 mg L⁻¹ para exposição por 21 dias. Assim, procedeu-se com a recuperação dos organismos expostos às soluções-teste e do controle para preparo das amostras e avaliação microscópica.

3.4.4.1 Microscopia de luz (ML) e Histoquímica

Os organismos dos tratamentos e do controle foram processados para análises citoquímica e morfológica. As daphnias foram fixadas em solução de paraformaldeído 2,5 % em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2,

durante 6 a 8 h, à temperatura de 4° C (SCHMIDT et al., 2009). Após a fixação, o material foi lavado em tampão fosfato, duas vezes, por 10 minutos em cada troca, seguido da desidratação em uma série de soluções aquosas de etanol em concentrações crescentes, com duas trocas de 15 minutos em cada concentração à temperatura ambiente. A pré-infiltração dos organismos foi realizada com uma mistura de 1:1 de etanol a 100% e historesina glicolmetacrilato (GMA), durante 4 h, posteriormente o material foi infiltrado em resina pura por 24 h. As amostras foram seccionadas em micrótomo manual de parafina modelo Leica RM 2135, com navalhas de tungstênio. As secções com espessura de 5 µm foram distendidas em lâminas de vidro sobre gotas de água destilada e secas em chapa de aquecimento a 40°C.

Os materiais seccionados foram submetidos ao teste histoquímico com azul de toluidina (AT-O) para a caracterização estrutural. Este corante foi utilizado para identificar polissacarídeos ácidos através da reação de metacromasia. As lâminas contendo as secções foram tratadas com solução aquosa de AT-O 0,5%, acidificada com HCl 1N para pH 3,0, por 30 segundos a 2 minutos, lavadas em água destilada e secas ao ar (GORDON & McCANDLESS, 1973; O'BRIEN & MCCULLY, 1981). Para cada grupo experimental foram feitas duas repetições; três cortes de cada repetição foram então examinados e fotografados com o microscópio Epifluorescent (Olympus BX 41), equipado com o sistema de captura Image Q Capture Pro 5.1 Software (Qimaging Corporation, Austin, TX, Estados Unidos da América) no Laboratório de Multiusuário de Estudos em Biologia (LAMEB).

3.4.4.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Para as análises com MEV e EDX foram utilizadas somente organismos *D. magna* do tratamento controle e expostas à 0,5 mg NP Cr₂O₃L⁻¹.

Por observação ao MEV, as amostras de cerca de 5 mm de comprimento foram fixados durante a noite com 2,5% de glutaraldeído em tampão de cacodilato de sódio 0,1M (pH 7,2) acrescido de 0,2 M de sacarose. Em sequência, o material foi desidratado em séries crescentes de etanol e seco sobre o ponto crítico EM-DPC-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha). As amostras foram depositadas sobre suportes metálicos (*stubs*) e em seguida revestido com ouro-paládio antes da análise, segundo Schmidt et al. (2012). Para cada grupo experimental foram feitas duas repetições e as amostras foram examinadas e fotografadas no MEV JSM 6390 LV (JEOL Ltd., Tóquio, Japão, em 10 kV). A presença

de cromo nas paredes das brânquias dos organismos foi verificada usando MEV (NORAN System 7, Thermo Scientific Instruments) acoplada a um espectrômetro de energia dispersiva de raios-X (SEM-EDX), sem a pós-fixação das amostras em tetróxido de ósmio.

3.4.4.3 Microscopia eletrônica de Transmissão (MET)

O procedimento de fixação para observações no MET foi idêntico aos utilizados para MEV. Em seguida, as amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1% durante 4 horas, desidratadas em série de soluções aquosas de concentrações crescentes de acetona (SCHMIDT et al., 2012). Após etapa de desidratação, as amostras foram embebidas em resina Spurr (SPURR, 1969). As secções ultrafinas foram contrastadas com acetato de uranila aquoso 5% seguido por citrato de chumbo. Duas réplicas foram feitas para cada grupo experimental; duas amostras (grids) foram analisadas e fotografadas usando o microscópio MET JEM 1011 (JEOL Ltd., Tóquio, Japão, a 80 kV), localizado no LCME (UFSC, Brasil).

3.5 ENSAIOS DE TOXICIDADE COM *A. fischeri*

Os testes de toxicidade realizados neste estudo estão baseados na norma americana ISO 11348- parte 3 que se refere a testes de toxicidade utilizando bactérias liofilizadas (ISO, 2007) e na norma brasileira NBR 15.411 – parte 3, que de maneira similar a ISO 11348 trata de testes de toxicidade utilizando bactérias liofilizadas. Além das normas americanas existe também a norma alemã DIN 38412-37 (DIN, 1999). Para a realização de testes de toxicidade aguda com *A. fischeri* foi utilizado bactérias do lote 10L1004, denominado reagente bacteriano, provenientes da SDI® (Newark, DE, USA).

O teste de toxicidade foi realizado no equipamento Microtox, o qual mantém as diluições do teste em temperatura controlada de $15^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e o reagente bacteriano em 3°C . A medição da intensidade luminosa emitida pelas bactérias foi realizada em três momentos: no tempo zero (antes da bactéria entrar em contato com a amostra), 15 e 30 minutos após o contato da bactéria com a amostra.

Os procedimentos executados para a realização do teste foram controlados pelo software Microtox Omni 4.0.

Para a realização do teste utilizando *A. fischeri* foram tomados alguns cuidados relacionados à amostra a ser testada. Inicialmente, foi verificado o pH, oxigênio dissolvido e salinidade da amostra. Se a

amostra apresentava pH entre 6 e 8,5 o teste pôde ser realizado sem a necessidade de ajustes de pH.

Para a validação do teste foi realizado previamente um teste de sensibilidade do lote de bactérias utilizado. A substância de referência utilizada foi o sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) $100mgL^{-1}$. A $CE_{50,15min}$ para o sulfato de zinco deve ser um valor entre 3–10 mgL^{-1} .

As amostras de NP Cr_2O_3 foram suspensa no meio diluente específico do teste (NaCl 2%) com concentração inicial de $1000 mgL^{-1}$. Em seguida a amostra foi centrifugada por 5 minutos em 3000 rpm para garantir a não interferência da cor nos ensaios com *A. fischeri*. O pH foi verificado estando na faixa apropriada para o teste (ABNT, 2006). Foram realizadas oito diluições com fator de divisão 1:1,25, iniciando com a concentração de $62,5 mgL^{-1}$, que corresponde ao fator de diluição (FD) 16; 83,3; 125; 166,7; 250; 333,3; 500 e $800 mgL^{-1}$, correspondente ao FD 1.

Para efeitos de comparação, optou-se em realizar um teste com amostra de MP Cr_2O_3 em paralelo, sob as mesmas condições de ensaio realizado para a NP.

Os resultados do teste foram determinados através da CE_{50} , que corresponde à concentração efetiva que causa a inibição de 50% da luminescência em 15 e 30 minutos de exposição. Os cálculos da CE_{50} foram realizados pelo software do equipamento Microtox Omni v. 4.0 software (AZUR Environmental — Carlsbad, CA, USA).

3.6 CITOTOXICIDADE: ENSAIOS *IN VITRO*

3.6.1 Cultura Celular

Para os testes *in vitro* com células foi empregada a linhagem celular Vero, oriunda de rim de macaco verde africano. Todos os procedimentos foram realizados em condições de esterilidade numa câmara de fluxo laminar classe II, tipo A1, com lâmpada UV (VECO, São Paulo, BRA).

A pré-cultura foi iniciada com células Vero provenientes do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil) e cultivadas no meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro de feto bovino (SBF), 2% de L-glutamina (200 mM), 1% de penicilina (50U/mL) e estreptomicina (50 $\mu g/mL$) e mantidas a $37^\circ C$ e atmosfera com 5% de CO_2 (MATIAS & CREPPY, 1998b; MANGER et al, 2003; MELEGARI, 2010). Todos os reagentes foram provenientes da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA).

Durante período antecedente aos experimentos, o meio de cultura celular foi trocado a cada 48 horas para evitar densidade elevada de células garantindo a qualidade da cultura.

3.6.2 Ensaio MTT: Determinação da CE_{50}

Os teste de MTT foram realizados com base em Humpage et al. (2007) e Perreault et al. (2011) com modificações. A viabilidade celular das células Vero foi avaliada através da atividade mitocondrial pelo ensaio com [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT, Sigma-Aldrich, EUA).

Uma suspensão com concentração inicial de 1×10^5 células mL^{-1} foram incubadas em microplacas de 96 poços por 24 horas com o meio de cultura suplementado nas mesmas condições do cultivo ($37^\circ C$ e 5% de CO_2). Após esse período, o meio completo foi retirado e elas foram expostas por um período de 24 horas a $37^\circ C$ e 5% de CO_2 às concentrações de NP Cr_2O_3 entre 0,001 e $10,0 g L^{-1}$. A NP foi suspensa em meio de cultura RPMI conforme item 3.1 desta tese. Após o preparo da suspensão, esta permaneceu em repouso por um período de 10 minutos sob incidência de luz UV (luz germicida), e então alíquotas da solução inicial foram transferidas para os poços da placa de teste para realização das diluições. As concentrações foram avaliadas em seis réplicas. No grupo de controle negativo foi utilizado apenas meio RPMI e para o grupo de controle positivo utilizou-se solução de $K_2Cr_2O_7$ 1mM.

Após, o tempo de exposição, foi retirado cuidadosamente o meio por inversão da placa e adicionado 200 μL de solução MTT/RPMI 0,5 mg mL^{-1} preparada imediatamente antes do uso. A placa foi recoberta com papel alumínio para proteger da incidência de luz e incubada por 2 horas nas mesmas condições do cultivo. Posteriormente, a solução foi removida cuidadosamente com auxílio de micropipetas e adicionou-se 200 μL de solvente orgânico dimetil- sulfóxido - DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Procedeu-se a agitação do DMSO nos poços por 2 minutos, para total diluição dos cristais de formazan. Em seguida foi realizada a leitura da absorção em uma leitora automática de microplacas (marca Biotek EL800, USA) no comprimento de onda de 570 nm. Os valores de absorbância foram normalizados e expressos em percentual de viabilidade celular através da equação 16.

$$\%VC = 100 \frac{(DO_{amostra} - DO_{min})}{(DO_{máx} - DO_{min})} \quad (16)$$

Onde: %VC = viabilidade celular;
DO_{max} = absorbância do controle negativo;
DO_{min} = absorbância do controle positivo;
DO_{amostra} = absorbância da amostra.

A concentração efetiva que causa inibição no crescimento a 50% da população (CE₅₀) foi determinada através da regressão linear múltipla (polinomial) da curva % VC vs. log da concentração.

Para efeitos de comparação, optou-se em realizar um teste com amostra da MP Cr₂O₃ em paralelo, sob as mesmas condições de ensaio realizado para a NP.

3.6.3 Lipoperoxidação: Extração e Quantificação do MDA

As células foram incubadas com meio de cultura suplementado em microplacas de seis poços por 24h nas mesmas condições do cultivo (37°C e 5% de CO₂). Após esse período, o meio foi removido e as células foram expostas ao meio RPMI contaminado com NP Cr₂O₃. As concentrações utilizadas na exposição foram 0,01 e 0,1 g L⁻¹. Um grupo de controle negativo, utilizando apenas o meio de cultura, e um grupo de controle positivo, utilizando a solução K₂Cr₂O₇ 1mM foram empregados. A avaliação foi realizada em triplicatas de cada caso. Após incubação de 24h, as células foram recuperadas no meio para a dosagem do MDA conforme Matias & Creppy (1998-b) e Melegari et al. (2012). A suspensão celular foi centrifugada durante 5 minutos a 800g e 4°C para retirada das células mortas. O meio sobrenadante foi eliminado, e as células foram ressuspensas em 250µL de tampão SET (NaCl 0,1M; EDTA 20mM; Tris-HCl 50mM, pH 8) e agitadas vigorosamente. Separou-se uma alíquota de 25µL da suspensão celular de todas as amostras e réplicas para posterior dosagem de proteínas (APÊNDICE C). Paralelamente foram preparadas soluções padrão com 1,1,3,3 - Tetra-methoxypropano (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) na faixa de concentração de 3,75nM a 600nM para construção da curva de calibração (APÊNDICE D).

O procedimento de quantificação do MDA, consistiu em transferir 25µL das suspensões celulares para tubos do tipo eppendorf de 1,5mL e adicionar 25µL de SDS 7%, 300µL de HCl 0,1N, 40µL de ácido fosfotungstúico 1% e 300µL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,67% (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Os tubos foram agitados em vortex por cerca de 30s, após mantidos no escuro, a 90°C, durante 1

hora, e depois resfriados com banho de gelo durante 10 minutos ao abrigo de luz. O complexo TBA-MDA formado foi extraído adicionando 600 μ L de n-butanol. Após centrifugação por 10 minutos a 5.000g em temperatura controlada a 4°C, a fase butanólica contendo o complexo TBA-MDA foi retirada e o malondialdeído foi quantificado por HPLC-fluorescência. Foi empregada uma coluna Hexis C18, SB - Fenil de 5 μ m de porosidade (250 x 4,6mm) com injeção automática de 40 μ L. A fase móvel isocrática utilizada foi uma mistura metanol:água 4:6 (v/v), pH 8,3 ajustado com KOH 0,5M, a um fluxo de 0,5mL min⁻¹. O detector de fluorescência empregado foi o FLD cell-1260 (Agilent, Califórnia, EUA) com comprimento de onda de excitação de 515nm e comprimento de onda de emissão de 553nm.

Foi necessário deduzir a concentração de proteína para normalização dos dados de MDA. Para a dosagem de proteínas foi utilizado o Método de Bradford (BRADFORD, 1976). Uma alíquota de 25 μ L das amostras foram adicionado 975 μ L do reativo Biorad® (Bio-Rad, Califórnia, EUA) diluído em água ultra-pura 1:4 (v/v). Esta solução foi homogeneizada e a absorbância medida a 595 nm em um espectrofotômetro de absorção molecular (UV-Vis, modelo Spectro 3000W, Marte Científica, São Paulo). A curva de calibração foi construída com solução-padrão de albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE CROMO (VI)

A determinação de Cr(VI) biodisponível foi baseado na NBR 13738 (ABNT, 1996) com algumas modificações. Para a análise, as amostras de NP Cr₂O₃ foram suspensa nos diluentes água ultrapura, meio ISO, meio M4, meio NaCl 2% e meio RPMI.

A quantificação de Cr(VI) foi realizada empregando a técnica de espectrofotometria de absorção molecular na região do UV-visível pelo método da 1,5-difenilcarbazida como reagente cromogênico. Esse método é baseado na reação do Cr(VI) presente na solução com o reagente 1,5-difenilcarbazida em meio ácido (pH = 1), formando a difenilcarbazona, produzindo uma solução violeta (VOGEL, 1992).

A solução de 1,5-difenilcarbazida (DFC) foi preparada pesando 0,5 g desse reagente e dissolvendo em 100 mL de acetona. O pH da solução foi ajustado para ≤ 4 com H₂SO₄. A solução foi armazenada em frasco âmbar a 4°C por até uma semana.

Uma alíquota de 5 mL da amostra foi separada e adicionado H₂SO₄ até pH ≤ 2 . Em seguida, foram adicionados 100 μ L de DFC e

deixado em repouso por 5 minutos para ocorrer a reação. A absorbância da solução colorida resultante foi medida. Como branco, foi usado apenas os meios diluentes e todos os reagentes empregados no procedimento de colorimetria. A absorbância do branco analítico foi subtraída do sinal de absorbância da respectiva amostra. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Para efeitos de comparação, foi realizada a análise da amostra de MP Cr₂O₃ nos meios de diluição ISO, M4, NaCl 2% e RPMI nas mesmas concentrações que a NP.

A curva de calibração foi construída usando solução padrão de dicromato de potássio 500 mg L⁻¹ dissolvido em água ultrapura. Foram utilizados oito pontos com concentrações de 0,01 a 2,5 mg L⁻¹.

O espectrofotômetro de absorção molecular (UV-Vis, modelo Spectro 3000 W, Marte Científica, São Paulo) foi utilizado para as determinações de Cr(VI), após reação desse íon com solução de DFC. O comprimento de onda empregado nas determinações de Cr(VI) foi de 540 nm.

CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DA NP Cr₂O₃

4.1.1 Potencial Zeta e Diâmetro Hidrodinâmico

A Tabela 4.1 apresenta os resultados da variação do diâmetro hidrodinâmico (D_H) e do potencial Zeta (P_z) da NP Cr₂O₃ suspensa em diferentes meios diluentes. Cada valor de dado é uma média de três medidas \pm desvio padrão.

Tabela 4. 1 - Valores do D_H e P_z para as NP Cr₂O₃ (concentração 100 mg L⁻¹) suspensas em diferentes meios diluentes.

Diluyente	pH	D_H (nm)	P_z (mV)
H ₂ O ultrapura*	6,89 \pm 0,00	107,51 \pm 2,02	-70,22 \pm 2,85
Meio HSM*	6,40 \pm 0,00	200,71 \pm 24,43	-42,64 \pm 5,20
H ₂ O ultrapura**	5,83 \pm 0,05	185,7	-17,17 \pm 0,38
Meio ISO**	5,53 \pm 0,12	1139,33 \pm 57,57	-4,93 \pm 0,36
Meio M4**	5,66 \pm 0,03	1461,67 \pm 56,59	-10,87 \pm 0,23
Meio NaCl 2%**	5,70 \pm 0,02	1354,33 \pm 34,39	-5,77 \pm 1,97
Meio RPMI**	7,47 \pm 0,05	1782 \pm 47,66	-30,93 \pm 9,40

*NP Cr₂O₃ lote código 1000884883

**NP Cr₂O₃ lote código 1001025977

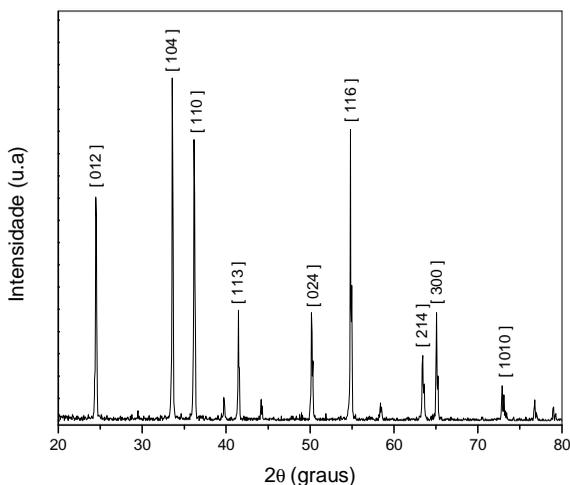
Pode-se observar um incremento significativo ($p < 0,05$) no valor médio de D_H quando se compara a NP Cr₂O₃ lote 1000884883 suspensa em água ultrapura (107,51 \pm 2,02) e meio HSM (200,71 \pm 24,43). Em relação ao P_z , houve uma redução, significativa ($p < 0,05$) no valor médio observado no meio HSM (-42,64 \pm 5,20) quando comparado à suspensão em água ultrapura (-70,22 \pm 2,85). Este resultado pode estar associado à presença de sais dissolvidos no meio HSM, que podem alterar a carga superficial das partículas possibilitando a formação de aglomerados e com isso diminuindo a estabilidade da NP na suspensão. Elevados valores absolutos (>30,0) indicam estabilidade da amostra em suspensão. Assim, essas duas suspensões foram consideradas estáveis.

Para a NP Cr₂O₃ lote 1001025977, podemos observar variabilidade nos valores de D_H e P_z com a alteração do meio de suspensão. A NP Cr₂O₃ suspensa nos meios diluentes ISO, M4, NaCl 2% e RPMI demonstrou uma forte aglomeração, visualizada pela aumento de tamanho (D_H) em relação à mesma NP suspensa em H₂O

ultrapura. Foi verificado uma redução significativa ($p < 0,05$) nos valores de Pz para os meios ISO e NaCl 2% quando comparado a suspensão em água ultrapura, caracterizando um aumento na instabilidade dessas suspensões. Já para a suspensão de NP em meio RPMI (cultura celular), foi observado um aumento significativo ($p < 0,05$) no valor de Pz ($-30,93 \pm 9,40$) em relação à suspensão em água ultrapura, mostrando uma tendência para a estabilidade da NP neste meio. O Potencial Zeta é influenciado pelo pH (BERG et al., 2009), concentração e tipo de íons presentes (força iônica) e a concentração de outras moléculas, como proteínas (DOORLEY & PAYNE, 2011) no dispersante. A interação do RPMI com as NP Cr_2O_3 devido à força iônica do meio biológico, provocada pela sua composição (sais orgânicos, inorgânicos, proteínas, etc.) e pH causaram alteração na carga superficial das NP, principalmente através da adsorção de proteínas, por exemplo. Estes resultados sugerem que as proteínas do meio podem ser um bom dispersante para NP Cr_2O_3 , aumentando a estabilização de NP na suspensão, efeito também foi relatado por Pan et al. (2014) e Wells et al. (2012).

4.1.2 Difração de Raios X (DRX)

Na Figura 4.1, é apresentado o difratograma da NP Cr_2O_3 (lote código 1001025977) correspondente à análise de DRX. Através deste, é possível verificar a regularidade e homogeneidade da estrutura cristalina, indicando a pureza da amostra. Os padrões observados no difratograma estão de acordo com os valores para Cr_2O_3 do banco de dados ICSD coll code 75577, e revela uma única estrutura cristalina presente composta por fase romboédrica (R-3c).

Figura 4. 1 - Difratoograma da amostra de NP Cr₂O₃ (lote cod. 1001025977).

A base dos picos sugerem cristallitos de pequeno tamanho. Através dos picos foi estimado o tamanho médio do cristallito da NP Cr₂O₃ calculado através da relação de Debye-Scherrer. O valor encontrado do diâmetro do cristallito foi de 66,8nm. Este valor está próximo ao diâmetro das partículas indicado pelo fabricante (< 100 nm), pelo qual se pode assumir que uma NP Cr₂O₃ é formada por um ou dois cristallitos.

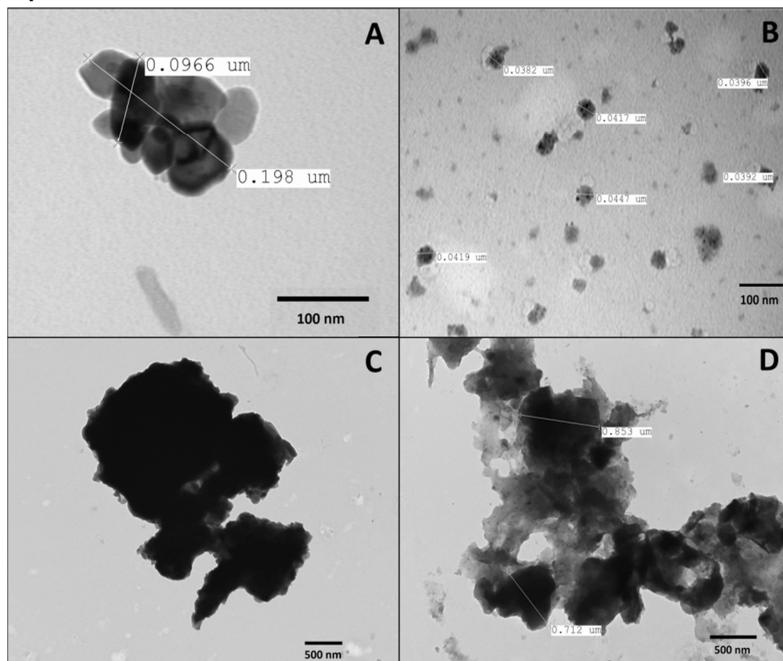
Medeiros (2007), ao sintetizar NP Cr₂O₃ pelo processo Sol-gel, encontrou uma variação de tamanho de cristallitos de acordo com o tempo e temperatura de calcinação. A autora identificou, à temperatura de 500 °C, a 30 minutos, cristallitos com tamanhos médio de 51 nm. Quando a sintetização ocorre a mesma temperatura, porém com tempo de calcinação de 1h, obteve-se tamanho médio dos cristallitos menor, de 41 nm. Gunnewiek et al. (2014) sintetizaram NP Cr₂O₃ por decomposição térmica e obtiveram cristallitos com diâmetro médio de 57 nm. Sabyasachi et al. (2011) obtiveram tamanho médio de cristallito para NP Cr₂O₃ de 60 nm.

Em estudos realizados por Toniolo (2009) as nanopartículas de cromo, sintetizadas pelo processo de combustão em solução (SCS), apresentaram cristallitos com tamanho médio de 18 nm.

4.1.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A seguir, serão mostrados os resultados da MET para a amostra de NP Cr₂O₃ suspensas em meio algal HSM.

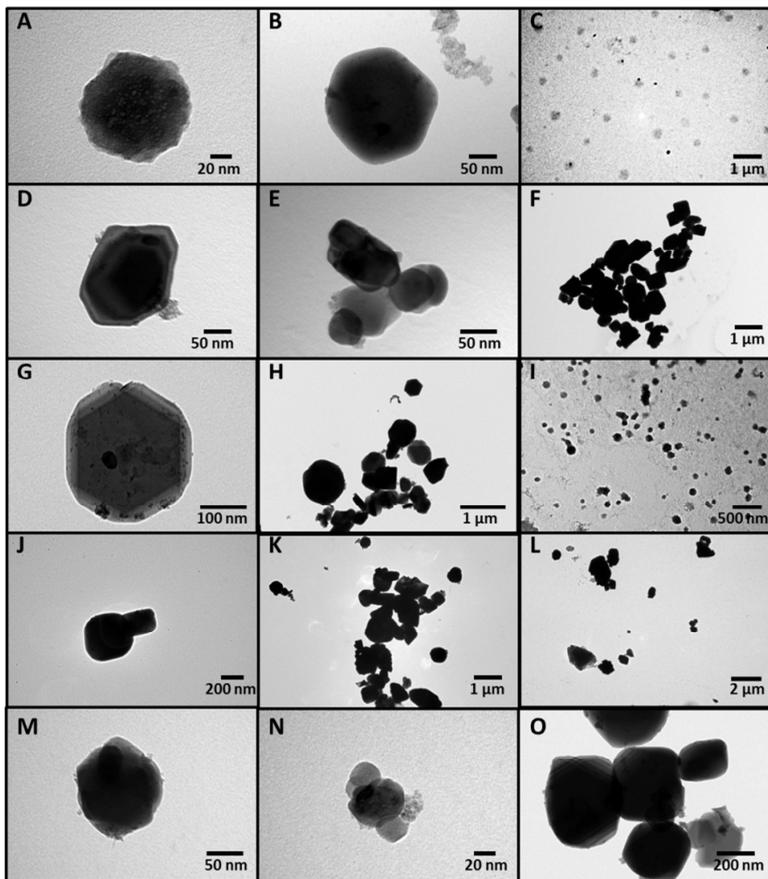
Figura 4.2 - Imagem de micrografia em MET da NP Cr₂O₃ (lote cod. 1000884883) (A) e (B): NP suspensas em água ultrapura; (C) e (D): NP suspensas em meio HSM.



As NP da micrografia Figura 4.2-A e B apresentaram tamanhos variando de tamanho de 30 a 96,6 nm e aglomerado com dimensão de 198 nm. Melegari et al. (2013) também observaram a formação de pequenos aglomerados (217,7 nm) para NP CuO suspensa em meio HSM. Porém, no presente estudo foi possível observar também a formação de grandes aglomerados como mostra a imagem da Figura 4.2-D.

A imagem a seguir (Figura 4.3) corresponde à micrografia da nanopartícula correspondente ao lote 1001025977.

Figura 4.3 - Imagem de micrografia em MET da NP Cr₂O₃ (lote cod. 1001025977) suspensa em diferentes meios diluentes. (A) - (C): NP Cr₂O₃ em H₂O ultrapura; (D) - (F): NP Cr₂O₃ em meio ISO; (G) - (I): NP Cr₂O₃ em meio M4; (J) - (L) NP Cr₂O₃ em meio NaCl 2%; (M) - (O) NP Cr₂O₃ em meio RPMI.



As partículas suspensas em água ultrapura apresentaram diâmetros na ordem de 100 nm (Figura 4.3-A) e 175 nm (Figura 4.3-B). Gunnewiek et al. (2014) analisaram a morfologia e tamanho de NP Cr₂O₃ sintetizada pelos autores por MET de alta resolução. Os autores encontraram partículas com tamanho entre 9 a 36 nm (média 16 nm).

A suspensão de NP Cr₂O₃ em meio diluente ISO apresentou tamanho de partículas com aproximadamente 164 nm. Observou-se também a formação de aglomerados de NP (Figura 4.3-E e Figura 4.3-F). Também foram notadas partículas com tamanho superior a 100 nm

(Figura 4.3-G) e formação de aglomerados (Figura 4.3-H e I) na suspensão em meio M4. Rossetto (2012) identificou a formação de aglomerados quando NP CuO foram suspensas em meio diluente ISO, um dos meios utilizados no presente estudo.

Em meio NaCl 2% foram observadas NP com tamanho de 467 nm e forte presença de grandes aglomerados. As NP suspensas em meio RPMI demonstraram grandes diâmetros, cerca de 400 nm (Figura 4.3-O), mas foi possível observar pequenas partículas, como mostrado na Figura 4.3-N. Assim, verificou-se a interferência da composição do meio RPMI no tamanho das partículas e formação de aglomerados. Perreault et al. (2012a) também observaram a influências do meio RPMI na distribuição de tamanho da NP CuO. Os autores identificaram a formação de agregados (complexos NP-proteínas) e aglomerados de NP que influenciaram no aumento das partículas em suspensão, apresentando valores médios de 356 ± 70 nm. Estes resultados estão de acordo com os valores encontrados de D_H e P_z mensurado para cada uma das suspensões.

Vale ressaltar que de acordo com os dados do fabricante (Sigma Aldrich), a NP utilizada neste estudo foi caracterizada com tamanho < 100 nm. Contudo, a presença de aglomerados nas suspensões pode estar associada com a carga superficial formada nas NP em suspensão e também com a cristalização dos íons de sais do meio com a NP. Essa cristalização ocorre devido ao procedimento de preparação das amostras para análise em MET, onde a suspensão de NP em meio é depositada sobre a grelha (*grid*) de carbono e deixado evaporar a água (MELEGARI et al., 2013).

4.1.4 Área Superficial Específica

A área superficial específica encontrada para a NP Cr_2O_3 (lote 1001025977) foi de $11,44 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ (laudo no Apêndice A). Esse valor está abaixo do encontrado por Horie et al. (2011) que estimou a área superficial específica pelo método BET para a NP Cr_2O_3 encontrando valor de $43,41 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$. Contudo os autores analisaram partículas com tamanho médio de 60 nm, o que justifica a diferença do valor encontrado no presente estudo, pois a redução no tamanho implica em um aumento na área superficial específica. Gunnewiek et al. (2014) sintetizaram NP Cr_2O_3 pelo método de decomposição térmica, e obtiveram NP com área superficial específica por BET de $21,14 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, para partículas com tamanho médio de 16 nm.

Segundo Brito et al. (2005), o Cr_2O_3 em tamanho microparticulado (diâmetro médio de $3,14 \mu\text{m}$) apresenta área superficial específica com valor de $2,31 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$, medida pela técnica BET. Assim, comparando os valores da área específica da NP Cr_2O_3 ($11,44 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), encontrada neste trabalho, e da MP Cr_2O_3 , retirada da literatura, verifica-se um aumento de quase 500% nos valores da NP sobre a MP. Esse incremento de área específica relacionado com a redução do tamanho implica em um aumento da interação da NP e meio, sendo importante fator para a determinação da toxicidade das NP (HOECKE et al., 2008).

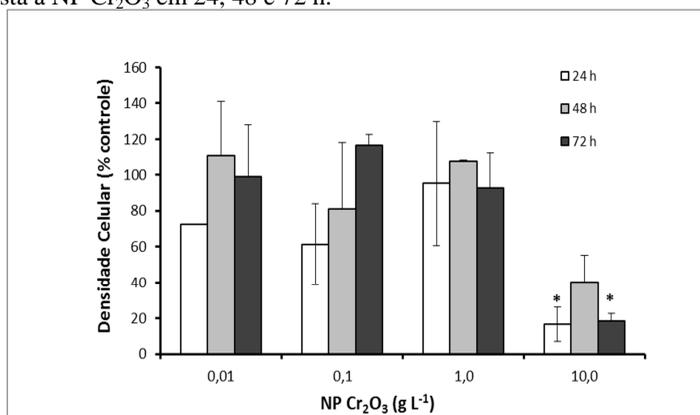
4.2 BIOENSAIO COM ALGA VERDE *C. reinhardtii*

Os resultados referentes aos ensaios realizados com as algas *C. reinhardtii* correspondem ao realizado durante o período de estágio doutoral na Universidade de Quebec a Montreal (UQAM). Nesses ensaios foram utilizadas as NP Cr_2O_3 do lote código 1000884883.

4.2.1 Avaliação da densidade celular

Pelo gráfico apresentado na Figura 4.4, pode-se observar um decréscimo na concentração de algas a partir da exposição a $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de NP Cr_2O_3 após 72 h de exposição.

Figura 4.4 - Avaliação populacional da densidade celular de algas *C. reinhardtii* exposta à NP Cr_2O_3 em 24, 48 e 72 h.



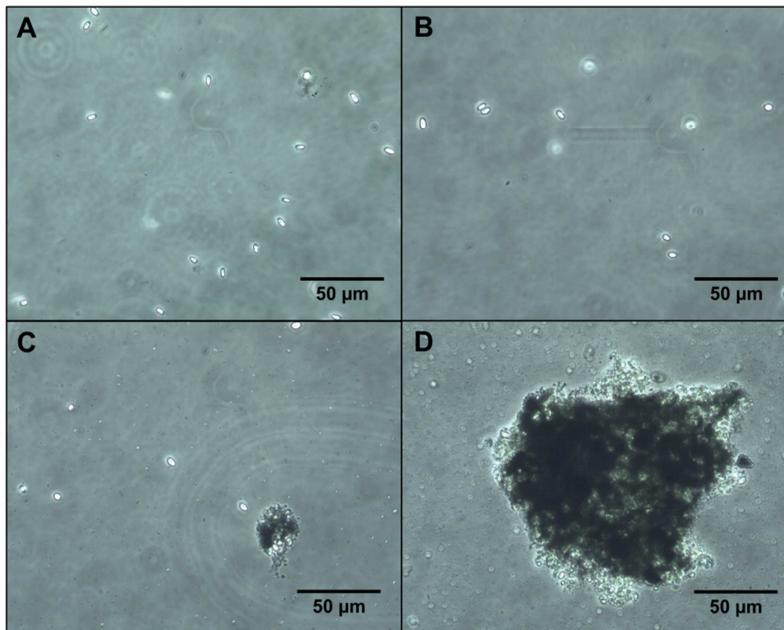
* a média para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $p < 0,05$.

Na maior concentração (10 g L^{-1}) fica evidente a mortalidade da população de *C. reinhardtii* em relação ao controle ($p < 0,05$). O valor encontrado para a CE_{50} foi de $1,57 \pm 0,53$ e $6,16 \pm 0,27 \text{ g L}^{-1}$ para 24 e 72 horas, respectivamente. Os valores da densidade populacional mostram que em 24 horas o efeito inibidor da NP Cr_2O sobre a taxa de crescimento das microalgas é mais evidente que em tempos mais longos de exposição (72 h), onde a população algal demonstra recuperar sua tendência normal de exposição, com estimulação de crescimento nas menores concentrações de exposição ($0,01$ e $0,1 \text{ g L}^{-1}$) e queda da população algal na maior concentração de exposição (10 g L^{-1}). Entre 24 e 48 h de exposição é verificado um incremento populacional para todas as concentrações testadas. Esse efeito pode ser atribuído a uma resistência ou tolerância ao estresse por Cr através da produção de metabólitos, como por exemplo, os peptídeos fitoquelatinas e aminoácidos histidina que podem complexar o metal (SCHMÜGER, 2001; KERKEB & KRAMER, 2003; ZHENG et al., 2013). Em estudos realizados por Vignati et al. (2010) sobre a toxicidade do cromo em algas, os autores verificaram uma alta toxicidade do Cr(III) para alga verde *P. subcapitata*, com valor médio de $CE_{50,72h}$ de $983 \pm 216 \mu\text{g L}^{-1}$ para $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ em meio ISO modificado. Outro estudo realizado por Pereira et al. (2013) verificaram uma taxa de inibição de 50% da população de microalga *D. chlorelloides* silvestre exposta ao cromo trivalente ($\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) a uma concentração de $1883,65 \mu\text{M}$ (cerca de $0,502 \text{ g L}^{-1}$).

4.2.2 Avaliação Microscópica

As imagens capturadas em microscópio óptico (Figura 4.5) ilustram um efeito de aglomeração das algas quando expostas a NP Cr_2O_3 .

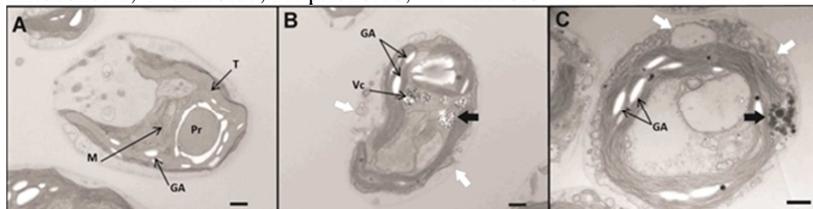
Figura 4.5 - Imagens de microscópio ótico: interação entre NP Cr₂O₃ e *C. reinhardtii* em 24 h de exposição. (A) população controle, (B) população exposta a 0,1 g L⁻¹, (C) população exposta à 1g L⁻¹ e (D) população exposta a 10 g L⁻¹.



Pode-se observar na Figura 4.5-C que as NP Cr₂O₃ começam a formar pequenos aglomerados, que se intensificam com o aumento da concentração da NP no meio. Na Figura 4.5-D tem-se a presença de grandes aglomerados para a maior concentração de NP Cr₂O₃ (10 g L⁻¹), causando assim a fixação das células de *C. reinhardtii* às NP e impedindo sua locomoção. Esse efeito pode prejudicar a locomoção das células de algas influenciando na alimentação desta e podendo resultar até na morte celular. Esse efeito de agregação da cultura de algas é comumente resultante das interações NP-alga, devido à adsorção da NP Cr₂O₃ na superfície das células, como já observados por outros autores para diferentes NP (RODEA-PALOMARES et al., 2011; PLETIKAPIĆ et al., 2012 e PERREAULT et al., 2012b).

As micrografias de MET (Figura 4.6 B e C, seta preta) revelaram que a NP Cr₂O₃ foi internalizada pelas células provocando danos visíveis nas membranas e organelas.

Figura 4.6 - Micrografias de MET das *C. reinhardtii* tratadas com NP Cr₂O₃ após 72 h de exposição. (A) população controle, (B) população exposta a 0,1 g L⁻¹ NP Cr₂O₃ e (C) população exposta à 1g L⁻¹ NP Cr₂O₃. Barra: 500 nm; seta branca: alterações ultraestruturais; seta preta: NP; GA: grão de amido; M: mitocôndria; T: tilacóide; Pr: pirenóide; Vc: vacúolo.

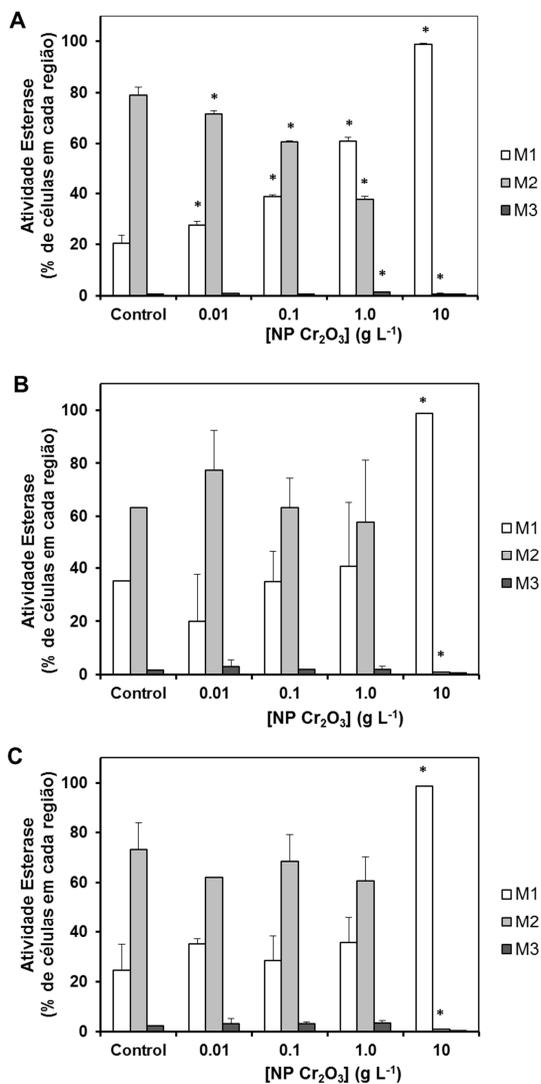


A parede celular das algas funciona como uma barreira seletiva e semipermeável com poros que variam de 5 a 20 nm (HARRIS, 2009). Contudo, a liberação, no meio de cultura, de íons cromo pela NP Cr₂O₃ pode danificar a parede e membrana celular e induzir a formação de novos poros com tamanhos maiores, permitindo a penetração das NP. Após a internalização das NP Cr₂O₃ nas células, esta por sua vez pode liberar mais íons de cromo, incluindo o hexavalente, sendo que em pH biológico o Cr⁶⁺ sofre redução a Cr³⁺, formando intermediários (Cr⁵⁺ e Cr⁴⁺), espécies envolvidas no ciclo oxidativo de Fenton, gerando radicais livres (TSOU, et al., 1996; BAGCHI et al., 2002), amplificando assim os danos celulares, através do mecanismo “Cavalo de Tróia” (LIMBACK et al., 2007; PARK et al., 2010; WANG et al., 2011; MELEGARI et al., 2013). Dificilmente, em condições fisiológicas normais, o cromo (III) gera este tipo de radicais (ATSDR, 2000).

4.2.3 Avaliação da viabilidade celular (FDA)

A Figura 4.7 mostra a alteração na atividade das esterases celulares das *C. reinhardtii* expostas à NP Cr₂O₃.

Figura 4.7 - Mudanças na atividade da esterase das *C. reinhardtii* exposta a NP Cr₂O₃. (A) 24 h, (B) 48 h e (C) 72 h. Região “M2” representa a atividade esterase normal; região “M1” indica um decréscimo na atividade da esterase; região “M3” indica um aumento na atividade da esterase. *p < 0,05 em relação ao controle.



* a média para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um p<0,05

Em todos os tempos de exposição, a concentração 10 g L^{-1} de NP Cr_2O_3 provocou forte redução da atividade normal das enzimas (região M2) com valores muito próximos de zero, e um aumento bastante significativo da proporção de algas com redução na atividade esterase (M1). Isso indica que essa concentração teve efeito sobre o metabolismo de *C. reinhardtii*, pois geralmente as esterases são essenciais para o metabolismo dos fosfolípidos das membranas celulares (LI et al., 2011), o que pode resultar na mortalidade da população.

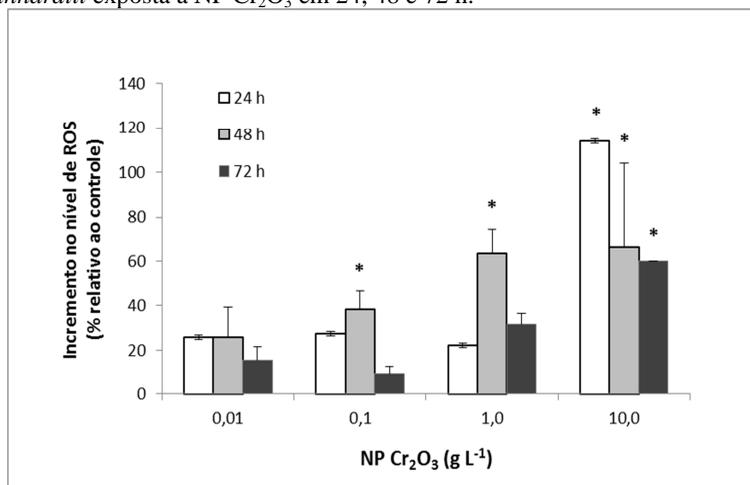
Após 24 h de exposição, foi observado uma redução do estado normal "M2", e um aumento no estado de atividade diminuída "M1" com incrementos na concentração de NP Cr_2O_3 . Esse mesmo efeito foi observado por Franklin et al. (2001) e Melegari et al. (2013). O aumento do percentual da fluorescência na região M1 indica uma diminuição da atividade das enzimas esterases ou a perda da integridade da membrana celular (MELEGARI et al., 2013).

Em 48h (figura 4.7-B), até o tratamento de 1 g L^{-1} de NP Cr_2O_3 foi observada uma recuperação no estado normal "M2", o que pode ser explicado pela possível adaptação da população a exposição à NP. Para os tempos de exposição de 48h e 72h, até a concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$, houve um ligeiro aumento no percentual de algas no estado "M3", indicando possivelmente, numa tentativa de reparar os efeitos tóxicos causados pela exposição à NP. No entanto, esta alteração não apresentou diferença significativa quando comparado ao controle ($p > 0,05$). Essas respostas de adaptação da população de algas à exposição podem ser justificadas pela produção de metabólitos, como por exemplo, os peptídeos quelantes de metal, conforme já mencionado no item 4.2.1 deste capítulo.

4.2.4 Avaliação do estresse oxidativo (ROS)

Pelos dados obtidos de avaliação de ROS na Figura 4.8 pode-se observar que para as menores concentrações ($0,01$ a $1,0 \text{ g L}^{-1}$) de NP a maiores taxas de incremento de ROS ocorre após 48h de exposição. Em 48h de exposição observou-se efeito significativo ($p < 0,05$ em relação ao controle) no incremento de ROS em quase todas as concentrações, exceto para $0,01 \text{ g L}^{-1}$. Na Figura 4.8 foi possível verificar que em 24 horas a população exposta a 10 g L^{-1} teve a maior concentração de ROS, correspondendo a um incremento de 114% quando comparado à população controle.

Figura 4.8 – Avaliação do estresse oxidativo através da produção de ROS de *C. reinhardtii* exposta a NP Cr₂O₃ em 24, 48 e 72 h.



* a média para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $p < 0,05$

Vários estudos mostraram que metais de transição como o cromo (Cr) estão envolvidos na produção de ROS através dos mecanismos como Haber-Weiss ou reações do tipo Fenton (MANKE et al., 2013; VALKO et al., 2006; YIP et al., 2005; KNAAPEN et al., 2004; WILSON et al., 2002; LLOYD et al., 1998). Espécies reativas como radicais hidroxila (OH^\bullet), ânions superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) ou peróxido de hidrogénio (H_2O_2) podem induzir a lipoperoxidação, causando danos principalmente na membrana plasmática e cloroplastos das algas (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; MELEGARI et al., 2013)

Melegari et al. (2013) avaliaram o estresse oxidativo da NP CuO em *C. reinhardtii* e os autores observaram um incremento de $190 \pm 0,45\%$ no nível de ROS para 1000 mg L^{-1} de NP CuO após 72 h de exposição. Ali et al. (2006) observaram um aumento de aproximadamente 60% no nível de ROS (em relação ao controle) em macrófitas da espécie *Lemna gibba* após 96 h de exposição à $200 \mu\text{M}$ Cr.

Para o maior tratamento (10 g L^{-1} NP Cr₂O₃), foi possível observar um decréscimo nos níveis de ROS no tempo de 72 h de exposição à NP em relação à primeira medição (24 h), sendo que no maior tempo o incremento de ROS em relação ao controle foi de $59,91 \pm 0,15\%$. Essa redução pode estar associada à diminuição da população algal após longo tempo de exposição, e também pela

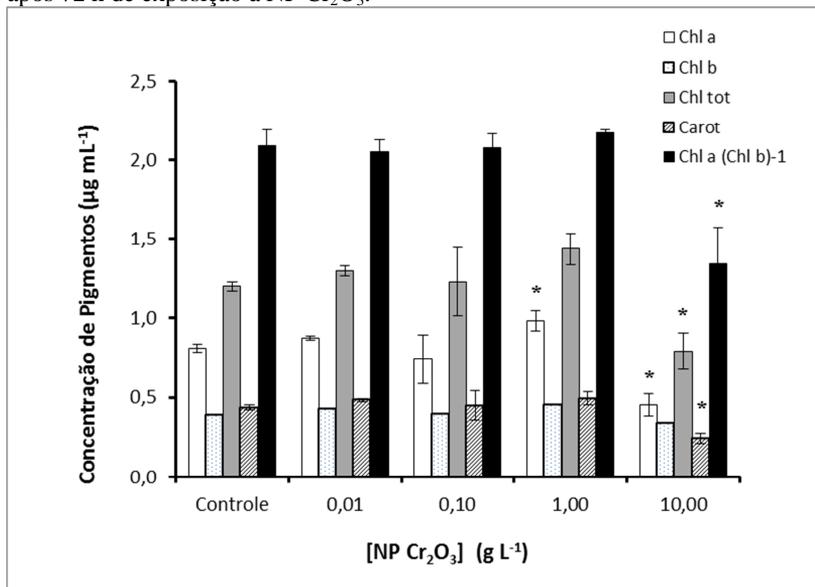
capacidade de adaptação das células ao estresse causado pela presença de NP Cr₂O₃. Outra explicação para o decréscimo dos níveis de ROS é a alteração da atividade da esterase. Foram observados, para todas as populações expostas as concentrações de NP Cr₂O₃, aumentos na região de baixa atividade da esterase (M1), conforme apresentado anteriormente na Figura 4.7. Essa redução na atividade da esterase implica na diminuição metabólica do organismo, o que consequentemente fez com que os níveis de ROS diminuíssem. Regel et al. (2002) concluíram em seu estudo que o estado da atividade da esterase influenciam claramente na resposta metabólica celular.

Quando a geração de ROS ultrapassa a capacidade antioxidante da célula, estes radicais livres podem provocar danos oxidativos as proteínas, lipídios, ácidos nucleicos e pigmentos (LEDFOORD & NIYOGI, 2005; PERREAULT et al., 2014b). Em organismos fotossintetizantes, o estresse oxidativo (produção de ROS) está intimamente associado com a fotoinibição e a diminuição da eficiência fotossintética (NISHIYAMA et al., 2006). Essa hipótese poderá ser confirmada e melhor discutida com a avaliação dos resultados relacionados ao sistema fotossintético das *C. reinhardtii* (subitens 4.2.4 e 4.2.5 a seguir).

4.2.5 Dosagem dos Pigmentos Fotossintéticos

Os resultados da quantificação dos pigmentos clorofila *a* (Chl *a*), clorofila total (Chl total), clorofila *b* (Chl *b*) e carotenoides (Carot) estão apresentados na Figura 4.9.

Figura 4.9 – Níveis de pigmentos fotossintéticos em células de *C. reinhardtii* após 72 h de exposição à NP Cr₂O₃.



* a média para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $p < 0,05$.

Poucas alterações significativas foram observadas para os pigmentos clorofilianos após exposição. O nível de Chl *a* foi alterado significativamente nas concentrações mais elevadas de NP Cr₂O₃ (1,0 e 10,0 g L⁻¹), no entanto os conteúdos de Chl *b* foram pouco influenciados pelos tratamentos com NP Cr₂O₃, já que não foram observadas diferenças significativas em relação ao controle. Os conteúdos de Chl *a*, Chl total e Carot tiveram uma redução significativa na concentração de 10 g L⁻¹ de NP Cr₂O₃, indicando danos nos cloroplastos, bem como nos desempenhos metabólicos. A Chl *a* pode ter sido reduzida pela redução dos conteúdos de Ferro (Fe) nos tecidos, na queda da eficiência das enzimas responsáveis pela síntese de clorofila e/ou pela substituição do átomo de Magnésio (Mg) no centro das moléculas de clorofila, de todas as formas (DHIR et al., 2009), prejudicando a produção desse pigmento.

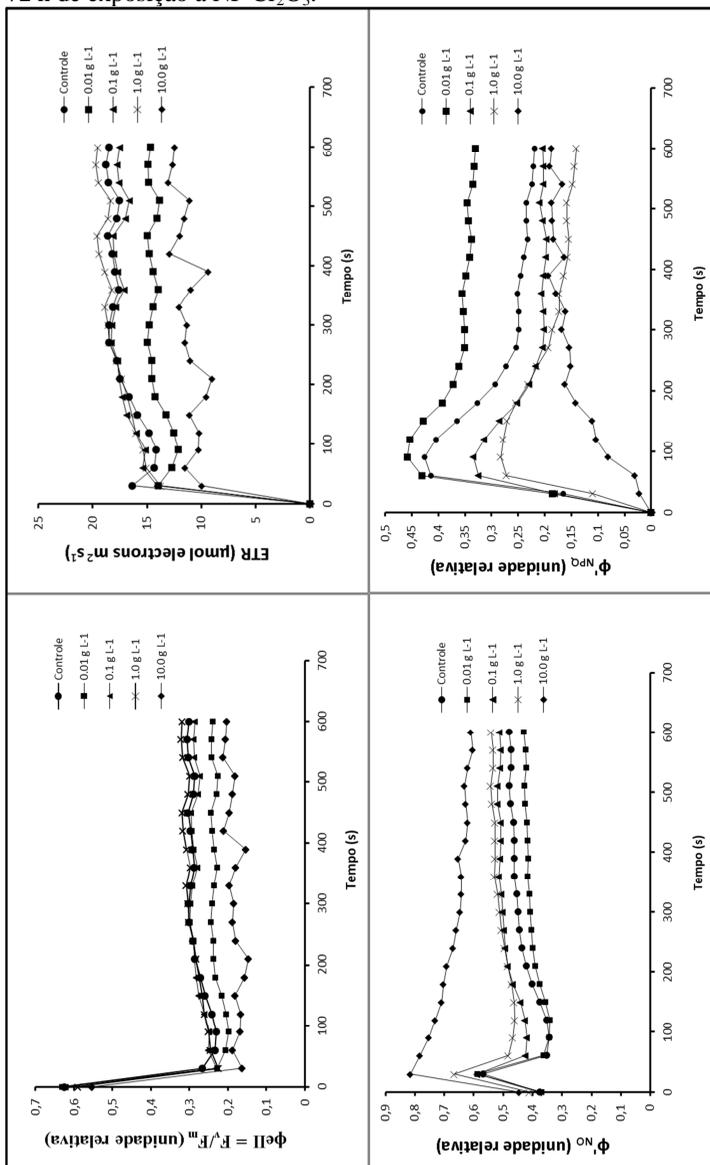
Já para a concentração de 1,0 g L⁻¹ foi possível observar um aumento no conteúdo de Chl *a*, mostrando uma indução na produção desse pigmento pela membrana dos cloroplastos. Foi observado um aumento, porém sem diferença estatística do controle, nos níveis de Carot, esse aumento pode ser devido aos mecanismos de proteção do

sistema fotossintético, pois os carotenoides são considerados pigmentos de fotoproteção (KOORNNEEF, 1986; SCHMIDT, 2011). Lalau et al. (2014) também observaram aumentos no conteúdo de carotenóides da espécie de macrófita *L. punctata*, com o incremento na concentração de NP CuO nos tratamentos até 1 g L^{-1} e um decréscimo no tratamento com 10 g L^{-1} de NP CuO. Como consequência da alteração da Chl *a*, a razão Chl *a* / Chl *b* foi alterada significativamente apenas no tratamento com concentração de $10,0 \text{ g L}^{-1}$ de NP Cr₂O₃, apresentando valor de $1,39 \pm 0,24$, estando abaixo de valores relatados na literatura. Essa relação de ambas as clorofilas ocorre na proporção de aproximadamente 3 para 1 em condições normais de ambiente (LICHTENTHALER et al, 1981).

4.2.6 Avaliação da atividade fotossintética

Os resultados da avaliação do FSII da alga *C. reinhardtii* através da cinética da fluorescência Chl *a* ($\phi_e\Pi$, ϕ'_{NO} , ϕ'_{NPQ} e ETR) são apresentados na Figura 4.10.

Figura 4.10 - Alterações na cinética da fluorescência Chl *a* de *C. reinhardtii* após 72 h de exposição a NP Cr₂O₃.



É possível observar uma redução de $31,83 \pm 11,69\%$ no ϕ_cII das algas expostas à concentração mais elevada de NP Cr_2O_3 ($10,0 \text{ g L}^{-1}$) em relação ao controle. Essa redução indica uma fotoinibição sobre o aparato fotossintético, acarretada possivelmente pela formação de ROS. Ao mesmo tempo, como observado na Figura 4.9, a redução dos pigmentos fotossintéticos provoca decréscimos na eficiência do FSII. Elfadl & Luukkanen (2006) observaram que a presença de poluentes como metais pesados em altas concentrações, podem levar a redução do rendimento quântico da fotossíntese e, por sua vez, reduzir a assimilação de CO_2 , afetando o metabolismo da planta. Nas menores concentrações não foi observado efeitos sobre o rendimento do sistema que diferiram estatisticamente ($p > 0,05$) do controle. Contudo, no tratamento de $1,0 \text{ g L}^{-1}$ de NP Cr_2O_3 um resultado contrário, com incremento, não estatisticamente significativo, do ϕ_cII em relação ao controle, foi observado. Assim, este efeito pode indicar que concentrações menores de NP Cr_2O_3 podem incrementar o rendimento do FSII e metabolismo das algas, através da produção de clorofila, conforme mostrado na Figura 4.9. Paiva et al. (2009) observaram que folhas de *Eichhornia crassipes* tratadas com 1 e 10 nM Cr^{3+} , respectivamente $0,22$ e $2,22 \text{ gL}^{-1}$ de Cr_2O_3 , mostraram um aumento, porém não significativo, no rendimento quântico efetivo (F_v/F_0).

No diagrama de ϕ'_{NO} (Figura 4.10) pode-se observar um aumento da dissipação de energia não-fotoquímica por vias não reguladas em todas as concentrações testadas, exceto em $0,01 \text{ g L}^{-1}$. Para a população tratada com 10 g L^{-1} de NP Cr_2O_3 foi verificado um aumento de $20,99 \pm 10,02\%$ dos valores de ϕ'_{NO} em relação ao controle. Esse aumento implica na dissipação de energia não-fotoquímica na forma de fluorescência, e conseqüentemente na redução da atenuação fotoquímica da fluorescência clorofiliana (*quenching* fotoquímico) traduzindo os danos nos centros de reação do FSII. Esse efeito é justificado pela redução significativa nos valores de carotenoides (concentração de 10 g L^{-1}), pigmentos que auxiliam na dissipação de energia relacionada à fotoproteção, conforme anteriormente apresentado no item 4.2.5. Na concentração de $0,01 \text{ g L}^{-1}$ de NP Cr_2O_3 foi possível observar uma pequena redução do ϕ'_{NO} em relação ao controle. Isso pode ser devido ao mecanismo de adaptação do organismo. Rodriguez et al. (2007) mostraram que *C. reinhardtii* tratadas com 1 a 5 mM de Cr, através da produção de antioxidantes, se aclimataram ao estresse oxidativo induzido pelo metal, atenuando ou diminuindo os danos nos aparatos fotossintéticos. Quando as algas são expostas a 10 nM de Cr, os níveis de ROS excedem a capacidade antioxidante da célula danificando

os compostos celulares. Neste estudo, foi observado um comportamento diferente do ϕ'_{NO} para a concentração de 10 g L^{-1} de NP Cr_2O_3 dos demais tratamentos (Figura 4.10). Esta maior concentração de exposição mostrou um decréscimo contínuo do rendimento de dissipação de energia não regulada ao longo do período de análise da cinética da fluorescência (600s) indicando uma tentativa de reparo do sistema.

Como se pode observar na Figura 4.10, o diagrama de ETR mostra uma perda de $31,82 \pm 11,69\%$ na eficiência do transporte de elétrons, para a concentração de 10 g L^{-1} em relação ao controle. Essa inibição na ETR do FSII por fatores exógenos pode resultar na formação de radicais livres e consequentemente o estresse oxidativo (CERVANTES et al., 2001; ALI et al., 2006; RODRÍGUEZ et al., 2007). Isto sugere que as alterações no sistema fotoquímico são devido à geração de ROS, afetando os processos de redução do sistema. Contudo a taxa de elétrons apresenta uma tendência ao aumento ao longo do período de análise do FSII. Essa tendência pode estar ligada aos sistemas de recuperação das algas quando o sistema é ativado. Foi possível observar um pequeno incremento ($9,49 \pm 5,88 \%$) da ETR no tratamento com 1 g L^{-1} de NP Cr_2O_3 , justificado também pelo aumento nos conteúdos de Chl *a*, mencionado no item 4.2.5 desta tese. O transporte fotossintético de elétrons das algas *C. reinhardtii* foi considerado um biomarcador confiável para a avaliação toxicológica das NP Cr_2O_3 , mas a sensibilidade desta metodologia ainda precisa ser investigada para seu uso em avaliação de contaminantes no meio ambiente, visto que o grau de contaminação pelos NM ainda é difícil de avaliar, devido à dificuldade de quantificar este tipo de poluente em condições naturais.

O ϕ'_{NPQ} indica a fração da energia dissipada por vias não-fotoquímica reguladas, como por exemplo, na forma de calor. Neste estudo foi observada a redução nesse parâmetro dos tratamentos em relação ao controle (exceto para $0,01 \text{ g L}^{-1}$ NP Cr_2O_3). Venancio (2009) observou que plantas da espécie *E. crassipes* quando tratadas com Cr^{3+} (1mM) tiveram uma diminuição em 40% do qN em relação as plantas controle. Ao analisar somente a curva da concentração de 10 g L^{-1} NP Cr_2O_3 , é possível observar uma tendência ao aumento dos valores de ϕ'_{NPQ} até 400s de tempo da análise da cinética de fluorescência. Esse comportamento pode indicar que a energia que chega às antenas do sistema não é transmitida pelos quinonas aos centros de reação do FSII, indicando possíveis danos nos cloroplastos pela formação de ROS. O rendimento quântico de energia regulada (ϕ'_{NPQ}) representa a energia dissipada na forma de calor, que é regulada como mecanismos de

fotoproteção. Portanto, valores elevados indicam grande capacidade de auto-proteção das algas. Isso foi observado na concentração de $0,01 \text{ gL}^{-1}$ que apresentou um aumento de 50,93% em relação à população controle.

4.3 ENSAIOS DE TOXICIDADE COM *D. magna*

4.3.1 Toxicidade Aguda

O teste de toxicidade aguda corresponde a uma dose única de poluente que pode ultrapassar a capacidade do organismo a reparar os danos causados por aquele, levando a mortalidade. Assim, as concentrações de CE_{50} traduzem os potenciais riscos ambientais às populações utilizadas na avaliação (MATIAS, 2010).

Os resultados dos testes agudo indicaram toxicidade das amostras, apresentando um valor de $CE_{50,48h}$ de $101,74 \pm 9,13 \text{ mg L}^{-1}$ para NP Cr_2O_3 . A concentração que resultou em 100% de mortalidade dos organismos após 48 de exposição foi de 250 mg L^{-1} . Tavares et al. (2014) $CE_{50,48h}$ de $6,74 \text{ mg L}^{-1}$ NP Cr_2O_3 para a espécie *Daphnia similis*. Essa maior toxicidade encontrada pelos autores é justificada pelo reduzido tamanho (15 a 30 nm) das NP utilizadas no estudo e diferente sensibilidade do organismo-teste. Ainda, os testes de toxicidade aguda realizados neste presente trabalho mostraram que os efeitos da NP Cr_2O_3 sobre a mobilidade de 50% da população exposta ocorreu entre 24 e 48 horas de exposição. E em 48 h de exposição à NP os efeitos agudos cessaram a partir da concentração de $50 \pm 3,54 \text{ mg L}^{-1}$ de NP Cr_2O_3 , representando assim a concentração subletal.

Para comparação, no presente estudo foi avaliada a toxicidade aguda da forma MP Cr_2O_3 sobre *D. magna*. A $CE_{50,48h}$ encontrada foi de $528,51 \pm 23,84 \text{ mg L}^{-1}$ para MP Cr_2O_3 . Assim, verificou-se que a NP Cr_2O_3 foi cerca de cinco vezes mais tóxica que sua mesma formulação em tamanho maior. Este resultado nos leva a acreditar que a toxicidade do Cr_2O_3 pode estar associada ao tamanho da partícula. A redução no tamanho da partícula facilitará sua ingestão pelos organismos expostos e possivelmente sua internalização celular, potencializando o efeito “Cavalo de Tróia” e causando maior toxicidade.

Ainda, a maior toxicidade da NP em relação à MP, pode estar relacionada com a maior liberação de íons cromo pela NP Cr_2O_3 devido a sua maior reatividade em solução. De acordo com Silva & Pedrozo (2001) a toxicidade do cromo pode variar conforme seu estado de oxidação. Os compostos de Cr na forma hexavalente são mais nocivos

que os trivalentes. Contudo, o cromo III pode ser convertido em cromo VI devido às alterações no pH ou na presença de outros íons indutores como, por exemplo, o manganês (Mn). A avaliação da espécie de Cr, que esta presente nos meios de exposição, será apresentada no item 4.6 desta discussão.

4.3.2 Toxicidade Crônica

A partir dos resultados obtidos dos ensaios de toxicidade aguda, as diluições estabelecidas para este ensaio foram concentrações de 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 mg L⁻¹ de NP Cr₂O₃, além do controle negativo, isento de contaminante.

A sensibilidade dos lotes de organismos utilizados no ensaio foi de 0,91 mg L⁻¹ K₂Cr₂O₇, estando o valor dentro da faixa recomenda (de 0,6 a 1,7 mg L⁻¹ K₂Cr₂O₇).

Durante o teste de toxicidade crônica foram analisados os parâmetros de longevidade, crescimento e reprodução. A Tabela 4.2 apresenta os resultados obtidos no ensaio crônico.

Tabela 4.2 - Resultados do teste crônico, para os parâmetros crescimento, reprodução e longevidade, de *D. magna* expostas à NP Cr₂O₃. Resultados expressos em média (n=10) ± desvio padrão.

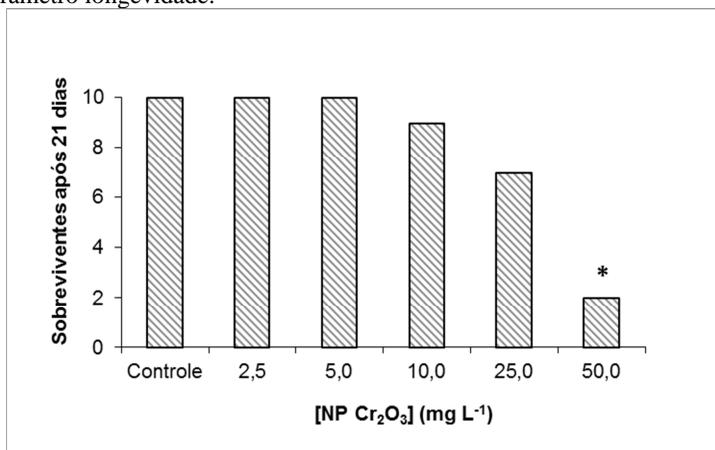
Concentração (mg L ⁻¹)	Crescimento: Comprimento (mm)	Reprodução: n° neonatos/prole	Longevidade: sobrevivência (%)
Controle	4,78±0,28	15,02±2,95	100
2,5	4,30±0,67	15,73±2,52	100
5,0	4,33±0,49	13,58±2,82	100
10,0	3,71±0,53*	11,72±4,44*	90
25,0	3,71±0,39*	8,91±3,55*	70
50,0	2,35±0,49*	0,0*	20*
CEO	10,0	10,0	50,0
CENO	5,0	5,0	25,0

* Média significativamente menor que a média do controle considerando um p=0,05 em um teste t com ajuste de Bonferroni.

CEO – Concentração de Efeito Observado.

CENO - Concentração de Efeito Não Observado.

Figura 4.11- Resultado do teste crônico com *D. magna* exposta a NP Cr₂O₃ para o parâmetro longevidade.



* a média para esta concentração é significativamente menor que a média do controle considerando um $p=0,05$ em um teste t com ajuste de Bonferroni.

Como apresentado na Figura 4.11, a amostra de NP Cr₂O₃ causou efeito crônico sobre a longevidade apenas para a maior concentração, sendo assim determinada a CEO como a concentração de 50 mg L⁻¹ e a CENO de 25 mg L⁻¹. O teste crônico é realizado com concentrações subletais da amostra, pois o principal objetivo é a sobrevivência da população para a verificação de efeitos sobre as funções biológicas dos organismos. Contudo a concentração de 50 mg L⁻¹ de NP Cr₂O₃ ocasionou a mortalidade de 80% da população inicialmente exposta. Essa alta taxa de mortalidade pode estar associada a sérios danos no metabolismo das *D. magna* provocados pela longa exposição à NP durante o teste, assumindo que esta concentração ainda apresentou efeitos subagudos.

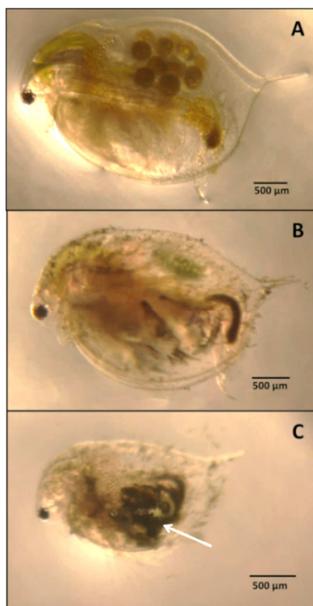
Ao analisar o parâmetro de crescimento da *D. magna*, após 21 dias de exposição a NP Cr₂O₃, foi observado uma redução na média do comprimento dos organismos em três concentrações da amostra. Nas concentrações de 10, 25 e 50 mg L⁻¹ de NP Cr₂O₃ houve redução significativa ($p<0,05$) no comprimento dos organismos desses tratamento em relação aos organismos do controle. Esse efeito no crescimento pode estar associado à redução na ingestão do alimento bem como na absorção dos nutrientes causada pelos danos nas células epiteliais do intestino desses indivíduos. Esses danos a nível celular (melhor evidenciado na Figura 4.17) podem ser induzidos pelo estresse

oxidativo provocado pela interação das NP Cr_2O_3 com o epitélio intestinal. Com os resultados da exposição crônica, foi possível determinar uma CEO de 10 mg L^{-1} e uma CENO igual a 5 mg L^{-1} para o parâmetro crescimento.

A reprodução de *D. magna* foi observada levando em consideração o número total de filhotes gerados em relação ao número de prole (ninhada) por cada réplica ao final de 21 dias. De forma equivalente aos resultados obtidos para o parâmetro crescimento, a reprodução apresentou efeitos tóxicos crônicos em três concentrações. Verificou-se que nos tratamentos com as maiores concentrações de NP Cr_2O_3 houve uma redução significativa no número de neonatos produzidos por fêmeas. Portanto, foi possível determinar a CEO que correspondeu à concentração de 10 mg L^{-1} e a CENO igual a 5 mg L^{-1} .

Ao final do teste crônico, os organismos expostos as concentrações mais elevadas de NP Cr_2O_3 (25 e 50 mg L^{-1}) foram observados em lupa, com aumento de 40 vezes, para verificar se ocorreu alguma alteração morfológica.

Figura 4.12 - Imagens dos indivíduos *D. magna* do teste crônico. (A) organismos do controle negativo com desenvolvimento normal, (C) organismos expostos a 25 mg L^{-1} de NP Cr_2O_3 e (D) organismos expostos à 50 mg L^{-1} de NP Cr_2O_3 .



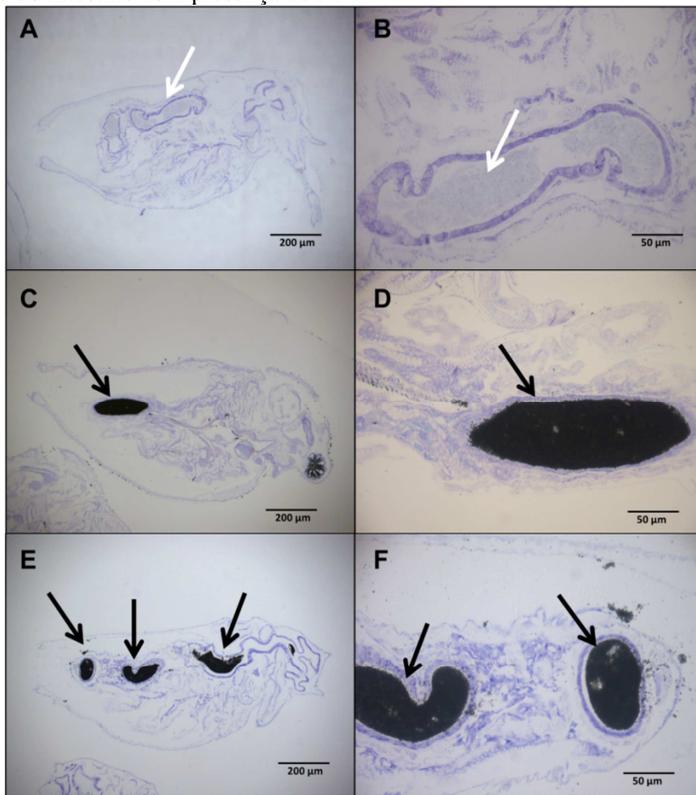
Apesar de não serem encontrados organismos com a morfologia alterada, observou-se a impregnação de NP na carapaça e nadadeiras dos organismos, conforme ilustra as Figuras 4.12 (B) e (C) em comparação ao controle (A). Também se observou possível acúmulo de aglomerados de NP na região do abdômen (seta branca).

4.3.3 Avaliação Microscópica

4.3.3.1 Microscopia de luz (ML) e Histoquímica

As fotografias da Figura 4.13 referem-se aos cortes transversais dos organismos de *D. magna* ao final do teste agudo (48 horas de exposição), analisados por ML após coloração com AT-O.

Figura 4.13 - Imagens das seções transversais dos indivíduos *D. magna* após período de 48h. (A) e (B) organismos do controle negativo, (C) e (D) organismos expostos a 25 mg L^{-1} de NP Cr_2O_3 , (E) e (F) organismos expostos a 50 mg L^{-1} de NP Cr_2O_3 . Seta branca: região do intestino controle. Seta preta: região do intestino com presença de NP.

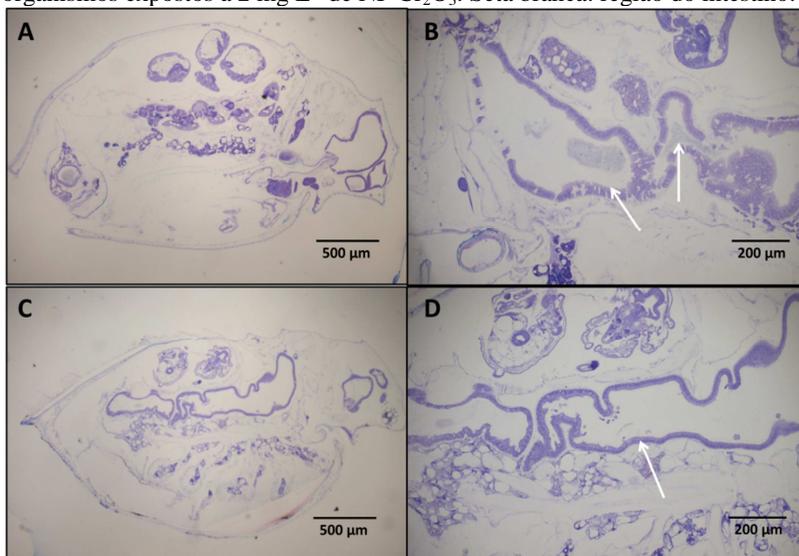


Pela Figura 4.13, evidencia-se que as NP possuem facilidade para penetrar no organismo através da filtração do meio e por isso aparecem em grande quantidade no interior do intestino. As imagens da Figura 4.13(A) e (B) mostram o organismo controle onde se observa a presença de matéria orgânica, principalmente algas, no interior do intestino. Nas fotos da Figura 4.13(C) – (F) é mostrado a predominância das NP acumuladas no interior do intestino da *D. magna*. Este acúmulo de NP no interior do órgão dos organismos pode dificultar a absorção do alimento algal, seja através do acúmulo propriamente dito das NP no intestino, reduzindo a entrada de alimento, como também pelos possíveis danos estruturais provocados pela interação da NP Cr_2O_3 com

o epitélio intestinal. Rossetto (2012) também demonstrou a presença de NP CuO no interior do intestino de *D magna* após 48h de exposição.

Na Figura 4.14, são apresentadas as fotografias de ML após coloração com AT-O dos cortes transversais da *D. magna* após 21 dias de exposição continuada. Nas fotos apresentadas na Figura 4.14(C) e (D) não foi possível verificar a presença de aglomerados ou grandes quantidades de NP no intestino dos organismos expostos a 2 mg L^{-1} de NP Cr_2O_3 . Isso era esperado, pois além da limitada resolução do microscópio óptico empregado para detecção de nanoestruturas (aumento máx. de 40x), a concentração analisada em ML foi bem abaixo da CEO (10 mg L^{-1} NP Cr_2O_3 para parâmetros de reprodução e crescimento) identificada neste estudo. Contudo, não foi possível afirmar a ausência absoluta da NP no interior do organismo.

Figura 4. 14 - Imagens das secções transversais dos indivíduos *D. magna* após período de 21 dias. (A) e (B) organismos do controle negativo, (C) e (D) organismos expostos a 2 mg L^{-1} de NP Cr_2O_3 . Seta branca: região do intestino.

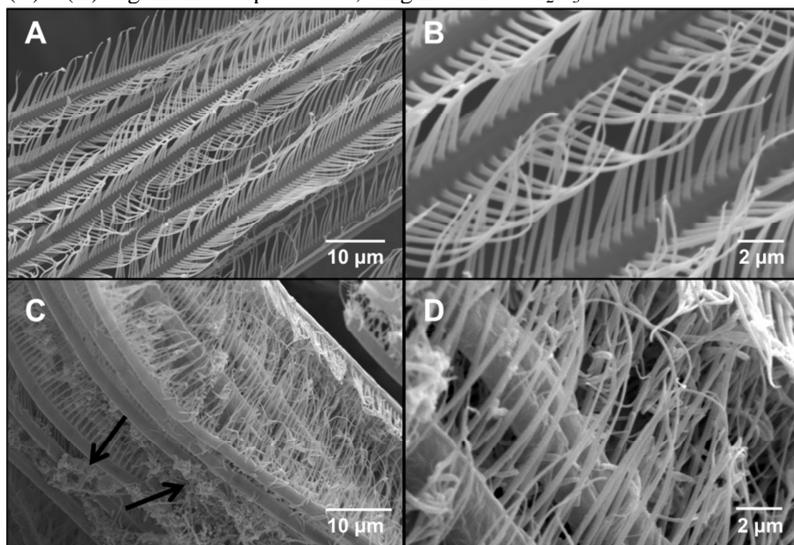


4.3.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

Nesta técnica não foi possível avaliar a região intestinal dos organismos devido aos limites das técnicas de análise. Contudo, a região das brânquias foi facilmente identificada na MEV e, portanto optou-se em analisá-la. Através das imagens de MEV, observou-se uma alteração

no ordenamento dos filamentos da brânquia dos organismos *D. magna* expostos à NP quando comparados com os do controle negativo. Na Figura 4.15 (C) é possível observar uma desorganização significativa nos cílios dos filamentos branquiais, incluindo alterações como fusão desses (seta preta).

Figura 4. 15 - Imagens de MEV. Micrografias das brânquias de *D. magna* após 21 dias de exposição à NP Cr_2O_3 . (A) e (B) organismos do controle negativo, (C) e (D) organismos expostos a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de NP Cr_2O_3 .



Essa alteração pode ser resultante da absorção dos íons de cromo liberados com a dissolução da NP no meio de teste. A NP Cr_2O_3 , devido a sua maior reatividade, pode estar dissociando íons de cromo trivalente e hexavalente em solução. Ainda que o Cr(VI) possa ser originado pela oxidação do Cr^{3+} nos meios quando em presença de concentrações suficientes de Mn, esse processo é lento e pode ser considerado insignificante em água naturais (SALEH, 1989; ATSDR, 2000). As alterações nos filamentos branquiais podem resultar em uma possível diminuição na superfície de absorção de água e trocas de íons (SOUZA et al., 2000), comprometendo a função respiratória dos organismos expostos à NP.

Microanálise de raios-X (EDS)

Os resultados obtidos pela análise MEV-EDS foram qualitativas, apresentado a composição relativa dos elementos nas amostras através do espectro na área de interesse (APÊNDICE B). Os valores são apresentados em percentual do peso. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4. 3 - Microanálise de raios-X da região das brânquias após 21 dias de exposição à NP Cr₂O₃ dos organismos *D. magna*. C: carbono; O: oxigênio; Ca: Cálcio; P: Fósforo; Pd: Paládio; Au: Ouro; Na: Sódio; Mg: Magnésio; Al: Alumínio; Si: Silício; S: Enxofre; N: nitrogênio; Cr: cromo.

Elementos	Controle	0,5 g L ⁻¹ NP Cr ₂ O ₃
C	29,89	49,28
O	17,36	8,04
Ca	11,79	9,01
P	4,05	5,32
Pd	8,93	9,38
Au	ND	7,41
Na	0,40	0,40
Mg	0,20	ND
Al	0,28	ND
Si	0,90	1,74
S	0,03	ND
N	26,15	8,52
Cr	ND	0,89
TOTAL	100%	100%

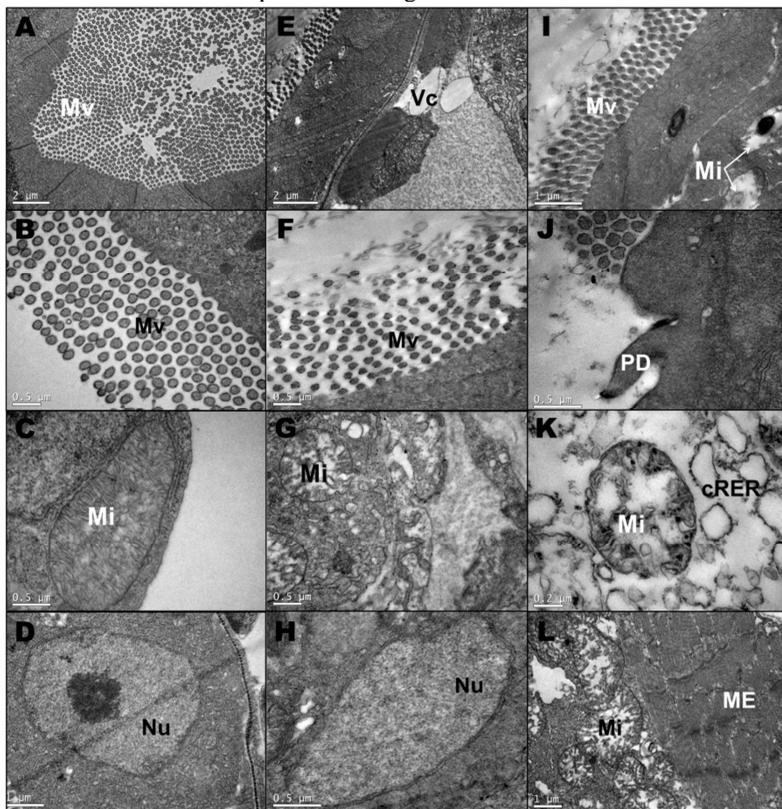
ND: Não Detectado.

Na avaliação da região das brânquias dos organismos *D. magna* expostas a NP Cr₂O₃ através do EDX foi possível detectar a presença de cromo no organismo exposto a amostra, indicando a absorção de cromo pelo organismo. É importante salientar que mesmo em concentrações de exposição subcrônicas, a NP Cr₂O₃ alterou os valores de cromo na região analisada. Isso responde aos danos encontrados nos cílios laterais das brânquias. Os valores identificados dos elementos Au e Pd são devido ao recobrimento da amostra necessário para análise. O percentual de Al identificado pode ser devido ao suporte onde a amostra é depositada.

4.3.3.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão - MET

As micrografias de MET apresentadas a seguir correspondem aos cortes transversais do epitélio intestinal dos organismos *D. magna*. As fotografias da Figura 4.16 referem-se aos cortes ultrafinos dos organismos de *D. magna* ao final do teste agudo (48 horas de exposição). Optou-se em analisar os organismos expostos apenas as concentrações subletais de NP Cr₂O₃ (25,0 e 50,0 mg L⁻¹).

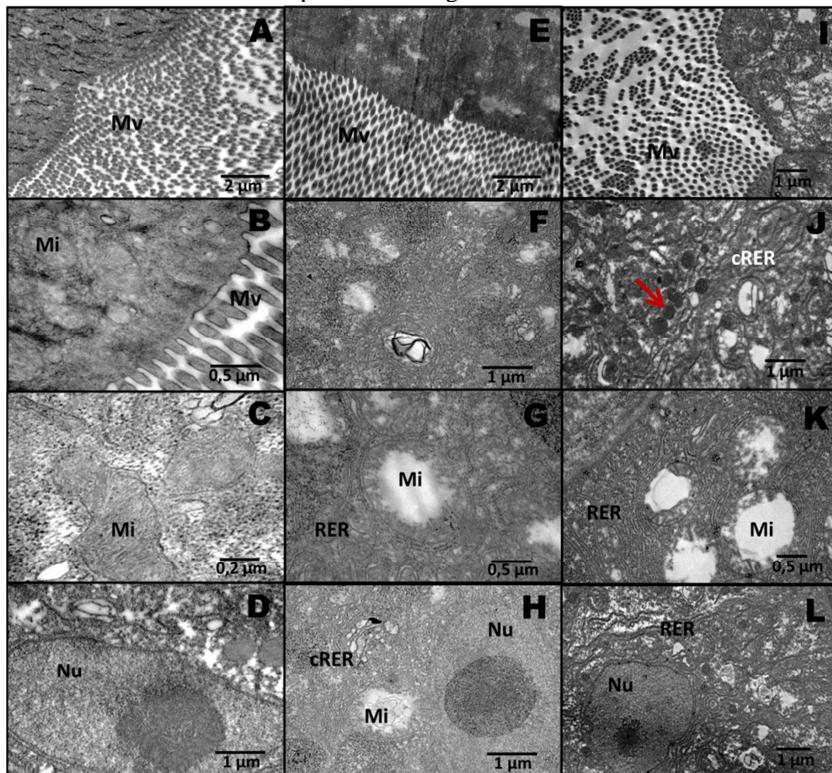
Figura 4.16 - Eletromicrografia de transmissão dos cortes ultrafinos de *D. magna* após 48h de exposição à NP Cr₂O₃. (A) - (D) organismos do controle negativo, (E) - (H) organismos expostos a 25 mg L⁻¹ de NP Cr₂O₃; (I) - (L) organismos expostos a 50 mg L⁻¹ de NP Cr₂O₃. Legenda: Mv = Microvilosidades; Mi = Mitocôndria; Vc = Vacúolo; PD = Projeção Digitiforme; Nu = Núcleo; RER = Retículo Endoplasmático Rugoso; cRER = cisternas do Retículo Endoplasmático Rugoso.



Através das fotografias da Figura 4.16-(E), (F), (I) e (J) é possível observar redução e perda das especializações superficiais da membrana celular microvilosidades (Mv) das células do epitélio intestinal dos organismos expostos às concentrações de NP Cr₂O₃. A principal função das Mv é aumentar a superfície de contato da membrana plasmática e tem relação direta com a capacidade de absorção de substâncias (alimento). Também, os microvilos das células intestinais participam da digestão de nutrientes, pois as enzimas dissacaridases e dipeptidases estão presentes somente nos microvilos das células do intestino (AVERS, 1991). Portanto, essa alteração nas Mv, implica em uma redução na taxa de absorção dos nutrientes, gerando estresse ao organismo. Nas imagens da Figura 4.16(G), (K) e (L) observa-se uma grande dilatação (tumefação) das mitocôndrias e redução do número e no tamanho das cristas (crístólise). Os danos mitocondriais podem causar diminuição da fosforilação oxidativa e da síntese de ATP, bem como levar a morte celular. Rossetto et al. (2014) também relataram danos nas mitocôndrias do epitélio intestinal dos organismo *D. magna* provocados pela exposição à NP CuO por 48 h (dados não mostrados na publicação). Na imagem da Figura 4.16(K) mostra a abundância das cisternas do retículo endoplasmático rugoso, conferindo um aspecto vacuolizado ao citoplasma. Esses danos ultraestruturais, observados nos organismos expostos às concentrações subletais de NP Cr₂O₃, pode estar relacionado com a toxicidade do íon cromo, liberado pelas NP. Sabe-se que animais e vegetais absorvem preferencialmente o cromo hexavalente, que após internalização celular é reduzido a cromo trivalente (WHO, 1988) causando danos celulares. Esta intoxicação por cromo pode induzir a geração de ROS.

As fotografias da Figura 4.17 referem-se aos cortes ultrafinos dos organismos de *D. magna* ao final do teste crônico (21 dias de exposição). Optou-se em analisar os organismos expostos apenas as concentrações subcrônicas de NP Cr₂O₃ (0,5 e 1,0 mg L⁻¹).

Figura 4.17 - Eletromicrografias dos cortes ultrafinos de *D. magna* após 21 dias de exposição à NP Cr₂O₃. (A) - (D) organismos do controle negativo, (E) - (H) organismos expostos a 0,5 mg L⁻¹ de NP Cr₂O₃; (I) - (L) organismos expostos a 1,0 mg L⁻¹ de NP Cr₂O₃. Legenda: Mv = Microvilosidades; Mi = Mitocôndria; Li = Lisossomos; Nu = Núcleo; RER = Retículo Endoplasmático Rugoso; cRER = cisternas do Retículo Endoplasmático Rugoso.



Nos organismos expostos a 1,0 mg L⁻¹ de NP Cr₂O₃ foram observadas pequenas irregularidades nas Mv (Figura 4.17-I). Nas fotos da Figura 4.17(J) é possível observar a desorganização do citoplasma e fica evidente a maior presença de estruturas eletrodensas (seta vermelha), que podem ser inclusões lipídicas. O aumento da presença dessas estruturas está associado a um possível estresse ambiental. Na Figura 4.17(K) é evidenciada uma acentuada dilatação das mitocôndrias e ocorrência de cristólise. As mitocôndrias participam de inúmeros processos bioquímicos e metabólicos como produção de ATP, NADPH e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sendo o

principal sítio de formação/acumulação de ROS intracelular (KOWALTOWSKI, 1999). Na avaliação microscópica foi possível observar que estas organelas foram as mais danificadas na exposição à NP, confirmando o estresse oxidativo provocado pelas concentrações, mesmo que subcrônicas, de NP Cr₂O₃. Foi possível observar também uma dilatação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso (Figura 4.17-H e J), que tem como uma de suas principais funções, a desintoxicação do organismo e delimitação do conteúdo fagocitado na célula, evidenciado na imagem Figura 4.17(J). Esses danos ultraestruturais podem estar sendo causados pela presença de íons de Cr⁶⁺ liberados no meio pela NP Cr₂O₃. Também, pela maior presença de lisossomos verificados no tratamento com NP, pode ter ocorrido a internalização de NP Cr₂O₃ com menores tamanhos, causando uma resposta do organismo para sua degradação.

Portanto, os danos ultraestruturais (tumefação mitocondrial e cristólise, dilatação das cisternas e fragmentação do Retículo Endoplasmático, perda das microvilosidades, desmossomos, formação de autofagossomas, alteração da densidade do núcleo) observados na análise em MET mostram um padrão de alterações morfológicas e bioquímicas celulares associadas a resposta ao estresse oxidativo provocado pelas mudanças ambientais (KERR et al., 1972; KERR, 1995) pelo agente químico (NP Cr₂O₃). Quando esses danos são graves e ultrapassam os limites de adaptação/reparação das células, ocorre uma sequência de eventos chamados de “injúria celular”, levando a morte celular e desencadeando processos inflamatórios (KERR, 1995; DAVIS JÚNIOR et al., 2001; CURTIN et al., 2002).

4.4 ENSAIO DE TOXICIDADE AGUDA COM *A. fischeri*

Os testes de toxicidade aguda com *A. fischeri* apresentaram valor médio de CE_{50,15min} de 769,17±19,69 mg L⁻¹ e CE_{50,30min} de 980,00±134,35 mg L⁻¹ para NP Cr₂O₃ e CE_{50,15min} de 9720,00 mg L⁻¹ e CE_{50,30min} de 3322,00 mg L⁻¹ para MP Cr₂O₃. O pH da amostra, após preparo conforme item 3.1, foi de 6,51±0,23 para NP e 6,29±0,07 para a MP, estando dentro dos valores recomendados pela ISO 11348-3 (ISO, 1998).

A NP Cr₂O₃ se mostrou também menos tóxica para o organismo *A. fischeri* em relação à *D. magna*. Essa redução na toxicidade pode estar associada à complexação do metal pelos íons cloreto presentes no meio diluente. Os ânions Cl⁻ formam complexos com os metais, reduzindo assim a sua biodisponibilidade, assim, os cátions Na⁺, em alta

concentração, também complexam os metais, reduzindo assim a concentração de espécies metálicas livres (LIBES, 1999; BIANCHINI et al., 2009). Outra razão para os valores de menor toxicidade encontrados para *A. fischeri* neste estudo, foi que o mecanismo de bioluminescência da bactéria pelo qual ocorre emissão de luz por reações químicas ligadas ao estresse oxidativo, por exemplo, altas concentrações de espécies reativas de oxigênio ou lipoperoxidação (HALLIWELL & GUTTERRIDGE, 2007; OLIVEIRA et al., 2013), resultando em um incremento na produção de luz através da quimiluminescência. Também, os radicais livres podem funcionar como catalisadores na reação de bioluminescência em fungos e bactérias, proposta por Airth & Foerster na década de 1960 (OLIVEIRA et al., 2013).

O aumento de toxicidade observado na exposição de 30 minutos para a MP pode ser explicado por esse maior tempo de contato entre o Cr_2O_3 e o organismo, podendo ocorrer a liberação de íons cromo no meio e conseqüentemente induzir a diminuição da luminescência emitida.

Apesar da baixa toxicidade da NP Cr_2O_3 para a *A. fischeri*, os resultados da CE_{50} em 15 minutos de exposição mostraram que a formulação nanométrica Cr_2O_3 foi até 12 vezes mais tóxico que a formulação micrométrica. Estudos realizados por Heinlaan et al., (2008), Mortimer et al., (2008) e Rossetto et al. (2014b) também mostraram que NP resultaram em maior toxicidade ao organismo teste *A. fischeri* (*V. fischeri*) que a forma micrométrica.

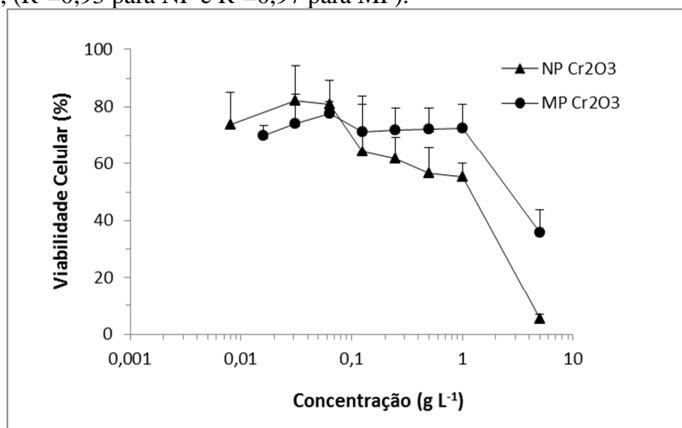
Neste estudo, verificou-se uma volubilidade do teste de inibição da luminescência com *A. fischeri* quando exposta à NP, mesmo após ajustes na amostra, devido ao teste ser sensível as variáveis como cor, turbidez, pH, salinidade e temperatura. Portanto, consideramos que esse organismo não se mostrou o mais indicado para a avaliação toxicológica da NP Cr_2O_3 nas condições deste estudo.

4.5 CITOTOXICIDADE: ENSAIOS *IN VITRO*

4.5.1 Ensaio MTT: Determinação CE_{50}

Após exposição das células Vero à NP Cr_2O_3 e MP Cr_2O_3 , os valores de viabilidade celular foram plotados e o resultado é apresentado na Figura 4.18.

Figura 4. 18 - Curva de viabilidade celular de células Vero expostas à NP e MP Cr₂O₃, ($R^2=0,93$ para NP e $R^2=0,97$ para MP).



Uma redução da viabilidade celular foi observada com o incremento na concentração de NP e MP, o que demonstra uma redução da atividade metabólica da mitocôndria, sugerindo a morte celular. Com os valores plotados em gráfico “Viabilidade Celular vs. log da Concentração” (Figura 4.18), foi possível calcular a $CE_{50,24h}$, que foi de $0,97 \pm 0,56$ g L⁻¹ para células Vero expostas à NP Cr₂O₃ e de $3,73 \pm 0,34$ g L⁻¹ para células Vero exposta à MP Cr₂O₃. Estudos realizados por Horie et al. (2011) avaliaram a citotoxicidade da NP Cr₂O₃ (60nm) em células HaCaT (queratinócitos humanos) e A549 (carcinoma de pulmão humano) e mostraram uma redução significativa na viabilidade celular para concentrações de $0,5$ mg mL⁻¹ de NP. Essa maior citotoxicidade encontrada pelos autores é justificada pelo menor tamanho da NP e diferentes linhagens de células. Os autores também descreveram que o método de preparo das suspensões de NP Cr₂O₃ foi usando a pré-adsorção e centrifugação. Isso pode ter facilidade a internalização das NP nas células aumentando sua toxicidade, já que para as partículas de menor tamanho, a adsorção de proteínas à superfície da NP pode mediar, por receptores, a captação desses NM via endocitose (CONNER & SCHMID, 2003; ALKILANY & MURPHY, 2010, JOSHI et al., 2012; PERREAULT et al., 2012a). Perreault et al. (2014) relataram que interações do meio de cultura RPMI com NP de ouro revestido de PAMAM (NP AuG0) participaram na redução da toxicidade da NP AuG0 em células de mamíferos (Neuro 2A).

4.5.2 Lipoperoxidação: Quantificação do MDA

As células Vero do controle negativo produziram espontaneamente, após 24 horas de incubação, $25,05 \pm 5,76$ nM de MDA/mg de proteína. Após 24 horas de exposição a $0,1 \text{ g L}^{-1}$ de NP Cr_2O_3 , as células produziram $36,90 \pm 14,96$ nM MDA.mg.proteína⁻¹, não apresentando aumento significativo ($p > 0,05$) na produção de MDA para as concentrações testadas quando comparado ao controle. As concentrações de NP Cr_2O_3 analisadas foram baixas, o que pode ter facilitado a interação dos componentes do meio de cultura (sais inorgânicos, proteínas, aminoácidos, vitaminas e outros químicos) com a NP alterando a química da superfície dessas, resultando na agregação das NP (VESARATCHANON et al., 2007; ALKILANY & MURPHY, 2010; PERREAULT et al., 2012a) diminuindo possíveis efeitos de indução à LPO. Contudo, o aumento de MDA identificado na concentração de $0,1 \text{ g L}^{-1}$ pode indicar um início de estresse oxidativo causado pela LPO e conseqüentemente produção de ROS acima do limite de equilíbrio das células. Segundo Møller & Wallin (1998), substâncias estranhas à célula podem provocar geração de ROS. Estas espécies reativas são fontes catalisadoras para reações do tipo Haber-Weiss e Fenton, que induzem, entre outros processos, a LPO (VALKO et al., 2006).

Embora não foram quantificados níveis significativos de MDA nos tratamentos, devido às baixas concentrações de NP Cr_2O_3 testadas, é importante salientar que concentrações elevadas de MDA podem ser tóxicas para a célula, provocando uma inibição da síntese de proteínas e formação de adutos de DNA (moléculas diferentes adicionadas ao DNA), podendo conduzir a processos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (MATIAS et al., 1999 e MELEGARI et al., 2012). Ainda, danos oxidativos podem resultar não apenas ao estresse oxidativo, mas também na desregulação do sistema de defesa e reparo das células, levando à morte celular (HALLIWELL, 2007; MELEGARI et al., 2012).

4.6 QUANTIFICAÇÃO DE CROMO (VI)

Com o intuito de identificar a espécie iônica de cromo que está sendo liberada nos meios de testes e explicar os efeitos tóxicos encontrados nas exposições dos organismos a NP e MP Cr_2O_3 até o momento, foi realizada a quantificação do cromo hexavalente nestas amostras. Os resultados da análise de liberação de Cr(VI) pela NP e MP

Cr₂O₃ são mostrados na Tabela 4.4. A partir destes resultados é possível afirmar que a NP libera o íon cromo na forma hexavalente nos meios em concentrações superiores a formulação MP.

Tabela 4. 4 - Determinação do Cr(VI) pelo método colorimétrico DFC nas suspensões de NP e MP Cr₂O₃.

Concentração (mgL ⁻¹)	Meio Diluente	NP Cr ₂ O ₃	MP Cr ₂ O ₃
		[Cr VI] (equivalente mg K ₂ Cr ₂ O ₇ L ⁻¹)	[Cr VI] (equivalente mg K ₂ Cr ₂ O ₇ L ⁻¹)
50	UP	0,007	0,000
100		0,017	0,004
200		0,038	0,016
50	Meio ISO	0,005	0,000
100		0,013	0,000
200		0,033	0,002
500		0,084	0,010
1	Meio M4	0,000	0,000
5		0,000	0,000
10		0,000	0,000
25		0,006	0,000
50		0,017	0,003
5	Meio NaCl 2%	0,000	0,000
50		0,005	0,000
500		0,093	0,010
50	Meio RPMI	0,001	0,000
500		0,085	0,002
5000		0,513	0,059

Limite de Quantificação (LQ = 0,05 mg L⁻¹).

Através da interpolação dos dados, pode-se estimar a concentração de cromo hexavalente para os valores de toxicidade encontrados aos diferentes organismos-teste. Em relação as concentrações de Cr(VI) nos meios do organismo *D. magna* (ISO e M4), para a $CE_{50,48h}$ de 101,74 mg L⁻¹ foi extrapolado um valor de 0,017 mg L⁻¹ equivalente K₂Cr₂O₇ e para a CEO (10mg L⁻¹) não foi detectado Cr(VI) pelo método DFC. Os valores de Cr(VI) de 0,151 e 0,194 mg L⁻¹ equivalente K₂Cr₂O₇ foram estimados para a $CE_{50,15min}$ e $CE_{50,30min}$, respectivamente, para *A. fischeri* (NaCl 2%). No meio de cultura de células Vero (RPMI), estimou-se 0,115 mg L⁻¹ de Cr(VI) para a $CE_{50,24h}$ de 1010,0 mg L⁻¹. Considerando a legislação nacional, apenas nas concentrações de NP Cr₂O₃ tóxicas à *D. magna*, os valores de cromo estão abaixo do limite permitido pela resolução CONAMA 430/2011, que é de 0,1 mg L⁻¹. Horie et al. (2010) quantificaram cromo solúvel em meio DMEM-FBS (meio de cultura de células humanas HaCaT e A549) por ICP-AES e identificaram 0,4 mM equivalente K₂Cr₂O₇ (117,7 mg L⁻¹ equivalente K₂Cr₂O₇) na suspensão de 10 g L⁻¹ de NP Cr₂O₃.

Esses resultados indicam que a toxicidade da NP Cr₂O₃ está relacionada não somente a liberação de íons Cr(VI) no meio, mas também a ingestão da NP, conforme evidenciado nas imagens de ML (Figura 4.13 e 4.14), e também no efeito “cavalo de Tróia”, pois as NP Cr₂O₃ ingeridas podem liberar os íons Cr(III) no interior do organismo e este oxidar a Cr(VI) no interior das células, potencializando o efeito tóxico.

Para *A. fischeri* e células Vero, as concentrações de Cr(VI) podem ter contribuído na toxicidade verificada para esses modelos biológicos testados. No entanto, *A. fischeri* e células Vero se apresentaram menos sensíveis ao incremento de NP, indicando que a liberação dos íons hexavalente não foi a principal fonte de toxicidade, sugerindo que para os testes com esses modelos biológicos a toxicidade da NP Cr₂O₃ foi modificada pela interação da NP com os meios de teste, alterando suas propriedades fisiológicas.

Para os valores de toxicidade encontrados para a MP Cr₂O₃, não foram identificadas concentrações significativas de Cr(VI) nos meios testados, evidenciando a menor reatividade da MP em relação à NP Cr₂O₃ justificado pelo maior diâmetro e menor área específica daquela.

CAPÍTULO V – CONSIDERAÇÕES FINAIS

As NP metálicas são conhecidas pela grande reatividade em virtude do seu tamanho, forma e química da superfície (LEWINSKI et al., 2008) e podem ser facilmente absorvidas pelos sistemas biológicos e se acumularem nos organismos (SCHLEH et al., 2012; McTEER et al., 2014;). Assim, a NP Cr₂O₃ pode se acumular nos organismos, seja na forma de NP ou íons de cromo, e acarretarem uma contaminação por biomagnificação nas cadeias tróficas, processo que resulta a altos níveis de cromo nas espécies superiores, potencializando assim a toxicidade.

Os metais, incluindo o cromo, são considerados contaminantes ambientais importantes pela sua resistência a degradação e persistência na cadeia trófica. O cromo III é classificado como recalcitrante, ou seja, não é biodegradável pelos organismos (ODUM & BARRETT, 2007). Esta bioacumulação causa danos irreparáveis à flora e fauna, pois o excesso deste metal nas plantas diminui seu crescimento, atrofia seu desenvolvimento radicular, causa descoloração das folhas e é tóxico aos animais (BARROS & SOUSA-AGUIAR, 2001; LEITE, 2002). O cromo (VI) induz o estresse oxidativo através do aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, levando a danos no DNA genômico e deterioração oxidativa dos lipídios e proteínas (BAGCHI et al., 2001; SHRIVASTAVA et al., 2002). Esse mecanismo de ação foi identificado no presente estudo através da geração de ROS e alteração das atividades da esterase para *C. reinhardtii* e efeitos sobre o crescimento e reprodução da *D. magna*. Com estas constatações, a hipótese 1 de que “A NP Cr₂O₃ provoca estresse oxidativo através da indução de espécies reativas de oxigênio” pode ser considerada como verdadeira. Assim como diante do exposto, a hipótese 3 de que “Em virtude da maior reatividade das NP metálicas, a NP Cr₂O₃ pode liberar mais íons de cromo hexavalente que a MP” também pode ser considerada como verdadeira. Outro fator que contribuiu para o nível de toxicidade foi o tamanho da partícula, em que a forma nanométrica foi comprovadamente mais tóxica que a forma micrométrica, nas condições desse estudo. Diante do exposto, a hipótese 2 de que “O tamanho da partícula Cr₂O₃ implica no aumento da toxicidade da substância” pode ser considerada como verdadeira.

Os organismos-teste foram escolhidos como modelos biológicos para este trabalho de acordo com sua relevância na cadeia trófica e representação no meio aquático. As algas, são os produtores primários, estando na base da cadeia trófica, e eventuais alterações na dinâmica e população dessas comunidades podem afetar os níveis

tróficos superiores do ecossistema aquático (COSTA et al., 2008). Os daphnídeos são representantes do zooplâncton e representam os consumidores primários e importantes fontes de alimento para peixes. Espécies desses microcrustáceos são os organismos-testes mais utilizados em estudos ecotoxicológicos. As bactérias são os representantes dos decompositores, sendo que as espécies mais utilizadas em avaliação ecotoxicológica são da família Vibrionaceae. Estes organismos tem extrema importância para manter o equilíbrio de toda a cadeia trófica. Assim, a identificação de poluentes que alterem o comportamento fisiológico das bactérias pode prognosticar um desequilíbrio dessas populações no ambiente aquático.

Dentre os efeitos tóxicos investigados no presente estudo, conforme apresentado no resumo no Quadro 5.1, verificamos que a NP Cr₂O₃ foi capaz de efetivamente causar efeitos deletérios sobre as funções do metabolismo para organismos produtores, consumidores primários e decompositores.

Quadro 5.1 – Quadro resumo dos valores de CE₅₀, CEO e CENO obtidos usando diferentes bioensaios.

Teste Toxicológico	Modelo Biológico	NP Cr ₂ O ₃		MP Cr ₂ O ₃		
		24 h	72 h			
Toxicidade Aguda (CE ₅₀ , mg L ⁻¹)	<i>C. reinhardtii</i>	1570±530	6160±270	--		
Toxicidade Aguda (CE _{50,48h} , mg L ⁻¹)	<i>D. magna</i>	101,74±9,13		528,51±23,84		
Toxicidade Crônica (mg L ⁻¹)	<i>D. magna</i>	Crescimento		Reprodução		
		CEO	CENO	CEO	CENO	--
		10	5	10	5	
Toxicidade Aguda (CE ₅₀ , mg L ⁻¹)	<i>A. fischeri</i>	15 min		30 min		
		769,17±19,69	980,00±134,35	9720,00±19,69	3322,00±134,35	
Citotoxicidade (mg L ⁻¹)	Células Vero	970±55,74		3730±34,51		

Esta constatação implica em considerar que NP pode interferir no equilíbrio da cadeia trófica, podendo levar a alteração e desequilíbrios de sistemas tróficos.

CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES

Neste trabalho, o principal objetivo foi avaliar a toxicidade de NP Cr₂O₃ em diferentes modelos biológicos. Assim, os resultados apresentados neste estudo permitem formar as seguintes conclusões:

- ✓ Os ensaios com *C. reinhardtii* demonstraram a interação entre NP Cr₂O₃ e microalgas, favorecendo a adsorção das NP na superfície das células, resultando em danos na parede e membrana celulares e internalização das NP pela membrana celular.
- ✓ Os resultados também mostraram um aumento no nível de ROS e diminuição da atividade da esterase, evidenciando o estresse oxidativo das células expostas à NP Cr₂O₃.
- ✓ Esses efeitos causaram alterações no sistema fotossintético das microalgas, tanto na redução da eficiência do fotossistema e transporte de elétrons como também a ativação dos sistemas de defesa.
- ✓ Os resultados obtidos através de teste de toxicidade aguda com *D. magna* e para *A. fischeri* demonstraram que a NP Cr₂O₃ é mais tóxica do que a mesma formulação na escala micrométrica (MP Cr₂O₃). Essa maior toxicidade da NP está relacionada com o reduzido tamanho e consequentemente maior reatividade. Com as análises de microscopia de luz, confirmou-se, em exposições agudas, o acúmulo da NP na região intestinal da *D. magna*. Através das eletromicrografias de transmissão e varredura confirmaram-se danos ultraestruturais causados pela exposição de concentrações subletais e subcrônicas de NP Cr₂O₃, evidenciando sua toxicidade a nível celular.
- ✓ Também foi possível verificar a maior citotoxicidade da NP Cr₂O₃ para cultura de células Vero quando comparado a forma MP da mesma formulação. Contudo, nas concentrações avaliadas não foi verificado estresse oxidativo através da indução de lipoperoxidação.
- ✓ Os dados obtidos através da caracterização da amostra demonstrou que a NP Cr₂O₃ suspensa em meios com sais inorgânicos ou orgânicos tendem a se aglomerar, evidenciando a influência direta da reatividade das NP com

a composição do meio diluente e consequentemente mudanças na toxicidade da NP Cr₂O₃.

- ✓ Os resultados da quantificação de cromo hexavalente evidenciaram que a redução de tamanho da partícula causa maior liberação de íons Cr(VI). Esses dados confirmam a maior reatividade da NP Cr₂O₃ e consequentemente sua maior toxicidade.

Conclui-se que, para os organismos testados neste trabalho, foi possível verificar a toxicidade da NP Cr₂O₃ (tamanho < 100nm). Nas condições ambientais testadas, as concentrações de NP Cr₂O₃, até 100 mg L⁻¹ não provocaram condições de toxicidade aguda em nenhum dos modelos biológicos testados. Entretanto, verificou-se a sua instabilidade em meios de diluição, podendo alterar essas condições de toxicidade tanto em relação a diferentes composições de meios como ao longo do tempo.

Portanto, este trabalho fornece uma gama de informações-base para futuros estudos que acrescentem informações sobre NP Cr₂O₃ com tamanho menor. Além disso, com conhecimentos mais aprofundados sobre a disposição das NP no meio ambiente, é possível que novas complementações desse estudo subsidiem resoluções de proteção ambiental, dispondo de condições e padrões para lançamento de resíduos ou efluentes contendo NP Cr₂O₃.

CAPÍTULO VII – RECOMENDAÇÕES

Com base nos ensaios realizados neste trabalho e os resultados obtidos recomenda-se para a continuação e o aprimoramento dos conhecimentos:

- Caracterizar a suspensão-teste no início e final de cada bioensaio para compreender o comportamento das NP dispersas nos meios diluentes específicos para cada organismo;
- Avaliar o efeito da NP sobre o fotossistema de *C. reinhardtii* em tempos menores de exposição. Também, verificar quais os sistemas de defesa que podem estar atuando no fotossistema;
- Realizar ensaios de toxicidade aguda e crônica com neonatos nascidos dos organismos *D.magna* expostos à NP no teste de toxicidade crônica para verificar se a sensibilidade das gerações futuras é alterada;
- Avaliar o efeito de aumento da bioluminescência da *A. fischeri* através da quantificação de enzimas como redutase;
- Proceder a estudos citotóxicos e genotóxicos com outras linhagens celulares, diferentes da empregada nesta tese, para identificar e confirmar o potencial toxicológico da NP Cr₂O₃ em células alvo.

CAPÍTULO VIII - REFERÊNCIAS

ABREU, Miriam Antonio. Reciclagem do resíduo de cromo da indústria do curtume como pigmentos cerâmicos. 2006. 170 p. Tese (Doutorado em Engenharia) - Escola Politécnica da Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia Metalúrgica e Materiais, 2006.

ABU-ZIED, B.M., Structural and catalytic activity studies of silver/chromia catalysts. **Appl. Catal. A Gen.** v. 198, p. 139–153, 2000.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL - ABDI. Panorama nanotecnologia, Série Cadernos da Indústria ABDI XIX, 180 p. Brasília, DF, 2010. Disponível em: <http://www.abdi.com.br/Estudo/Panorama%20de%20Nanotecnologia.pdf>. Acesso em: 31 de agosto de 2013.

_____. Nanotecnologias: subsídios para a problemática dos riscos e regulação. Brasília, DF, 2011. Disponível em: http://www.abdi.com.br/Estudo/Relat%C3%B3rio%20Nano-Riscos_FINALreduzido.pdf. Acessado em: 31 de agosto de 2013.

AGENCY FOR TOXIC SUBSTANCES AND DISEASE REGISTRY - ATSDR. **Toxicological profile for chromium**. Syracuse: U.S. Department of Health & Human Services, 2000.

ALI, N.A.; DEWEZ, D.; DIDUR, O. Inhibition of photosystem II photochemistry by Cr is caused by the alteration of both D1 protein and oxygen evolving complex, **Photosynth Res.**, v. 89, p. 81 – 87, 2006.

ALLEN, J.F.; BENNETT, J.; STEINBACK, K.E.; ARNTZEN, C.J. Chloroplast protein-phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution excitation-energy between photosystems. **Nature**, v. 291, n. 5810, p. 25 – 29, 1981.

ALLEY, M.C.; SCUDIERO, D.A.; MONKS, A.; HURSEY, M.L.; CZERWINSKI, M.J.; FINE, D.L.; ABBOTT, B.J.; MAYO, J.G.; SHOEMAKER, R.H.; BOYD, M.R. Feasibility of drug screening

with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Res.**, v. 48, p. 589 - 601, 1988.

ALKILANY, A.M. & MURPHY, C.J. Toxicity and cellular uptake of gold nanoparticles: what we have learned so far? **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, p. 2313-2333, 2010.

ANDERSSON, B.; STYRING, S. Photosystem II: Molecular organization, function and acclimation. In: LEE, C.P. (Ed.) **Current topics in bioenergetics**. San Diego: Academic Press, p. 1 – 81, 1992.

ANDERSON, R.A. Chromium as an essential nutrient for humans. **Regul Toxicol Pharmacol**, v. 26, p. 35-41. 1997.

ANN KAHRU & HENRI-CHARLES DUBOURGUIER (2009) From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**. September 2009. doi:10.1016/j.tox.2009.08.016.

AOUADA, M. R. M. 2009. **Aplicação de nanopartículas em filmes utilizados em embalagens para alimentos**. Tese (Doutorado em Ciências), Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

AVERS, C.J. **BIOLOGIA CELULAR**, Grupo Editorial Iberoamérica, México, 2ª ed., 748 p., 1991.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.
NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). Rio de Janeiro: ABNT, 2009.

_____. **NBR 13.373**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera), 3ª edição, 18 p., Rio de Janeiro, 2010.

_____. **NBR 15411-3**: Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente): Parte 3 – Método utilizando bactérias liofilizadas. Rio de Janeiro, 2006.

AUBIN-TAM, M.E. & HAMAD-SCHIFFERLI, K. Structure and function of nanoparticle–protein conjugates. **Biomedical Materials**, v. 3, n 3, 2008.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. São Paulo: Rima e InterTox, 2003. 321p.

BAGCHI, D.; BAGCHI, M.; STOHS, S.J. Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of tumor suppressor gene. **Mol. Cell. Biochem.** V. 222, p. 149-158, 2001.

BAGCHI, D., STOHS, S.J.; DOWNS, B.W.; BAGCHI, M.; PREUSS, H.G. Cytotoxic and oxidative mechanisms of different forms of chromium. **Toxicology**. 2002, Vol. 180, p. 5-22.

BALACHANDRAN, U.; SIEGEL, R.W.; LIAO, Y.X.; ASKEW, T.R. Syntesis, Sintering and Magnetic Properties of nanophase Cr₂O₃. **Nanostructured Materials**, v. 5, n.5, p. 505-512, 1995.

BANDEIRA, S., 2011. **Síntese, Caracterização e Avaliação do Grau de Cristalinidade de Compostos Tipo Hidrotalcita**. Dissertação (Mestrado em Química), Programa de Pós Graduação em Química, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juíz de Fora, 2011.

BARBER, A.D., HARRIS, S.R. Oxygen free radicals and oxidants: a review. **Amer. Pharm.**, v.34, n.9, p.26-35, 1994.

BARNES, R. **Zoologia de los Invertebrados**, 3a edição, Interamericana, São Paulo, 1977.

BARROS, M.A.S.D. & SOUSA-AGUIAR, E.F. **O Elemento Cromo e Suas Características**. Problemas Ambientais com Soluções Catalíticas. O Cromo no Processamento de Peles, p. 1–10, CYTED, Madrid, 2001.

BARROS, S.B.M.; DAVINO, S.C. **Avaliação da Toxicidade**. In: OGA, S. (org). Fundamentos da Toxicologia. Editora Atheneu. 2ª edição. São Paulo-SP. p.59-67, 2003.

BARROS, Débora de. **Avaliação da ecotoxicidade de solos contaminados por hidrocarbonetos**. Rio de Janeiro/SC. 52p.

Monografia (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química. Rio de Janeiro. 2007.

- BARTLETT, R. J. Chromium cycling in soils and water: links, gaps, and methods. **Environ. Health Perspect**, v. 92, p.17-24.1991.
- BARUFI, José Bonomi. **Fotoproteção em *Gracilaria tenuistipitata* (Rhodophyta): uma abordagem fisiológica e molecular**. Tese (Doutorado em Ciências). Instituto de Biociências, Departamento de Botânica, Universidade de São Paulo. 2010.
- BASTOS, Rodrigo Alves de Brito. **Áreas de Fragilidade Ambiental: uma abordagem metodológica para áreas de expansão urbana com risco potencial à erosão. Estudo de caso: Bairro Urbanova – São José dos Campos/SP**. Dissertação (Mestrado em Planejamento Urbano e Regional). Programa de Pós Graduação em Planejamento Urbano e Regional. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba. São José dos Campos, 2006.
- BENITE, A. M. C; MACHADO, S. P. & BARREIRO, E. J. Uma visão da química bioinorgânica medicinal. **Química Nova**, n.8, v. 30, 2007.
- BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, onsequences, measurements and dietary influences. **Int. J. Food Sci. Nut**, v.47, p.233-261, 1996.
- BERNAUER, U.; OBEREMM, A.; MADLE, S.; GUNDERT-REMY, U. The use of in vitro data in risk assessment. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, n.3, p.176 -181, mar. 2005.
- BESSON, C.; FINNEY, E.E. & FINKE, R.G. A mechanism for transition-metal nanoparticle self-assembly. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 127, n. 22, p. 8179-8184, 2005.
- BIANCHINI, A. e WOOD, C.M. Physiological effects of chronic silver exposure in *Daphnia magna*, **Comparative Biochemistry and Physiology C**, v. 133, n. 1-2, p. 137–145, 2002.
- BIANCHINI, A; MARTINS, S.E.; JORGE, M.B. **O Modelo do Ligante Biótico e suas Aplicações em Ecotoxicologia**, 2009. Disponível em:

<http://www.inct-ta.furg.br/english/difusao/BLMM.pdf>. Acesso em: 14 setembro 2014.

- BIANCHIN, Liane. 2011. **Atributos químicos e especiação de cromo em solo com aplicação de resíduos de curtume e carbonífero em experimento de campo**. Tese (Doutorado em Ciência do Solo), Programa de Pós-Graduação em Ciência do Solo, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 114 p., 2011.
- BLAZI, L. A. 2012. **Desenvolvimento de sensores de gás a partir da integração de nanotubos de carbono em microdispositivos eletrônicos**. Tese (Doutorado em Ciência e Engenharia de Materiais), Programa de Pós Graduação em Ciência e Engenharia de Materiais, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2012.
- BIELICKA, A.; BOJANOWSKA, I.; WIŚNIEWSKI, A. Two Faces of Chromium - Pollutant and Bioelement (Review), **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 14, n. 1, p. 5-10, 2005.
- 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, 1980.
- BILGER, W. & BJORKMAN, O. Role of the xanthophyll cycle in photoprotection elucidated by measurements of light-induced absorbance changes, fluorescence and photosynthesis in leaves of *Hedera canariensis*. **Photosynthesis Research**, v. 5, n. 3, p. 173 – 185, 1990.
- BLINOVA, I.; IVASK, A.; HEINLAAN, M.; MORTIMER, M.; KAHRU, A. 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. **Environmental Pollution**, 158, p. 41-47, 2010.
- BONET, A.; POSCHENRIEDER, C.; BARCELO, J. Chromium III-iron interaction in Fe-deficient and Fe-sufficient bean plants. I. Growth and nutrient content. **J. Plant Nutr.**, v. 14, n.4, p. 403–414, 1991.
- BOOMINATHAN, R. & DORAN, P.M. Organic acid complexation, heavy metal distribution and the effect of ATPase

inhibition in hairy roots of hyperaccumulator plant species. **J. Biotechnol.**, v. 101, p. 131-146, 2003.

BORSCHIVER, S.; GUIMARÃES, M. J. O. C.; SANTOS, T. N.; SILVA, F. C.; BRUM, P. R. C. Patenteamento em nanotecnologia: estudo do setor de materiais poliméricos nanoestruturados. *Polímeros: Ciência e Tecnologia*, Rio de Janeiro vol.15, nº4, pág. 245, 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/po/v15n4/a07v15n4.pdf>. Acesso em: agosto de 2012.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v.72, p.248-254, 1976.

BRASIL. CONGRESSO NACIONAL. Constituição da República Federativa do Brasil de 1988. Casa Civil, 05 de outubro de 1988. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/constituicao/constituicao.htm. Acesso em: 20 nov 2013.

_____. MINISTÉRIO DA JUSTIÇA. Lei nº 11.105. Dispõe sobre a Política Nacional de Biossegurança – PNB e estabelece normas de segurança e mecanismos de fiscalização sobre organismos geneticamente modificados – OGM e seus derivados. Casa Civil, 24 de março de 2005. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/111105.htm. Acesso em: 20 nov 2013.

_____. MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO – MTCTI. Sítio de informação sobre nanotecnologia. Disponível em: <http://nano.mct.gov.br/>. Acesso em: 24 setembro 2014.

_____. MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Lei nº 9.433. Institui a política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei no 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei no 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Diário Oficial da União, Brasília, 08 de janeiro de 1997.

_____. CONSELHO NACIONAL DE MEIO AMBIENTE. Resolução CONAMA nº 357. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes e de outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, 17 de março de 2005.

_____. CÂMARA DOS DEPUTADOS. Projeto de lei PL 5076 (Arquivado). Dispõe sobre a pesquisa e o uso da nanotecnologia no País, cria Comissão Técnica Nacional de Nanosseguurança - CTNano, institui Fundo de Desenvolvimento de Nanotecnologia - FDNano, e dá outras providências.

BRENTANO, D. M.; LOBO, E. A. Biomonitoramento de caráter ecotoxicológico no Vale do Rio Pardo. **Tecnológica**, v. 7, n.2, p. 85 – 95, 7(2): 85-95. 2003.

BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: Avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário**. Florianópolis – SC. 130p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. 2006.

BRITO, S.L.M; GOUVÊA, D.; GANZELLA, R. Estudo da adsorção de dispersante à base de poliacrilato em um sistema varistor comercial: caracterização físico-química, **Cerâmica**, v. 51, p. 30-36, 2005.

BROADHEAD, C.L.; et al. Prospects for reducing and refining the use of dogs in the regulatory toxicity testing of pharmaceuticals. **Human & Experimental Toxicology**, v.19, n.8, p.440-447, 2000.

BROWN, D.M.; WILSON, M.R.; MacNEE, W.; STONE, V.; DONALDSON, K. Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines, **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 175, p. 191–199, 2001.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P.H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, **J. Am. Chem. Soc.**, v. 60, p 309 – 319, 1938.

- BURATINI, S. V.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 73, p. 878 - 882, 2004.
- BURGESS, D. J.; HICKEY, A. J. Microsphere technology and applications. In: SWARBRICK, J.; BOYLAN, J. C., eds. **Encyclopedia of Pharm.aceutical technology**. New York: Marcel Dekker, v. 10, p. 1-29. 1994.
- CAMINADE, A.; LAURENT, R.; MAJORAL, J. Characterization of Dendrimers. **Adv. Drug Delivery Rev.** v. 57, p. 2130–2146, 2005.
- CAMPOS, C. E. M. **Estudo de propriedades físicas de nanomateriais produzidos por síntese mecânica**. 2005. Tese (Doutorado em Física) - Programa de Pós-Graduação em Física, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC), 2005.
- CANHOTO, J. M. 2010. **Biotecnologia Vegetal : da Clonagem de Plantas à Transformação Genética**. Imprensa da Universidade de Coimbra, Coimbra, ed. Outubro de 2010. p. 405.
- CAO, H.; QIU, X.; LIANG, Y.; ZHAO, M.; ZHU, Q. Sol–gel synthesis and photoluminescence of p-type semiconductor Cr₂O₃ nanowires, **Appl. Phys. Lett.**, v. 88, issue 24, 2006.
- CAMPOSTRINI, E. Fluorescência da clorofila a: considerações teóricas e aplicações práticas (1997). Disponível em: http://www.uenf.br/Uenf/Downloads/CENTRO_CCTA_1629_1112121492.pdf. Acesso em: 18 julho 2011.
- CARVALHO PINTO-SILVA , C. R. ; BELLI, P. F. ; CREPPY, E. E. ; COSTA, R. H. R. ; FERREIRA, J. ; MATIAS WG . Micronucleus induction in mussels exposed to Okadaic acid. *Toxicon*, Amsterdam, Holanda, v. 41, n. 1, p. 93-97, 2003.
- CARVALHO PINTO-SILVA , C. R.; CREPPY, E. E. ; MATIAS WG . Micronucleus test in mussels *Perna perna* fed with the toxic dinoflagellate *Prorocentrum lima*. **Archives of Toxicology**, v. 79, p. 422-426, 2005 .

- CARVALHO PINTO-SILVA , C. R.; MOUKHA, SERGE ;; CREPPY, EDMOND E. MATIAS WG . Comparative Study of Domoic Acid and Okadaic Acid Induced - Chromosomal Abnormalities in the CACO-2 Cell Line. *The International Journal of Environmental Research and Public Health*, Jackson, Mississippi 39217, US, v. 3, n. 1, p. 4-10, 2006.
- CARVALHO PINTO-SILVA , C. R. ; MOUKHA, S. ;; CREPPY, E. E. MATIAS WG . Domoic acid induces direct DNA damage and apoptosis in Caco-2 cells: Recent advances. **Environmental Toxicology**, v. 23, p. 657-663, 2008.
- CASTILHOS, D.D.; VIDOR, C.; TEDESCO, M.J. Redução do cromo em solo suprimido com lodo de curtume e cromo hexavalente. **Revista Brasileira de Agrociência**, v. 5, n. 3, p. 228-232. 1999.
- CATALA, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**., v. 38, p. 1482-1495, 2006.
- CELLARD, A.; GARNIER V.; FANTOZZI, G.; BARET, G, FORT, P. Wear resistance of chromium oxide nanostructured coatings. **Ceramics International**, v. 35, p. 913 – 916, 2009.
- CERVANTES, C.; CAMPOS-GARCÍA, J.; DEVAR, S.; GUTIÉRREZ-CORONA, F.; LOZA-TAVERA, H.; TORRES-GUZMÁN, J.C. E RAFAEL MORENO-SÁNCHEZ. Interactions of chromium with microorganisms and plants, **FEMS Microbiology Reviews**, v. 25, p. 335 – 342, 2001.
- CHASIN, A.A. da M.; PEDROZO, M. de F.M. **O estudo da toxicologia**. In: AZEVEDO, F.A.; CHASIN, A.A. da M. (org) *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*. São Carlos: RIMA, 2003.
- CIEŚLAK–GOLONKA M. Toxic and mutagenic effects of chromium(VI) - a review, **Polyhedron**, v. 15, n. 21, p. 3667-3689, 1995.

- COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair: Principles, Applications, and Limitations. **Molecular Biotechnology** v. 26, p. 249-261, 2004.
- CONNER, S.D.; SCHMID, S.L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, v. 422, p. 37–44, 2003.
- COSTA, C. R.; OLIVI, P.; BOTTA, C. M. R.; ESPINDOLA, E. L. G.; Toxicity in aquatic environments: discussion and evaluation methods. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1820–1830, 2008.
- COSTA, A. C. F. M.; LIMA, M. G.; LIMA, L. H. M. A.; CORDEIRO, V. V.; VIANA, K. M. S.; SOUZA, A. C., LIRA, H. L. (2009). Hidroxiapatia: Obtenção, caracterização e aplicações. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 4.3, p. 29-38, 2009.
- COSTA, V. & MORADAS-FERREIRA, P. Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. **Molecular Aspects of Medicin**, v. 22, p. 217-246, 2001.
- COTTON, F.A.; WILKINSON, G. **Advanced inorganic chemistry**, 6^a ed., Nova York, John Wiley & Sons, 1999.
- CHEN, X.; SCHLUESENER, H. J.; Nanosilver: A nanoparticle in medical application. **Toxicology Letters**, v. 176, Issue 1, 2008.
- CULLITY, B. D., 1978. Elements of X-Ray Diffraction. 2^a Edição, **Addison-Wesley Publishing Company Inc**, 1978.
- CUNHA, A.F; LAGE, A.D.; PEREIRA E ARAÚJO, M.M.; SANTOS, R.D.P.; RESENDE, G.M.; CERQUEIRA, M.M.O.P. Avaliação da qualidade microbiológica de bebida láctea e creme de leite UAT por ATP-Bioluminescência, **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.65, n.2, 2013.
- CURTIS, J.; GREENBERG, M.; KESTER, J.; PHILLIPS, S.; KRIEGER, G.. Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians **Toxicology Review**, v. 25, 2006, p. 245–260.

- CHANDRA, S., CHAUHAN, L. K. S., MURTHY, R. C., SAXENA, P. N., PANDE, P. N., GUPTA, S. K. Comparative biomonitoring of leachates from hazardous solid waste of two industries using Allium test. **Sci. Total Environ.**, v. 347, p. 46-52, 2005.
- CHRISTIANI, D.C. Occupationally induced pulmonary malignancy(excluding asbestos-related cancers). In: Banks DE, Parker JE, editors. **Occupational lung disease - international perspective**. London: Chapman & Hall; 1998. p. 485-98.
- CURTIN, J. F.; DONOVAN, M.; COTTER, T. G. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis. **J. Immunol. Methods.**, n. 265, p. 49-72, 2002.
- DALAI, S.; ISWARYA, V.; BHUVANESHWARI, M.; SUNANDAN, P.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Different modes of TiO₂ uptake by *Ceriodaphnia dubia*: Relevance to toxicity and bioaccumulation, **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 139 – 146, 2014.
- DAMASCENO, J.C.; RIBEIRO, A. R. .; BALOTTIN, L.B.; GRANJEIRO, J.M. Nanometrologia – desafios para a regulação sanitária, **Vigilância Sanitária em Debate**; v. 1, n. 4, p. 104-114, 2013.
- DAUDT, C.E.; CANTO, M.W. Cromo (III), cromo (VI) e cromo total em alguns vinhos brasileiros. **Cienc. Rural**, vol.25, n.1, Santa Maria 1995.
- DAVIS JÚNIOR, W.; RONAI, Z.; TEW, K. D. Cellular thiols and reactive oxygen species in drug-induced apoptosis. **Perspectives in Pharmacol.**, n. 296, p. 1-6, 2001.
- DAWSON, K.A.; SALVATI, A.; LYNCH, I. Nanotoxicology: Nanoparticles reconstruct lipids, **Nature Nanotechnology**, v. 4, Issue 2, p. 84-85, 2009.
- DHIR, B.; SHARMILA, P.; SARADHI P.P.; NASIM S.A. Physiological and antioxidant responses of *Salvinia natans* exposed to chromium-rich wastewater. **Ecotox. Environ. Safe.**, v. 72, n. 6, p. 1790-1797, 2009.

- DIN - Deutsches Institute für Normung . **DIN 38412**: testverfahren mit Wasserorganismen (gruppeL)Bestimmunh der nicht akut giftigen Wirkung von Abwasser gegenüber Daphnien über erdünnungsstufen. Deutschland, 13 p, 1989.
- DI TORO, D.M.; ALLEN, H.E.; BERGMAN, H.L.; MEYER, J.S.; PAQUIN, P.; SANTORE, R.S. Biotic Ligand Model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 20, n. 10, p. 2383-2396, 2001.
- DOWLING, A.; et al., **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**, A Report by The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, 2004.
- DURAN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C.; Nanotecnologia: Introdução, Preparação e Caracterização de Nanomateriais e Exemplos de Aplicação, 1ª. ed., Artliber: São Paulo, Brasil, 2006.
- DYAL, A.; LOOS, K.; NOTO, M.; CHANG, S.W.; SPAGNOLI, C.; SHAFI, K.; ULMAN, A.; COWMAN, M. e GROSS, R. A. Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on gamma-Fe₂O₃ magnetic nanoparticles, **J. Am. Chem. Soc.**, v. 125, p. 1684–1685, 2003.
- ELDER, A.; GELEIN, R.; SILVA, V.; FEIKERT, T.; OPANASHUK, L.; CARTER, J.; POTTER, R.; MAYNARD, A.; ITO, Y.; FINKELSTEIN, J.; OBERDÖRSTER, G. **Environ. Health Perspect.**, v. 114, p. 1172–1178, 2006.
- ELFADL, M.A.; LUUKKANEN, O. Field studies on the ecological strategies of *Prosopis juliflora* in a dryland ecosystem. 1- A leaf gas exchange approach. **J. Arid Eviron.** v. 66, p. 1-15, 2006.
- EL-SHOBAKY, H.G.; GHOZZA, A.M.; EL-SHOBAKY, G.A.; MOHAMED, G.M.. Physicochemical surface and catalytic properties of Cr₂O₃/Al₂O₃ system. *Coloids and Surface A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 152, p. 315-326,1999.
- EPA – United States Environmental Protection Agency. EPA-821-R-02-012: Methods for Measuring the Acute Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater and Marine Organisms. 5.ed. Washington, DC. 266p. 2002a.

_____. EPA-821-R-02-013: Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms.4.ed. Washington, DC. 335p, 2002b.

ERDTMANN, B. **A genotoxicidade nossa de todos os dias**. In: SILVA, J., ERDTMANN, B., HENRIQUES, J.A.P. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Editora Alcance, p. 21- 46, 2003.

ESTADO DE SANTA CATARINA. Fundação do Meio Ambiente. Portaria nº 17 de 18 de abril de 2002: **Limites Máximos de Toxicidade Aguda para efluentes de diferentes origens**. Disponível em: <www.fatma.sc.gov.br>. Acesso em: 17 fevereiro 2009.

FAN, A.M., HARDING -BARLOW, I. **Chromium Hazard Evaluation Section** , Berkeley, Department of Health Services, 1988.

FENDORF, S. E.; ZASOSKI, R. J. Chromium (III) oxidation by delta-MnO₂. **Environ. Sci. Technol**,v. 26, p. 79-85.1992.

FERREIRA, N. S., 2010. **Morfologia e Propriedades Estruturais de Nanopartículas de ZnO Sintetizadas pelo Processo Sol-Gel Proteico**. Dissertação (Mestrado em Ciências em Física), Pós Graduação em Física da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 41 p., 2010.

FERREIRA, A.L.A. & MATSUBARA, L.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev Ass Med Brasil**, v. 43, n. 1, p. 61 – 68, 1997.

FERRUZZI, C. **Manual de lombricultura**. Madrid: Mundi-prensa, 2001. 138p.

FIGUEIREDO, J.L. e RIBEIRO, F.R. **Catálise Heterogênea**. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1989.

FILHO, Mário Terra & KITAMURA, Satoshi. Câncer pleuropulmonar ocupacional. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 32, suppl.1, São Paulo, mai. 2006. p. S60-68

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

FISCHER, Hans; CHAN, Warren. Nanotoxicity: the growing need for in vivo study. **Current Opinion in Biotechnology** , Toronto, v.18, n.6, p.565-571. 2007.

FLOHR, L.; BRENTANO, D.M.; CARVALHO-PINTO, C.R.S.; MACHADO, V.G.; MATIAS, W.G. Classificação de resíduos sólidos industriais com base em testes ecotoxicológicos utilizando *Daphnia magna*: uma alternativa, **Biotemas**, v. 18, n.2, p. 7 – 18, 2005.

FLOHR, L. **Aplicação e validação do Modelo WTox para avaliar risco ambiental toxicológico de misturas complexas: estudo de caso em amostras de resíduos industriais**. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental), Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2011.

FOYER, C.H. Willey Series in cell biology – **Photosynthesis**. London: Edwards Bittar, 219 p., 1984.

FRANKLIN, N. M.; ADAMS, M. S.; STAUBER, J. L.; LIM, R. P. Development of an Improved Rapid Enzyme Inhibition Bioassay with Marine and Freshwater Microalgae Using Flow Cytometry. **Environmental Contamination and Toxicology**, v. 40, p. 469-480, 2001.

FREITAS, Tânia Christina Marchesi de. **O Cromo na Indústria de Curtumes de Mato Grosso do Sul, Brasil: Aspectos Ecológicos**. Tese (Doutorado), Programa Multiinstitucional de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande. 2006.

FRESHNEY, J. R. Culture of Animal Cells- Manual de Técnica Básica. 5 ed. Estados Unidos:Wileyliss, 642p., 2005.

FURLANETO, F. P. B. 2011. Nanotecnologia no setor agropecuário. **Pesquisa & Tecnologia**, vol. 8, n. 69, outubro de 2011.

FUZINATTO, Cristiane Funghetto. **Avaliação da qualidade da água de rios localizados na ilha de Santa Catarina utilizando parâmetros toxicológicos e o índice de qualidade de água**. 2009. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) - Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC), 2009.

GABBAY, J., BORKOW, G., MISHAL, J., MAGEN, E., ZATCOFF, R., SHEMER-AVNI, Y. Copper oxide impregnated textiles with potent biocidal activities. **J. Ind. Text.** 35, 323–335, 2006.

GENTY, B.; BRIANTAIS, J.M.; BAKER, N.R. The relationship between the quantum yield of photosynthetic electron-transport and quenching of chlorophyll fluorescence, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 990, n. 1, p. 87 – 92, 1989.

GHERARDI-GOLDSTEIN, E.; BERTOLETTI, E.; ZAGATTO, P. A.; ARAÚJO, R. P. A.; RAMOS, M. L. L. C. **Procedimentos para Utilização de Testes de Toxicidade no Controle de Efluentes Líquidos**, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB), São Paulo, 1990.

GIANNETTI, B.F.; ALMEIDA, C.M.V.B.; BONILLA, S.H.; VENDRAMETO, O. **Nosso Cromo de Cada Dia: Benefícios e Riscos**. Laboratório de Físico-Química Teórica e Aplicada, Instituto de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Paulista. Disponível em: <http://www.hottopos.com.br/regeq8/biaggio.htm>. Acesso em: 10/07/ 2012.

GOUVÊA, D. & MURAD, B. B. S, 2001. Influência das características ácido-básicas da superfície dos óxidos na estabilidade de suspensões cerâmicas de Al₂O₃ ou SnO₂ com dispersantes comerciais. **Cerâmica** 47, v. 301, p. 51-56, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/ce/v47n301/a1047301.pdf>. Acesso em: Março/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.

GROSELL, M.; BLANCHARD, J.; BRIX, K.V.; GERDES, R.
Physiology is pivotal for interactions between salinity and acute copper toxicity to fish and invertebrates. **Aquat. Toxicol.** 84: 162-172, 2007.

GUIMALHÃES, Afrânio Augusto. *Eisenia fetida ou andrei?*. **Revista eletrônica Zoonews**. Publicado em: 27/04/2008. Disponível em: www.zoonews.com.br/noticiax.php?idnoticia=139228. Acesso em: 20 janeiro 2010.

GUNNEWIEK, Rodolfo F.K., MENDES, Camilla F., KIMINAMI, Ruth H.G.A. Synthesis of Cr₂O₃ nanoparticles via thermal decomposition of polyacrylate/chromium complex. **Materials Letters**, v. 129, p.54–56, 2014.

GUPTA, R.K.; MITCHELL, E.; CANDLER, J.; KAHOL, P.K.; GHOSH, K.; DONGC, L. Facile synthesis and characterization of nanostructured chromium oxide, **Powder Technology**, v. 254, p.78–81, 2014.

GUO, B.; CHI, M.; SUN, X.-G.; DAI, S. Mesoporous carbon–Cr₂O₃ composite as an anode material for lithium ion batteries, **J. Power Sources**, v. 205, p. 495–499, 2012.

HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. Free radicals in biology and medicine. 4.ed. New York: **Oxford University Press**, 2007. 851p.

HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress, **Biochem. Soc. Trans.**, v. 35, p. 1147–1150, 2007.

HAMILTON, R.F.; WU, N.; PORTER, D.; BUFORD, M.; WOLFARTH, M.; HOLIAN, A. Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity. **Part Fibre Toxicol**, v. 6, n. 35, 2009.

HANDY, RD; VON DER KAMMER, F.; LEAD, JR; HASSELLOV, M.; OWEN, R. CRANE, M. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 287–314, 2008.

HANSON, M. HexChrom. **Professional Safety**, Park Ridge, v.48,n.1, p.40-44, jan. 2003.

HARMEL, V. C. **Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* para análise da qualidade de águas superficiais**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade Regional de Blumenau, Blumenau – SC. 100p. 2004.

HARRIS, E.H. The *Chlamydomonas* Sourcebook: A Comprehensive Guide to Biology and Laboratory Use. **Academic Press**, San Diego, CA, 1989.

HARRIS, E.H., The *Chlamydomonas* Sourcebook, Biotechnology, **Academic Press**, Inc. 2009.

HEINLAAN, M.; IVASK, A.; BLINOVA, I.; DUBOURGUIER; H-C.; KAHRU, A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. **Chemosphere**, Estonia, p. 1308-1316. 2008.

HENDRICKSON, L.; FURBANK, R.T.; CHOW, W.S. A simple alternative approach to assessing the fate of absorbed light energy using chlorophyll fluorescence, **Photosynth Res.**, v. 82, p. 73 – 81, 2004.

HERMAN JG, BAYLIN SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.*, 2003; v. 349, p. 2042-2054.

HERSHKO, C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Semin Hematol**, v. 26, p. 277 – 285, 1989.

Van HOECKE, K.; DE SCHAMPHELAERE, K. A. C.; VAN DER MEEREN, P.; LUCAS, S. e JANSSEN, C. R., Ecotoxicity of silica

nanoparticles to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: Importance of surface area, **Environ. Toxicol. Chem.**, v. 27, p. 1948–1957, 2008.

HOFFMAN, A.; SPETNER, L.M.; BURKE, M. Ramifications of a Redox Switch within a Normal Cell; its Absence in a Cancer cell, **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 265–268, 2008.

HOLMES, A.L.; WISE, S.S.; WISE, J.P., Sr. Carcinogenicity of hexavalent chromium. **Indian. J. Med. Res.**, v. 128, p. 353–372, 2008.

HORDEGEN, P.; CABARET, J.; HERTZBERG, H.; LANGHANS, W.; MAURER, V. In vitro screening of six anthelmintic plant products against larval *Haemonchus contortus* with a modified methyl-thiazolyl-tetrazolium reduction assay, **J. Ethnopharmacol.**, v. 108, p. 85–89, 2006.

HORIE, M.; NISHIO, K.; ENDOH, S.; KATO, H.; FUJITA, K.; MIYAUCHI, A.; NAKAMURA, A.; KINUGASA, S.; YAMAMOTO, K.; NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; IWAHASHI, H. Chromium (III) oxide nanoparticles induced remarkable oxidative stress and apoptosis on culture cells. **Environ. Toxicol.**, v. 28, Issue 2, p. 61 – 75, 2011.

HOWARD, C.V. Small particles — big problems, *Int Lab News*, v. 34, n. 2, p. 28–29, 2004.

HSOUNA, A.B.; TRIGUI, M.; MANSOUR, R.B.; JARRAYA, R.M.; DAMAK, M.; JAOUA, S. Chemical composition, cytotoxicity effect and antimicrobial activity of *Ceratonia siliqua* essential oil with preservative effects against *Listeria* inoculated in minced beef meat, **Inter. J. Food Microbiol.**, v. 148, p. 66 – 72, 2011.

HU, Z.J.; SONG, S.Q.; ZHENG, Z.; REN, L.Y. The study on the germination and growth of three common vegetable seeds in contaminated by chromium environment. **J. Dazhongkeji**, v. 6, p. 121–123, 2010.

HUMPAGE, A.R.; LEDREUX, A.; FANOK, S.; BERNARD, C.; BRIAND, J.F.; EAGLESHAM, G.; PAPAGEORGIOU, J.; NICHOLSON, B.; STEFFENSEN, D. Application of the

neuroblastoma assay for paralytic shellfish poisons to neurotoxic freshwater cyanobacteria: interlaboratory calibration and comparison with other methods of analysis *Environ. Toxicol. Chem.*, 26 (2007), p. 1512–1519, 2007.

HURT, R. H. Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue. Science Direct. USA: 2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. IARC. Chromium and chromium compounds. Chromium [VI] (Group 1). Metallic chromium and chromium [III] compounds (Group 3). Lyon, France: IARC; 1990. p. 49. Disponível em: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol49/mono49-6.pdf> Acesso em: 02/01/2014.

ISO - INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 6341**: water quality – Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test. ed 4, 22 p., USA, 2012.

_____. ISO 8692: water quality – Fresh water algal growth inhibition test whit *Scenedesmus subspicatus* and *Selenastrum capricornutum*. USA, 6 p, 1989.

_____. **ISO 10706**: Water quality – Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Geneva, ISO. 2000.

_____. **ISO 11348-3**: Water quality – Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) – Part 3: Method using freeze-dried prepared bacteria. USA: ISO, 2007.

_____. **ISO/TC 229**. Technical committees. Nanotechnologies.. International Organization for Standardization. 2005. Disponível em: http://www.iso.org/iso/home/standards_development/list_of_iso_technical_committees/iso_technical_committee.htm?commid=381983. Acessado em: agosto de 2014.

- _____. **ISO/TS 27687**. Nanotechnologies - Terminology and definitions for nano-objects -- Nanoparticle, nanofibre and nanoplate. 2008.
- _____. **ISO/TS 10867** Nanotechnologies - Characterization of single-wall carbon nanotubes using near infrared photoluminescence spectroscopy. 2010.
- _____. **ISO/TS 11251** Nanotechnologies - Characterization of volatile components in single-wall carbon nanotube samples using evolved gas analysis/gas chromatograph-mass spectrometry. 2010.
- _____. **ISO/TR 11360**. Nanotechnologies - Methodology for the classification and categorization of nanomaterials. 2010.
- _____. **ISO/TR 12802**. Nanotechnologies - Model taxonomic framework for use in developing vocabularies - Core concepts. 2010.
- _____. **ISO/TR 13014**. Nanotechnologies -- Guidance on physico-chemical characterization of engineered nanoscale materials for toxicologic assessment. 2012.
- _____. **ISO/TR 16197**. Nanotechnologies -- Compilation and description of toxicological screening methods for manufactured nanomaterials. 2014.
- JAMERS, A.; LENJOU, M.; DERAEDT, P.; VAN BOCKSTAELE, D.; BLUST, R.; DE COEN, W. Flow cytometric analysis of the cadmium-exposed green alga *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyceae). **Eur. J. Phycol.**, v. 44, p. 541-550, 2009.
- JI, Z.; JIN, X.; GEORGE, S.; XIA, T.; MENG, H.; WANG, X.; SUAREZ, E.; ZHANG, H.; HOEK, E.M.V.; GODWIN, H.; NEL, A.E.; ZINK, J.I. Dispersion and stability optimization of TiO₂ nanoparticles in cell culture media. **Environ Sci Technol**, v. 44, p. 7309-7314, 2010.
- JOMOVA, K. e VALKO, M. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. **Toxicology**. 2011, Vol. 283, p. 65-87.

- JOSHI, S.; GHOSH, I.; POKHREL, S.; MADLER, L.; NAU, W.M. Interactions of amino acids and polypeptides with metal oxide nanoparticles probed by fluorescent indicator adsorption and displacement, **ACS Nano**, v. 6, p. 5668–5679, 2012.
- JUNEAU, P.; POPOVIC, R. Evidence for the rapid phytotoxicity and environmental stress evaluation using the PAM Fluorometric Method: importance and future application. **Ecotoxicol.**, v.8, p. 449-455, 1999.
- KAMALUDEEN, S.P.; MEGHARAJ, M.; JUHASZ, A.L.; SETHUNATHAN, N.; NAIDU, R. Chromium–microorganism interactions in soil remediation implications. **Rev Environ Contam Toxicol**, v. 178, p.1076–1084, 2003.
- KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, Estonia, p. 105-119, 2009.
- KERGER, B.D.; PAUSTENBACH, D.J.; CORBETT, G.E.; FINLEY, B.L. Absorption and elimination of trivalent and hexavalent chromium in humans following ingestion of a bolus dose in drinking water. **Toxicol. Appl. Pharmacol.** v. 141, p. 145-158, 1996.
- KERKEB, L. & KRÄMER, U. The role of free histidine in xylem loading of nickel in *Alyssum lesbiacum* and *Brassica juncea*. **Plant Physiol.**, v. 131, p. 716–724, 2003.
- KERR, J. F. R.; WYLLIE, A. H.; DURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. **Br. J. Cancer**, n. 26, p. 239-257, 1972.
- KERR, J. F. R. Neglected opportunities in apoptosis research. **Trends Cell Biol.**, n. 5, p. 55-57, 1995.
- KHANGAROT, B.S.; RAY, P.K. Investigation of correlation between physicochemical properties of metals and their toxicity to the water flea *Daphnia magna* Straus, **Ecotoxicological Environmental Safety**, New York, v.18 p. 109-120, 1989.
- KITAJIMA, M. & BUTLER, W.L. Quenching of chlorophyll fluorescence and primary photochemistry in chloroplasts by

dibromothymoquinone, **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 376, n. 1, p. 105 – 115, 1975.

KITSUNAI, H.; HOKKIRIGAWA, K.; TSUMAKI, N.; KATO, K.
Transitions of microscopic wear mechanism for Cr₂O₃ ceramic coatings during repeated sliding observed in a scanning electron microscope tribosystem. **Wear**, v. 151, p. 279–289, 1991.

KLUGHAMMER, C.; SCHREIBER, U. Complementary PSII quantum yield calculated from simple fluorescence parameters measured by PAM fluorometry and saturation pulse method. **PAM Application Notes**, v.1, p. 27-35, 2008.

KNAAPEN, A.M.; BORM, P.J.A.; ALBRECHT, C.; SCHINS, R.P.F.
inhaled particles and lung cancer, part A: mechanisms. **International Journal of Cancer**, v. 109, n. 6, p. 799–809, 2004.

KNAUERT, S. & KNAUER, K. The role of reactive oxygen species in copper toxicity to two freshwater green algae. **Journal of Psychology**, v. 44, p. 311–319, 2008.

KNIE, J. L.W.; LOPES, E.W.B. **Testes Ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/ GTZ**, 288 p., 2004.

KOORNNEEF, M. Genetic aspects of abscisic acid. In **A Genetic Approach to Plant Biochemistry**, A.D. Blonstein and P.J. King, ed (New York: Springer-Verlag), p. 35-54, 1986.

KOOTEN, O. van & SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v. 25, n. 3, p. 147 – 150, 1990.

KOTA'S, J & STASICKA, Z. Chromium occurrence in the environmental and methods of its speciation. **Environ. Pollut.**, v. 107, p. 263, 2000.

KOUADIO, J. H.; DANOB, S. D.; MOUKHA S., MOBIO T. A. AND CREPPY E. E.: Effects of combinations of Fusarium mycotoxins on the inhibition of macromolecular synthesis, malondialdehyde levels, DNA methylation and fragmentation, and viability in Caco-2 cells. **Toxicon**, v. 49, n. 3, 2007, p. 306-317.

KOWALTOWSKI, A.J. VERCESI, A.E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radic. Biol. Med.**, New York, v. 26, p. 463 – 471, 1999.

KRALL, J.P. & EDWARDS, G.E. Relationship between photosystem II activity and CO₂ fixation. **Physiologia Plantarum**, v. 86, p. 180–187, 1992.

KRAMER, D.M.; JOHNSON, G.; KIIRATS, O.; EDWARDS, G.E. New fluorescence parameters for the determination of QA redox state and excitation energy fluxes. **Photosynthesis Research**, v.79, p.209-218, 2004.

KRAUSE, G.H. & WEIS, E. Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 42, p.313-349, 1991.

KÜLKAMP, I.C.; RABELO, B.D.; BERLITZ, S.J.; ISOPPO, M.; BIANCHIN, M.D.; SCHAFFAZICK, S.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S. Nanoencapsulation improves the in vitro antioxidant activity of lipoic acid. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, p. 598 - 607. 2011.

LALAU, C. M.; MOHEDANO, R.A.; SCHMIDT, E.C. ; BOUZON, Z.L. ; OURIQUES, L.C. ; DOS SANTOS, R.W. ; DA COSTA, C. H.; VICENTINI, D.S. ; MATIAS, W.G. . Toxicological effects of copper oxide nanoparticles on the growth rate, photosynthetic pigment content, and cell morphology of the duckweed *Landoltia punctata*. **Protoplasma**, v. 1, p. 1, 2014.

LEDFORD, H.K. & NIYOGI, K.K. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae, **Plant Cell Environ.**, v. 28, p. 1037–1045, 2005).

LEE, J.D. **Química Inorgânica não tão Concisa**. Editora Edgard Blücher LTDA. São Paulo, 494p, 2000.

LEITE, M. A. **Análise e Aporte da Taxa de Sedimentação e da Concentração de Metais na Água, Plânctons e Sedimentos do Reservatório de Salto Grande, Americana, SP**. Tese (Doutorado

em Ciências da Engenharia Ambiental), Universidade Federal de São Carlos, SP, 2002.

LENZ E SILVA, G.F.B. **Nanotecnologia: avaliação e análise dos possíveis impactos à saúde ocupacional e segurança do trabalhador no manuseio, síntese e incorporação de nanomateriais em compósitos refratários de matriz cerâmica.**

Monografia apresentada ao Curso de Especialização em Engenharia de Segurança do Trabalho, Escola de Engenharia da UFMG, Belo Horizonte, MG. 2008.

LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**, v. 4, p. 26–49, 2008.

LI, J.; OU, D.; ZHENG, L.; GAN, N.; SONG, L. Applicability of the fluorescein diacetate assay for metabolic activity measurement of *Microcystis aeruginosa* (Chroococcales, Cyanobacteria), **Phycol. Res.**, v. 59, p. 200-207, 2011.

LIBES, S.M. **An introduction to marine biogeochemistry.** John Wiley & Sons, 734 p, 1992.

LICHTENTHALER, H.K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, **Method Enzymol.**, v. 148, p. 350–383, 1987.

LIMBACH, L.K.; WICK, P.; MANSER, P.; GRASS, R.N.; BRUININK, A.; STARK, W.J. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. **Environ. Sci. Technol.**, v. 41, p. 4158-4163, 2007.

LIMA, Patrícia Carla Giloni de. **Estudos dos mecanismos de detoxificação e tolerância aos metais cromo e cobre em *Pseudokirchneriella subcapitata* e *Pistia stratiotes* e o uso das macrófitas *Typha sp* e *Phragmites sp* na remoção de nutrientes em wetlands construídos.** Tese (Doutorado), Programa de Pós Graduação em Ciências da Engenharia Ambiental, Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo, 2010.
Disponível em:

<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/18/18139/tde-01022011-142420/en.php>. Acesso em: junho de 2014.

LIN, Albert C. Regulating Nanotechnology, *Harvard Environmental Law, Review*, **Size Matters**, v. 31, issue 2, p. 349-408, 2007.

LIRA, R. A. (2011). **Estudo do rendimento de biomassa da microalga nativa *Chlorella* sp. Visando a obtenção de biocombustíveis**. Tese (Doutorado), Programa de Pós Graduação em Engenharia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2011. Disponível em: <http://alexandria.cpd.ufv.br:8000/teses/engenharia%20agricola/2011/238969f.pdf>. Acesso em: junho de 2012.

LISBOA-FILHO, P.N.; MONTEIRO, M.A. Análises da nanociência e nanotecnologia na Perspectiva de ciência, tecnologia e sociedade – CTS, **Revista de Física**, n. 46E, 2013.

LIVINGSTONE, D.R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms, **Mar Pollut Bull**, v. 42, p. 656–666, 2001.

LLOYD, D.R.; CARMICHAEL, P.L.; PHILLIPS, D.H. Comparison of the formation of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine and single- and double-strand breaks in DNA mediated by Fenton reactions. **Chem Res Toxicol**, v. 11, p. 420–427, 1998.

LOURO, H., BORGES, T. E SILVA, M.J. Nanomateriais manufacturados: novos desafios para a saúde pública (artigo de revisão), **Rev. Port. Saúde Pública**, v. 31, n. 2, p. 145–157, 2013.

LOSI, M.E.; AMRHEIN, C.; FRANKENBERGER Jr., W.T. Environmental biochemistry of chromium. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v.136, p. 91-121, 1994.

LUBICK, N. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles—or both? **Environ. Sci. Technol.**, v. 42, n. 23, p. 8617-8617, 2008.

LYON, D. Y.; ADAMS, L. K.; FALKNER, J. C.; ALVAREZ, P. J. J.; **Environ. Sci. Technol.**, v. 40, p. 4360, 2006.

- MAGALHÃES, D.P.; FILHO, A.S.F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecol. Bras.** v.12, n.3, p. 355-381, 2008.
- MAGENHEIM, B. e BENITA, S. Nanoparticle characterization: a comprehensive physicochemical approach. **STP Pharma Sciences**, v. 1, p. 221–241, 1991.
- MAKHLOUF, S.A., Magnetic properties of Cr₂O₃ nanoparticles, **J. Magn. Magn. Mater.** p. 272–276 (Part 2:1530–2), 2004.
- MALISKA, A. M. Microscopia eletrônica de varredura. Santa Catarina: Departamento de Engenharia Mecânica. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. 98p. Apostila.
- MALVERN INSTRUMENTS. Manual do usuário Zetasizer Nano Series. England Malvern Instruments, 2014. Disponível em: <http://www.malvern.com/br/Search.aspx?q=Zetasizer+Nano>manual>. Acessado em: 02 de agosto de 2014.
- MANKE, A.; WANG, L. & ROJANASAKUL, Y. Mechanisms of Nanoparticle-Induced Oxidative Stress and Toxicity (Review), **BioMed Research International**, v. 2013, 15 p., Article ID 942916, 2013.
- MARIANI, D. 2008. **Citotoxicidade e função do sistema de defesa antioxidante durante a exposição a cisplatina no modelo *Saccharomyces cerevisiae***. Dissertação (Mestrado em Bioquímica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Química, Programa de Pós-graduação em Bioquímica, Rio de Janeiro, 2008.
- MARIANO, L. C. **Estudo das Propriedades Elétricas do Compósito de Polianilina e Nanotubos de Carbono com Aplicação em Transistores de Efeito de Campo**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciências dos Materiais), Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Paraná, 2012.
- MARTINS, Clauren Moura. **Determinação das espécies de cromo nas cinzas da incineração de couro *wet-blue* em reatores de leito fixo e leito fluidizado**. 2001. Dissertação (Mestrado em Engenharia

Química), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001.

MASTERTON, W.L.; SLOWINSKI, E.J.; STANITSKI, C.L.

Princípios de Química. Editora Guanabara, 6ª edição, Rio de Janeiro, 681p. 1990.

MASSCHELEYN, P.H.; PARDUE, J.H.; DELAUNE, R.D.; PATRICK, W.H.Jr. Chromium Redox Chemistry in a Lower Mississippi Valley Bottomland Hardwood Wetland. **Environmental Science and Technology**, v. 26, p.1217-1226, 1992.

MATIAS, W.G. Etude des mecanismes moleculaire d'action de l'acide okadaïque, une toxine marine diarrheique, *in vivo* et *in vitro*. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Université de Bordeaux, Bordeaux, França. 1996.

MATIAS, W.G. & CREPPY, E. E. 5-Methyldeoxycytosina as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in Vero cells. **Environmental Toxicology and Water Quality**, Estados Unidos, v. 04, p. 83- 88, 1998a.

MATIAS, W.G., CREPPY, E.E. Lipoperoxidação induzida pelo Ácido Ocadaíco, uma toxina marinha. **Biotechnol. Ciên. Desenvolvimento**, v. 04, p. 40–44, 1998b.

MATIAS, W.G.; TREOE, A.; CREPPY, E. E. ; BONINI, M. . Oxygen reactive radicals production in cell culture by okadaic acid and their implication in protein synthesis inhibition. **Human & Experimental Toxicology**, Stockton Press, Basingstoke, v. 18, p. 634-639, 1999.

MATIAS, W. G.. Anotações de aula. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina. 2010.

McBRIDE, B.M. Environmental chemistry of soils. N. York: **Oxford University Press**, 466 p., 1994.

McTEER, J.; DEAN, A.P.; WHITE, K.N.; PITTMAN, J.K. Bioaccumulation of silver nanoparticles into *Daphnia magna* from a

freshwater algal diet and the impact of phosphate availability, **Nanotoxicology**, p. 1–12, 2014.

MEDEIROS, A. M. L.. **Síntese e Caracterização de Nanopartículas de Cr₂O₃ através do Método Sol-Gel Protéico**. Dissertação (Mestrado), Curso de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Materiais, Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza (Ceará), 2007.

MERTZ, W. Chromium occurrence and function in biological systems. **Physiological Reviews**. v. 42. n. 2, p. 163-238, 1969.

METCALF, L & EDDY, H. P., 2003. **Wastewater engineering: Treatment and reuse**. 4^a ed., editora. McGraw Hill College, New York, 2003.

MELEGARI, S. P. **Estudo do mecanismo de ação tóxica da saxitoxina e avaliação de sua adsorção em materiais alternativos para aplicação em sistemas de tratamento de água**. 2010. 205p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental), Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MELEGARI, S.P.; PERREAULT, F. ; CREPPY, E. E. ; MATIAS, W. G. ; MOUKHA, S.; POPOVIC, R. Induction to oxidative stress by saxitoxin investigated through lipid peroxidation in Neuro 2A cells and *Chlamydomonas reinhardtii* alga. **Chemosphere** (Oxford), v. 1, p. 1-10, 2012.

MELEGARI, S.P.; PERREAULT, F.; RIBEIRO DA COSTA, R.H.; POPOVIC, R. ; MATIAS, W.G. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 142, p. 431-440, 2013.

MILLAR, D.S., HOLLIDAY, R., GRIGG, G.W. Five not four: history and significance of the fifth base. In: *The Epigenome, Molecular Hide and Seek*. Beck, S., Olek, A. (Eds.), Wiley–VCH Verlag GmbH Co. KGaA, Weinheim, 3–20, 2003.

MILACIC, R.; STUPAR, J. Fractionation and oxidation of chromium in tannery waste-and sewage sludge-amended soils. **Environmental Science and Technology**, v.29, n.2, p.506-514, 1995.

MØLLER, P.; WALLIN, H. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product, **Mutat. Res.**, v. 410, p. 271–290, 1998.

MONSERRAT, J. M. Resíduos de Nanotoxicologia. **XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia – ECOTOX**, Bombinhas (SC), Brasil, setembro/2010.

MOORE, M.N. Biocomplexity: the post-genome challenge in ecotoxicology, **Aquat Toxicol**, v. 59, p. 1–15, 2002.

MOORE, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environmental International**, v. 32, p. 967-976, 2006.

MOREIRA, Eliane Cristina P. **Nanotecnologia e Regulação: as inter-relações entre o Direito e as ciências**. In: MARTINS, Paulo Roberto (Org.). Nanotecnologia, sociedade e meio ambiente. São Paulo: Xamã, 2006. p. 309-313.

MORTIMER, M.; KASEMETS, K.; HEINLAAN, M.; KURVET, I. e KAHRU, A. High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles. **Toxicology In Vitro**, Tallinn, p. 1412-1417, 2008.

MORO, Carlo Frederico. **Comportamento do peptídeo entomotóxico Jaburetox-2Ec em solução e a sua interação com lipossomas miméticos de plaquetas humanas**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

- MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly(d,l-lactide) nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **J. Pharm. Sci.**, v. 89, p. 614-626, 2000.
- NANOREG - Uma abordagem europeia comum para os testes regulamentares dos nanomateriais manufacturados. Disponível em: <http://www.nanoreg.eu/>. Acesso em: 01 setembro 2014.
- NANJWADE, B. K.; BECHRA, H.M.; DERKAR, G.K.; MANVI, F.V.; NANJWADE, V.K. Dendrimers: Emerging polymers for drug-delivery systems, **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 185-196, 2009.
- NAVARRO, E.; BAUN, A.; BEHRA, R.; HARTMANN, N.B.; FILSER, J.; MIAO, A.-J.; QUIGG, A.; SANTSCHI, P.H.; SIGG, L. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 372-386, 2008a.
- NAVARRO, E.; PICCAPIETRA, F.; WAGNER, B.; KÄGI, R.; ODZAK, N.; SIGG, L.; BEHRA, R.. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environ. Sci. Technol.** V. 42, p. 8959-8964, 2008b.
- NEALSON, K.H.; HASTINGS, J.W. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. **Microbiol Rev.**, v. 43, n. 4, p. 496-518, 1979.
- NEL, A.; XIA, T.; MÄDLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanoscale level. **Science**, v. 311, p. 622-627, 2006.
- NELLESEN, J. E.; FLETCHER, J. S. Assessment of published literature on the uptake, accumulation and translocation of heavy metals by vascular plants. **Chemosphere**, Oxford, v. 27, p. 1669-1680, 1993
- NEWMAN, M.C.; ZHAO, Y. Ecotoxicology nomenclature: LC, LD, LOC, LOEC, MAC. In: Jorgensen, S.E., Fath, B. (Eds.), **Encyclopedia of Ecology**. Elsevier, pp. 1187-1193, 2008.

- NGÔ, Christian; VAN DE VOORDE, Marcel H. Nanomaterials in Industrial Application. In: **Nanotechnology in a Nutshell**. Atlantis Press, p. 393-402, 2014.
- NGUYEN, L. T. H.; JANSSEN, C. R.; VOLCKAERT, F. A. M. Susceptibility of embryonic and larval African catfish (*Clarias gariepinus*) to toxicants. **Bull. Environ. Contam. Toxicol.**, v. 62, p. 230-237, 1999.
- NISHIYAMA, Y.; ALLAKHVERDIEV, S.I.; MURATA, N. A new paradigm for the action of reactive oxygen species in the photoinhibition of photosystem II, **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1757, p. 742–749, 2006.
- OAKES, K.D., Van DER KRAAK, G.J. Utility of the TBARS assay in detecting oxidative stress in white sucker (*Catostomus commersoni*) populations exposed to pulp mill effluent. **Aquat. Toxicol.**, v. 63, p. 447-463, 2003.
- OBERDÖRSTER G; FERIN, J.; GELEIN, R.; SODERHOLM, S.C.; FINKELSTEIN, J. Role of the alveolar macrophage in lung injury: studies with ultrafine particles. **Environ Health Perspect**, v. 97, p.193–197, 1992.
- OBERDÖRSTER, E. Manufactured Nanomaterials (Fullerenes, C60) Induce Oxidative Stress in the Brain of Juvenile Largemouth Bass, **Environmental Health Perspectives**, v. 112, n. 10, p. 1058 – 1062, 2004a.
- OBERDÖRSTER, G.; SHARP, Z.; ATUDOREI, V.; ELDER, A.; GELEIN, R.; KREYLING, W.; et al. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. **Inhal Toxicol.** V. 46, p. 437 – 445, 2004b.
- OBERDÖRSTER, Gunter; OBEDÖRSTER, Eva; OBEDÖRSTER Jan. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**, New York, v.113, n.7, p.823-839. 2005.

- O'BRIEN, T.P. & MCCULLY, M.E.. The study of plant structure principles and selected methods. **Termarcaphi Pty. Ltda**, Melbourne, 357 p., 1981.
- ODUM, Eugene P. & BARRETT, Gary. W. **Fundamentos de ecologia**. 5° edição. São Paulo, Thomson Learning, 2007.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development) 207, Earthworm, Acute Toxicity Tests, Guideline for Testing of Chemicals, P.1-9, 1984.
- OGA, S.; DE SIQUEIRA, M.E.P.B. **Introdução à Toxicologia**. In: OGA, S. (org.) Fundamentos da Toxicologia. Editora Atheneu. 2ª edição. São Paulo-SP. p.3-12. 2003.
- OHLWEILER, O.A., **Química Inorgânica**, vol. II, Ed. Edgard Blücher LTDA, São Paulo-SP, 1973.
- OLIVEIRA, A.G.; CARVALHO, R.P.; WALDENMAIER, H.E; STEVANI, C.V. Bioluminescência de fungos: distribuição, função e mecanismo de emissão de luz, **Quím. Nova**, v. 36, n. 2, p. 314 – 319, 2013.
- ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DO TRABALHO – OIT. **Riesgos emergentes y nuevos modelos de prevención en un mundo de trabajo en transformación**. 2010, Genebra. Disponível em: http://www.ilo.org/wcmsp5/groups/public/---ed_protect/---protrav/---safework/documents/publication/wcms_124341.pdf. Acesso em: 09/08/2012.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Risk Management.
- ORTEGA, F. S.; PANDOLFELLI, V. C.; RODRIGUES, J. A.; SOUZA, D. P. F. de. Aspectos da Reologia e Estabilidade de Suspensões Cerâmicas. Parte II: Mecanismos de Estabilidade Eletrostática e Estérica, **Cerâmica** 43,v. 280, p. 77-83, 1997.
- ORTEGA, R.; FAYARD, B.; SALOMÉ, M.; DVÈS, G.; SUSINI, J. Chromium oxidation state imaging in mammalian cells exposed in

vitro to soluble or particulate chromate compounds, **Chem. Res. Toxicol.**, v. 18, p. 1512 – 1519, 2005.

OXBOROYGH, K., BAKER, N.R. Resolving chlorophyll a fluorescence images of photosynthetic efficiency into photochemical and non-photochemical components – calculation of qP and Fv/Fm; without measuring F₀, **Photosynthesis Research**, v. 54, n.2, p. 135 – 142, 1997.

PAIVA, L.B.; OLIVEIRA, J.G.; AZEVEDO, R.A.; RIBEIRO, D.R.; SILVA, M.G; VITÓRIA, A.P. Ecophysiological responses of water hyacinth exposed to Cr³⁺ and Cr⁶⁺, **Environmental and Experimental Botany**, v. 65, p. 403–409, 2009.

PANDA, S.K. & CHOUDHURY, S. Chromium stress in plants. **Braz. Soc. Plant. Physiol.**, v. 17, p. 95 – 102, 2005.

PARK, E.J.; YI, J.; KIM, Y.; CHOI, K.; PARK, K. Silver nanoparticles induce cytotoxicity by a Trojan-horse type mechanism, **Toxicol In Vitro**, v. 24), p. 872–878, 2010.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. Revista virtual **Química Nova** v.33, nº.2. São Paulo. 2010. Disponível em: www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422010000200033&script=sci_arttext. Acesso em: 16 agosto 2010.

PATNAIK, P. **Handbook of inorganic chemicals**, ISBN 0-07-049439-8, McGraw-Hill Companies, New York, 1086 p., 2002.

PENNYCOOK, S. J.; LUPINI, A. R.; VARELA, M.; BORISEVICH, A. Y.; PENG, Y.; OXLEY, M. P.; VAN BENTHEM, K.; CHISHOLM, M. F., 2007. Scanning transmission electron microscopy for nanostructure characterization. In: Zhou W and Wang Z L (eds.), Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications, pp. 152–191, **Springer**, New York.

PEREIRA, M.; BARTOLOMÉ, M.C.; SÁNCHEZ-FORTÚN, S. Bioadsorption and bioaccumulation of chromium trivalent in Cr(III)-

tolerant microalgae: A mechanisms for chromium resistance, **Chemosphere**, v. 93, n. 6, p. 1057 – 1063, 2013.

PERKEL, J.M. Nanoscience is out of the bottle, **The Scientist**, v. 17, n. 15, p. 20–23, 2004.

PERREAULT, F.; AIT ALI, N.; SAISON, C.; POPOVIC, R.; JUNEAU, P. Dichromate effect on energy dissipation of photosystem II and photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Journal Photochem Photobiology**. V. 96,p. 24–29, 2009.

PERREAULT, F.; OUKARROUM, A.; PIRASTRU, L.; SIROIS, L.; MATIAS, W. G.; RADOVAN, P. Evaluation of Copper Oxide Nanoparticles Toxicity Using Chlorophyll α Fluorescence Imaging in *Lemna gibba*. **Journal of Botany**, v. 2010, 9 p. 2010.

PERREAULT, F.; SELEME-MATIAS, M.; MELEGARI, S. P.; CARVALHO-PINTO, C. R. S.; CREPPY, E. E.; POPOVIC, R.; MATIAS, W. G. Investigation of animal and algal bioassays for reliable saxitoxin ecotoxicity and cytotoxicity risk evaluation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p. 1021-1026, 2011.

PERREAULT, F.; MELEGARI, S. P.; HENNING DA COSTA, C.; ROSSETTO, A. L. O. F.; POPOVIC, R, MATIAS, W. G. Genotoxic effects of copper oxide nanoparticles in Neuro 2A cell cultures. **Science of the Total Environmental**, v. 441, p. 117–124, 2012(a).

PERREAULT, F., OUKARROUM, A., MELEGARI, S.P., MATIAS, W.G., POPOVIC, R.. Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Chemosphere**, v. 87, 1388–1394.2012(b).

PERREAULT, F.; MELEGARI, S.P.; FUZINATTO, C.F.; BOGDAN, N.; MORIN, M.; POPOVIC, R.; MATIAS, W.G. Toxicity of pamam-coated gold nanoparticles in different unicellular models. **Environmental Toxicology** (Print), v. 29, p. 328-336, 2014a.

PERREAULT, F.; POPOVIC, R.; DEWEZ, D. Different toxicity mechanisms between bare and polymer-coated copper oxide

- nanoparticles in *Lemna gibba*. **Environmental Pollution**, v. 185, p. 219 – 227, 2014b.
- PETKOVIĆ, J.; ŽEGURA, B.; MAGDALENA, S.; DRNOVŠEK, N.; USKOKOVIĆ, D.; NOVAK, S.; & FILIPIČ, M. DNA damage and alterations in expression of DNA damage responsive genes induced by TiO₂ nanoparticles in human hepatoma HepG2 cells, **Nanotoxicology**, v. 5, n. 3 , p. 341-353, 2011.
- PETTINE, M.; MILLERO, F.J.; LaNOCE, T. Chromium (III) Interactions in Seawater through its Oxidation Kinetics. **Marine Chemistry**, v.34, p. 29-46, 1991.
- PETTINE, M.; CAMUSSO, M.; MARTINOTTI, W. Dissolved and Particulate Transport of Arsenic and Chromium on the Po River (Italy). **Science of The Total Environment**, v. 119, p. 253-280, 1992.
- PLETIKAPIĆ, G.; ZUTIĆ, V.; VRČEK, I. V.; SVETLIČIĆ, V. Atomic force microscopy characterization of silver nanoparticles interactions with marine diatom cells and extracellular polymeric substance. **J. Mol. Recognit.**, v. 25, p. 309–317, 2012.
- POGSON, B.J.; RISSLER, H.M. Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis and Photoprotection, **Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol Sci**, v. 355, p. 1395 – 1403.
- PONZIO, E. A. 2006. **Nanocompósitos de Blendas Poliméricas Condutoras e Óxidos de Metais de Transição**. Tese (Doutorado em Química), Instituto de Química de São Paulo, Universidade de São Paulo, 2006.
- PORTAL BRASIL. Sítio de Notícias em Ciência e Tecnologia. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/ciencia-e-tecnologia/2014/08/comite-de-nanotecnologia-aprova-adesao-do-brasil-ao-nanoreg>. Acesso em: 29 setembro 2014.
- POTGIETER, S.S; PANICHEV, N.; POTGIETER, J.H; PANICHEVA, S. Determination of hexavalent chromium in the South African cements and cement-related materials with electrothermal atomic

absorption spectrometry. **Cem. Concr. Res.**, v. 33, p. 1589-1593, 2003.

PRADIER, C.M.; RODRIGUES, F.; MARCUS, P.; LANDAU, M.; KALIYA, M.L.; HERSKOWITZ, M.; GUTMAN, A. Supported chromia catalysts for oxidation of organic compounds the state of chromia phase and catalytic performance, **Applied Catalysis B:Environmental**, v. 27, p. 73 – 85, 2000.

PROCTOR, D.M.; THOMPSON, C.M.; SUH, M.; HARRIS, M.A. A response to “A quantitative assessment of the carcinogenicity of hexavalent chromium by the oral route and its relevance to human exposure”. **Environ Res.**, v. 111, p. 468–70, 2011.

PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES,
Nanotechnology Consumer Product Inventory. Washington, DC. 2014. Disponível em: <http://www.nanotechproject.org/cpi/>. Acesso em: 22 setembro 2014.

RAMOS, Aline dos Santos; EGLER, Silvia Gonçalves & CASTILHOS, Zuleica Carmen. **Implantação do Laboratório de Ecotoxicologia Aplicada à Indústria Mínero-metalúrgica (LECOMIN) do CETEM**. Anais da I Jornada do Programa de Capacitação Interna – CETEM. 2006.

RAND, G.M. Fish toxicity studies. In: GIULIO, R.T.D.; HINTON, D.E. The Toxicology of Fishes. **CRC Press**, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, p. 659-682, 2008.

RAND, G.M. & PETROCELLI, S.R. **Fundamentals of aquatic Toxicology**. Washington, Publinshing. Hemisphere, 1985. 665 p.

RAND, G. M.; WELLS, P. G.; McCARTY, L. S. Em **Fundamentals of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate, and Risk Assessment**; Rand, G. M., ed.; 2nd ed., Taylor & Francis: Washington, cap. 1, 1995.

RAZZINO, Cláudia do Amaral. **ELETROQUÍMICA DO CITOCROMO C EM FILME NANOESTRUTURADO “DENDRÍMERO-PT” ATIVADO**. 2013. 102f. Tese (Doutorado),

Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos/SP, 2013

READER, S.; MARION, M.; DENIZEAU, F., 1993. Flow cytometric analysis of the effects of tri-n-butyltin chloride on cytosolic free calcium and thiol levels in isolated rainbow trout hepatocytes. **Toxicology**. 80:117– 129.

REGEL, R.H; FERRIS, J.M.; GANF, G. G.; BROOKES, J. D. Algal esterase activity as a bioassay of environmental degradation in a freshwater creek. **Aquatic Toxicology**, v. 59, p. 209-223, 2002.

REIMER, L., 1997. Transmission Electron Microscopy. 4 ed., **Springer Verlag**, Berlin, 1997.

RIBO, J.M. Interlaboratory comparison studies of the luminescent bacteria toxicity bioassay, **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 12, n. 4, p. 283-294, 1997.

RIBOLDI, B.R. **Nanotecnologia: fundamentos e aplicações**. Rio Claro, Departamento de Física/ Instituto de GeoCiência Exatas (UNESP), 2009. 22p.

RICHARD, Françoise C.; BOURG, Alain C.M. Aqueous geochemistry of chromium: A review. **Water Research**, v. 25, p. 807-816. 1991.

RODEA-PALOMARES, I.; BOLTES, K.; FERNANDEZ-PINAS, F.; LEGANES, F.; GARCIA-CALVO, E.; SANTIAGO, J.; ROSAL, R.. Physicochemical characterization and ecotoxicological assessment of CeO₂ nanoparticles using two aquatic microorganisms, **Toxicol. Sci.**, 119, p. 135–145, 2011.

RODRIGUES, M. L. **Ordem, distribuição e mobilidade potencial de metais pesados em ambientes fluvial impactado por cortumes**. 2007. 255f. Tese (Doutorado), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

RODRÍGUEZ, F.M.; MARTÍN, B.J.C.; VARGASMACHUCA, R.N.; ROVESTI, L. **Lombricultura: manual práctico**. Ciudad de La Habana. 2003. 99p.

- ROHACEK, K. & BARTAK, M. Technique of the modulated chlorophyll fluorescence: basic concepts, useful parameters, and some applications, **Photosynthetica**, vol. 37, n. 3, p. 339–363, 1999.
- RONCO, A.; BÁEZ, M.C.D.; GRANADOS, Y.P. **Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas: CONCEPTOS GENERALES**. Editado por MORALES, G.C., Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo: Ottawa, cap. 1, 2004.
- ROSSETTO, ANA LETÍCIA DE O.F. **Estudo comparativo entre os efeitos tóxicos agudos e crônicos do óxido de cobre na forma de nanopartícula e micropartícula**. Dissertação (Mestrado), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- ROSSETTO, A.L.O.F. ; VICENTINI, D.S. ; COSTA, C.H. ; MELEGARI, S.P. ; MATIAS, W.G. . Synthesis, characterization and toxicological evaluation of a core-shell copper oxide/polyaniline nanocomposite. **Chemosphere** (Oxford), v. 108, p. 107-114, 2014a.
- ROSSETTO, A. L. O.F. ; MELEGARI, S. P.; OURIQUES, L.C. ; MATIAS, W.G. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. **Science of the Total Environment**, v. 490, p. 807-814, 2014b.
- SABYASACHI, S.; MAJUMDAR, S.; GIRI, S. Nanocrystallite interface effect and exchange bias phenomenology in Cr₂O₃ and NiO nanoparticles, **Solid State Commun**, v. 151, p. 1515–1519, 2011.
- SALEH, F.Y.; PARKERTON, T.F.; LEWIS, R.V. et al.. Kinetics of chromium transformations in the environment. **Sci Total Environ**, v. 86, p. 25-41, 1989.
- SANT'ANNA, José P. Nanotecnologia minúsculas partículas, grandes negócios. **Química e Derivados**, ed. 443, São Paulo, dezembro de 2005.

- SANTOS, R.M.S.; SANTOS, M.F.; COSTA, M.F.D. Revisão: quimioluminescência e bioluminescência. **Quím. Nova**, v.16, p.200-209, 1993.
- SANTULLI, A.C.; FEYGENSON, M.; CAMINO, F.E.; ARONSON, M.C.; WONG, S.S. Synthesis and characterization of one-dimensional Cr₂O₃ nanostructures. **Chem Mater**, v. 23, p. 1000 – 1008, 2011.
- SAISON, C.; PERREAULT, F.; DAIGLE, J.C.; FORTIN, C.; CLAVERIE, J.; MORIN, M.; POPOVIC, R.. 2009. Effect of core-shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**. v.96, p. 109–114, out/2009.
- SAUER, U.G.; VOGEL, S.; AUMANN, A.; et al. Applicability of rat precision-cut lung slices in evaluating nanomaterial cytotoxicity, apoptosis, oxidative stress, and inflammation, **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 276, Issue 1, p. 1 – 20, 2013.
- SCAPIN, M. A., 2003. **Aplicação da Difração e Fluorescência de Raios X (WDXRF): Ensaio em Argilominerais**. Dissertação (Mestrado em Ciências), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2003.
- SCHIEDECK, G. et al.. Uso do leite como estimulante da reprodução de minhocas. Congresso Brasileiro de Agroecologia, 3., Florianópolis: Empasc, 2005.
- SCHLEH, C. et al. Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in secondary target organs after oral administration. **Nanotoxicolog**, v. 6, p. 36–46, 2012.
- SCHMIDT, É.C.; ROVER, T.; SCARIOT, L.; 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. **Micron**, v. 40, p. 860–869, 2009.

- 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.; et al. Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales), **Protoplasma**, v. 249, p. 353–367, 2012.
- SCHMÜGER, M.E.V., 2001. **Phytochelatin: Complexation of Metals and Metalloids, Studies on the Phytochelatin Synthase**, Tese (Doutorado), Munich University of Technology (TUM), Munich, Germany, 2001.
- SCHREIBER, U.; SCHLIWA, U.; BILGER, W. Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer. **Photosynthesis Research**, v. 10, n. 1, p. 51 – 62, 1986.
- SEATON, A.; TRAN, L.; AITKEN, R. DONALDSON, K. Nanoparticles, human health hazard and regulation - Review, **J. R. Soc. Interface**, v. 7, p. S119–S129, 2010.
- SHAN, X.; AW, T.Y.; JONES, D.P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Ther**, v. 47, p. 61-71, 1990.
- SHAW, I. C.; CHADWICK, J.; **Principles of Environmental Toxicology**, Taylor & Francis: Philadelphia, 216 p., 1998.
- SHRIVASTAVA, R.; UPRETI, R.K.; SETH, P.K.; CHATURVEDI, U.C Effects of chromium on the immune system. **FEMS Immunol. Med. Microbiol.**, v. 34, p. 1-7, 2002.
- SILVA, C. S.; PEDROZO, M. F. M. **Ecotoxilogia do Cromo e seus Compostos. Centro de Recursos Ambientais-** Caderno de Referência Ambiental, v. 5, 2001.
- SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. **Genética toxicológica.** Porto Alegre: Alcance, 424p., 2003.

- SIMS, R.W.; GERARD, B.M. Earthworms. London: FSC, 1999. 169p.
- SMITAL, T.; TERZIĆ, S.; LONČAR, J.; SENTA, I.; ŽAJA, R.;
POPOVIĆ, M. et al. Prioritisation of organic contaminants in a
river basin using chemical analyses and bioassays, **Environ Sci
Pollut Res**, v. 20, p. 1384 – 1395, 2013.
- SOUZA, M.L.R.; MARTINS, M.L.; SANTOS, J.M. Microscopia
eletrônica de varredura de parasitos branquiais de *Piaractus
mesopotamicus* Holmberg, 1887 cultivados no Estado de São
Paulo, Brasil, **Acta Scientiarum**, v. 22, n. 2, p. 527-531, 2000.
- SRINIVAS, A.; JAGANMOHAN RAO, P.; SELVAM, G.;
BALAKRISHNA MURTHY, P.; NEELAKANTA REDDY, P.
Acute inhalation toxicity of cerium oxide nanoparticles in rats,
Toxicology Letters, v. 205, Issue 2, p. 105–115, 2011.
- SRIVASTAVA N.; GONUGUNTA V.K.; PULI M.R.;
RAGHAVENDRA A.S. Nitric oxide production occurs downstream
of reactive oxygen species in guard cells during stomatal closure
induced by chitosan in abaxial epidermis of *Pisum sativum*.
Planta.v. 229, n. 4, p. 757- 765, 2009.
- SISINNO, Cristina Lúcia Silveira. **Uso de ensaios ecotoxicológicos
com organismos aquáticos e do solo para avaliar a toxicidade de
amostras de solos contaminados e resíduos sólidos**. Proposta de
projeto de pesquisa da FIOCRUZ, Rio de Janeiro. 2003.
- SMITH, C. J.; SHAWN, B. J.; HANDY, R. D.; **Aquatic Toxicology**, v.
82, p. 94, 2007.
- SPURR, A. R. 1969. A low viscosity epoxy resin-embedding medium
for electron microscopy. **Journal Ultrastructure Research**, 26: 31-
43.
- STANDEVEN, A.M.; WETTERHAHN, K.E. Is there a reactive oxygen
species in the mechanism of chromium (VI) carcinogenesis? **Chem.
Res. Toxicol.**, v. 4; p. 616 – 625, 1991.

- STRASSER, R.J., SRIVASTAVA, A., TSIMILLI- MICHAEL, M.,
Analysis of the chlorophyll a fluorescence transient. In:
PAPAGEORGIOU, G., Govindjee (Eds.), Chlorophyll Fluorescence
a Signature of Photosynthesis, Advances in Photosynthesis and
Respiration. **Kluwer Academic Publishers**, The Netherlands,
p.321–362, 2004.
- SUSSULINI, A.; ARRUDA, M. A. Z. Determinação de cromo (VI) por
espectrometria de absorção atômica com chama após a extração e
pré- concentração no ponto nuvem. **Eclética Química**. Campinas,
vol. 31, n.1, p. 73-80, 2006.
- TAVARES, K.P.; CALOTO-OLIVEIRA, Á.; VICENTINI, D.S.;
MELEGARI, S.P.; MATIAS, W.G.; BARBOSA, S.; KUMMROW,
F. Acute toxicity of copper and chromium oxide nanoparticles to
Daphnia similis, **Ecotoxicol. Environ. Contam.**, v. 9, n. 1, p. , 43-
50, 2014.
- TERRA, N. R.; FEIDEN, I. R. Reproduction and survival of *Daphnia
magna* Straus, 1820 (Crustacea: Cladocera) under different hardness
conditions. **Acta Limnologica Brasilis**, v.15, n.2, p. 51-55. 2003.
- TERRY, N. An analysis of the growth responses of *Beta vulgaris* L. to
phototoxic trace elements. II. Chromium. Final report to the
Kearney Found. of Soil Sci., 1981.
- THORNER, J.P. Biochemical characterization and structure of
pigment-proteins of photosynthetic organisms. In: STAEHELIN,
C.J.; ARNTZEN, C.J., Encyclopedia of plant physiology:
photosynthesis III; photosynthetic membranes and light harvesting
systems. Berlin: **Springer-Verlag**, cap. 19, p. 98 – 142, 1996.
- TOBIA, D.; WINKLER, E.L.; ZYSLER, R.D.; GRANADA, M.;
TROIANI, H.E. Superparamagnetism in AFM Cr₂O₃ nanoparticles,
J. Alloys Compd., v. 495, p. 520–523, 2010.
- TONIOLO, J. C. 2009. **Influência da Razão Combustível – Oxidante
nas Características de Óxidos Nanoestruturados Sintetizados por
Combustão em Solução**. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia
dos Materiais). Programa de Pós-graduação em Engenharia de

Minas, Metalúrgica e de Materiais, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

TRAVERSO, T., MENINI, S., MAINERI, E.P., PATRIARCA, S., ODETTI, P., COTTALASSO, D., MARINARI, U.M., PRONZATO, M.A. Malondialdehyde, a lipoperoxidation-derived aldehyde, can bring about secondary oxidative damage to proteins. **J. Gerontol. A-Bio.**, v. 59. n. 9, p. 890-895, 2004.

TRINDADE, T. & MANUEL, R. 2006. **Protocolo Experimental - Ensaio de Tratabilidade em Águas Residuais (Tratamentos Físico-Químicos: Coagulação/Floculação)**. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, Departamento de Engenharia Química. Setembro/2006. Disponível em: http://pwp.net.ipl.pt/deq.isel/teodoro/li6c2006b/pdf/li6c_floculacao.pdf. Acesso em: 14 de julho de 2012.

TROCHE, KARLA SOUZA. 2007. **Estudo estrutural e eletrônico de fulerenos e diamondóides encapsulados em nanotubos de carbono**. Tese (doutorado) em Física. Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Física “Gleb Wataghin”. Campinas, SP.

TRUHAUT, R. Eco-toxicology—objectives, principles and perspectives. **Ecotoxicol. Environ. Saf.** 1, 151–173, 1977.

TSOU, T. C. e YANG, J. L. Formation of reactive oxygen species and DNA strand breakage during interactions of chromium(III) and hydrogen peroxide *in vitro*: evidence for a chromium(III)-mediated Fenton-like reaction. **Chemico-Biological Interactions**. 1996, vol. 102, p. 133-153.

UMBUZEIRO, G. de A.; ROGRIGUES, P. F. **O teste de toxicidade com bactérias luminescentes e o Controle da Poluição**. Informativo técnico. Ambiente técnico – CRF/CETESB ano 4 n° 007, junho, 2004.

UHM, J.H.; SHIN, M.Y.; ZHIDONG, J.; CHUNG, J.S. Selective Oxidation of H₂S to Elemental Sulfur over Chromium Oxide Catalysts. *Applied Catalysis B: Environmental*, v. 22, p. 293-303, 1999.

- USEPA - UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms**: EPA 821-R-02-013. 4th ed. Washington, USA: EPA, 2002.
- _____. **EMSL Cincinnati Dunnet Software version 1.5**. Disponível em: <http://www.epa.gov/nerleerd/stat2.htm#dunnett> EPA, 2008. Acesso em: 07 abril 2010.
- _____. **Volunteer Stream Monitoring: A Methods Manual**: EPA 841-B-97-003. Washington, USA: EPA, 1997. Disponível em <http://www.epa.gov/volunteer/stream/index.html>> Acesso em: 15 dezembro 2010.
- _____. **Appendix A to Part 423-126 Priority Pollutants**. Washington, DC. (e-CFR Electronic Code of regulations). Disponível em: <http://water.epa.gov/scitech/methods/cwa/pollutants.cfm>. Acesso em: 01 julho 2014.
- UTEX The Culture Collection of Algae. Disponível em: <http://www.sbs.utexas.edu/utex/algaeDetail.aspx?algaeID=2630>. Acesso em: 18 setembro 2012.
- VANKOOTEN, O.; SNEL, J.F.H. The use of chlorophyll fluorescence nomenclature in plant stress physiology. **Photosynthesis Research**, v. 25, n.3, p. 147 – 150, 1990.
- VAN MEERBEEK, B.; VARGAS, M.; INOUE, S.; YOSHIDA, Y; PERDIGÃO, J. LAMBRECHTS, P.; VANHERLE, G. Microscopy investigations: Techniques, results, limitations. **American Journal Dentistry**, 2000.
- VAN VLACK, L. H. **Princípio de ciência dos materiais**. Edgar Blucher, 1984.
- VALKO, M.; RHODES, C.J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chem Biol Interact**. v. 160, p. 1-40. 2006.

- VENANCIO, J.B. **MECANISMO DE TOLERÂNCIA AO CROMO DE *Eichhornia crassipes* (Mart.) Solms: CAPACIDADE DE ACUMULAÇÃO DO METAL, EFEITOS SOBRE A FOTOSSÍNTESE E MODULAÇÃO DAS BOMBAS DE H⁺**. 2009. Tese (Mestrado), Centro de Biociências e Biotecnologia, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, RJ, 2009.
- VESARATCHANON, S.; NIKOLOV, A.; WASAN, D.T. Sedimentation in nano-colloidal dispersions: effects of collective inter actions and particle charge. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 134–35, p. 268–278, 2007.
- VIGNATI, D.A.; DOMINIK, J.; BEYE, M.L.; PETTINE, M.; FERRARI, B.J. Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: a paradigm to revise? *Ecotoxicology and Environmental Safety* v. 73, p.743-749, 2010.
- VOGEL, A. I., **Química Analítica Qualitativa**. São Paulo: Mestre Jou, 665 p. 1981.
- VOGEL, A. I. **Análise Inorgânica Qualitativo**. Editora Guanabara Koogan S.A, 5ª edição, Rio de Janeiro. 1992.
- VOLLATH, D.; SZABÓ, D.V.; WILLIS, J.O. Magnetic properties of nanocrystalline Cr₂O₃ synthesized in a microwave plasma, **Mater. Lett.** v. 29, p. 271–279, 1996.
- WANG, C.; MARTIN, D.F.; MARTIN, B.B.; J. **Environ. Sci. Health**, v. 34, n. 3, p. 705 - 719. 1999.
- WANG, Z.; LI, J; ZHAO, J.; XING, B. Toxicity and internalization of CuO nanoparticles to prokaryotic alga *Microcystis aeruginosa* as affected by dissolved organic matter, **Environ. Sci. Technol.**, v.45, p. 6032 – 6040, 2011.
- WANG, T-G.; JEONG, D.; LIU, Y.; WANG, Q.; IYENGAR, S.; MELIN, S.; KIM, K. H. Study on nanocrystalline Cr₂O₃ films deposited by arc ion plating: II. mechanical and tribological properties. **Surface and Coatings Technology**, v. 206, p. 2638 – 2644, 2012.

- WAN, H.; WILLIAMS, R. L.; DOHERTY, P. J.; WILLIAMS, D. F.
Cytotoxicity evaluation of Kevlar and silicon carbide by MTT assay. **Journal of Material Science: Materials in Medicine.**, v.5, p.411-415, 1994.
- WEBER, C. I. **Method for measuring the acute toxicity of effluents and receiving water to freshwater and marina organisms.**
Cincinnati, Ohio: EPA, 253 p. 1993.
- WHITESIDES, G. M. Nanoscience, Nanotechnology, and Chemistry, **Small**, v. 1, p. 172–179, 2005. doi: 10.1002/smll.200400130, 20.
- WHO, TASK GROUP ON CHROMIUM (Organização Mundial do Trabalho). **Environmental health criteria 61. Chromium.**
Geneva, 1988. Disponível em:
<http://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc61.htm>>. Acesso em: 18 fev. 2014.
- WILCZEWSKA, A. Z.; NIEMIROWICZ, K.; MARKIEWICZ, K. H.;
CAR, H. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacol. Rep.** 64, 1020–37 (2012).
- WILSON, M.R.; LIGHTBODY, J.H.; DONALDSON, K.; SALES, J.;
STONE, V. Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro*. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 184, p. 172-179, 2002.
- WITTBRODT, P. R.; PALMER, C. D. Reduction of Cr(VI) in the presence of excess soil fulvic acid. **Environmetal Science Technology**, Oregon, v. 29, p. 255-263, 1995.
- XIE, H.; WISE, S.S.; WISE, J.P., Sr. Deficient repair of particulate hexavalent chromate-induced DNA double strand breaks leads to neoplastic transformation. **Mutat. Res.**, v. 649, p. 230-238, 2008.
- YIP, A.C.K.; LAM, F.L.Y & HU, X. Chemica- vapor-deposited copper on acid-activated bentonite clay as an applicable heterogeneous catalyst for the photo-Fenton-like oxidation of textile organic pollutants. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 44, p. 7983-7990, 2005

YU, J. K.; FOGEL, M. M. The development of a combined Water Quality Index. **Water Resources Bulletin**, v. 14, p. 1239-1250. 1978.

YU, M-H. Environmental toxicology: biological and health effects of pollutants. 2a ed. **CRC Press LLC**. Florida, 2005.

ZAGATTO, P. A. & BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática - princípios e aplicações**. Ed. RIMA, São Carlos, 464 p., 2006.

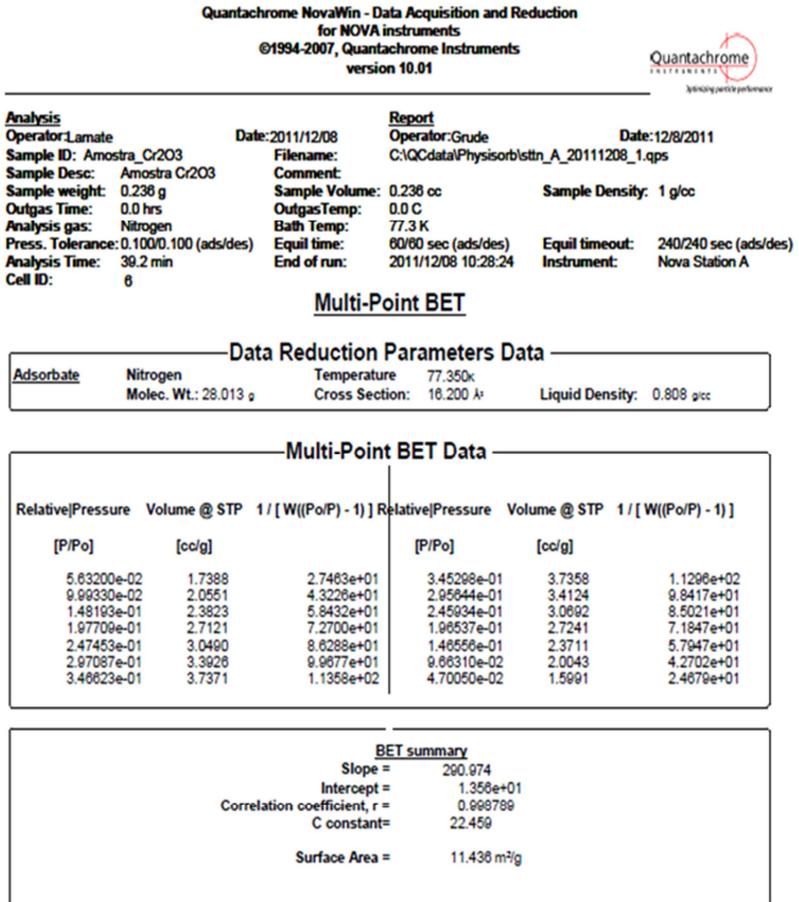
ZANELLO, S. Mineralogia e Teores de Cromo, Níquel, Cobre, Zinco e Chumbo nos Solos no Entorno do Aterro Sanitário da Caximba em Curitiba-PR. **Scientia Agraria**, v.10, n.1, p.051-060, 2009.

ZHENG, Q.; CHENG, Z.Z.; YANG, Z.M. HISN3 Mediates Adaptive Response of *Chlamydomonas reinhardtii* to Excess Nickel, **Plant Cell Physiol.**, v. 54, n. 12, p. 1951–1962, 2013.
doi:10.1093/pcp/pct130

CAPÍTULO IX – APÊNDICES

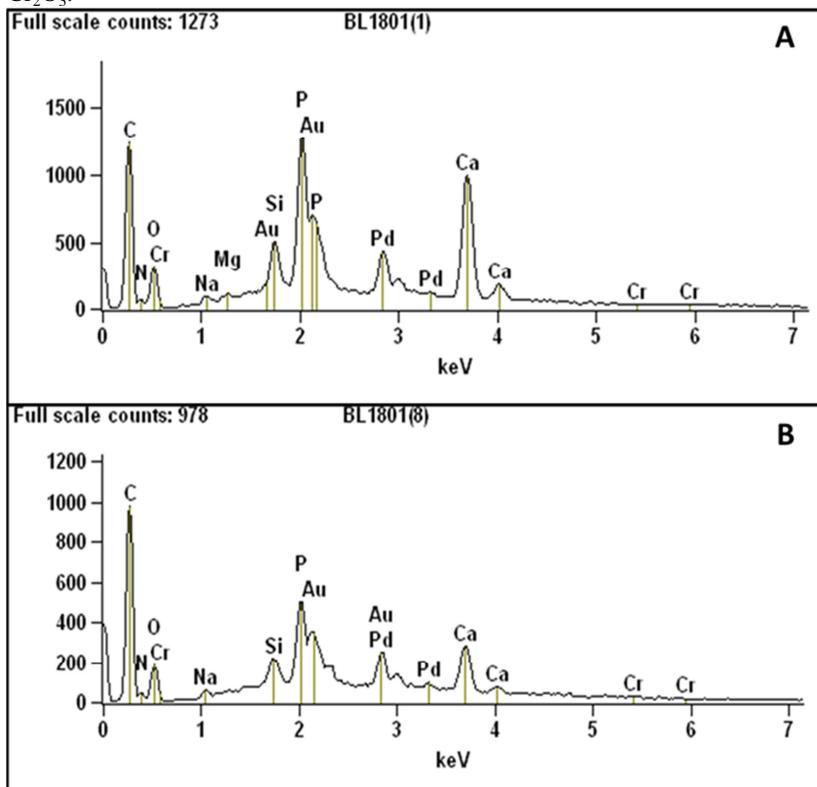
A1. Laudo da área superficial da NP Cr₂O₃

Figura A.1– Laudo da área superficial da NP Cr₂O₃ (lote 1001025977). Método BET.



A2. Espectros EDX da superfície da região branquial dos organismos *D. magna* controle e expostos a NP Cr₂O₃ após 21 dias.

Figura A.2 – Espectro EDX (MEV) da amostra *D. magna* após 21 dias de exposição. (A): organismo controle; (B): organismo exposto a 0,5 g L⁻¹ NP Cr₂O₃.



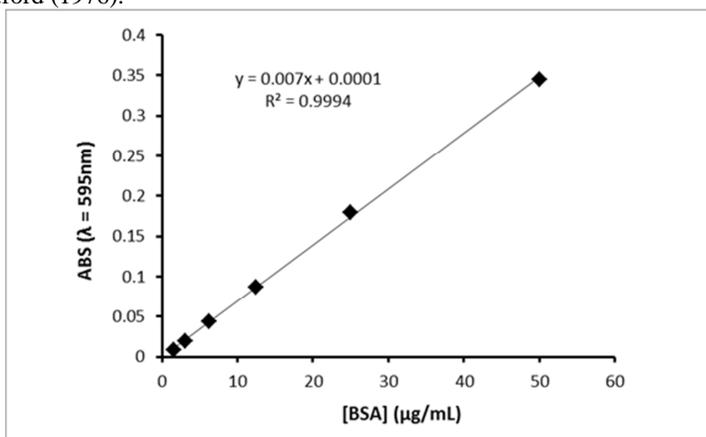
A3. Curva de calibração para a quantificação de Proteínas, Método Bradford (1976).

Para a construção da curva de calibração de dosagem da proteína nas células foram definidos 07 pontos correspondentes a uma gama de concentrações do padrão albumina bovina (BSA). A leitura foi realizada através de espectrometria de ultravioleta (UV), com comprimento de onda de 595nm. Os valores estão apresentados na Tabela A.1 a seguir. A partir dos valores de absorbância foi possível construir a curva de calibração (Figura A.3) que foi empregada na quantificação da proteína nas amostras celulares para o ensaio de liperoxidação.

Tabela A. 1- Pontos para a construção da curva de calibração BSA.

[BSA] µg/mL	ABS 595nm
0,7812	0,000
1,563	0,009
3,125	0,020
6,25	0,044
12,5	0,087
25	0,180
50	0,345

Figura A.3 - Curva de calibração para quantificação da proteína. Método Bradford (1976).



A4. Curva de calibração para a quantificação do malondialdeído – MDA

Foi preparada uma solução padrão de 1,1,3,3 - Tetramethoxypropano e definidos 10 pontos para a construção da curva de calibração do MDA. As análises foram realizadas por HPLC-FD e os valores das áreas dos picos de injeção estão apresentados na Tabela A.2 a seguir. A partir do cálculo das médias das áreas, foi possível construir a curva de calibração (Figura A.4) que foi empregada para a quantificação do MDA nas amostras de células.

Tabela A. 2 - Dados para a construção da curva de calibração MDA.

[MDA] nM	Área pico ($\mu\text{V.S}$)
7,5	230,831
15	241,229
30	265,156
60	289,113
120	528,676
240	1100,55
750	1827,52
1500	3538,63
3000	7249,02

Figura A.4 - Curva de calibração para quantificação do MDA no ensaio de LPO.

