



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Diego José Nogueira

**TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ALUMÍNIO DEPENDENTE DA FASE CRISTALINA E AVALIAÇÃO DE RISCO EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS USANDO UMA ABORDAGEM PROBABILÍSTICA**

Florianópolis

2020

Diego José Nogueira

**TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ALUMÍNIO DEPENDENTE DA FASE CRISTALINA E AVALIAÇÃO DE RISCO EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS USANDO UMA ABORDAGEM PROBABILÍSTICA**

Tese submetida ao Programa de Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. William Gerson Matias

Coorientador: Dra. Denice Schulz Vicentini

Florianópolis

2020

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

Nogueira, Diego José

TOXICIDADE IN VITRO E IN VIVO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ALUMÍNIO DEPENDENTE DA FASE CRISTALINA E AVALIAÇÃO DE RISCO EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS USANDO UMA ABORDAGEM PROBABILÍSTICA / Diego José Nogueira ; orientador, William Gerson Matias, coorientador, Denice Schulz Vicentini, 2020. 170 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. Oxido de alumínio. 3. Nanopartículas. 4. Toxicidade. 5. Avaliação de risco. I. Matias, William Gerson. II. Vicentini, Denice Schulz. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.

Diego José Nogueira

**Título: TOXICIDADE *IN VITRO* E *IN VIVO* DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ALUMÍNIO DEPENDENTE DA FASE CRISTALINA E AVALIAÇÃO DE RISCO EM ECOSISTEMAS AQUÁTICOS USANDO UMA ABORDAGEM PROBABILÍSTICA**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Cristiane Funghetto Fuzinato, Dr(a)  
Universidade Federal da Fronteira Sul

Prof(a) Maria Elisa Magri, Dr(a).  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Paulo Antunes Horta, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rodrigo de Almeida Mohedano, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em engenharia ambiental.

---

Prof. Dr.(a) Maria Eliza Nagel Hassemer  
Coordenador(a) do Programa

---

Prof. Dr. William Gerson Matias  
Orientador

Florianópolis, 13 de março de 2020.

Este trabalho é dedicado a minha esposa (Eliane) e aos meus queridos pais (Antônio e Valéria).

## **AGRADECIMENTOS**

Ao longo dos 4 anos de trabalho que resultaram nesta tese, foram muitas as pessoas e instituições que me ajudaram, considero-me abençoado, por ter conhecido e compartilhado momentos com todos. Sozinho eu não teria chegado até o final, e é por isso que agradeço, a todos e a cada um, de maneira muito especial.

Sobretudo, a Deus, o centro da minha vida, que me guiou na longa caminhada e me correjou no colo quando me faltaram forças;

Ao meu orientador William Gerson Matias, pela oportunidade que me deu de adquirir tanto conhecimento, quando aceitou me orientar no doutorado, por toda atenção e boa vontade de sempre em me atender, além de acreditar na minha capacidade e confiar em minhas decisões, muito obrigado!!!

À toda equipe do LABTOX-UFSC pelo aprendizado e auxílio;

Um agradecimento especial à Miriam, Marlon, Jessica e Vitor, pelo companheirismo e amizade;

Deixo um agradecimento especial à Denice S. Vicentini, minha orientadora, que me ajudou muuuuuito, obrigado por toda assistência e ensinamentos e pelos puxões de orelha.

Ao Programa de Pós-Graduação em engenharia ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, por ter possibilitado o desenvolvimento e conclusão deste trabalho;

Aos membros do laboratório multiusuários LCME e LAMEB, por terem me auxiliado nos experimentos;

Ao professor Silvio Marques Zanata do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, pela doação das células N2A

Ao CNPq, pelo suporte financeiro;

A todos que direta ou indiretamente contribuíram com a realização deste trabalho, o meu muito obrigado!

Entregue as suas obras ao Senhor, e o que você tem planejado se realizará (Provérbios 16:3).

## RESUMO

As nanopartículas de óxido de alumínio (NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) podem ser encontradas em diferentes fases cristalinas e, com o surgimento da nanotecnologia, houve um rápido aumento na demanda por NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em diferentes áreas da engenharia, biomédica e alimentícia. No entanto, é necessária uma avaliação cuidadosa dos possíveis riscos ambientais e à saúde humana para avaliar as implicações da liberação das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> no meio ambiente. Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar e comparar os possíveis efeitos toxicológicos *in vitro* e *in vivo* das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com duas fases cristalinas distintas, NP α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (alfa) e NP η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (eta), e determinar o potencial risco das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com diferentes fases cristalinas para os ambientes aquáticos. Diferentes técnicas físico-químicas foram empregadas para a caracterização das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e múltiplos *endpoints* toxicológicos foram utilizados para avaliar a toxicidade *in vitro* (linhagens celulares neuroblastoma (N2A) e epitélio Brônquico Humano (BEAS-2B) e *in vivo* (microcrustáceo de água doce *Daphnia magna*). A distribuição probabilística de sensibilidade de espécies (PSSD) foi usada para estimar o risco das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para os ambientes aquáticos. Com base nos resultados de caracterização as fases cristalinas das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> testadas possuem diferentes células unitárias, ou seja, distintos arranjos atômicos, resultando em diferentes empacotamentos e formatos. Esses fatores influenciaram diretamente as propriedades físico-químicas finais, tal como menor estado de aglomeração, formato das partículas, maior área superficial e carga superficial positiva da NP η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, que promoveu uma maior interação com as células e *D. magna*, favorecendo a uma maior internalização e/ou ingestão, conforme evidenciado por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) e quantificado por espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplada (ICP-MS). Consequentemente os resultados dos múltiplos *endpoints* toxicológicos (*in vitro* e *in vivo*), revelaram diferenças nos resultados do potencial tóxico para as NP α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, com um efeito mais pronunciado observado para as NP η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. No entanto, a avaliação de risco indica que, de acordo com a abordagem probabilística as NP α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, NP γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (gama), NP θ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (teta), NP δ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (delta) e NP η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> não representam ameaça direta aos organismos aquáticos. Uma vez que, as concentrações perigosas encontradas estão acima das concentrações ambientais previstas. Portanto, as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> devem ser consideradas como uma opção para substituir outros materiais com as mesmas propriedades ou, ainda, semelhantes e que atualmente apresentam alto potencial toxicológico em pequenas concentrações.

**Palavras-chave:** Oxido de alumínio. Nanopartículas. Avaliação de risco. Toxicidade. Estresse oxidativo. Células. *Daphnia magna*.



## ABSTRACT

The aluminum oxide nanoparticles ( $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs) can be found in different crystalline phases and, with the emergence of nanotechnology, there was a rapid increase in the demand for NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  in different areas of engineering, biomedical and food. However, a careful assessment of possible environmental and human health risks is necessary to assess the implications of the release of  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs in the environment. In this context, the objective of this work was to evaluate and compare the possible in vitro and in vivo toxicological effects of  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs with two distinct crystalline phases,  $\alpha$ -  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs (alpha) and  $\eta$ -  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs (eta), and to determine the potential risk of  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs with different crystalline phases for aquatic environments. Different physicochemical techniques were used for the characterization of  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs and multiple toxicological endpoints were used to assess toxicity in vitro (neuroblastoma cell lines (N2A) and human bronchial epithelium (BEAS-2B) and in vivo (freshwater microcrustacean *Daphnia magna*). The probabilistic species sensitivity distribution (PSSD) was used to estimate the risk of  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs to aquatic environments. Based on the characterization results, the crystalline phases of the  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs tested have different unit cells, that is, different atomic rearrangements, resulting in different packages and formats. Based on the characterization results, the crystalline phases of the  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs tested have different unit cells, that is, different atomic rearrangements, resulting in different packages and formats. These factors directly influenced the final physicochemical properties, such as lower agglomeration status, particle shape, greater surface area and positive surface charge of  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs, which promoted greater interaction with cells and *D. magna*, favoring the greater internalization and/or ingestion, as evidenced by Transmission Electron Microscopy (TEM) and quantified by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Consequently, the results of multiple toxicological endpoints (in vitro and in vivo) revealed differences in the results of the toxic potential for  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs and  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs, with a more pronounced effect observed for  $\eta$ -  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs. However, the risk assessment indicates that, according to the probabilistic approach,  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs,  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs (gamma),  $\theta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs (theta),  $\delta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs (delta) and  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs pose no direct threat to aquatic organisms. Since, the dangerous concentrations found are well above the expected environmental concentrations. Therefore,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  NPs should be considered as an option to replace other materials with the same or similar properties and that currently have high toxicological potential in small concentrations.

**Keywords:** Aluminum oxide. Nanoparticles. Risk assessment. Toxicity. Oxidative stress. Cells. *Daphnia magna*.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Evolução da área superficial com a diminuição das dimensões de um cubo. Fonte: (MARTINS; TRINDADE, 2012).....24
- Figura 2** - Comparação de escala de tamanho de diversos organismos e estruturas com nanopartículas. ....25
- Figura 3** - Estruturas cristalina dos metais.....27
- Figura 4** – (A) DRX e esquemas de célula unitária de  $\alpha$ ,  $\eta$  e  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Fonte: (LU et al., 2017). (B) Temperaturas de transformações de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  de transição em  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ . 28
- Figura 5** - Aplicações das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  para diferentes categorias de produtos. Fonte: (WANG; NOWACK, 2018b).....29
- Figura 6** - Esquema das três etapas de desenvolvimento do trabalho. ....48
- Figura 7** - Difractogramas de DRX das NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ . ....70
- Figura 8** - Imagens de MET para (A) NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e (B) NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ , histograma de diâmetros médios (n = 100 partículas) para (C) NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e (D) NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ ..... 72
- Figura 9** - Viabilidade celular em porcentagem para células N2A e BEAS-2B tratadas com NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  por 24, 48 e 72h. Os valores são médias  $\pm$  DP (n=3). O asterisco (\*) representa diferença significativa (p < 0,05) entre a amostra tratada e o respectivo controle. ....76
- Figura 10** - Biomarcadores de estresse oxidativo de células N2A e BEAS-2B expostas as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  por 24, 48 e 72h. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle (100%) como média  $\pm$  DP (n = 2). Letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna após a ANOVA de duas vias (p <0,05).....79
- Figura 11** - Indução de apoptose em células N2A e BEAS-2B. (A-C) Porcentagem de células viáveis e apoptóticas detectadas com dupla coloração (LA/IP) é mostrada para as células N2A e BEAS-2B. (D) Imagens fluorescentes de células não tratadas com estrutura normal. (E) Apoptose precoce, incluindo bolhas, apoptose tardia e necrose observada após 24, 48 e 72 h. (F-H) Porcentagem da atividade da Caspase 3/7. V: células viáveis; B: bolha na membrana celular; AP: apoptose precoce AT: apoptose tardia; N: necrose. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP (n = 3). Letras diferentes indicam diferenças significativas nos mesmos grupos após os diferentes tempos de exposição, de acordo com a ANOVA de duas vias (p <0,05). 81
- Figura 12** - Análise morfométrica dos núcleos das células N2A e BEAS-2B expostas as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . (A) Imagens de identificação e classificação da morfometria nuclear de células expostas e coradas com DAPI. (B-G) Porcentagem de núcleos normais, apoptóticos e irregulares. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP (n = 3).

Letras diferentes indicam diferenças significativas nos mesmos grupos após os diferentes tempos de exposição, de acordo com a ANOVA de duas vias ( $p < 0,05$ ). 84

**Figura 13** - Ensaio clonogênico mostrando os efeitos a longo prazo das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nas células N2A e BEAS-2B. (A) Imagens representativas da formação de colônias (contendo acima de 50 células) após exposição a diferentes concentrações de NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  por 10 dias. (B-C) gráfico mostrando os resultados para a porcentagem de número de colônias. .... 86

**Figura 14** - Imagens de MET das células N2A e BEAS-2B após exposição as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . (A e I) Controle (não tratado), (B, C, D, G, J, K e O) mostrando internalização das NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e (E, F, H, L, M, N e P) mostrando internalização das NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  nas estruturas endossômicas e lisossomos (setas). A análise de MET (J, K e L) demonstrou sinais precoces de apoptose, como formato arredondado, vacuolização citoplasmática e sinais de formação de bolhas nas células expostas as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ... 88

**Figura 15** - Quantificação das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  em células N2A e BEAS-2B determinada por ICP-MS. Os valores são médias  $\pm$  DP ( $n = 2$ ). .... 89

**Figura 16** - Curva dose-resposta das NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  na imobilização de *D. magna* após exposição após de 48 horas. Os valores representam médias  $\pm$  DP ( $n = 4$ ). .... 91

**Figura 17** - Imagens dos organismos sobreviventes de *D. magna* após 21 dias no ensaio crônico com as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . .... 93

**Figura 18** - *D. magna* exposta as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  por 24 h: o painel direito mostra imagens do tratamento de controle (A) e exposta as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  (B) e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  (C), no modo de iluminação de campo claro. Inseridas nessas imagens estão as imagens MEV, indicando a distribuição das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  no intestino (imagem superior) e cílios filtradores (imagem inferior); o painel esquerdo mostra os resultados da composição química dos cílios do intestino e dos cílios obtidos por EDS. Os dados mostram picos intensos de Al (círculo vermelho) para as *D. magnas* expostas as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . .... 97

**Figura 19** - Quantificação da concentração de Al em *D. magna* determinada quantitativamente por ICP-MS. Os valores representam médias  $\pm$  DP ( $n = 2$ ). .... 98

**Figura 20** - Imagens de campo claro das *D. magnas* do tratamento controle, expostas as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  (Painel esquerdo). Imagens de fluorescência das *D. magnas* indicadas por fluorescência verde brilhante no controle, expostas as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  (Painel direito). .... 99

**Figura 21** - Quantificação dos níveis intracelulares de EROs (A); Atividade de CAT (B), SOD (C) e GSH (D); Teores de MDA (E) em *D. magna* expostos as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  por 48 h. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle (100%) como média  $\pm$  DP ( $n = 3$ ). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos após a ANOVA de uma via ( $p < 0,05$ ). .... 100

**Figura 22** - Trajetórias de natação das *D. magnas* expostas as (A) NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$ . (B) Distância média de natação das *D. magnas* após 48 h de exposição. Os

resultados estão expressos como média  $\pm$  DP (n = 20). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos após a ANOVA de uma via (p <0,05)..... 102

**Figura 23** - DSE para NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (n = 53) com base na distribuição das concentrações do limiar de toxicidade para diferentes organismos aquáticos com intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas). Composições dos grupos taxonômicos (inserção a esquerda) e fases cristalinas (inserção a direita). ..... 104

**Figura 24** - Curvas da DSE para NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e detalhes do ranking de sensibilidade das espécies, agrupados de acordo com seu grupo taxonômico. Composições de fases cristalinas (inserção). ..... 106

**Figura 25** - Razões de caracterização de risco (RCR) calculadas para as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Linha tracejada (vermelho) representa risco potencial. .... 109

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Concentrações das NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> em diferentes compartimentos ambientais e processos de gestão de resíduos em 6 regiões da Europa (WANG; NOWACK, 2018b).....	32
<b>Tabela 2</b> - PZ, pH, DE e IP para NP α-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> e NP η-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> suspensas nos meios água UP, ISO, M4 e RPMI. ....	74
<b>Tabela 3</b> - Resultados para os ensaios de toxicidade crônica, CEO e CENO para parâmetros de longevidade, crescimento, reprodução de <i>D. magna</i> expostos a NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	92
<b>Tabela 4</b> - Número de partículas e área superficial total correspondente a cada concentração de massa das NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . ....	95
<b>Tabela 5</b> - Classificação de sensibilidades das espécies utilizadas para as análises de DSE.....	105
<b>Tabela 6</b> - Concentração perigosa para 5% das espécies (HC5) e concentração sem efeito previsto (PNEC) para espécies reunidas por fases cristalinas das NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . ....	107
<b>Tabela 7</b> - Caracterização de risco para fases cristalinas das NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> . ....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ab	absorbância
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Oxido de Alumínio
AP	Apoptose precoce
AT	Apoptose tardia
ATP	<i>Adenosine triphosphate</i>
CAT	Catalase
CDNB	2,4-Dinitroclorobenzeno
CE50	Concentração efetiva que causa imobilidade em 50% da população exposta
CENO	Concentração de efeito não observado
CEO	Concentração de efeito observado
CeO <sub>2</sub>	Óxido de Cério
CI50	Metade da concentração inibidora mima
CIM	Concentração inibitória mínima
CuO	Oxido de cobre
d	Dias
DAPI	Dicloridrato de 2-(4-amidinofenil)-6-indolecarbamidina, dicloridrato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol
DCFH-DA	diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína
DE	Diâmetro Efetivo
DE	Diâmetro efetivo
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
DRX	Difração de Raios-X
DSE	Distribuição de Sensibilidade de Espécies
DTNB	<i>5,5'-Dithiobis (ácido 2-nitrobenzóico)</i>
EDS	Espectrometria de energia dispersiva de raios-X
EDS	Espectroscopia de energia dispersiva
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ETE	Estação de tratamento de esgoto
FA	Fator de avaliação
FACE	<i>Federation of aluminum Consumers in Europe</i>
G	Gramas
GPX	Glutathione Peroxidase
GSH	L-glutathione reduzida
GSSG	L-glutathione oxidada
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de Hidrogênio
HC5	Concentração perigosa para 5% das espécies
HCl	Ácido clorídrico
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma mass spectrometry</i>
IP	Iodeto de Propídio
JCPDS	<i>Joint Committee on Powder Diffraction Standards</i>
KCl	Cloreto de potássio
L	Litros
LA	Laranja de Acridina
LDH	Lactato desidrogenase

LPO	Lipoperoxidação
MDA	Malonaldeído
MET	Microscopia de transmissão eletrônica
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
Mg	Miligrama
ml	Mililitro
mm	Milímetros
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio)
N	necrose
n	Numero de organismos
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	Fosfato de dinucleótido de adenina de $\beta$ -nicotinamida
NM	Nanomaterial
nm	nanômetros
NP	Nanopartícula
NRU	<i>Neutral Red</i> (Vermelho Neutro)
OR	água de osmose reversa
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PEC	Predicted Environmental Concentration (concentração ambiental prevista)
PNEC	<i>Predicted No-Effect Concentrations</i> (Concentração previsivelmente sem efeitos)
PZ	Potencial Zeta
RCR	<i>Risk Characterisation Ratio</i> (taxa de caracterização de risco)
SBF	Soro bovino fetal
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SOD	Superóxido Dismutase
SSD	<i>Species Sensitivity Distribution Generator</i> (Gerador de distribuição de sensibilidade de espécies)
TBA	4,6-Dihidroxipirimidina-2-tiol
TEP	1,1,3,3-tetraetoxipropano
TiO <sub>2</sub>	Dioxido de Titânio
Tris-HCl	Cloridrato de 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol
Triton X-100 <sup>®</sup>	Fenil-polietileno glicol, t-octilfenoxipoletoxiol
UP	Água Ultrapura
eV	elétrons-volt

## SUMÁRIO

CAPITULO I .....	15
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 JUSTIFICATIVA.....	19
1.2 HIPÓTESES .....	21
1.3 OBJETIVO GERAL.....	22
1.3.1 Objetivo específicos.....	22
CAPITULO II .....	23
2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA .....	23
2.1 NANOTECNOLOGIA.....	23
2.2 NANOPARTÍCULAS DE Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	26
2.2.1 Características físico-química.....	26
2.2.2 Aplicações das NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	28
2.2.3 Cenário ambiental das NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	31
2.2.4 Preocupações ambientais .....	33
2.2.5 Efeitos das NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in vitro e in vivo .....	35
2.2.5.1 Estudos in vitro .....	35
2.2.5.2 Estudos in vivo .....	39
2.2.5.2.1 Bactérias.....	39
2.2.5.2.2 Algas.....	40
2.2.5.2.3 Plantas.....	41
2.2.5.2.4 Invertebrados terrestres.....	43
2.2.5.2.5 Invertebrados aquáticos .....	44
2.2.5.2.6 Vertebrados aquáticos.....	45
2.2.5.2.7 Vertebrados terrestres (mamíferos).....	46
CAPÍTULO III .....	48
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	48



3.1	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	48
3.2	MATERIAIS .....	49
3.3	SÍNTESE DAS NP $\alpha$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	50
3.4	CARACTERIZAÇÃO DAS NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	50
3.4.1	Difratometria de raios-X (DRX).....	50
3.4.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	50
3.4.3	Diâmetro efetivo (DE), Potencial Zeta (PZ) e índice de polidispersão (IP) ...	51
3.4.4	Área Superficial Específica (BET).....	52
3.5	ENSAIOS TOXICOLÓGICOS.....	52
3.5.1	Ensaio in vitro .....	52
3.5.1.1	Linhagens celulares N2A e BEAS-2B.....	52
3.5.1.2	Manutenção das células .....	53
3.5.1.3	Ensaio de viabilidade celular .....	53
3.5.1.4	Biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo (EROs, CAT, SOD, GSH e LPO) .....	54
3.5.1.5	Análise de morte celular por LA/IP e Caspase .....	56
3.5.1.6	Avaliação morfométrica nuclear.....	56
3.5.1.7	Ensaio Clonogênico.....	57
3.5.1.8	Internalização das NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	57
3.5.1.9	Quantificação das NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> internalizadas .....	58
3.5.2	Ensaio in vivo .....	59
3.5.2.1	Manutenção dos organismos teste Daphnia magna.....	59
3.5.2.2	Ensaio de toxicidade aguda.....	59
3.5.2.3	Ensaio de toxicidade crônica .....	60
3.5.2.4	Localização e Ingestão das NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> em D. magna .....	60
3.5.2.5	Biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo (EROs, CAT, SOD, GSH e LPO) .....	61

3.5.2.6	Análise do comportamento de natação .....	63
3.6	AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL DAS NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	64
3.6.1	Coleta dos dados .....	64
3.6.2	Distribuição de Sensibilidade de Espécies (DSE) .....	65
3.6.3	Risco ecológico.....	66
3.7	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	67
CAPÍTULO IV .....		69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	69
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	69
4.1.1	Difratometria de Raio-X (DRX) .....	69
4.1.2	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) .....	71
4.1.3	Área superficial (BET).....	72
4.1.4	Diâmetro efetivo (DE) e Potencial Zeta (PZ) e índice de polidispersão (IP) .....	73
4.2	ENSAIOS TOXICOLÓGICOS.....	75
4.2.1	Ensaio in vitro .....	75
4.2.1.1	Ensaio de viabilidade celular .....	75
4.2.1.2	Biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo .....	77
4.2.1.3	Análise de morte celular por LA/IP e Caspase .....	80
4.2.1.4	Avaliação morfométrica nuclear.....	82
4.2.1.5	Ensaio Clonogênico.....	85
4.2.1.6	Internalização e quantificação das NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	87
4.2.2	Ensaio in vivo .....	90
4.2.2.1	Ensaio de Toxicidade Aguda .....	90
4.2.2.2	Ensaio de Toxicidade crônica.....	91
4.2.2.3	Localização e ingestão das NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> em Daphnia magna.....	96
4.2.2.4	Biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo (EROs, CAT, SOD, GSH e LPO) .....	98

4.2.2.5 Análise do comportamento de natação .....	101
4.3 AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL DAS NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	103
CAPÍTULO V .....	110
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	110
6 CONCLUSÕES.....	111
CAPÍTULO VI.....	114
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	114
CAPÍTULO VII.....	151
APÊNDICES.....	151
A1 Dados de toxicidade aquática para NP Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> .....	151
A2 Artigo publicado referente à tese 1 .....	159
A3 Artigo publicado referente à tese 2 .....	160
A4 Artigos publicados em coautoria .....	161
A5 Trabalhos publicados em congressos.....	164



## CAPITULO I

### 1 INTRODUÇÃO

A demanda global por produtos contendo nanotecnologia vem aumentando continuamente devido às suas propriedades diferenciadas, que resultam, principalmente da redução do tamanho das partículas e aumento da área superficial (NASROLLAHZADEH et al., 2019). Entre os diferentes formatos ou morfologias dos materiais produzidos em nanoescala estão as nanopartículas (NP). As NP são atualmente os aditivos que possibilitam atribuir novas tecnologias ou propriedades diferenciadas aos produtos industrializados, tais como cosméticos (NAFISI; MAIBACH, 2017), vestuários (MISHRA; MILITKY, 2019), eletroeletrônicos (LAH; ZUBIR; SAMYKANO, 2018), pigmentos (CARREÑO et al., 2019), fármacos (PELTONEN, 2018), pesticidas (RANI; SHANKER; JASSAL, 2017), entre outros (GUO et al., 2018).

As NP metálicas podem ser obtidas via métodos físicos, ditos de baixo para cima (*bottom-up*) ou químicos de cima para baixo (*top-down*) (CAO; WANG, 2011), entretanto, a seleção do processo metodológico de obtenção depende da composição química e das características das NP desejadas (VILLENA DE FRANCISCO; GARCÍA-ESTEPA, 2018). Além disso, as NP são sintetizadas a partir de diferentes materiais e resultam em NP poliméricas (poliestireno) (RAO; GECKELER, 2011), metálicas (prata e ouro) (MELO JR. et al., 2012) ou de óxidos metálicos (SUBRAMANIAN et al., 2016). Entre as NP de óxidos metálicos destaca-se o óxido de alumínio ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ), que podem apresentar diferentes fases cristalinas:  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gama),  $\delta$  (delta),  $\eta$  (eta),  $\theta$  (teta),  $\kappa$  (kappa) e  $\chi$  (chi), sendo a NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  a fase mais estável (DOREMUS, 2008).

Inicialmente, as pesquisas e a aplicações de NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  eram focadas somente em abrasivos e revestimentos resistentes na indústria metalúrgica, porém nas últimas décadas foram realizadas pesquisas em diversas áreas para novas aplicações das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , incluindo produtos de higiene pessoal, retardador de fogo, antifúngicos, inseticidas e catalisador (LIU et al., 2007; FEDERATION OF

ALUMINUM CONSUMERS IN EUROPE, 2017; SHENASHEN et al., 2017). Os relatórios de análise do mercado de consumo de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> vêm mostrando a crescente de produção, em 2010 foram produzidas 35.000 toneladas de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e a expectativa de produção para 2020 é de mais de 100.000 toneladas (FEDERATION OF ALUMINUM CONSUMERS IN EUROPE, 2017).

O uso crescente de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em produtos comerciais tende a promover sua liberação no meio ambiente, sendo possível concentrar quantidades potencialmente tóxicas do produto em nanoescala no meio ambiente. Isso pode representar uma ameaça não só para diversos organismos e plantas como também para os seres humanos (STANLEY et al., 2010; PERIASAMY; ATHINARAYANAN; ALSHATWI, 2016; SUN et al., 2016).

Diante disso, a identificação das características físico-químicas das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> são determinantes para compreender seus efeitos tóxicos. Dentre as principais características físico-químicas que afetam o potencial toxicológico estão: tamanho de partícula, estado de aglomeração, formato, estrutura cristalina, composição química, química superficial, área superficial, carga superficial e porosidade (GATOO et al., 2014). Tais características foram discutidas em revisões de nanotoxicologia como, por exemplo, o diâmetro da partícula, área superficial e grau de agregação das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> tem mostrado em alguns casos levar a efeitos adversos como dano genético (LI et al., 2016), resposta inflamatória (OESTERLING et al., 2008), genotoxicidade (JALILI et al., 2017), citotoxicidade (PARK et al., 2015), geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e disfunção mitocondrial (SIEG et al., 2018) em linhagens celulares de mamíferos. Outros estudos recentes relataram a toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em vários organismos aquáticos, incluindo espécies de microalgas (SURIYAPRABHA et al., 2015; LI; ZHOU; FAN, 2016), invertebrados aquáticos (PAKRASHI et al., 2014; ATES et al., 2015), bem como peixes (KOVRIŽNYCH et al., 2013; BENAVIDES et al., 2016).

Adicionalmente, os efeitos tóxicos das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> também são relatados nos organismos modelo para testes de ecotoxicidade, como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens* (JIANG; MASHAYEKHI; XING, 2009; SADIQ et al.,

2014), *Caenorhabditis elegans* (LI et al., 2012) e *Daphnia magna* (ZHU et al., 2009). Vários estudos *in vivo* (ratos e camundongos) levantam preocupações em comunidades públicas e científicas sobre seus efeitos imprevisíveis e adversos à saúde humana, isto é, as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> afetam vários sistemas fisiológicos, como o sistema renal (YOUSEF; MUTAR; KAMEL, 2019), neurológico (ZHANG et al., 2011) e o respiratório (CHALANSONNET et al., 2018).

Apesar dos vários estudos realizados, até o momento existe uma lacuna de conhecimento sobre a correlação das diferentes fases das estruturas cristalinas das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e os efeitos toxicológicos. No estudo de Ates et al., (2015) foi avaliado diferentes efeitos de toxicidade das fases cristalinas  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em *Artemia salina*. O estudo concluiu que a fase  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foi mais tóxica que  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em todas as condições devido as distintas propriedades físico-químicas de cada partícula, as quais são resultantes da metodologia de síntese e temperatura do tratamento térmico. Já em outros estudos realizados com dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) indicaram que o TiO<sub>2</sub> na fase anatase é mais ativo que a fase rutilo sob irradiação UV, gerando maiores quantidades de EROs intracelular e extracelularmente sendo potencialmente mais tóxico (BRAYDICH-STOLLE et al., 2009; XUE et al., 2010; SAYES, 2014).

Neste contexto, mais estudos precisam ser conduzidos para determinar se os efeitos toxicológicos das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> estão ou não associados às suas diferentes fases cristalina e fornecer subsídios para contribuir com as futuras diretrizes regulatórias para as NP. Portanto, o objetivo desta tese foi investigar e comparar o efeito da estrutura cristalina de dois tipos de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, sendo elas: alfa ( $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) e eta ( $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) na toxicidade *in vitro* e *in vivo*, além de avaliar os riscos para a biodiversidade aquática. As NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram caracterizadas por técnicas físico-químicas e adicionalmente, múltiplos parâmetros toxicológicos foram utilizados para avaliar a toxicidade em ensaios *in vitro* e *in vivo*. Para os ensaios *in vitro* foram usadas as linhagens celulares neuroblastoma (N2A) e epitélio Brônquico Humano (BEAS-2B) e os parâmetros utilizados foram: viabilidade celular, estresse oxidativo, apoptose, morfometria nuclear, formação de colônias e internalização. Nos ensaios

*in vivo* foi usado o microcrustáceo de água doce *Daphnia magna*, e os parâmetros utilizados foram: teste agudo, estresse oxidativo, comportamental e teste crônico. Para a avaliação de risco, foi determinado a concentração que afeta 5% das espécies e protege 95%, por meio da construção de curva de sensibilidade das espécies aquáticas para as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e foi encontrado a concentração previsivelmente sem efeitos e a taxa de caracterização de risco.



## 1.1 JUSTIFICATIVA

O alumínio é o metal mais abundante e o terceiro elemento mais abundante na crosta terrestre, após o oxigênio e silício (TAYLOR, 1964; EXLEY, 2003), no entanto, o alumínio não é encontrado como metal livre na natureza, ele é encontrado na forma combinada, em rochas e minerais, particularmente rochas ígneas, que é constituído de aproximadamente 16% de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (GREENWOOD; EARNSHAW, 1997). Existem diversas formas em que se pode encontrar o  $\text{Al}_2\text{O}_3$  e com o surgimento da nanotecnologia houve uma rápida introdução das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  em diferentes áreas de engenharia e em produtos de consumo. Sendo assim, as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  estão entre as mais usadas devido à sua ampla estabilidade termodinâmica em condições ambientais. As NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  são constituídas de uma estrutura hexagonal fechada e sua elevada resistência química e térmica, baixa condutividade elétrica e baixo custo de produção são indicadas para aplicações industriais, como, por exemplo, usado como material cerâmico abrasivo ou eletrônico, filtro e ingrediente de tinta.

Por outro lado, as NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$ , que pertencem ao grupo das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  de transição, ou seja, fases intermediárias antes da forma mais estável ( $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ), possuem estrutura cúbica, tamanhos de partículas finas, elevadas áreas superficiais. Tais características resultam na atividade catalítica da superfície aumentada e amplas aplicações industriais como adsorventes, catalisadores e revestimentos (TEMUUJIN et al., 2000). Dessa forma, as distintas estruturas cristalinas das NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  influenciam as propriedades físico-químicas finais, tais como o estado de aglomeração, a forma da partícula, área superficial, carga superficial e porosidade, resultando, portanto, em diferentes efeitos toxicológicos.

A crescente demanda de produção e aplicações das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  aliada à escassez de informações a respeito do potencial toxicológico *in vivo* e *in vitro* e também das variações deste potencial toxicológico de acordo com as distintas fases das estruturas cristalinas evidenciam a necessidade e a extrema relevância de novos estudos para compreender, prever e evitar danos aos seres vivos e meio

ambiente. Além disso, também é relevante identificar o intervalo de concentração ambientalmente segura de aplicação, visto que, os dados gerados podem servir de parâmetros para agências reguladoras no momento de selecionar os materiais em nanoescala para determinada aplicação.

## 1.2 HIPÓTESES

O presente trabalho foi desenvolvido usando como base artigos científicos e estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC que resultaram nas seguintes hipóteses:

1. As fases cristalinas das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> estudadas resultarão em partículas com diferentes propriedades físico-químicas, que conseqüentemente influenciará nos potenciais efeitos toxicológicos;
2. A exposição das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com diferentes fases cristalinas acarretará distintos efeitos toxicológicos nos ensaios: *in vitro* (células N2A e BEAS-2B) e *in vivo* (microcrustáceo *Daphnia magna*);
3. As concentrações ambientais (atuais e futuras) das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em ambientes aquáticos não representam um risco potencial para a biodiversidade aquática.

### 1.3 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar os possíveis efeitos toxicológicos *in vitro* e *in vivo* de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com duas fases cristalinas distintas (alfa e eta) e determinar o potencial do risco das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para os ambientes aquáticos.

#### 1.3.1 Objetivo específicos

1. Sintetizar e caracterizar as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e caracterizar as NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (comercial) por técnicas físico-químicas;
2. Avaliar e comparar os efeitos toxicológicos *in vitro* das NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, utilizando como modelo as células N2A e BEAS-2B;
3. Investigar os efeitos toxicológicos *in vivo* das NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, utilizando como organismo-teste *Daphnia magna*, para os testes de toxicidade agudo e crônico;
4. Comparar os efeitos toxicológicos das NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, resultantes dos testes agudo (imobilização e comportamento natatório) e crônico (longevidade, fecundidade, crescimento e morfologia) para a *Daphnia magna*;
5. Determinar o risco ambiental das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com diferentes fases cristalinas usando dados de toxicologia da literatura.

## CAPITULO II

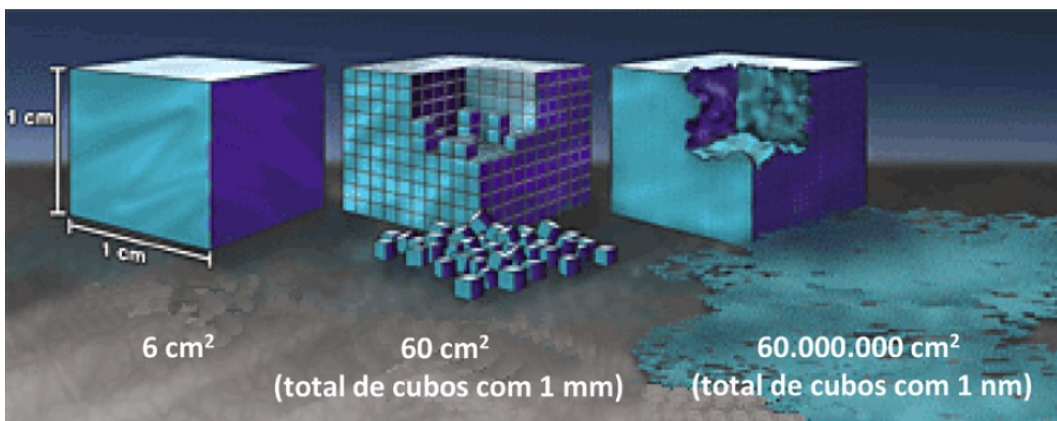
### 2 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

#### 2.1 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é um campo interdisciplinar muito vasto que agrega conhecimento oriundo de várias áreas científicas convencionais, que estuda, desenvolve e manipula diferentes materiais produzidos com dimensões inferior a 1000 nm (FEREIDOON; MORIYAMA; BAGCHI, 2013). Os materiais em escalas nanométricas podem apresentar propriedades físico-químicas e comportamentos biológicos distintos dos materiais em escalas massivas ou *bulk* (NEL, 2006). As propriedades físico-químicas e comportamentos biológicos também podem ser distintos para as possíveis variações de morfologia apresentadas por um mesmo material como, por exemplo, nanopartículas, nanobastões, nanotubos, entre outras (WILEY et al., 2005; WAGNER et al., 2007; HASHIMOTO; SASAKI; IMAZATO, 2016). Adicionalmente, as propriedades físico-químicas de materiais metálicos em escalas nanométricas, mesmo apresentado igual composição química, podem resultar em diferentes fases cristalinas, sendo que a formação de uma ou de outra fase cristalina e, até mesmo misturas de fases cristalinas, depende das condições de síntese e do tratamento térmico empregado (DHAND et al., 2015), levando a mudanças em suas propriedades químicas, reatividade, atividades fotocatalíticas e propriedades energéticas e, por sua vez, alteram a toxicidade, destino, cinética e comportamento nos seres vivos e meio ambiente (ISO, 2010).

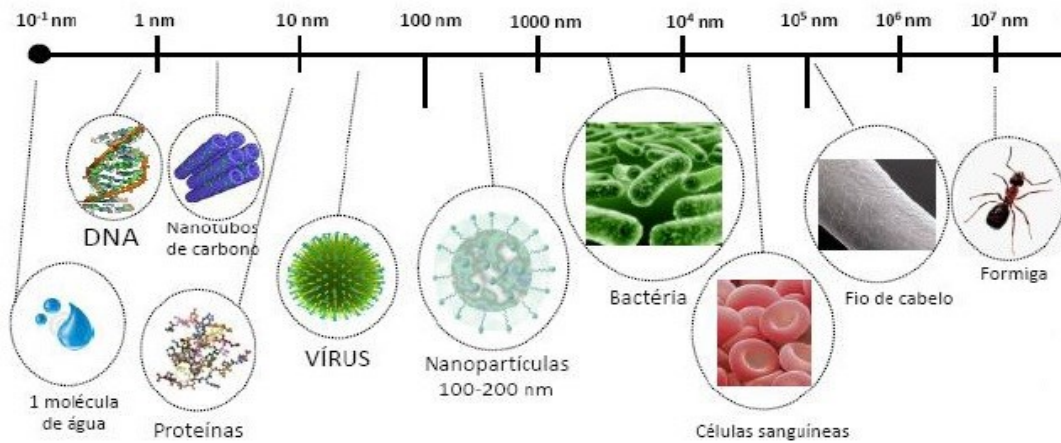
A redução do tamanho médio de partícula dos materiais metálicos resulta no aumento da área superficial por volume, isso pode ser visualizado na ilustração mostrada na **Figura 1**, no qual, quanto menor o tamanho da partícula, maior a área superficial e, conseqüentemente, maior a reatividade a superfície, uma vez que maior número de átomos estão expostos. Por exemplo, um cubo (Figura 1) com arestas medindo 1 cm possui uma área superficial de 6 cm<sup>2</sup> para um cubo com

volume de  $1 \text{ cm}^3$ , ao reduzir a aresta do cubo para  $1 \text{ mm}$ , com o mesmo volume de  $1 \text{ cm}^3$ , existem 1000 cubos cuja área superficial totaliza  $60 \text{ cm}^2$ . Em uma escala nanométrica, isto é, admitindo que cada cubo tem  $1 \text{ nm}$  de lado, existem 1021 cubos por  $1 \text{ cm}^3$  de volume total, e a área superficial resultante é agora de  $60.000.000 \text{ cm}^2$ . Por esta razão, a partícula, quimicamente estável na torna-se altamente reativo quando projetado em escala nanométrica (AZOULAY; SENJEN; FOLADORI, 2014).



**Figura 1** - Evolução da área superficial com a diminuição das dimensões de um cubo.  
Fonte: (MARTINS; TRINDADE, 2012).

A natureza também produz materiais em nanoescala, por exemplo, uma cadeia de DNA tem aproximadamente  $2,5 \text{ nm}$  de largura, enquanto uma molécula de água tem aproximadamente  $0,25 \text{ nm}$  de tamanho, e um átomo de ouro tem aproximadamente  $0,14 \text{ nm}$  de diâmetro (**Figura 2**). Assim como a natureza, o homem também produz objetos, como nanotubos de carbono, que são uma coleção de átomos de carbono dispostos em forma de cilindro, estão ordem de  $1,3 \text{ nm}$  (NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2012).



**Figura 2** - Comparação de escala de tamanho de diversos organismos e estruturas com nanopartículas.

Na última década, produtos baseados em nanotecnologia modificados com nanopartículas (NP) de óxidos metálicos ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{TiO}_2$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{CuO}$  e  $\text{ZnO}$ ) têm dominado o mercado consumidor em expansão (SUBRAMANIAN et al., 2016). Segundo dados atuais, mais de 3100 produtos comerciais desenvolvidos com NP estão disponíveis de todo mundo, a maioria dos produtos são normalmente usados nas áreas de saúde e fitness, casa e jardim, automotiva, eletrodomésticos, revestimentos, eletrônicos, alimentos e bebidas (HANSEN; MIKKELSEN; JØRGENSEN, 2020). Nos próximos anos espera-se que o número de produtos aumente, de acordo com a *StatNano*, um total de 11891 patentes foram publicadas no USPTO (*United States Patent and Trademark Office*) em 2019, entre as quais mais da metade pertencem aos Estados Unidos e seguido por Coreia do Sul, Japão, China e Taiwan, o Brasil aparece com 21 patentes nesse período (STATNANO, 2020).

Estimativas futuras que o mercado global de nanotecnologia deve atingir US\$ 3 trilhões em 2020, com uma taxa de crescimento anual composta de 25% (ROCO; MIRKIN; HERSAM, 2011; BCC RESEARCH NANOTECHONOLGY REPORT, 2016). Diante desse contexto, a presença das partículas em nanoescala sempre foi realidade no ciclo de vida do planeta, contudo o aumento do contingente

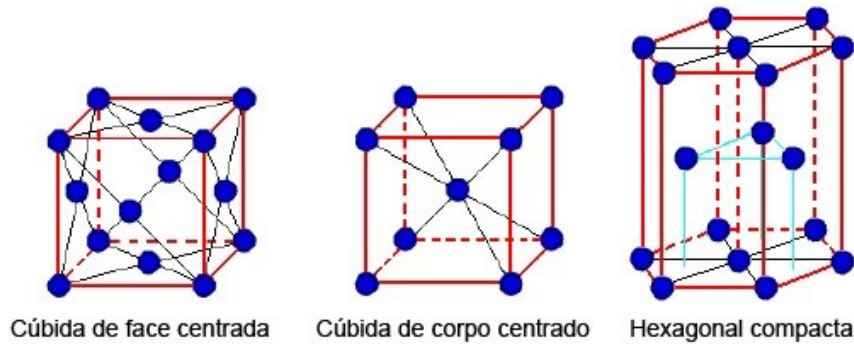
populacional e aumento da atividade antropogênica, sobretudo do desenvolvimento da nanotecnologia, estejam avançando rapidamente, introduzindo uma carga extra de partículas em nanoescala, os riscos ambientais, de saúde e segurança das NP utilizadas nas mais diversas aplicações ainda não são conhecidos com certeza.

## 2.2 NANOPARTÍCULAS DE $\text{Al}_2\text{O}_3$

### 2.2.1 Características físico-química

O  $\text{Al}_2\text{O}_3$  é frequentemente denominado na literatura como alumina, apresentando-se como uma das NP mais importantes do ponto de vista comercial. Em geral, as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  têm muitas propriedades interessantes como, por exemplo, alta resistência mecânica, resistência ao desgaste, resistência à corrosão, resistência ao calor, alta constante dielétrica e alta transmitância (FANG et al., 2018). Além disso, o  $\text{Al}_2\text{O}_3$  pode ser identificado sob diversas fases cristalinas e cada fase possui estrutura cristalina distinta (LEVIN; BRANDON, 2005), sendo que a forma mais comum é  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  (DOREMUS, 2008), a qual possui simetria com sistema cristalino romboédrico (TRAINOR et al., 2002) e empacotamento da célula unitária hexagonal (CHAN; LIN, 1995; LEVIN; BRANDON, 2005) (**Figura 3**). Outras fases em que o  $\text{Al}_2\text{O}_3$  pode apresentar-se são:  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gama),  $\delta$  (delta),  $\eta$  (eta),  $\theta$  (teta),  $\kappa$  (kappa) e  $\chi$  (chi). Estruturalmente essas fases são conhecidas como “fases de transição”, ou seja, fases intermediárias antes da forma mais estável ( $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ ) (BOWEN; CARRY, 2002; HERNÁNDEZ; BAUTISTA; MARTÍN, 2005; DOREMUS, 2008; ABDRAKHIMOV, 2013). As fases  $\gamma$ ,  $\eta$ ,  $\theta$  e  $\delta$  possuem oxigênios em um empacotamento cúbico de face centrada (CFC) (**Figura 3**) (LU et al., 2017).

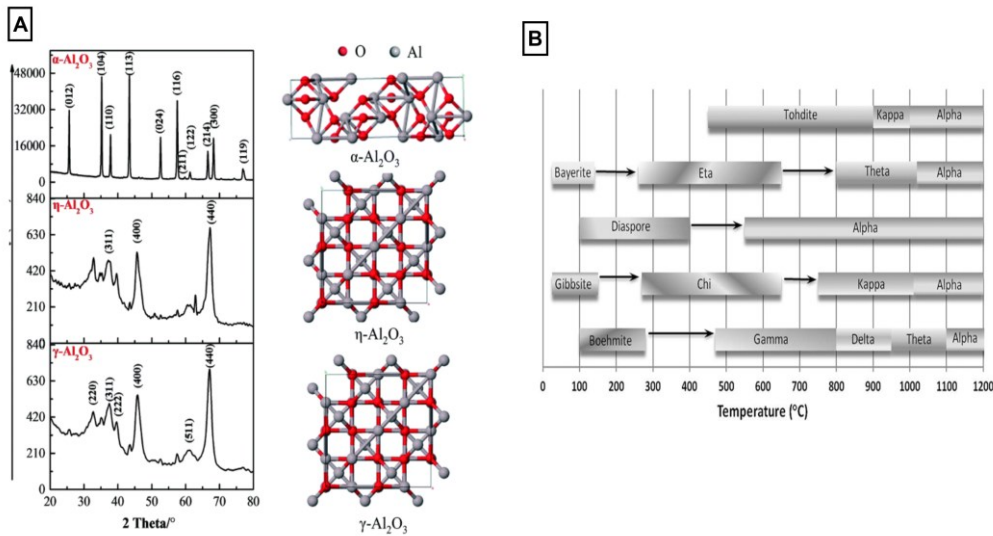




**Figura 3** - Estruturas cristalina dos metais.

A formação de uma fase ou misturas de fases ocorrem durante o tratamento térmico das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (OESTERLING et al., 2008). Na etapa de tratamento térmico, as NP são submetidas à temperaturas elevadas por tempo suficiente para que todas as fases de transição do  $\text{Al}_2\text{O}_3$  convertam-se em  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  estável. Por outro lado, para a obtenção do  $\text{Al}_2\text{O}_3$  existem diversas técnicas, incluindo precursores nas três fases (sólida, líquida e vapor), para a síntese de micro e nanopartículas (SILVA, 2010), se o tempo ou a temperatura não são suficientes, serão formadas fases ou misturas de fases de transição (**Figura 4B**) (LU et al., 2017).

A **Figura 4A** mostra exemplifica diferentes fases cristalinas formadas e os respectivos difratogramas de raio-X (DRX). Quando o tempo de calcinação foi estabelecido em 3 h, foi formado NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  e o padrão de DRX associado apresentou picos mais amplos, com um grau de resolução reduzido, indicando um alto grau de desordem estrutural na amostra (KEAR et al., 2000). Além disso, quando a temperatura de calcinação também foi alterada para  $900\text{ }^\circ\text{C}$ , foi obtido NP  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ . O padrão de DRX associado apresentou picos com um grau de resolução um pouco menor quando comparado com as  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  conforme aumento da temperatura o desenvolvimento de picos largos da NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  fica bem evidente, uma consequência do efeito do tratamento térmico (LU et al., 2017).



**Figura 4** – (A) DRX e esquemas de célula unitária de  $\alpha$ ,  $\eta$  e  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Fonte: (LU et al., 2017). (B) Temperaturas de transformações de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  de transição em  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

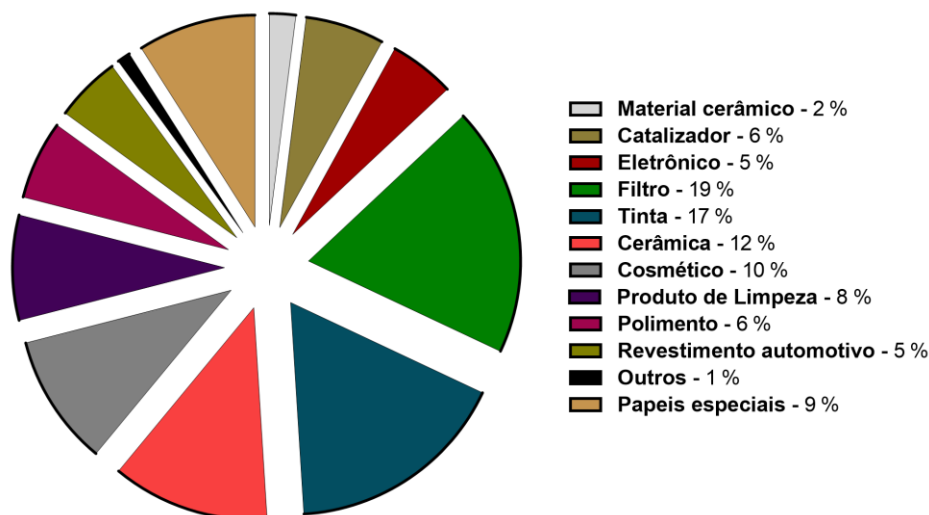
## 2.2.2 Aplicações das NP $\text{Al}_2\text{O}_3$

Em decorrência da variedade de propriedades físico-químicas, as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  estão entre os principais materiais utilizados na indústria como catalisador, sensor, semiconductor, bem como adsorvente (DUAN et al., 2016). Adicionalmente, as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  são aplicadas como retardador de chama, isolante e revestimento protetor de superfície (SIQUEIRA et al., 2001). As cerâmicas constituídas de/ou modificadas com adição de NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  têm alta resistência mecânica, dureza, resistência ao desgaste e boa biocompatibilidade, portanto, essas propriedades tornando-as atraentes para uso em implantes dentários e ósseos (LUKIN; TARASOVA; KOROLEV, 2001). Adicionalmente, foi relatado que NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  possui bandas de luminescência em 3,6 e 3,3 eV, sendo possível sua aplicação em matrizes de fluorescência (XIE et al., 2002; LIU et al., 2007).

Outra importante propriedade das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  é a alta condução térmica, uma vez que, ela pode ser suspensa em um líquido para aumentar a eficiência da transferência de calor em fluidos convencionais, que são amplamente utilizados em diversas indústrias como água, glicol e óleo, formando uma nova classe de fluidos

de transferência de calor, chamados nanofluidos. As propriedades desses materiais incluem alta condutividade térmica, estabilidade e homogeneidade, sendo utilizado também em combustível para foguetes e explosivos (XIE et al., 2002; DE LUCA et al., 2005; PLATONOV et al., 2007). Alguns estudos testaram a adição das NP  $Al_2O_3$  para resolver o problema do retardamento prolongado da ignição de motores a diesel e observaram um aumento significativo na temperatura de ignição, menor tempo de ignição, melhora significativa no consumo de combustível e, ainda, houve uma redução nas emissões de gases responsáveis pelo efeito estufa (TYAGI et al., 2008; SADHIK BASHA; ANAND, 2011).

Ainda, as NP  $Al_2O_3$  foram aplicadas no desenvolvimento de tecnologias alternativas para tratamento de água potável e para efluentes industriais (ASHTARI; ASHRAFIZADEH; BAYAT, 2012; SALEH; GUPTA, 2012; HOSSEINI et al., 2014). Os testes com membranas cerâmicas contendo NP  $Al_2O_3$  apresentaram desempenho eficiente de rejeição, despontando como uma importante alternativa de tratamento de águas nos processos clássicos de purificação utilizados nas indústrias químicas, petrolíferas farmacêuticas, biotecnológicas, têxteis e de alimentos (REZAKAZEMI et al., 2017; SETIAWAN et al., 2017). Nessa mesma linha de aplicação, estudos com membranas cerâmicas contendo as NP  $Al_2O_3$  mostraram alta eficiência para remoção de compostos orgânicos e inorgânicos de efluentes industriais (OVENDEN; XIAO, 2002; KIM et al., 2004; REZAKAZEMI et al., 2017).



**Figura 5** - Aplicações das NP  $Al_2O_3$  para diferentes categorias de produtos. Fonte: (WANG; NOWACK, 2018b)

O fato de as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  serem amplamente utilizadas na indústria associado à necessidade crescente de desenvolver alternativas de inovação contribuiu para o desenvolvimento de estudos envolvendo a aplicabilidade das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  na agricultura, biomédica e indústria alimentícia. Uma abordagem aceitável que está sendo investigada refere-se a substituição de antifúngicos e inseticidas convencionais por NP (JOGEE; RAI, 2020; THIPE et al., 2020), embora as pesquisas utilizando NP estejam em andamento, um estudo de Shenashen et al., (2017) mostrou eficiência para combater o fungo *Fusarium oxysporium*, que é prejudicial para cultura de tomate e ótimos resultados foram obtidos em outros estudos realizados contra os insetos *Sitophilus oryzae* e *Rhizopertha dominica*, sendo ambos pragas causadoras de danos para diversas culturas de cereais (OMAR; O'NEILL; ROSSALL, 2006; STADLER; BUTELER; WEAVER, 2010).

Na área médica, a atenção tem sido voltada na atividade antibacteriana das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  para o desenvolvimento de materiais antibacterianos mais eficazes contra o crescimento de bactérias resistentes (ANSARI et al., 2015; WANG; HU; SHAO, 2017). Além disso, os avanços na imunologia e biologia molecular com objetivo de compensar as deficiências das formulações de vacinas, as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ofereceram inovações para o desenvolvimento de novos adjuvantes, ou seja, capaz de auxiliar o antígeno a desencadear uma resposta imune precoce em comparação a vacinas tradicionais (FREY et al., 1999; ZHONG; ZHUANG, 2017).

Na indústria alimentícia, as embalagens revestidas com filmes de (ou contendo) NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  demonstram melhoras para barrar oxigênio, vapor de água e aromas, que entram ou saem do produto através das embalagens, sendo essencial para manter a integridade e, conseqüentemente a longevidade dos produtos alimentícios embalados (HIRVIKORPI et al., 2010; STRULLER; KELLY; COPELAND, 2014). Por fim, nos últimos anos, vem crescendo a aceitação de cosméticos contendo NP devido suas propriedades promoverem proteção UV, maior penetração na pele, elevada estabilidade dos ingredientes ativos e efeitos duradouros, além de aumentar a cor e a qualidade dos produtos acabados. As NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  são usadas em base e corretivos, uma vez que suas propriedades difundem

luz, fazendo com que rugas possam ser disfarçadas (RAJ et al., 2012; BOROWSKA; BRZÓSKA, 2015).

### **2.2.3 Cenário ambiental das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>**

O volume de produção de uma NP, associado as aplicações no dia a dia pode fornecer uma boa indicação da quantidade que, possivelmente, serão liberados ao longo do ciclo de vida dos produtos contendo NP para os diferentes compartimentos ambientais (terrestre, aquático e atmosférico). Os dados disponíveis sobre volumes de produção diferem muito dependendo de como os dados são coletados. De acordo com um estudo de mercado as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> são certamente um dos mais relevantes em termos de volumes de produção mundiais entre os óxidos metálicos. Em 2010 estima-se que a produção de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> variou entre 18.500 - 35.000 ton/ano, atrás apenas TiO<sub>2</sub> (83.500 – 88.000 ton/ano), ZnO (31.500 - 34.000) e FeO<sub>2</sub> (33.000 – 42.000 ton/ano). Adicionalmente, no mesmo estudo foi projetado a perspectiva de volume de produção de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> maior que 100.000 ton/ano em 2020 (FUTURE MARKETS, 2019).

E isso, portanto, é um indício do aumento na liberação das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para o meio ambiente, podendo potencializar os efeitos negativos sobre a biodiversidade aquática e terrestre (WANG; NOWACK, 2018a; WIGGER; NOWACK, 2019). No entanto, avaliar os impactos ambientais das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> é um desafio devido às dificuldades de compreender sobre seu transporte, destinos e quantificar as concentrações no ambiente por meio de técnicas analíticas (NOWACK, 2017). Diante desses desafios, modelos de análise de fluxo de materiais e modelos de destino ambiental surgiram como a melhor abordagem alternativa para estimar as quantidades liberadas das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (WANG; NOWACK, 2018b). Sendo assim, alguns modelos probabilísticos de análise de fluxo de material foram desenvolvidos e usados para estimar as liberações das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a nível regional e local através de descargas diretas de esgoto industrial e doméstico em rios, escoamento urbano, liberação de lodo de Estação de Tratamento de Esgoto (ETE) aplicada a solos

agrícolas como fertilizante, colocados em aterros, incinerados ou despejados nos oceanos em diferentes países (BOXALL et al., 2007; KELLER; LAZAREVA, 2013; LAZAREVA; KELLER, 2014; SUZUKI et al., 2017; WANG; NOWACK, 2018b).

As estimativas globais das emissões das NP, em geral, indicam que aproximadamente 60-86% dos produtos com NP (principalmente  $TiO_2$ ,  $ZnO$  e  $Ag$ ) em sua composição devem acabar em aterros sanitários (GOTTSCHALK et al., 2009), outros estudos indicam que aproximadamente 8–28% são liberados nos solos e 7% acabam no meio aquático (KELLER; LAZAREVA, 2013). Apesar dos estudos mostrarem que a maioria das NP acabarem em aterros sanitários, alguns pesquisadores, na tentativa de estimar as liberações das NP  $Al_2O_3$ , sugerem que a maioria das NP acabam no lodo de ETE e, assim, são descartados em aterros sanitários (KLAINÉ et al., 2008). Estudos posteriores identificaram as ETE como uma via de liberação significativa de NP para ecossistemas aquáticos e terrestres (GOTTSCHALK; NOWACK, 2011; GOTTSCHALK; SUN; NOWACK, 2013).

Na tentativa de quantificar as NP  $Al_2O_3$  em diferentes regiões da Europa Wang e Nowack, (2018b) descobriram diferenças regionais nas concentrações de liberação no efluente de ETE, lodo de ETE, aterro sanitário, resíduo incinerado, atmosférico, terrestre natural, terrestre (agrícolas), aquático (água doce) (**Tabela 1**). Conforme dados da Europa Central, há maior concentração das NP  $Al_2O_3$  na maioria dos compartimentos, como no solo agrícola, o que pode ser uma consequência da maior concentração das NP  $Al_2O_3$  no lodo de esgoto.

**Tabela 1** - Concentrações das NP  $Al_2O_3$  em diferentes compartimentos ambientais e processos de gestão de resíduos em 6 regiões da Europa (WANG; NOWACK, 2018b)

<b>Compartimentos</b>	<b>UE</b>	<b>EC</b>	<b>EO</b>	<b>NE</b>	<b>SE</b>	<b>SDE</b>	<b>Un.</b>
<b>Efluente de ETE</b>	3,6	5,1	3,5	2,6	2,5	2,5	µg/L
<b>Lodo de ETE</b>	240	380	160	250	220	240	mg/kg
<b>Aterro Sanitário</b>	9,9	20	13	41	16	4,7	mg/kg
<b>Resíduo incinerado</b>	9,6	17	11	9,9	6,1	140	µg/kg
<b>Atmosférico</b>	1,2	3,7	0,8	64	1,6	1,9	ng/m <sup>3</sup>
<b>Terrestre natural</b>	1,3	4,1	1,2	88	1,9	2	µg/kg
<b>Terrestre (agrícolas)</b>	8,2	27	24	0,2	23	7,9	mg/kg

<b>Aquático (água doce)</b>	0,3	0,5	0,2	0,5	1,1	1	µg/L
<b>Sedimento</b>	5,7	9,3	4,1	14	19	1,7	mg/kg

ETE: Estação de Tratamento de Esgoto; UE: União europeia; EC: Europa Central; Europa Oriental; NE: Norte Europeu; SE: Sul Europeu; SDE: Sudeste Europeu.

No estudo Keller e Lazareva, (2013) foi mostrado que as concentrações das NP  $Al_2O_3$  variam 0,4 - 9 µg/L no efluente de ETE e 0,8 - 1,5 mg/kg no lodo na região da Baía de São Francisco (EUA). Já em outro estudo realizado na região da cidade de Nova Iorque (EUA) os autores supracitados encontraram concentrações que variaram de 0,09 - 7,13 µg/L no efluente de ETE e 19 - 56 mg/L no lodo. Essas diferenças nas concentrações nas duas regiões podem ser atribuídas a fatores, como consumo de produtos em determinadas aplicações e disponibilidade de tratamento de esgoto (LAZAREVA; KELLER, 2014).

Infelizmente estudos semelhantes, visando estimativas de uso e liberação detalhadas para América do Sul não foram realizados, entretanto, foi estimado que na América do Sul apenas 1,6 ton/ano de NP  $Al_2O_3$  vão para o aterro sanitário, 349 ton/ano acabam no meio terrestre 18 ton/ano são liberados no meio atmosférico e 463 ton/ano são despejados no meio aquático, levando-se em conta que o Brasil é o país mais industrializado do continente e 55% do esgoto produzido é despejado diretamente no meio aquático sem nenhum tratamento, o que corresponde a 5,2 bilhões de metros cúbicos por ano, desta forma percebe-se que o Brasil contribui significativamente com a liberação das NP  $Al_2O_3$  na América do Sul (KELLER; LAZAREVA, 2013; SNIS, 2018).

#### 2.2.4 Preocupações ambientais

Com o desenvolvimento da nanotecnologia desde o início da década de 2000, programas de pesquisa multidisciplinares foram iniciados por diversas agências ambientais de diversos países, visando promover pesquisas sobre o impacto das NP sobre saúde humana e meio ambiente (SANTAMARIA, 2012). Sabe-se que todos os processos antropogênicos de alguma forma geram resíduos contendo NP em diferentes tamanhos e formas, resultando em algum momento, seja na produção ou desgastes por intemperismo na liberação das NP para o meio ambiente, sendo, portanto,

necessário compreender as rotas de exposição (NOWACK, 2017; WANG; NOWACK, 2018b).

Uma vez no meio ambiente, processos como reações de superfície, estabilidade, mobilidade e dissolução desempenham um papel importante no controle do destino e comportamento no meio aquoso. A extensão desses processos são reguladas, entre outras coisas, pelas propriedades superficiais das NP e pelas condições do meio (por exemplo, composição do material, temperatura, pH, força iônica e matéria orgânica), fazendo com que as NP sejam facilmente combinadas com vários elementos de sistemas biológicos, químicos e físicos, o que facilita a interação com vários organismos através dos compartimentos ambientais (NOWACK; BUCHELI, 2007; WAGNER et al., 2014; DALE et al., 2015).

A interação depende da rota da exposição, do tecido e/ou órgãos envolvidos, nível de absorção, interação e internalização. Entre estes, a rota da exposição de NP é muito crítica, pois as NP entram em contato com um organismo através de partes do corpo ou órgãos e, assim, tornando-se prováveis rotas de entrada das NP (KUMAR et al., 2015). Uma vez que, as NP entram em contato com algum organismo nas diferentes rotas de interação podem ocasionar efeitos adversos significativos (OESTERLING et al., 2008). Para elucidar as interações das NP com sistemas biológicos, desvendando a relação entre as propriedades físico-químicas e biológicas com a toxicidade, a nanotoxicologia surgiu como um ponto importante da nanotecnologia (ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012; SRIVASTAVA; GUSAIN; SHARMA, 2015). Por exemplo, na literatura existem vários estudos *in vitro* e *in vivo* utilizando bioindicadores, modelos para investigaram os efeitos toxicológicos das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, alguns desses estudos indicaram que as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> podem causar neurotoxicidade, induzindo efeitos citotóxicos, genotóxicos e eventos inflamatórios no cérebro de ratos, e, somado a isso foi mostrado que o acúmulo de Al no hipocampo pode levar a déficit de memória espacial e potencializar a agregação do peptídeo β-amiloide, o que resulta no processo de neurodegeneração causador da doença de Alzheimer (BALASUBRAMANYAM et al., 2009; LI et al., 2009, 2017; SHAH et al., 2015; M'RAD et al., 2018).



Para os seres humanos, não há uma avaliação global destes efeitos para definir uma avaliação de risco adequada, visando proteger os trabalhadores e a população em geral da exposição as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Existem apenas estudos *in vitro* e *in vivo*, que fornecem evidências de que as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induzem efeitos adversos em seres humanos (BOUR et al., 2015). Os potenciais efeitos adversos do Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para a saúde na sua forma “micro” foram investigados em diferentes estudos epidemiológicos na extração da bauxita, associando a exposição cumulativa à bauxita e problemas respiratórios ou função pulmonar (VOISIN et al., 1996; DONOGHUE; FRISCH; OLNEY, 2014; DENNEKAMP et al., 2015).

## **2.2.5 Efeitos das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> *in vitro* e *in vivo***

### *2.2.5.1 Estudos in vitro*

Os testes *in vitro* têm sido tradicionalmente utilizados para avaliar a toxicidade dos produtos químicos, uma vez que são simples e eficazes em termos de tempo e custo quando comparados com ensaios *in vivo* (KROLL et al., 2009). Além disso, novas tecnologias estão surgindo rapidamente, incluindo tecnologias de imagem e diversas tecnologias ômicas. A abordagem reducionista permite o acesso ao material de teste em todos os momentos e facilita a interpretação. Modelos de células para praticamente todos os tecidos ou espécies de animais de laboratório estão disponíveis e existem poucos problemas éticos, com exceções de doação de tecido humano e células-tronco embrionárias (HARTUNG; DASTON, 2009)

A citotoxicidade pode ser afetada por muitos fatores, como propriedades físico-químicas das NP, tipo de célula e condições experimentais etc. Isso significa que o resultado são combinações de fatores e não causado por um fator isolado. As diferenças também podem resultar da variedade de metodologias empregadas. Portanto, não é razoável fazer conclusões gerais com um único conjunto de NP ou sistemas biológicos (KROLL et al., 2009). A citotoxicidade também pode ser expressa por danos celulares, sob os quais as células não estão necessariamente

mortas. As NP podem alterar a expressão gênica, danificar a integridade da membrana celular (HIRANO; KANNO; FURUYAMA, 2008), inibir a proliferação e reprodução celular (FRACZEK-SZCZYPTA et al., 2012), gerar citocinas pró-inflamatórias e EROs (ZHANG et al., 2012), sem a ocorrência da morte celular óbvia em condições experimentais, embora esse dano leve à morte celular em longo prazo.

Diferentes metodologias têm sido utilizadas para avaliar a citotoxicidade. Entre elas: MTS/MTT e coloração com calceína/PI são métodos comumente utilizados para avaliar a viabilidade celular; a liberação de LDH, potencial de membrana e coloração com azul de tripano são métodos utilizados para caracterizar a integridade celular e DCFH-DA intracelulares, atividade de GSH, nitrito, SOD e MDA para avaliar o estresse oxidativo. Contudo, há evidências de que as NP são muito diferentes dos produtos químicos existentes e podem interferir com os sistemas de teste comumente usados. Por exemplo, NP levaram a resultados falso-negativos ao interagir com o substrato em ensaios MTT (BELYANSKAYA et al., 2007; KROLL et al., 2009), podem influenciar diretamente as medições aumentando a absorção da luz devido as suas propriedades ópticas (BARILLET et al., 2010) e, além disso, as NP podem levar à subestimação da produção de EROs por extinção da fluorescência do diacetato de diclorofluorescina (AAM; FONNUM, 2007).

Estudos *in vitro* têm investigado as propriedades das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, utilizando várias linhas de células cultivadas. Todavia, a variedade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com diferentes fases cristalinas gera incerteza quanto à comparação dos resultados encontrados. Como exemplo, Park et al., (2015) identificaram uma clara diferença na sensibilidade entre os ensaios de citotoxicidade em diferentes linhagens celulares usando quatro ensaios de viabilidade com diferentes princípios, os autores concluíram que a escolha das linhagens de células e das ferramentas de avaliação da citotoxicidade deve ser cuidadosamente considerada durante a avaliação da toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Tendo as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> diversas aplicações potenciais, um estudo foi conduzido para avaliar os efeitos adversos das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em fibroblastos murinos (L929),

recomendado para avaliação de citotoxicidade de compostos e tendem a ser utilizados em materiais biomédicos, mostraram diminuição da viabilidade celular menor de 10% comparado ao controle (RADZIUN et al., 2011). Nesse mesmo trabalho verificou-se que a viabilidade celular média após incubação com as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  foi 96,51% para fibroblastos humanos (BJ) e 91,53% para L929. Dessa forma, foi demonstrado que as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  não induzem a apoptose das células, apesar de poder penetrar nas células, o que foi visto microscopicamente (RADZIUN et al., 2011).

Outro estudo conduzido para a comparação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos das NP  $\text{TiO}_2$  e NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  em células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) mostrou a diminuição da viabilidade celular após 24 horas de exposição em ambas com alterações na atividade lisossomal e mitocondrial. A viabilidade celular diminuiu 40% quando exposta a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NP  $\text{TiO}_2$ , enquanto que a viabilidade celular foi ainda menor para as células expostas as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  para a mesma concentração, como mostrado pela análise de absorção de vermelho neutro (NRU). Os resultados dos ensaios MTT mostraram que a viabilidade celular foi significativamente menor quando exposta as duas NP para valores de concentração iguais ou superiores a 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Os efeitos genotóxicos aumentaram significativamente quando as células foram expostas a 0,5 e 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NP  $\text{TiO}_2$  e 0,5-10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (DI VIRGILIO et al., 2010).

Embora existam estudos limitados sobre o ensaio de MTT utilizando as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  com linhagens celulares de peixe, Di virgilio et al., (2010) observaram a redução expressiva na viabilidade celular em células UMR 106 a uma concentração de 25-100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , concluindo que a citotoxicidade de diferentes NP baseia-se principalmente na dose e composição das partículas e pode variar de linhagem celular. Resultados semelhantes foram observados em células hMSCs quando expostas as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  a concentrações superiores a 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  que inibem significativamente a viabilidade celular (ALSHATWI et al., 2013). Uma diminuição na viabilidade celular foi também observada em culturas de fibroblastos murinos (L929) (RADZIUN et al., 2011) e células A549 (SIMON-DECKERS et al., 2008) quando

expostas as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> dependentes da dose. Por outro lado, a citotoxicidade exibida das MP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foi menor quando comparada com a sua forma nano.

Além dos efeitos citotóxicos, as NP também demonstraram induzir a geração de EROs, potencialmente prejudiciais ao funcionamento das células, resultando em estresse oxidativo, ou seja, um desequilíbrio entre a geração de EROs e a capacidade de um sistema biológico para desintoxicar os reativos ou reparar os danos resultantes (MANKE; WANG; ROJANASAKUL, 2013). Para superar o excesso de EROs, as células podem ativar o sistema antioxidante enzimático e não-enzimático (MANKE; WANG; ROJANASAKUL, 2013). A maioria dos trabalhos sugerem que a geração de EROs, que pode ser protetora ou prejudicial durante as interações biológicas, são frequentemente observadas em resposta à exposição das NP (NEL, 2006). Diferentes NP estão envolvidas na interrupção da função mitocondrial pela geração de EROs em várias linhagens celulares (LONG et al., 2007; KANG et al., 2008) e podem causar uma série de lesões incluindo oxidação de proteínas, lipídios e DNA (SRIKANTH et al., 2014).

Nesse sentido, as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> também induzem efeitos citotóxicos, mediada pela geração de EROs, resultando na morte celular (SHAH et al., 2015). Em um estudo realizado por Srikanth et al., (2015), foi observado um declínio dependente da concentração na viabilidade celular em células CHSE-214 expostas as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mediado pela geração de EROS, no qual desencadeou o estresse oxidativo nas células CHSE-214 expostas as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. O estresse oxidativo induzido por as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> resultou na redução significativa de superóxido dismutase, catalase e glutatona, contudo, verificou-se um aumento significativo da glutatioa sulfo-transferase e da lipoperoxidação. Também foi relatado que as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de diferentes tamanhos e formas induzem a geração de EROs intracelular, desencadeando a produção de IL-1β (KIM et al., 2015).

### 2.2.5.2 Estudos *in vivo*

A maioria dos estudos comprovando a toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram realizadas com células de mamíferos relacionados aos efeitos na saúde humana, entretanto, os resultados de tais estudos *in vitro* não podem, portanto, ser diretamente transferidos para condições ambientais, como objetivam alguns estudos (BERNHARDT et al., 2010; STANDER; THEODORE, 2011; SMITA et al., 2012; SCHIRMER; BEHRA, 2013). De forma geral, o transporte entre compartimentos ambientais e biológicos e o seu comportamento químico no ambiente ainda são pouco compreendidos devido à complexidade dos mecanismos de absorção biológica e os modos de ação da toxicidade (JU-NAM; LEAD, 2008).

Estudos para entender os efeitos biológicos das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram realizados em diversos organismos terrestres e aquáticos, conforme apresentados no **Quadro A1** (apêndice A). As NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induzem efeitos adversos para a saúde de peixes, microcrustáceos de água doce, algas, plantas, microrganismos, entre outros. A toxicidade terrestre, muitas vezes, representada pelos efeitos nas plantas ou nos microrganismos (bactérias) foi dada atenção considerável.

#### 2.2.5.2.1 Bactérias

As bactérias atuam como um nicho fundamental nas redes alimentares e, portanto, desempenham um papel importante na manutenção dos ciclos ecológicos e biogeoquímicos dos ecossistemas aquáticos (IVASK et al., 2014). As bactérias são decompositoras essenciais da matéria orgânica e são a base para muitas redes alimentares aquáticas e terrestres, sendo assim o efeito adverso nas bactérias pode ter um impacto nos níveis tróficos elevados (SHADE et al., 2012). Entre os organismos unicelulares, as bactérias são o modelo mais utilizado para estudar a toxicidade das NP (HEINLAAN et al., 2008). A maioria dos estudos de toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em espécies de bactérias ecologicamente relevantes foram conduzidas em *Escherichia coli*, seguida de *Salmonella typhimurium* e *Bacillus subtilis*, entre outras.

A exposição das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aos organismos demonstraram uma taxa de mortalidade de 57% para *B. subtilis*, 36% para *E. coli* e 70% para *P. fluorescens* em baixa concentração (20 µg/mL) (JIANG; MASHAYEKHI; XING, 2009). Já em um meio de teste enriquecido em com nutrientes, Sadiq et al., (2009) observaram um efeito inibitório do crescimento da *E. coli* expostas às NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em concentrações muito altas (acima de 1000 µg/mL). As bactérias gram-negativa são mais susceptíveis as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e micropartículas (MP) comparado as bactérias gram-positivas (BHUVANESHWARI et al., 2016), que podem ser atribuídas às diferenças na estrutura da membrana celular das bactérias que controlam o acesso aos locais de ação. Os resultados dos estudos supracitados demonstram a seletividade da natureza tóxica das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para diferentes sistemas bacterianos e o impacto do tamanho das partículas sobre a toxicidade.

A inibição do crescimento e a viabilidade celular foram as principais alterações observadas nas espécies de bactérias expostas as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, sendo usualmente utilizadas como *endpoints* (MA; WILLIAMS; DIAMOND, 2013). Tais alterações podem variar conforme as espécies utilizadas, características físico-químicas do material, bem como método de ensaio. Do ponto de vista ecológico, a compreensão da toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para espécies bacterianas relevantes para o ambiente é de grande importância. Além disso, as bactérias podem atuar como vetores para as NP adsorvidas ou internalizadas, iniciando seu movimento (bioacumulação ou biomagnificação) através de cadeias alimentares.

#### 2.2.5.2.2 Algas

As algas desempenham um papel importante no ecossistema aquático, não só produzindo biomassa que constitui o alimento básico para as redes alimentares, mas também contribuindo para a autopurificação da água poluída, são amplamente utilizadas nos ensaios de toxicidade de poluentes aquáticos, uma vez que são organismos sensíveis com uma elevada capacidade de bioacumulação resultante da sua imensa superfície de contato (DELORENZO et al., 2002).

Para as algas, apenas poucos dados estão disponíveis sobre a toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na literatura (**Quadro A1 – apêndice A**). Em geral, os estudos relataram a inibição de crescimento de algas em uma faixa de concentração variando de 0,05 µg/mL a 1000 mg/mL. Ji, Long e Lin, (2011) observaram efeitos das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (1000 mg/L) no crescimento das algas *Chlorella sp*, que variaram por diversos fatores relacionados as características das NP. Em um outro estudo, Metzler et al., (2012) observaram que as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> não afetaram o crescimento em *Chlorella sp*, segundo os autores, vários fatores podem interferir sobre o efeito das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sobre o crescimento de algas como: flocculação, disponibilidade de luz, disponibilidade de nutrientes e tamanho de partícula.

A opacidade da suspensão de NP indiretamente desempenha um papel na inibição do crescimento, diminuindo a intensidade da solução. A restrição física é um dos mecanismos indiretos de toxicidade das NP em relação às algas (NAVARRO et al., 2015). Um efeito inibitório típico dependente da concentração das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foi observado por Sadiq et al., (2011) devido à diferença de toxicidade relacionada ao tamanho das partículas na análise comparativa dos dados de crescimento de duas espécies de algas tratadas com NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e MP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, revelando maior sensibilidade para a *Scenedesmus sp* comparado à *Chlorella sp* e com maior resposta inibitória no caso das NP. Ainda, no mesmo estudo, foi observado que os efeitos de toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em relação às MP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram evidentes, o teor total de clorofila foi significativamente menor nas células tratadas em comparação com as células de controle, com uma diminuição dependente da concentração no teor de clorofila, o que confirmou o efeito inibitório do crescimento da concentração crescente das partículas.

#### 2.2.5.2.3 Plantas

Há um número limitado de estudos de plantas disponíveis, embora uma variedade relativamente ampla de espécies tenha sido testada, incluindo agrião de jardim (*Lepidium sativum*) (ASZTEMBORSKA et al., 2015), cebola (*Allium cepa*)

(RAJESHWARI et al., 2015), couve (*Brassica oleracea*) (AMIST et al., 2017), milho (*Zea mays*) (RAJENDRAN et al., 2016), soja (*Glycine max*), tabaco (*Nicotiana tabacum*) (BURKLEW et al., 2012) e trigo (*Triticum aestivum*) (YANIK; VARDAR, 2018). Contudo, as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> são as menos estudadas em plantas do ponto de vista toxicológico. Elevadas concentrações de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (na faixa de mg/L a g/L) podem causar apoptose no trigo radicular (YANIK; AYTÜRK; VARDAR, 2017), afetar os processos de transcrição de genes no tabaco (BURKLEW et al., 2012) e inibir a germinação de sementes e o alongamento das raízes de *G. max*, *Z. mays* e *B. oleracea* (YANG; WATTS, 2005; RAJENDRAN et al., 2016).

Lin e Xing, (2007) verificaram que o alongamento da raiz de mudas de *Z. mays* com 5 dias de idade foi reduzido com 2000 mg/L de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (60 nm) enquanto que nas mesmas condições não foram observados efeitos negativos no crescimento de *R. sativus*, *B. napus*, *C. sativus*, *L. perenne* e *L. sativa*. Da mesma forma, Yang e Watts, (2005) também observaram efeitos sobre inibição no comprimento da raiz, porém na concentração de 2 mg/mL de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (13 nm) para cinco plantas: *Z. mays*, *C. sativus*, *L. max*, *B. oleracea* e *D. carota*. Em contraste, estudos com *L. sativa* e *R. sativus* mostraram que de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (60 nm) não apresentaram efeito adverso sobre o crescimento das plantas (LIN; XING, 2007).

Adicionalmente, verificou-se que as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> afetam o crescimento das raízes de *A. cepa* e causam genotoxicidade (RAJESHWARI et al., 2015) e um aumento da atividade da peroxidase foi considerado um dos fatores de estresse oxidativo em *T. aestivum* (YANIK; VARDAR, 2015). Os fatores de estresse foram estudados em *N. tabacum* e observou-se que à medida que a concentração das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> aumenta o comprimento da raiz diminui. Além disso, a biomassa média e o número de folhas de cada planta de *N. tabacum* também diminuem (BURKLEW et al., 2012). Segundos estes autores, as mudas formam raízes múltiplas com o aumento da concentração de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, portanto, identificado como mecanismo defensivo para evitar o contato com excesso de NP. A conclusão do referido estudo (ou dos referidos autores) foi que os genes de microRNA foram regulados de forma



positiva e desempenharam um papel fundamental na capacidade das plantas para resistir ao estresse as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

#### 2.2.5.2.4 Invertebrados terrestres

A maioria dos estudos de toxicidade em invertebrados terrestres foram realizados com o nematóide *Caenorhabditis elegans* (WANG; WICK; XING, 2009; WU et al., 2011; YU et al., 2011; LI et al., 2012) e com a minhoca *Eisenia fetida* (COLEMAN et al., 2010; HECKMANN et al., 2011). Entre os poucos estudos existentes sobre os efeitos das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em *C. elegans*, as concentrações de efeito relatadas variam com o tamanho da partícula. Wang, Wick e Xing, (2009) observaram efeito das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> acima de 102 mg/L em comparação com o controle, que inibiu o crescimento, número de ovos e a reprodução, enquanto que para as MP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foi necessário 203,9 mg/L para inibir o número de ovos e a reprodução, sugerindo que as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> apresentam toxicidade adicional sobre o mematóide.

Em um outro estudo, Li et al., (2012) avaliaram os comportamentos de locomoção e observaram que após 6 horas de exposição as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (51-203,9 mg/L) houve alteração nos comportamentos de locomoção. No entanto, alguns comportamentos nos nematoides expostos as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram inferiores aos dos nematoides expostos as MP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em concentrações de 51-203,9 mg/L. Ainda, nesse mesmo estudo, os autores confirmaram que a exposição prolongada as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (8,1-23,1 mg/L) aumentou os níveis de estresse oxidativo, sendo que uma possível causa de indução de estresse oxidativo é o aumento na geração de EROs.

Outros estudos foram projetados para investigar o potencial do tamanho de partícula sobre a bioacumulação, toxicidade e comportamento de evasão. Nesse contexto, no estudo de Coleman et al., (2010) as *E. fetida* foram expostas a altos níveis de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, que reduziram reprodução em relação às expostas a MP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Sendo assim, verificou-se que as minhocas exibiram um comportamento de evasão dos solos tratados com altas concentrações de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> quanto MP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, embora o

comportamento de evitar seja significativo somente nos tratamentos com as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em altas concentrações.

#### 2.2.5.2.5 Invertebrados aquáticos

Grandes quantidades de NP são encontradas em ambientes aquáticos marinhos e de água doce (EXBRAYAT; MOUDILOU; LAPIED, 2015), todavia estudos de toxicidade em invertebrados aquáticos têm sido surpreendentemente escassos comparando com bactérias, algas e plantas (MA; WILLIAMS; DIAMOND, 2013). Os poucos estudos com NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> se concentraram principalmente em crustáceos de água doce, como *Ceriodaphnia dubia* (LI; CZYMMEK; HUANG, 2011; HU et al., 2012; PAKRASHI et al., 2013) e *Daphnia magna* (ZHU et al., 2009), em organismos aquáticos marinhos, até o momento apenas um trabalho foi feito avaliando os efeitos das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em *Artemia salina* (ATES et al., 2015).

Os resultados destes estudos (**Quadro A1**) demonstraram que as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> apresentaram efeitos diferentes sobre os invertebrados aquáticos testados. A *C. dubia* foi mais suscetível as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Pakrashi et al., (2013) observaram que a imobilização e subsequente mortalidade foi dependente da concentração (µg) e tempo. Em 24 h, observou-se que todos os animais estavam vivos para exposições de 20 e 40 µg/mL, enquanto que 44,34% de sobrevivência foram registradas para 120 µg/mL. No tempo de 48 h, 94,34% estavam vivos após 20 e 40 µg/mL de exposição, enquanto que 20% de sobrevivência foram observados para a dose de 120 µg/mL.

Conforme outro estudo de Pakrashi et al., (2014), no qual avaliou-se o potencial de transferência trófica, comportamento das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e seus prováveis impactos no fluxo de energia no ecossistema aquático de água doce, foi observado leves alterações no comportamento alimentar das *C. dubia* alimentadas com algas *C. elipsoides* expostas as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, que a longo prazo pode ter consequências no fluxo de energia através da cadeia alimentar. Por outro lado, o comportamento

reprodutivo das *C. dubia* permaneceu inalterado após a exposição à alimentação de algas bioacumuladas com NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

No estudo delineado para avaliar a diferença na toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nas fases cristalinas  $\alpha$  e  $\gamma$  sobre mortalidade, bioacumulação e estresse oxidativo, Ates et al., (2015) apresentaram diferenças de toxicidade com a mudança no tamanho e fase cristalina das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Os resultados níveis de malondialdeído (MDA) indicaram que NP  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> menores (5 nm) foram mais tóxicos do que partículas maiores de  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,4  $\mu$ m) em 96 h. A maior mortalidade foi medida como 34% em 96 h para NP  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a 100 mg/L (CL<sub>50</sub> acima de 100 mg/L). Segundo os autores, as NP de  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram mais tóxicos do que as NP de  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em todas as condições.

#### 2.2.5.2.6 Vertebrados aquáticos

A literatura é escassa a respeito de estudos ou dados de toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para vertebrados aquáticos. Os estudos encontrados são de peixes, particularmente, o peixe-zebra, *Danio rerio*, concentrando-se em estágios de desenvolvimento inicial (ZHU et al., 2008; KOVRIŽNYCH et al., 2013) (**Quadro A1**) devido à sua biologia bem compreendida, além de ser um modelo de organismo de teste aceito por diversas agências reguladoras (CHAKRABORTY et al., 2016). Portanto, os estudos com *D. rerio* demonstraram que as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> não apresentaram toxicidade para embriões e larvas.

A toxicidade de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para *Carassius auratus* também foi relatada e seus efeitos incluem danos aos tecidos superficiais, lesões no fígado e brânquias, problemas respiratórios e estresse oxidativo (BENAVIDES et al., 2016). Para a exposição de 100  $\mu$ g/L de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, por 14 dias, não ocorreu letalidade para o peixe, porém causou estresse oxidativo significativo, que causou o aumento da atividade de várias enzimas antioxidativas (SOD, CAT, GPx) e da peroxidação lipídica, sendo que a susceptibilidade ao estresse oxidativo foi observado nas brânquias e fígado.

#### 2.2.5.2.7 Vertebrados terrestres (mamíferos)

As avaliações de toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> via exposição oral são pouco relatadas. Algumas experiências realizadas com ratos (*Rattus norvegicus*) e camundongos (*Mus musculus*) apresentaram efeitos nocivos das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, tais como bioacumulação em diversos tecidos (cérebro, fígado, rins, intestino, baço e pulmão) (FERIN et al., 1990; PARK et al., 2015; MORSY; EL-ALA; ALI, 2016), alteração miocárdial (EL-HUSSAINY et al., 2016), inflamação, estresse oxidativo e dano no DNA (BALASUBRAMANYAM et al., 2009; LI et al., 2009; LU et al., 2009; ZHANG et al., 2011) e diminuição de células sanguíneas brancas (PARK et al., 2015).

Park et al., (2015) investigaram a toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> após uma administração oral de 28 dias, depois desse período, aumentaram o consumo de alimentos e água dos grupos expostos, contudo houve uma leve inibição no aumento do peso corporal a 30 e 60 mg/kg por dia. A 60 mg/kg, diariamente, as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> apresentaram toxicidade de acordo com análises de hematologia, bioquímica, fator de crescimento transformante-β (TGF-β) e análises de expressão gênica. Outra avaliação foi realizada por Balasubramanyam et al., (2009), na qual as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mostraram genotoxicidade para células sanguíneas e medula óssea após a exposição oral.

Zhang et al., (2011) expuseram camundongos as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (50 nm) por via nasal e monitoraram para avaliar os possíveis efeitos sobre o comportamento. Os resultados indicaram que a exposição as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> causaram comprometimento da função neurocomportamental, caracterizada por maior latência de fuga. A alteração nas mitocôndrias demonstrou desempenhar um papel importante nos efeitos neurotoxicológicos e pode ser uma causa direta de defeitos neurocomportamentais.

Em outro estudo realizado em ratos foi observado que em testes agudos cérebro, fígado, rins, intestino e baço foram afetados, além disso, o acúmulo das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> no cérebro, fígado, rim, intestino e baço de ratos foi significativamente maior do que os controles (MORSY; ABOU EL-ALA; ALI, 2013). No teste de

genotoxicidade (Teste cometa) foi evidenciado o aumento significativo na porcentagem de danos no DNA nas células cerebrais. De acordo com os autores, os resultados obtidos indicam que a bioacumulação das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> depende das doses e dos períodos experimentais.

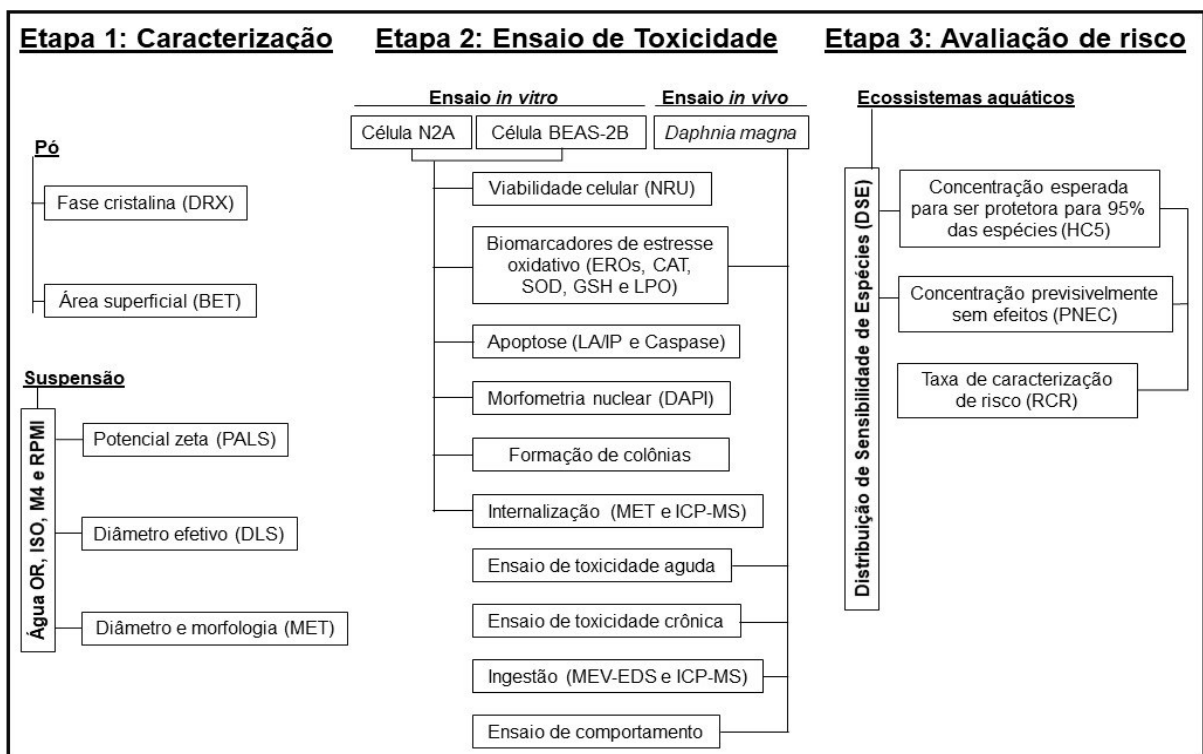
No estudo de Morsy, El-ala e Ali, (2016) foi constatado ver que o estresse oxidativo depende principalmente da bioacumulação das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, uma vez que, os autores observaram inibição significativa das atividades das enzimas SOD, CAT, GPx do cérebro, fígado e rim e redução acentuada nas concentrações de GSH associadas a elevação significativa nos níveis de malondialdeído. Em contrapartida, a toxicidade aguda das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em camundongos foi avaliada preliminarmente por Yang et al., (2012) após a exposição oral. Anormalidades, incluindo letargia, anorexia, vômitos ou diarreia, não foram observados durante a observação de 14 dias. O aumento do peso corporal foi semelhante entre os grupos expostos e o grupo controle. Ambas, as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e MP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, não afetaram os pesos corporais dos camundongos. Os comportamentos clínicos indicaram que as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e MP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> eram de baixa toxicidade, corroborando com os dados disponíveis para outros modelos (**Quadro A1**) que sugerem que a toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> é baixa.

## CAPÍTULO III

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi dividido em três etapas, as quais podem ser melhor observadas na **Figura 6**. A primeira etapa consistiu na síntese e caracterização das propriedades físico-químicas das NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Na segunda etapa foi avaliada a toxicidade *in vitro*, utilizando as células neuroblastoma murino Neuro-2A (N2A) e células epiteliais brônquicas humanas (BEAS-2B). Por fim, na terceira e última etapa foi determinada a toxicidade *in vivo*, utilizando o bioindicador *Daphnia magna*, e avaliado o risco para a biodiversidade aquática.



**Figura 6** - Esquema das três etapas de desenvolvimento do trabalho.

### 3.2 MATERIAIS

As NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  foram sintetizadas no Laboratório de Toxicologia Ambiental - LABTOX da UFSC e as NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  foram adquiridas de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), tanto as NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  como as NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  apresentaram diâmetros médios <50 nm. Além das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  foram usados no trabalho os seguintes materiais: nitrato de alumínio não-hidratado ( $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ ), Urea, RPMI-1640 Medium; Soro bovino fetal (SBF), piruvato de sódio, penicilina/estreptomicina, L-glutamina, solução salina de tampão de fosfato (PBS), brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), Cloridrato de 3-amino-7-dimetilamino-2-metilfenazina (NRU); Azul de Tipan, paraformaldeído, violeta de cristal, 4-(1,1,3,3-tetrametilbutil) fenil-poliétileno glicol, t-octilfenoxipoletoxiol (Triton X-100), metanol, diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA ); Laranja de Acridina (LA); Iodeto de Propídio (IP), dicloridrato de 2-(4-amidinofenil)-6-indolecarbamidina, dicloridrato de 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI); Cloridrato de 2-amino-2-(hidroximetil)-1,3-propanodiol (Tris-HCl); Cloreto de sódio (NaCl); Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (EDTA); Ácido clorídrico (HCl); Dodecilsulfato de sódio (SDS); 4,6-Dihidroxipirimidina-2-tiol (TBA) e 1,1,3,3-tetraetoxipropano (TEP); Fosfato de potássio monobásico; 2,4-Dinitroclorobenzeno (CDNB); 5,5'-Ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB); L-glutationa oxidada (GSSG); L-glutationa reduzida (GSH); fosfato de dinucleótido de adenina de  $\beta$ -nicotinamida (NADPH); Albumina de soro bovino (BSA); Cloreto de potássio (KCl); Solução de peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); Solução de tetróxido de ósmio; Sal de sódio de ácido cacodílico trihidratado; Solução de glutaraldeído 25%; resina Spurr, foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). O Tripsina-EDTA foi adquirido de Vitrocell (Campinas, Brasil), Etanol 99,3% foi adquirido de SPlabor (Presidente Prudente, Brasil), água de osmose reversa (OR) (0,05 S/cm) e água Ultrapura (UP) (18,2 m $\Omega$ ).

### 3.3 SÍNTESE DAS NP $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

As NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram sintetizadas de acordo com o método de combustão descrito por Ianoş, Lazău e Păcurariu, (2009) com algumas modificações, sendo elas a variação da concentração do precursor (Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>·9H<sub>2</sub>O), do combustível (ureia) e da temperatura de calcinação. Para a reação 26,1 g (70 mmol) do precursor foram dissolvidos em 10 mL de água e mantidos sob agitação constante por 30 min. Depois, foram adicionados 10,5 g (175 mmol) do combustível. A mistura foi agitada constantemente por mais 30 min. Em seguida, solução cristalina foi calcinada em forno mufla a 350 °C por 1 h. Após esse período, o produto da reação foi resfriado, macerado e novamente calcinado no forno de mufla a 1000 °C por 1 h. Por fim, as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> obtidas foram lavadas com água, centrifugadas a 2800 RPM por 5 min, e secas na estufa a 50 °C por 24 h.

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO DAS NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

#### 3.4.1 Difratomia de raios-X (DRX)

A técnica de DRX foi utilizada para identificar as fases cristalinas para ambas NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Para efetuar as medidas as amostras do pó das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram prensadas no formato de pastilhas. Os difratogramas de raios-X das NP foram obtidos numa faixa de varredura do ângulo de difração  $2\theta = 20^\circ - 70^\circ$  e a taxa de coleta dos dados de foi 0,01 °/s, utilizando um Difrátometro Philips, modelo X'Pert, equipado com um tubo de Cu (CuK  $\alpha$ ,  $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$ ) do Laboratório de Caracterização Microestrutural do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC.

#### 3.4.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A partir das imagens de MET foram determinados os diâmetros médios das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. As amostras das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram dispersas em água UP (500 mg/L) com



auxílio do equipamento de ultrassom (Qsonica Q 500 W) com potência de 120 W (24%) por 2 min. Em seguida, uma gota desta dispersão foi depositada sobre uma grade de cobre e recoberta com um filme de carbono e secas por 24 h antes da análise. As micrografias foram obtidas no microscópio JEOL JEM-1011, operando a 100 kV. As distribuições de diâmetros foram identificadas a partir da curva gaussiana com média no diâmetro de 100 partículas de uma imagem de MET e analisadas no software ImageJ (versão 1.46r - <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). O equipamento de MET faz parte da estrutura do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

### **3.4.3 Diâmetro efetivo (DE), Potencial Zeta (PZ) e índice de polidispersão (IP)**

Para determinar o PZ, DE e IP das suspensões coloidais das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em água UP e nos meios de cultivo e ensaio de *D. magna* (M4 e ISO) e celular (meio RPMI suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF)) foram preparadas suspensões de 500 mg/L e diluídas 1:10 (v/v). As suspensões água UP, ISO e M4 foram previamente dispersas no ultrassom (Qsonica Q 500 W) a potência de 120 W (24%) por 2 min. Para o meio RPMI, afim de minimizar a degradação sonolítica (isto é, desnaturação de moléculas de proteína) induzida pela sonicação, a suspensão RPMI foi previamente dispersa por ultrassom a potência de 50 W (10%) por 30 s (TAUROZZI; HACKLEY; WIESNER, 2011).

Em seguida, foi medido o pH (Alfakit, AT-355) a  $20 \pm 1$  °C para os meios água UP, ISO e M4. Para o meio RPMI as leituras foram realizadas a 25 °C (temperatura de caracterização padrão) e a 37 °C (condições de cultura de células). Os DE, PZ e IP foram realizados em triplicata no equipamento NanoBrook 90Plus Zeta do Laboratório de Toxicologia Ambiental – LABTOX da UFSC.

#### 3.4.4 Área Superficial Específica (BET)

A área superficial das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram analisadas no equipamento *Surface Area Analyzer* (Quantachrome Instruments) do Laboratório de Central de análises do Departamento de Engenharia Química e alimentos da UFSC. As amostras secas foram resfriada para 77 K por 1 h, pois nesta temperatura o gás inerte (nitrogênio) foi adsorvido fisicamente na superfície das amostras expostas. Após ciclos de adsorção e dessorção um ou mais pontos de dados da isoterma de adsorção foram medidos e a equação de BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938) foi usada para determinar a área superficial específica. A equação BET é utilizada para calcular o volume de gás necessário para formar uma monocamada na superfície da amostra. A superfície real foi calculada a partir do conhecimento do tamanho e do número de moléculas de gás adsorvido.

### 3.5 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

#### 3.5.1 Ensaio *in vitro*

##### 3.5.1.1 Linhagens celulares N2A e BEAS-2B

Para a realização desse estudo foram utilizados células da linhagem de neuroblastoma murino, Neuro-2a (N2A), generosamente cedidas pelo Prof. Silvio Marques Zanata (Universidade Federal do Paraná) obtidas da *American Type Culture* (ATCC® CCL-131™) e as células epiteliais brônquicas humanas (BEAS-2B), gentilmente cedidas pela Prof<sup>a</sup>. Ana Paula de Melo Loureiro (Universidade de São Paulo) obtidas da *American Type Culture* (ATCC® CRL-9609™).

As células selecionadas representam diferentes locais alvo, ou seja, possíveis vias de exposição e efeitos causados, considerando os mecanismos de ação envolvidos e possíveis efeitos causados pelas NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (KARMAKAR; ZHANG; ZHANG, 2014). Em estudos anteriores foi demonstrado que as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> podem

afetar o sistema nervoso (YU et al., 2015; ZHANG et al., 2015), sendo este um dos sistemas mais responsivos aos xenobióticos. Desse modo, a linha celular de neuroblastoma de camundongo Neuro-2A (N2A) foi selecionada como modelo para investigar possíveis efeitos neurotóxicos. Já a linhagem celular epitelial brônquica humana BEAS-2B foi escolhida para os testes de toxicidade em decorrência do trato respiratório ser a via de entrada mais provável para as NP presentes no ar (FERREIRA; CEMLYN-JONES; ROBALO CORDEIRO, 2013).

#### 3.5.1.2 *Manutenção das células*

As linhagens celulares foram mantidas em frasco de 25 cm<sup>2</sup> a uma densidade de  $1 \times 10^5$  células/mL em meio de cultura RPMI *Medium* 1640, suplementado com soro fetal bovino (SFB) (10%), L-glutamina (2 mM), 10 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1,0 mM de piruvato de sódio - pH 7,2, penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (50 µg/ml) em uma incubadora (Laboven, L212) a 37 °C com CO<sub>2</sub> a 5% e umidade saturada. O meio de cultura foi trocado a cada 3 dias e as células foram lavadas com *Phosphate buffered saline* (PBS) e tripsinizadas quando necessário, utilizando uma solução de tripsina a 0,25% EDTA 0,53 mM para desprendimento.

#### 3.5.1.3 *Ensaio de viabilidade celular*

As células foram semeadas ( $4 \times 10^4$ /poço) em uma placa de 96 poços e incubadas a 37 °C com CO<sub>2</sub> a 5% e umidade saturada por um período de 8 h para adesão. Após exposição, as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0,5; 5; 50; 100; 500 e 1000 mg/L) foram mantidas por 24, 48 e 72 h. Em seguida, o meio de cultura foi removido e as células foram incubadas com uma solução de vermelho neutro (NRU), 0,04 mg/mL em PBS por 12 h a 37 °C com CO<sub>2</sub> a 5% e umidade saturada. Depois, o NRU foi removido e 150 µL de uma solução de ácido acético/etanol/água 1:50:49 (v/v) foi adicionada para dissolver os cristais formados. Por fim, os valores de absorvância

(Ab) foram obtidos na leitora (BioTek ELx800) com comprimento de onda de 540 nm. As Ab medidas para cada concentração de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram convertidas em porcentagens de viabilidade celular em relação à média dos controles, os quais foram considerados 100% viáveis de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{Ab. Cel tratada} - \text{Ab. Branco}}{\text{Ab. Cel controle} - \text{Ab. Branco}} \times 100$$

#### 3.5.1.4 Biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo (EROs, CAT, SOD, GSH e LPO)

A geração intracelular de Espécies reativas de oxigênio (EROs) foi determinada conforme metodologia Keston e Brandt, (1965). Células N2A e BEAS-2B foram semeadas ( $5 \times 10^4$ ) em placas de 12 poços e incubadas em estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Após um período de 12 h para adesão, a geração de EROs foi monitorada no controle e células tratadas com NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nas concentrações 0,5 e 50 mg/L (concentrações baseadas nos resultados do ensaio de viabilidade), após 24, 48 e 72 h de exposição as células foram lavadas com PBS e adicionados 100  $\mu$ L de H2DCF-DA a 50  $\mu$ M e incubadas por 30 min a 37 °C no escuro, seguindo o protocolo descrito por Lojk et al., (2015). Em seguida, a fluorescência foi analisada em um leitor de fluorescência (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices) com excitação 488 nm e emissão 530 nm e visualizadas em microscópio de fluorescência (Olympus, IX83).

Sob condição desfavorável, em que há um aumento de EROs, o sistema de defesa amplia sua atividade do sistema enzimático e não enzimático para controlar os níveis intracelulares destas moléculas. Assim, os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e glutathiona reduzida (GSH) foram utilizadas como biomarcadores de estresse oxidativo. Para realização dessas análises as células N2A e BEAS-2B foram semeadas ( $2,5 \times 10^6$ ) em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> e incubadas em estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Depois de 24, 48 e 72 h de exposição nas concentrações 0,5 e 50 mg/L, as células foram tripisinizadas,

homogeneizadas em tampão fosfato salino (100 mM - pH 7,4) e centrifugadas a 10.000 RPM por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram utilizados para os ensaios cinéticos. A atividade da CAT foi determinada com base no método descrito por Aebi, (1984), que consiste em misturar as amostras com peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A decomposição do substrato H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi registrada por espectroscopia de UV (UV-5100S) a 240 nm.

A determinação da atividade da SOD foi realizada seguindo o método descrito por Mccord e Fridovich, (1969), em 50 µL de amostra. O princípio do ensaio baseou-se na inibição da redução do citocromo c (0,075mM) pelo superóxido gerado no sistema enzimático xantina/xantina oxidase (56 mM). A quantidade de xantina oxidase empregada foi aquela capaz de produzir uma velocidade de redução do citocromo c registada por espectroscopia de UV (UV-5100S) a 550 nm. A determinação da atividade da GSH foi realizado como descrito por Beutler, Duron e Kelly, (1963), assim 500 µl de amostra foi precipitada com TCA 12% na proporção 1:10 (m/v). Em seguida a amostra foi centrifugada a 1.000 RPM por 15 min, adicionado DTNB (2,5 mM) e tampão fosfato de potássio (80 mM - pH 8,0 para, então, manter sob agitação por aproximadamente 1 min. Posteriormente, as medidas de absorbância foram registadas imediatamente por espectroscopia de UV (UV-5100S) a 412 nm. Para a normalização dos resultados de CAT, SOD e GSH usou-se a massa total de proteína (mg), que foi determinada de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada estimando o conteúdo de Malondialdeído (MDA), usando o método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), descrito por Draper e Hadley, (1990) com poucas modificações. As células N2A e BEAS-2B foram lisadas com tampão (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 15 mM) e misturado com 7% de SDS, 0,67% de TBA e HCL 1M. A mistura foi aquecida a 95 °C durante 90 min, resfriada, centrifugada e registrada as medidas de absorbância por espectroscopia de UV (UV-5100S) a 532 nm. As concentrações de MDA foram calculadas usando TEP como um padrão de referência. Para a

normalização do resultado de LPO foi usada a massa total de proteína (mg), determinada seguindo o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

#### 3.5.1.5 *Análise de morte celular por LA/IP e Caspase*

A indução de apoptose foi avaliada pela coloração diferencial de Laranja de acridina/iodeto de Propídeo (LA/IP). As células N2A e BEAS-2B ( $4 \times 10^4$ /poço) foram tratadas com NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nas concentrações 0,5 e 50 mg/L (concentrações baseadas nos resultados do ensaio de viabilidade) por 24, 48 e 72 h. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS, o meio foi substituído por 10  $\mu$ L da solução (1:1) contendo ambos LA/IP (100  $\mu$ g/mL), mantido em repouso por 5 min e examinado por um microscópio de fluorescência (Olympus, BX41) com o filtro de excitação 480/30 nm. Para quantificar o percentual de cada um dos eventos celulares (células viáveis e apoptóticas) foram contadas 200 células de cada amostra (triplicata) e fotografadas para o registro visual de possíveis alterações. Além disso, a atividade da caspase foi medida usando o kit de teste Caspase-Glo<sup>®</sup> 3/7, conforme o protocolo do fabricante.

#### 3.5.1.6 *Avaliação morfométrica nuclear*

A avaliação de alterações na morfologia nuclear das células N2A e BEAS-2B foram realizadas através da microscopia de fluorescência, utilizando como corante o DAPI. Após o tratamento nas concentrações 0,5 e 50 mg/L (concentrações baseadas nos resultados do ensaio de viabilidade) por 24, 48 e 72 h, o meio foi totalmente retirado, procedeu-se à lavagem das células com PBS e posterior adição de paraformaldeído 4% por 15 min para fixação das células. Após esse tempo, as células foram novamente lavadas com PBS e depois mantidas em solução de PBS contendo 0,1% de Triton<sup>®</sup> X-100 e 300 nM de DAPI a temperatura ambiente por 30 min.

Depois da incubação, as células foram ressuspensas em PBS e a visualização dos núcleos das células coradas com DAPI foram feitas em microscópio de fluorescência (Olympus, BX41). A fim de observar irregularidades nucleares foram realizadas avaliações de tamanhos e regularidades dos núcleos em várias medidas de morfometria nuclear combinadas em um único índice de irregularidade nuclear (NII), usando o *software ImageJ* (versão 1.46r - <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) acoplado com NII\_Plugin (FILIPPI-CHIELA et al., 2012).

### 3.5.1.7 Ensaio Clonogênico

Para avaliar a capacidade de formar colônias nas culturas de N2A e BEAS-2B foi determinado o efeito das NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sobre o potencial replicativo de uma única célula, conforme o ensaio de formação de colônia adaptado a partir de Franken et al., (2006). As células foram tratadas nas concentrações 0,5 e 50 mg/L (concentrações baseadas nos resultados do ensaio de viabilidade) por 24, 48 e 72 h. Uma vez encerrado o tempo de tratamento, as células foram lavadas, tripsinizadas e contadas em câmara de Neubauer para determinar o volume necessário para obter 1000 células para cada poço de placa de cultura de 6 poços. Após 10 dias de incubação, as colônias formadas foram fixadas com uma solução de metanol/ácido acético/água na proporção 1:1:8 (v/v), coradas com solução de violeta cristal 0,1% e contadas com o auxílio de um estereomicroscópio (Olympus, SZX16).

### 3.5.1.8 Internalização das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Para visualizar as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> no interior das células, estas foram semeadas ( $5 \times 10^5$ ) em placas de 6 poços e incubadas em estufa a 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Após a exposição com NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na concentração de 50 mg/L por 24, 48 e 72 h, as células foram preparadas para observação em MET. Para isso as células foram pré-fixadas em solução de glutaraldeído 2,5% e sacarose 2% e tamponada com cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) a 4 °C por 12 h. Posteriormente, as amostras

foram pós-fixadas em tetróxido de ósmio ( $\text{OsO}_4$ ) a 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M 1:1 (v/v) por 4 h à temperatura ambiente (PUESCHEL, 1990; BOUZON, 2006) e desidratadas em uma série de soluções aquosas de concentrações crescentes de 30, 50, 70, 90 e 100%, sendo a última série de etanol (100%) trocada três vezes.

Após a desidratação, as amostras foram infiltradas com resina Spurr (SPURR, 1969). Logo após a infiltração, o material foi polimerizado em moldes horizontais em estufa a 70 °C por 24 h. As secções ultrafinas (70-90 nm) foram cortadas no ultramicrotomo (Leica UC7/EMKMR3), com navalha de diamante (Diamant ultra 45 °), sendo que, pelo menos, 5-10 cortes ultrafinos foram colocados em grades de malha de 300 revestidas com Cu (EMS, EMS300-Cu) e contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo conforme os procedimentos de Reynolds, (1963). Finalmente, as amostras foram observadas e fotografadas em TEM (JEOL JEM 1011), operando a uma voltagem de aceleração de 80 kV. As imagens capturadas foram registradas digitalmente e preparadas as pranchas utilizando o pacote Adobe Photoshop CS5 (Adobe Systems).

#### 3.5.1.9 *Quantificação das NP $\text{Al}_2\text{O}_3$ internalizadas*

A quantificação da internalização das NP nas células foi realizada por espectrometria de massa de plasma indutivamente acoplada (ICP-MS), de acordo com o método descrito por Gojova et al., (2007). As células N2A e BEAS-2B foram semeadas ( $2,5 \times 10^6$ ) em garrafas de 75 cm<sup>2</sup> e incubadas em estufa a 37 °C, 5%  $\text{CO}_2$ . Após 24, 48 e 72 h de exposição na concentração de 50 mg/L, as células foram lavadas suavemente três vezes com PBS para remover quaisquer NP residuais de  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ou íons livres de Al. Em seguida, as células foram tripisinizadas, centrifugadas a 1500 RPM por 5 min, o sobrenadante foi removido e as células foram ressuspensas em 1 mL de PBS. Após a contagem das células, para padronizar seu número por tratamento, estas foram levemente lavadas com água UP, secas no forno a 80 °C, pesadas e submetidas à digestão por microondas (Milestone; MLS



1200) com ácido nítrico bidestilado e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 2 h e depois filtrada através de um filtro de 0,45 µm para remover a fração orgânica. O Al total foi então quantificado usando ICP-MS (Perkin Elmer; Nexion 300 D).

### 3.5.2 Ensaio in vivo

#### 3.5.2.1 Manutenção dos organismos teste *Daphnia magna*

Os procedimentos para manutenção foram realizados de acordo com a NBR 12713 (ABNT, 2016) e ISO 6341 (ISO, 1996). Em resumo, os animais adultos foram mantidos em grupos de 20-30 em recipientes de vidro de 2L armazenados em incubadoras com temperatura de 20 ± 2 °C e fotoperíodo de 16/8 h claro-escuro. O meio de cultivo foi composto de água de OR osmose reversa reconstituída com nutrientes e as *D. magna* foram alimentadas três vezes por semana, sendo que alimentação consistiu da alga *Desmodesmus subspicatus* em 3,5 × 10<sup>7</sup> células/mL.

#### 3.5.2.2 Ensaio de toxicidade aguda

As condições de ensaio agudo foram realizadas de acordo com as diretrizes da NBR 12713 (ABNT, 2016) e OECD 202 (OECD, 2004). Os experimentos foram conduzidos com cinco concentrações (0, 5, 50, 500, 1000, 1500 e 2000 mg/L) para cada NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, por 48 h e em duplicata. Dez neonatos (menos de 24 h de vida) foram selecionados aleatoriamente e colocados nas soluções teste em cada réplica. Os experimentos foram conduzidos em condições similares às das culturas, porém sem alimentação ou iluminação e após 48 h foram avaliados imobilidade/mortalidade. A concentrações médias efetiva (CE<sub>50</sub>) para as NP α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram determinadas pela observação dos números de indivíduos imóveis após 48 h de exposição.

### 3.5.2.3 Ensaio de toxicidade crônica

A avaliação da toxicidade crônica seguiu a norma ISO 10706 (ISO, 2000), que consiste em expor às mesmas condições do cultivo (ISO, 2012; ABNT, 2016), durante um período de 21 dias, os neonatos (filhotes com idade entre 2 e 26 h) de *D. magna* a diferentes concentrações das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (0, 3,12, 6,25, 12,5 e 25 mg/L), que foram definidas de acordo com os resultados observados no teste de toxicidade aguda e na concentração mais alta sem efeito observado. Cada concentração testada contou com 10 réplicas, isto é, individualmente 10 organismos foram colocados em béqueres de 50 mL. Os ensaios foram monitorados para os seguintes parâmetros: temperatura de 19±1°C, fotoperíodo de 16 horas luz e 8 horas escuro; alimentação com a microalga *D. subspicatus* e renovação do meio/solução-teste três vezes por semana (sistema semi-estático).

Após 21 dias de exposição foram analisados os parâmetros, longevidade (número de organismos sobreviventes), reprodução (números filhotes gerados por réplica e idade da primeira ninhada) e crescimento (tamanho da *D. magna* no final dos 21 dias). Os resultados para cada parâmetro foram expressos em concentração de efeito observado (CEO) e a concentração de efeito não observado (CENO). Sendo que, a CEO indica a menor concentração da amostra que causa efeito significativo nos organismos e a CENO a maior concentração da amostra que não causa efeito significativo nos organismos.

### 3.5.2.4 Localização e Ingestão das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em *D. magna*

Para monitorar a ingestão e o destino das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para *D. magna*, os organismos foram expostos (50 mg/L) às NP α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e NP η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sob as mesmas condições usadas nos ensaios agudos (OECD, 2004; ABNT, 2016). No final da exposição, os organismos foram removidos, lavados e separados para observar a localização dos aglomerados de NP em diferentes estruturas internas e externas da *D. magna* com o auxílio de um microscópio estereoscópico de fluorescência

(Olympus BX41) e microscópio eletrônico de varredura com espectroscopia por dispersão de energia de raios X (MEV/EDS).

A preparação dos organismos para a análise de MEV/EDS consistiu em fixar os organismos em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2), pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1 M e desidratar as amostras em uma série de soluções crescentes de etanol (30, 50, 70, 90 e 100 %). Posteriormente, os organismos foram secos no ponto crítico EM-DPC-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha), colocados em suportes metálicos (*stubs*) com uma folha adesiva de carbono e revestidos com ouro para análise em MEV (JVM JSM 6390 LV, JEOL Ltd., Tokyo, Japão, a 10 kV), no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

A ingestão das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foi investigada usando organismos de 8 dias de idade, após 24 h de exposição e concentração de NP de 50 mg/L. Cada tratamento teve três repetições e cada réplica foi composta por 10 organismos. No final da exposição de 24 h, os organismos móveis foram lavados com água UP, secos em estufa a 80 °C, pesados e digeridos com ácido nítrico bidestilado e peróxido de hidrogênio com auxílio de microondas (Milestone micro-ondas, modelo MLS 1200 ) O teor de Al total (massa seca) foi determinado usando o ICP-MS (PerkinElmer Nexion 300 D).

#### 3.5.2.5 Biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo (EROs, CAT, SOD, GSH e LPO)

Para a realização dos ensaios com os biomarcadores, as concentrações escolhidas foram baseadas na CE<sub>50</sub> de cada NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> encontrada nos testes de toxicidade aguda, portanto, a maior concentração utilizada foi o valor da CE<sub>50</sub> e a menor concentração foi um valor aproximado da CE<sub>5</sub>, isto é, 1200 mg/L e 50 mg/L para as NP α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e 900 mg/L e 50 mg/L para as NP η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, respectivamente. A quantificação da geração de EROs procedeu-se seguindo protocolo de Xie et al., (2006), com algumas modificações. Após 48 h de exposição, as *D. magna* (juvenis,

maior do que 5 dias de vida) foram recolhidas e transferidas para 1 mL de H<sub>2</sub>DCF-DA com uma concentração final de 50  $\mu$ M durante 4 h a 25 °C no escuro. Em seguida, as *D. magna* foram lavadas com água ultrapura, homogeneizadas por homogeneizador manual e centrifugadas a 6500 RPM durante 5 min. O sobrenadante recolhido foi analisado em um leitor de fluorescência (SpectraMax Paradigm, Molecular Devices) excitação 488 nm e emissão 530 nm e as *D. magna* inteiras foram visualizadas em estereomicroscópio de fluorescência (Olympus, SZX16).

Os antioxidantes enzimáticos catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD) e não enzimático glutathiona reduzida (GSH) foram utilizados como biomarcadores de estresse oxidativo. Para realização da quantificação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos seguiu-se procedimento de extração de Barata et al., (2005), com poucas modificações. Depois de 48 h de exposição, as *D. magna* (juvenis, com 8 dias de vida) foram recolhidas, homogeneizadas em tampão fosfato salino (100 mM - pH 7,4), centrifugadas a 10,000x *g* por 5 min a 4°C e os sobrenadantes foram utilizados para os ensaios cinéticos. A atividade da CAT foi determinada segundo o método descrito por Aebi, (1984), consistindo em misturar 10  $\mu$ L de amostra com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM) e tampão fosfato salino (100 mM), para a decomposição do substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e, por fim, registrada via espectroscopia de UV (UV-5100S) a 240 nm.

A determinação da atividade da SOD foi realizada em 50  $\mu$ L de amostra, seguindo o método descrito por Mccord e Fridovich, (1969). O princípio do ensaio baseou-se na inibição da redução do citocromo c (0,075mM) pelo superóxido gerado no sistema enzimático xantina/xantina oxidase (56 mM). A quantidade de xantina oxidase empregada foi aquela capaz de produzir uma velocidade de redução do citocromo c registada por espectroscopia de UV (UV-5100S) a 550 nm.

Para avaliação da atividade da GSH, conforme descrito por Beutler, Duron e Kelly, (1963), 500  $\mu$ l de amostra foi precipitada com TCA 12% na proporção 1:10 (m/v). Em seguida, a amostra foi centrifugada a 1.000 RPM por 15 min e adicionado DTNB (2,5 mM) e tampão fosfato de potássio (80 mM - pH 8,0) para manter sob agitação por cerca de 1 min. Na sequência, iniciou-se imediatamente as medidas de

absorbância registrada por espectroscopia de UV (UV-5100S) a 412 nm. Para a normalização dos resultados de CAT, SOD e GSH utilizou-se a massa total de proteína (mg), determinada seguindo o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

A peroxidação lipídica (LPO) foi determinada estimando o conteúdo de Malondialdeído (MDA), segundo o método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) descrito por Draper e Hadley, (1990) com mínimas modificações. Após 48 h de exposição, as *D. magna* (juvenis, com 8 dias de vida) foram recolhidas e homogeneizadas com tampão (Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 15 mM), misturado com 7% de SDS, 0,67% de TBA e HCL 1M. A mistura foi aquecida a 95 °C durante 90 min, resfriada e centrifugada e registrada as medidas de absorbância por espectroscopia de UV (UV-5100S) a 532 nm. As concentrações de MDA foram calculadas usando TEP como um padrão de referência. Para a normalização do resultado de LPO utilizou-se a massa total de proteína (mg), que foi obtida de acordo com o método de Bradford (BRADFORD, 1976).

#### 3.5.2.6 Análise do comportamento de natação

O comportamento de nadar dos daphnídios é complexo, multiparamétrico e considerado como um dos biomarcadores de toxicidade mais sensíveis (BOWNIK, 2017). Dessa forma, para avaliar as mudanças no comportamento de natação induzida pela exposição as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para *D. magna*, os organismos foram expostos as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (50 mg/L e 1200 mg/L) e NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (50 mg/L e 900 mg/L), respectivamente, sob as mesmas condições usadas nos ensaios agudos (OECD, 2004; ABNT, 2016) e a análise de rastreamento da distância de natação por vídeo foi realizada de acordo com o método descrito na literatura (PIKUDA et al., 2019).

Decorrido o tempo de exposição, 10 *D. magna* de cada tratamento, contendo cada um 20 replicas (n = 20) foram transferidas individualmente para uma placa de 24 poços, preenchida com 2 mL de ISO 6341 (ISO, 2012) e após um período de aclimação de 3 min a capacidade natatória de cada *D. magna* foi rastreada por 60 s (com uma velocidade de 30 frames/s), usando estereomicroscópio (aumento de

10X, Olympus BX41). As gravações de vídeo foram analisadas com o software *Kinovea* (<https://www.kinovea.org/>), calibrado para medir o rastreamento com base nas diferenças de contraste entre objetos (animais) e fundo (água) sem uso de marcadores (PIKUDA et al., 2019).

### 3.6 AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL DAS NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Diante do grande volume de NP Al<sub>2</sub>O produzidas que, por sua vez, acarreta no aumento na liberação das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para o meio ambiente, justifica-se a importância de efetuar uma avaliação de risco ambiental, estabelecendo concentrações máximas ou limite que protejam a diversidade de espécies e os atributos funcionais dos ecossistemas naturais, especialmente nos ambientes aquáticos. Para isso foi proposto o método de avaliação da Distribuição de Sensibilidade de Espécies (DSE) por Newman et al., (2000). Segundo esse método, a existência de uma variação na sensibilidade aos contaminantes ambientais é considerada e descrita por uma curva de distribuição da sensibilidade de espécies. Assim, calcula-se a concentração perigosa para 5% das espécies (HC5) e, como consequência, estima-se quais espécies são mais afetadas pelas NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, com ênfase nas fases cristalinas das NP.

#### 3.6.1 Coleta dos dados

Os estudos de toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram coletados de mais de 50 relatórios e publicações científicas no banco de dados *Web of Science*, *Science Direct* e *Scopus*, até dezembro de 2019 (**Quadro A1 – Apêndice**). Dentre os vários *endpoints* publicados na literatura, a triagem de dados seguiu os critérios descritos por Coll et al. (2016), incluindo efeitos na sobrevivência, crescimento, reprodução, concentração letal mediana (CL50), metade da concentração máxima de efeito (CE50), concentração inibitória mínima (CIM), menor concentração de efeito observado (CEO), nenhuma concentração de efeito observada (CENO) e a metade

da concentração inibidora mima (CI50). No entanto, como relatado em estudos recentes foram incluídos estudos com alterações nos processos metabólicos, expressão gênica, imunotoxicidade e atividade enzimática. Apesar de sua relevância relativamente menor para a avaliação de risco, objetivou-se cobrir a maioria dos estudos que investigaram a toxicidade em diferentes grupos taxonômicos expostos as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com diferentes fases cristalinas, visando avaliar a variedade de dados de toxicidade em ecossistemas aquáticos. Além disso, na seleção de dados toxicológicos optou-se por desconsiderar as publicações que relataram efeitos *in vitro* e priorizar *endpoints* crônicos sobre agudos, se ambos estivessem disponíveis no mesmo estudo, no conjunto de dados os valores de toxicidade foram padronizados em mg/L.

### 3.6.2 Distribuição de Sensibilidade de Espécies (DSE)

O DSE foi realizado com os valores de toxicidade (CE, LC, CEO, CMI, CI e CENO) dos dados experimentais recuperados dos relatórios e publicações científicas (**Quadro A1**). Os dados de toxicidade de 53 espécies de diferentes grupos foram resumidas como médias geométricas e uma curva logística (*log*) foi ajustada aos dados, usando regressão não linear construída usando o *Species Sensitivity Distribution Generator* (SSD), que é uma ferramenta usada para criar DSE personalizados (USEPA, 2005). Além disso, o HC5, isto é, a concentração esperada para ser protetora para 95% das espécies expostas as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram calculadas a partir dos SSD. De acordo com o valor do HC5 derivado do modelo SSD, a concentração previsivelmente sem efeitos (PNEC) foi determinada dividindo-se por um fator de avaliação (FA), que foi calculado pela seguinte equação:

$$PNEC = \frac{HC5}{FA}$$

Onde:

PNEC = Concentração previsivelmente sem efeitos

HC5 = Concentração perigosa para 5% das espécies

FA = Fator de Avaliação

Atualmente, um FA de 2 é usado na maioria dos estudos quando os dados de toxicidade abrangem pelo menos três grupos taxonômicos (GOTTSCHALK; NOWACK, 2011; COLL et al., 2016), No presente estudo foi usado uma metodologia de acordo com a orientação REACH (ECHA, 2008) e adaptada para NP (COLL et al., 2016; WANG; NOWACK, 2018a), isto é, um FA de 10 foi usado para LC/CE<sub>25-50</sub> e Cl<sub>25-50</sub>, um FA de 2 para LC/CE<sub>10-20</sub> e um FA de 1 para valores de CEO, CMI e CENO (**Quadro A1**).

### 3.6.3 Risco ecológico

O potencial risco ambiental das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foi avaliado pelo uso da taxa de caracterização de risco (RCR), sendo esse calculado pela seguinte equação:

$$RCR = \frac{PEC}{PNEC}$$

Onde:

RCR = Caracterização de risco

PEC = Concentração ambiental prevista

PNEC = Concentração previsivelmente sem efeitos



Na fórmula a relação da concentração ambiental prevista (PEC)/concentração previsivelmente sem efeitos (PNEC) indica o grau de risco esperado para ser causado pelas NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Se o risco for menor que 1, significa que o risco para o ambiente é controlado no cenário de exposição em questão. Se o risco for maior que 1, certas medidas de gerenciamento de risco devem ser tomadas. As PEC foram retiradas de recentes estudos (WANG; NOWACK, 2018a; WIGGER; NOWACK, 2019) em água superficial na União Européia. As distribuições das PNEC correspondem aos valores HC5 calculados neste trabalho, conforme descrito na seção anterior.

### 3.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados relativos aos efeitos das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nos ensaios *in vitro* e *in vivo* foram analisados usando as ferramentas disponíveis no pacote especializado do programa *GraphPad Prism*® v7.0 (*StatSoft Inc*). Antes de realizar qualquer análise paramétrica nos conjuntos de dados, o teste de normalidade de Shapiro-Wilk foi realizado para garantir que os dados atendessem aos requisitos de distribuição normal. Se os requisitos para o teste paramétrico foram atendidos, um teste de Bartlett era aplicado para verificar a homogeneidade da variação dos dados. Os conjuntos de dados para os parâmetros medidos atendem aos requisitos normais de distribuição e homogeneidade e, portanto, foram avaliados usando a ANOVA, seguido pelo teste de Dunnett (comparação entre tratamentos e seus respectivos controles) ou Tukey (comparação múltipla) foi aplicado como teste *post-hoc*.

O ensaio de viabilidade celular foi calculado pelo teste de Dunnett, para comparar os tratamentos com seus respectivos controles, já os dados de morfometria nuclear, apoptose, ensaio clonogênico e biomarcadores bioquímicos foram calculados pelo teste de Tukey. Para o ensaio de toxicidade aguda em *D. magna*, a CE<sub>50</sub> e o intervalo de confiança de 95% foram calculados a partir de curvas de regressão não linear pelo método *probit* (NEWMAN, 1995). A concentração de efeito não observado (CENO) e a menor concentração de efeito observado (CEO),

considerando longevidade, comprimento corporal, idade da primeira ninhada, tempo da primeira ninhada e recém-nascidos por adultos sobreviventes foram calculadas pelo teste de Dunnett, visando identificar diferenças significativas entre os tratamentos controle e expostos as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Os dados para biomarcadores bioquímicos e comportamento para *D. magna* foram calculados pelo teste de Tukey. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão (DP) e as diferenças foram consideradas estatisticamente significantes para p<0,05.

## CAPÍTULO IV

### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

##### 4.1.1 Difractometria de Raio-X (DRX)

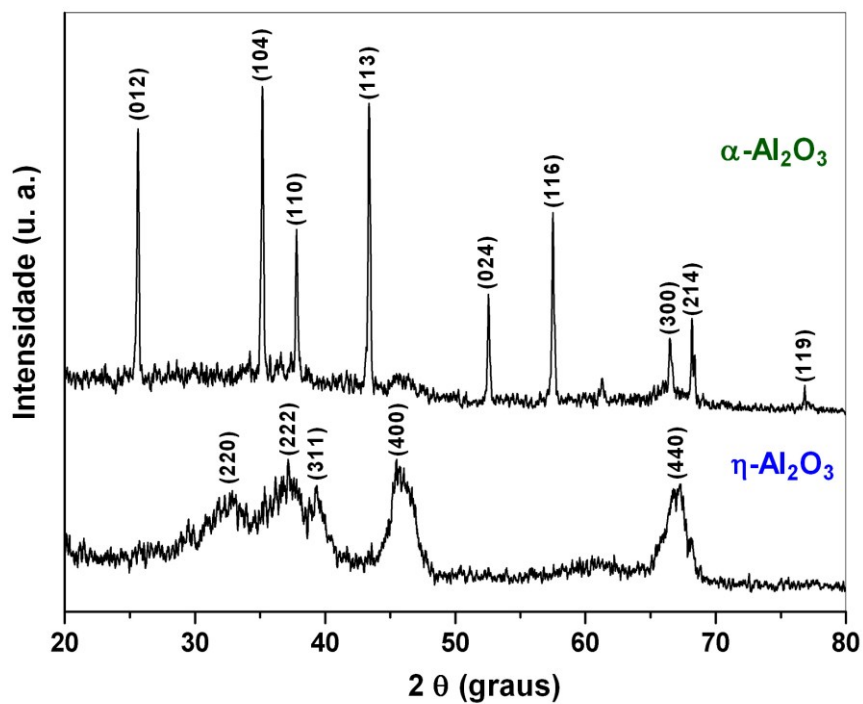
A fase cristalina das NP devem ser levadas em conta quando avaliados os potenciais efeitos biológicos adversos, visto que, as propriedades físico-químicas dos materiais podem variar de acordo com a fase cristalina, como demonstrado para o TiO<sub>2</sub> (BRAYDICH-STOLLE et al., 2009; XUE et al., 2010; SAYES, 2014) e Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (DEMIR et al., 2015). Nesse trabalho utilizou-se diferentes técnicas de caracterização para confirmar as características das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e a técnica DRX confirmou as duas fases cristalinas  $\alpha$  (alfa) e  $\eta$  (eta).

Os padrões dos picos de DRX para as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> na **Figura 7** revelaram partículas de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> de elevada pureza, conforme o banco de dados *Joint Committee on Powder Diffraction Standards* (JCPDS) N°. 01-088-0826, e todos os principais picos dominantes da  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> podem ser identificados. A fase  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foi confirmada pelo padrão de DRX (JCPDS N°. 01-079-1557) e apresentou picos mais amplos com um grau de resolução reduzido, indicando certo grau de desordem estrutural (NOGUEIRA et al., 2016; LU et al., 2017). As NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mostraram a simetria de um sistema cristalino romboédrico (TRAINOR et al., 2002) e uma estrutura compactada de átomos de O na célula unitária hexagonal com Al ocupando dois terços dos interstícios, em contraste com a célula unitária das NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> apresentava uma estrutura cúbica de face centrada.

Isso pode ser explicado pelas distintas metodologias de sínteses utilizadas e, principalmente, pelas diferentes temperaturas empregadas nos tratamentos térmicos (TONIOLO; LIMA; TAKIMI, 2005). Nos últimos anos, várias técnicas, como hidrotérmica, métodos de combustão, pulverização, ablação a laser, pirólise,

fresagem mecânica, precipitação e método sol-gel foram utilizadas para a síntese de NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Dessa forma, essas diferenças na estrutura cristalina influenciam as propriedades físico-químicas finais, como estado de aglomeração, formato das partículas, química da superfície, área superficial, carga superficial e porosidade (DHAND et al., 2015).

Materiais cristalinos exibem um difratograma característico, o que simplificado quer dizer que os materiais podem ser identificados e caracterizados segundo a sua cristalinidade. Dessa forma, a largura da base do pico é inversamente proporcional ao tamanho das partículas, sendo assim, às NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  devem apresentar diâmetro de partícula menor que as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  (CULLITY; STOCK, 2001).

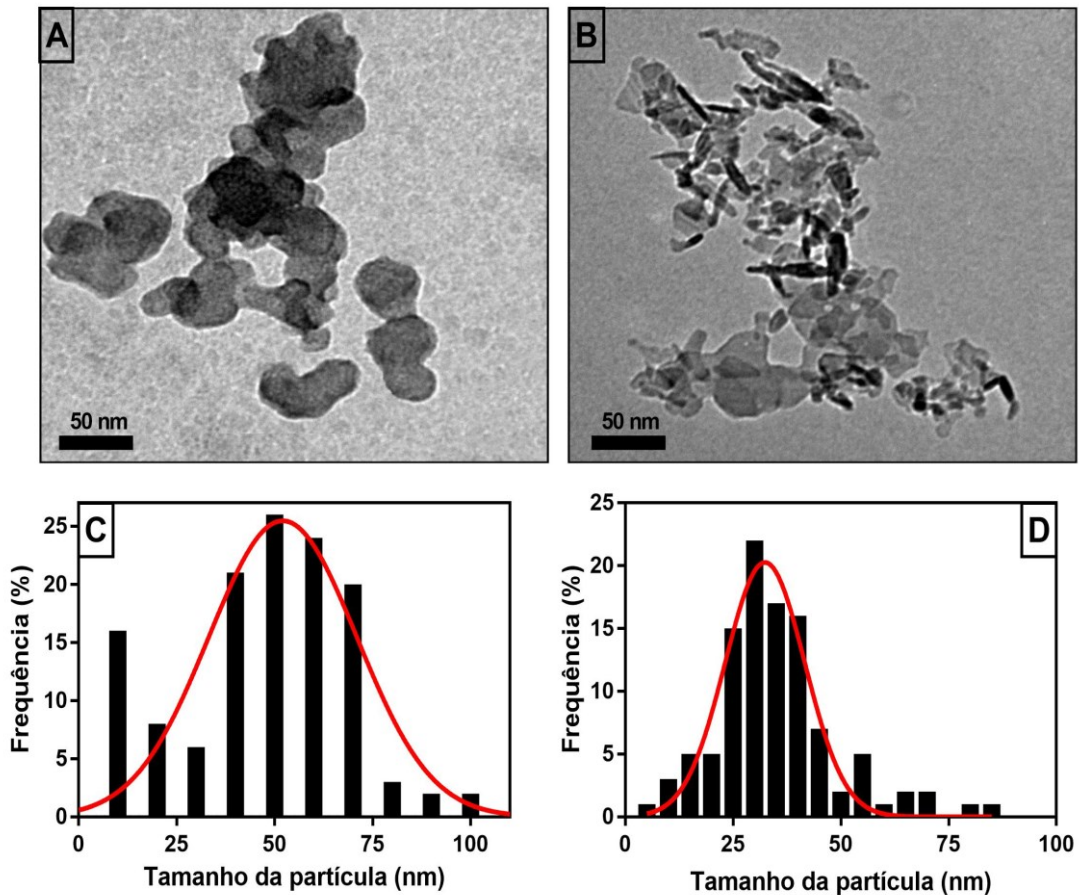


**Figura 7** - Difratogramas de DRX das NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$ .

#### 4.1.2 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A técnica de MET foi utilizada para determinar o diâmetro médio e o formato das NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  (**Figura 8**). A análise das imagens indicaram que o diâmetro médio das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  não diferiu significativamente ( $p > 0,05$ ) entre elas, isto é, o diâmetro médio para NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  foi de  $49 \pm 20,8$  nm, apresentando partículas entre 5 a 90 nm com a maioria das partículas entre 35 a 60 nm (aproximadamente 65%) (**Figura 8 C**) e para NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  o diâmetro médio foi de  $35 \pm 14,1$  nm, compreendendo partículas com diâmetros entre 5 a 85 nm com a maioria das partículas entre 25 a 40 nm (aproximadamente 73%) (**Figura 8 D**). Além disso, no que diz respeito ao formato, as NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  mostraram partículas irregulares, aglomeradas e com formato quase esféricas (**Figura 8 A**). Já as NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  também apresentaram partículas irregulares e aglomeradas, porém o formato tendeu a bastões (**Figura 8 B**).

A forma cristalina das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  influencia muito suas propriedades físico-químicas, enquanto estudos sobre os efeitos de diferentes formas cristalinas das  $\text{Al}_2\text{O}_3$  são particularmente escassos. Neste estudo, além das distintas fases cristalinas também pode-se concluir que são dois formatos de partículas diferentes, ou seja, esferas e bastões. Em um recente estudo mais detalhado das propriedades cristalinas das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Lu et al., (2017) relataram que as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  com diferentes formas cristalinas ( $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) apresentaram diferentes formas, os autores atribuem essa diferença aos precursores usados para obtenção das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Além disso, os resultados das imagens de MET corroboram com os dados dos difratogramas de DRX das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , visto que, as NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  apresentaram diâmetros médios menores que as NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Esse resultado já era esperado, pois a base dos picos do difratograma de DRX das NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  apresentou base mais alargada em comparação com a base dos picos das NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ .



**Figura 8** - Imagens de MET para (A) NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e (B) NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ , histograma de diâmetros médios ( $n = 100$  partículas) para (C) NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e (D) NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

#### 4.1.3 Área superficial (BET)

As áreas superficiais estimadas pela equação BET foram  $94,4 \text{ m}^2/\text{g}$  para NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e  $167,0 \text{ m}^2/\text{g}$  para NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ , esses resultados indicam um menor diâmetro para NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ , resultando em maior área superficial e, conseqüentemente maior disponibilidade de íons superficiais. De fato, NP menores têm maior área superficial e número de partículas por unidade de massa em comparação com micropartículas (GATOO et al., 2014). Além do aumento da reatividade com a diminuição do diâmetro da partícula, observado nas imagens de MET e nos difratogramas de DRX, resultam no aumento da área de superfície por unidade de massa. Partículas menores tendem a ter mais arestas e cantos por unidade de superfície e, portanto, a

reatividade por unidade de área de superfície também tende a aumentar com a diminuição do tamanho de partícula (SHAJI; ZACHARIAH, 2017).

#### 4.1.4 Diâmetro efetivo (DE) e Potencial Zeta (PZ) e índice de polidispersão (IP)

Para monitorar os principais fatores que podem influenciar os efeitos adversos das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , o diâmetro efetivo (DE), estabilidade (PZ) e amplitude da distribuição de tamanhos (IP) em diferentes suspensões coloidais foram determinados em água UP, nos meios dos ensaios agudo (ISO) e crônico (M4) com *D. magna* e, ainda, no meio para cultivo celular RPMI contendo 10% de SBF (**Tabela 2**). Em geral, as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  permaneceram estáveis em água UP e a estabilidade tendeu a diminuir com o aumento da concentração de sais dissolvidos no meio. O PZ, por exemplo, diminuiu de -30,8 para -5,4 mV para as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e 33,4 para 17,3 mV para as NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$ , respectivamente, no meio de suspensão M4 (Tabela 2). Para o meio RPMI também ocorreu uma redução de aproximadamente 50% do valor do PZ em relação ao observado em água UP (**Tabela 2**).

As NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  apresentaram maior estabilidade na água UP, pois sob essa condição há mais íons livres na superfície da NP. Os meios ISO e M4 contêm cátions divalentes, principalmente cálcio e magnésio. Já o meio RPMI é uma solução tamponada composta principalmente de proteínas, como albumina sérica e outras biomoléculas (incluindo aminoácidos e sais iônicos), levando a alta força iônica e sedimentação acelerada das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (WELLS et al., 2012; LIU et al., 2018; MELEGARI et al., 2019). Além disso, a reversão da polaridade indicou que as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  possuem características superficiais distintas, isto é, para as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  (carga negativa) e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  (carga positiva), promovendo maior interação entre as superfícies as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e o meios (ISO, M4 e RPMI) (BERG et al., 2009; HWANG et al., 2012; GHOSH et al., 2019).

**Tabela 2** - PZ, pH, DE e IP para NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> suspensas nos meios água UP, ISO, M4 e RPMI.

NP	Meios	PZ (mV)	pH	DE (nm)	IP
$\alpha$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	UP	-30,8 ± 1,8	7,2 ± 0,7	504,4 ± 108,6	0,33 ± 0,1
	ISO	-9,5 ± 2,3	7,3 ± 1,0	1320,0 ± 241,7	0,49 ± 0,2
	M4	-5,4 ± 1,0	7,6 ± 0,4	1652,0 ± 206,5	0,67 ± 0,1
	RPMI	-15,70 ± 1,2	8,22 ± 0,2	7370,2 ± 1885,3	0,40 ± 0,07
$\eta$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	UP	33,4 ± 1,1	6,7 ± 0,7	473,0 ± 67,2	0,29 ± 0,07
	ISO	18,3 ± 1,0	7,2 ± 0,9	802,3 ± 124,3	0,34 ± 0,1
	M4	17,3 ± 0,9	7,5 ± 0,6	1192,2 ± 118,6	0,40 ± 0,1
	RPMI	15,36 ± 1,9	8,26 ± 0,9	647,30 ± 36,0	0,12 ± 0,02

Os baixos valores de PZ e a carga superficial distinta, como pode ser visto na **Tabela 2**, indicam uma tendência para a agregação das NP (HWANG et al., 2012; GHOSH et al., 2019), nesse sentido, o DE das NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em comparação aos NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mostrou uma ligeira diferença no aumento dos diâmetros no meio ISO, M4 e RPMI em comparação a água UP. De acordo com a literatura (GONÇALVES et al., 2018; MELEGARI et al., 2019; PUERARI et al., 2019) a alta dureza, devido à alta concentração de íons (principalmente em M4 e RPMI), indica que o meio desestabiliza as partículas devido à sua interação com os íons de sal e biomoléculas, o que resulta em um aumento no DE e também promove a formação de aglomerados (MAIORANO et al., 2010), permitindo que as partículas se dispersem em tamanhos maiores, o que resulta na redução da área de superfície da partícula, como verificado por valores do IP acima de 0,3 (**Tabela 2**). Foi relatado (MORADI-SARDAREH et al., 2018) que, para as NP, um valor de PDI menor que 0,1 indica que eles são altamente monodispersos, 0,1-0,4 moderadamente monodispersos e maior que 0,4 altamente polidispersos. Assim, os NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> apresentaram uma distribuição de tamanho mais estreita que os NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.



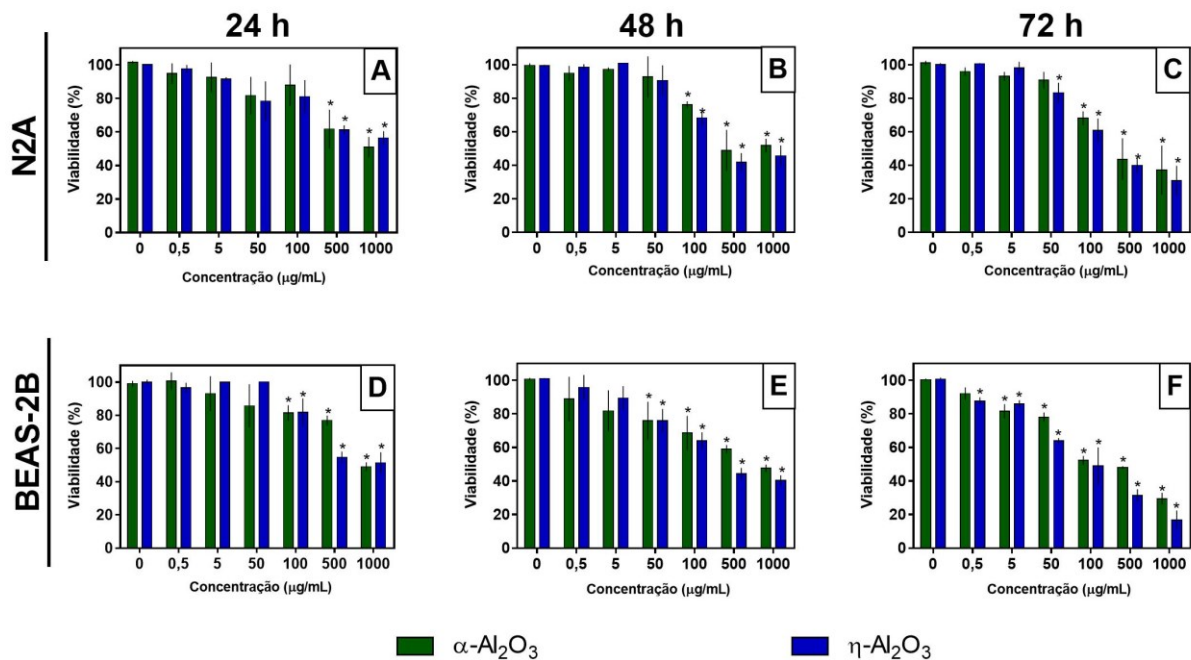
## 4.2 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

### 4.2.1 Ensaio in vitro

#### 4.2.1.1 Ensaio de viabilidade celular

Para determinar a citotoxicidade das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  expostas às células N2A e BEAS-2B foi realizado o ensaio de vermelho neutro (NRU), que é um indicador de viabilidade celular altamente sensível da integridade lisossômica (BORENFREUND; PUERNER, 1985). Nesse ensaio, o número de células viáveis se correlaciona com a magnitude da redução do corante (LI et al., 2011), fornecendo uma visão geral da condição metabólica da célula. Sendo assim, possibilita distinguir entre células viáveis, danificadas ou mortas por meio de medições espectrofotométricas (GHOSH; CHAKRABORTY; MUKHERJEE, 2013). Os danos aos lisossomos foi proposto como um mecanismo emergente de nanotoxicidade (STERN; ADISESHIAH; CRIST, 2012), pois a maioria das NP endocitadas se acumulam dentro dos compartimentos lisossômicos sem saída evidente (IVERSEN; SKOTLAND; SANDVIG, 2011).

Os resultados mostraram que a exposição de células às NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  levaram à diminuição da viabilidade em função da concentração das NP e do tempo de exposição (**Figura 9**). Para tempos de exposição mais curtos (24 h e 48 h), foram observadas reduções significativas de viabilidade para as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , com efeitos começando em concentrações de 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (24 h) e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (48 h) para células N2A (**Figuras 9 A e B**) e 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (24 h) e 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (48 h) para células BEAS-2B (**Figuras 9 D e E**).



**Figura 9** - Viabilidade celular em porcentagem para células N2A e BEAS-2B tratadas com NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 24, 48 e 72h. Os valores são médias  $\pm$  DP (n=3). O asterisco (\*) representa diferença significativa (p < 0,05) entre a amostra tratada e o respectivo controle.

Por outro lado, após 72 h de exposição, as NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> apresentaram maior citotoxicidade que as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e as NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> não mostraram um efeito citotóxico significativo nas células N2A em concentrações menores que 100  $\mu$ g/mL (**Figura 9 C**). Para as células BEAS-2B, após 72 h, foi observada uma redução da viabilidade na concentração 5  $\mu$ g/mL na exposição nas duas NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**Figura 9 F**) e, notavelmente as NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induziram uma diminuição significativa da viabilidade na concentração de 0,5  $\mu$ g/mL (**Figura 9 F**). A correlação dos principais fatores que influenciaram a maior citotoxicidade das NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (por exemplo, tamanho de partícula, forma e área superficial) não foram estudados anteriormente. No entanto, poucos autores abordaram a fase cristalina das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ou diferenças morfológicas e não observaram que certas fases cristalinas podem induzir citotoxicidade (KWON et al., 2015).

Verificou-se que as NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> são mais tóxicas em menores concentrações do que as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, as fases cristalinas das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> testadas possuem diferentes células unitárias, ou seja, distintos arranjos atômicos, resultando em

diferentes empacotamentos e formatos. Esses fatores influenciam diretamente as propriedades físico-químicas finais, tal como a carga superficial positiva da NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ , verificada na análise de PZ, que promove maior interação com as células e uma maior internalização mediados por processos endocíticos associado à desestabilização lisossômica resultante do ambiente ácido lisossômico (pH abaixo de 5) (CASEY; GRINSTEIN; ORLOWSKI, 2010; KIM et al., 2015). O ambiente ácido dentro dos lisossomos podem acelerar a liberação de íons de Al, resultando na liberação de proteases lisossômicas, incluindo hidrolases e catepsinas a catepsina B para o citosol, que, por sua vez, levam à produção de EROs e outras alterações que gradualmente se tornam irreversíveis (BOYA; KROEMER, 2008).

#### 4.2.1.2 *Biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo*

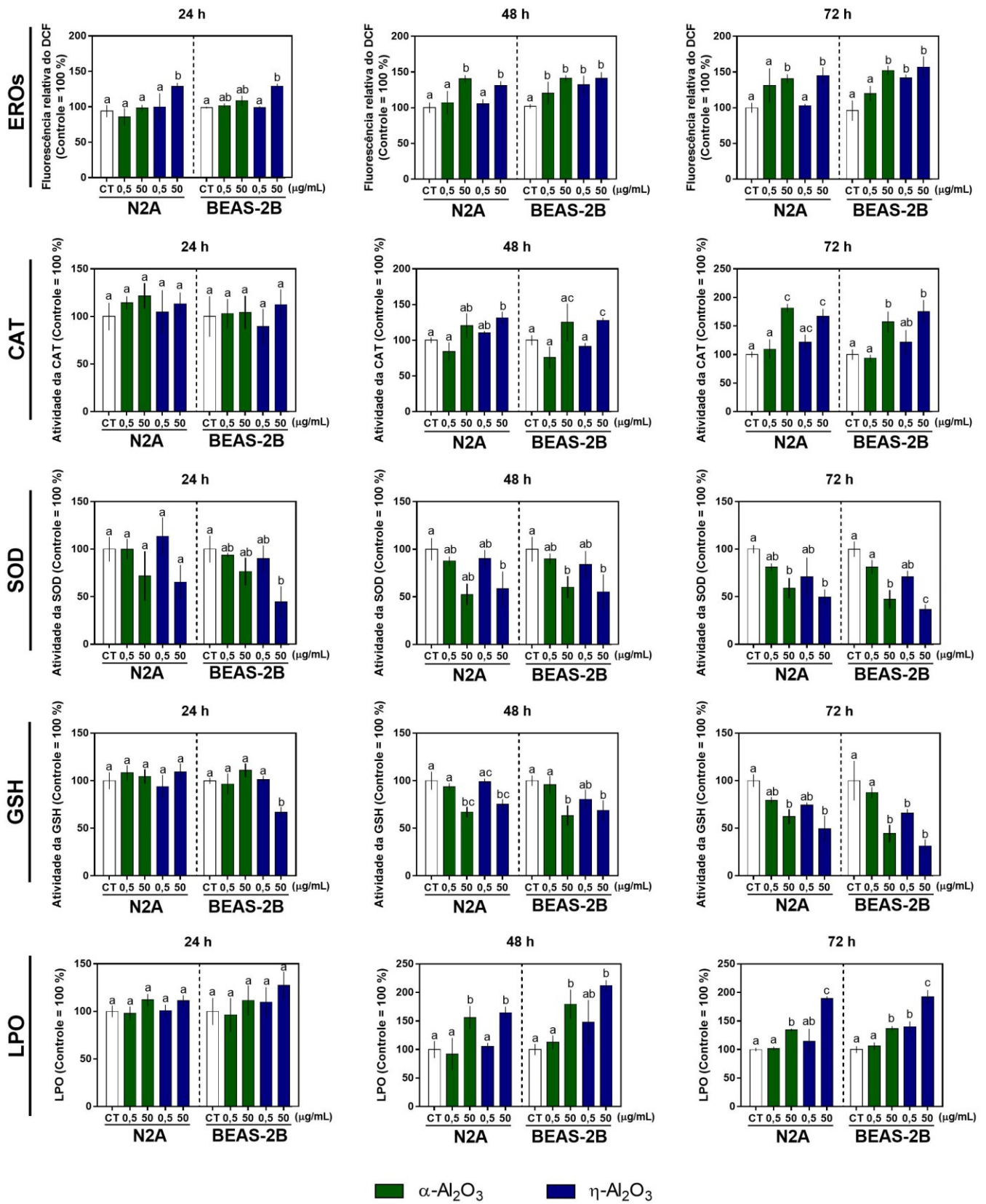
Uma possível causa de indução do estresse oxidativo é o aumento na geração EROs, correlacionados com a concentração das NP, a qual as células são expostas (NEL, 2006). Geralmente, quando a geração de EROs aumenta ou quando os mecanismos de defesa das EROs são comprometidos diz-se que células estão sob estresse oxidativo (NEL, 2006). A capacidade das NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  de induzir estresse oxidativo foram avaliadas medindo-se a geração de EROs, a atividade dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos CAT, SOD e GSH e a determinação da LPO das células N2A e BEAS-2B expostas por 24, 48 e 72 h.

Como visto na **Figura 10**, os resultados indicam que as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  induziram um aumento significativo na geração de EROs intracelular em ambas as células. Contudo, o nível aceitável de significância foi alcançado apenas na concentração mais alta testada, isto é, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para as células N2A expostas por 24, 48 e 72 h. Um resultado semelhante foi observado para células BEAS-2B, porém na concentração mais baixa testada, ou seja, 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  após 72 h de exposição. Nessa concentração foi observado um aumento significativo para as células expostas às NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Alguns estudos indicaram que há uma relação direta entre as propriedades físico-químicas das NP (por exemplo, área de superfície e forma da

partícula) e a capacidade de geração de EROs (OBERDÖRSTER et al., 2005; NEL, 2006; MIRSHAFI et al., 2017). Neste estudo, às NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  mostraram uma área de superfície maior que às NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ , portanto, a primeira induziu um aumento na geração de EROs em comparação com à última nos dois tipos de células (**Figura 10**).

Com isso, conseqüentemente, foi observado uma instabilidade do sistema antioxidante, enzimático e não enzimático (CAT, SOD e GSH) e antioxidantes essenciais, que desempenham papéis importantes na proteção das células contra o estresse oxidativo (BIRBEN et al., 2012). Os resultados mostraram que as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  não causaram quase nenhuma alteração na atividade de CAT, SOD e GSH nas células, principalmente nas células N2A após 24 h (**Figura 10**). Todavia, com tempos de exposição mais longos, embora tenha havido um aumento na atividade da CAT, os resultados mostraram que as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  causaram diminuição nas concentrações de SOD e GSH (**Figura 10**).

Esses resultados corroboram com um estudo realizado por Alshatwi et al., (2013), no qual as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  causaram inibição significativa das enzimas antioxidantes CAT, SOD e GPx, levando a um aumento nas EROs. Em relação à resposta ao estresse, impulsionada pela instabilidade do antioxidante, observou-se um aumento significativo nos conteúdos de MDA nas duas células expostas as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , resultantes da LPO, danificando as membranas celulares e causando morte celular (SRIKANTH et al., 2015). Portanto, os resultados mostram que a exposição as NP de  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  promoveram uma perda de integridade das membranas celulares. Em vários outros estudos verificou-se que a LPO via geração de EROs está associada à exposição as NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  (estruturas cristalinas alfa e gama), induzindo citotoxicidade para as células de mamíferos (ALSHATWI et al., 2013; DAOUD ALI; ALKAHTANI; ALARIFI, 2015; SRIKANTH et al., 2015; LI; ZHOU; FAN, 2016), podendo acarretar apoptose e muitas vezes uma perturbação geral do equilíbrio redox celular (EISENBRAND et al., 2002; FU et al., 2014).

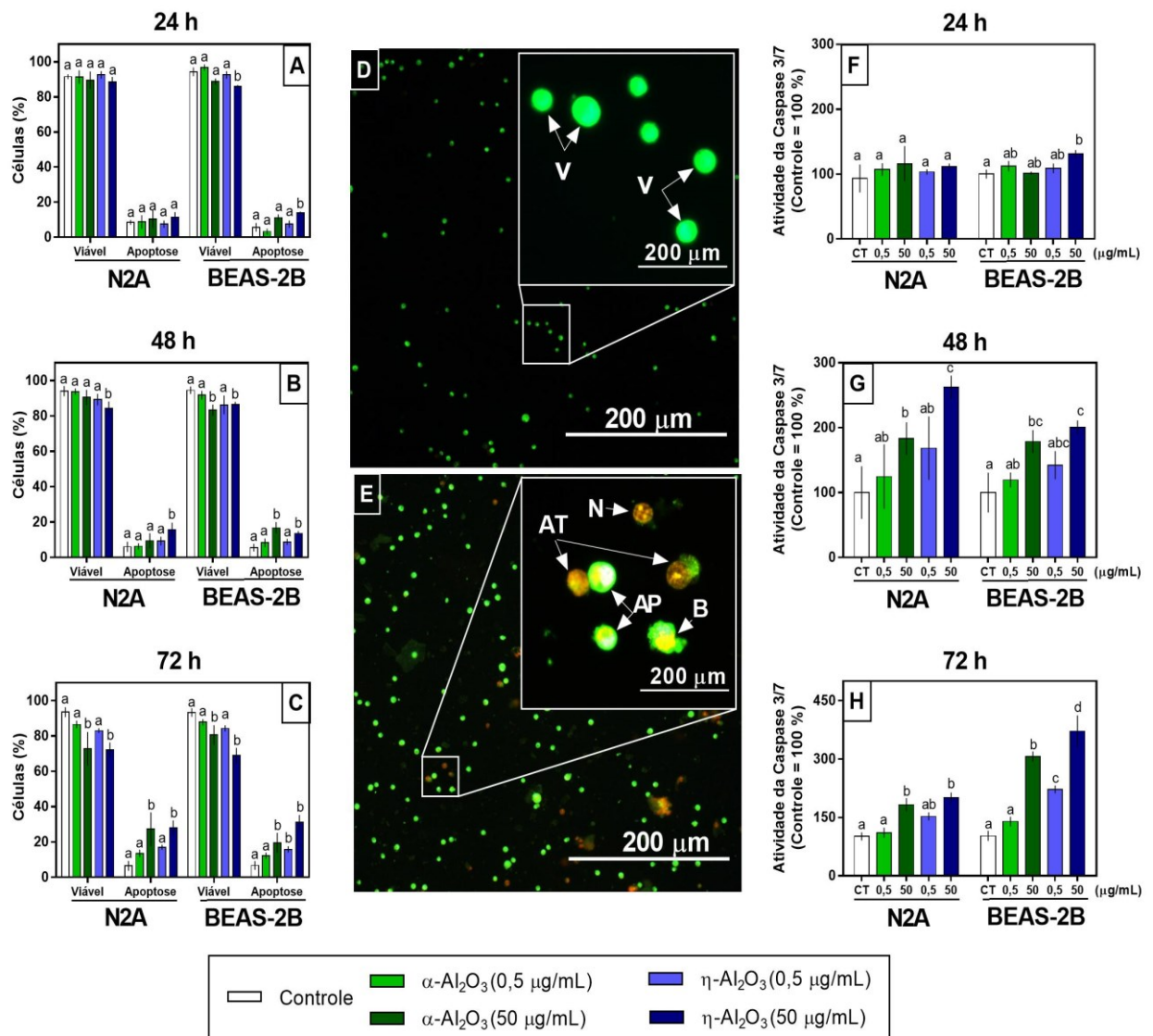


**Figura 10** - Biomarcadores de estresse oxidativo de células N2A e BEAS-2B expostas as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 24, 48 e 72h. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle (100%) como média ± DP (n = 2). Letras diferentes indicam diferenças significativas na mesma coluna após a ANOVA de duas vias (p < 0,05).

#### 4.2.1.3 Análise de morte celular por LA/IP e Caspase

A apoptose é um importante mecanismo de morte celular causado pelo estresse oxidativo induzido por NP (HSIN et al., 2008). Entre as diferentes vias apoptóticas, a via apoptótica mitocondrial intrínseca desempenha um papel importante na morte celular induzida por NP de óxidos metálicos, uma vez que, as mitocôndrias são uma das principais organelas alvo do estresse oxidativo induzido por NP (TIAN et al., 2006). Estudos mostraram que as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  induzem geração de EROs, ocasionando desestabilização lisossomal, visto que, hidrolases e catepsinas lisossômicas podem promover a geração de EROs pelas mitocôndrias, criando, assim, um ciclo de *feedback* que leva a um aumento adicional da permeabilização lisossômica e, conseqüentemente, a ativação de caspases que poderiam acelerar ou ampliar o processo de morte (KERMANI et al., 2018).

Após a exposição as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$ , as células N2A e BEAS-2B mostraram as alterações morfológicas características de: (i) células apoptóticas precoces com núcleos verdes com a condensação da cromatina perinuclear, sendo exibida como manchas ou fragmentos verdes brilhantes (**Figura 11 E**); e (ii) células apoptóticas tardias com núcleos de laranja a vermelho com cromatina condensada ou fragmentada e sangramento da membrana celular (**Figura 11 E**). Por outro lado, esses tipos de alterações morfológicas características foram raramente vistos nas células de controle, que mostravam núcleos verdes brilhantes e homogêneos com uma estrutura íntegra (**Figura 11 D**).



**Figura 11** - Indução de apoptose em células N2A e BEAS-2B. (A-C) Porcentagem de células viáveis e apoptóticas detectadas com dupla coloração (LA/IP) é mostrada para as células N2A e BEAS-2B. (D) Imagens fluorescentes de células não tratadas com estrutura normal. (E) Apoptose precoce, incluindo bolhas, apoptose tardia e necrose observada após 24, 48 e 72 h. (F-H) Porcentagem da atividade da Caspase 3/7. V: células viáveis; B: bolha na membrana celular; AP: apoptose precoce AT: apoptose tardia; N: necrose. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP (n = 3). Letras diferentes indicam diferenças significativas nos mesmos grupos após os diferentes tempos de exposição, de acordo com a ANOVA de duas vias ( $p < 0,05$ ).

A exposição à concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$  mostrou que as células apoptóticas tornaram-se o tipo de célula cada vez mais predominante para as células N2A e BEAS-2B expostas as duas NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , especialmente, após 48 e 72 h (**Figura 11 B e C**). As células BEAS-2B expostas às NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  (50  $\mu\text{g/mL}$ ) mostraram uma diminuição no número de células viáveis quando comparadas ao

controle, seguido do aumento concomitante no número de células apoptóticas:  $14 \pm 0,7\%$  (24 h),  $16,7 \pm 3,1\%$  (48 h) e  $31 \pm 3,0\%$  (72 h) (**Figura 11 A-D**). A apoptose pode ser induzida por diferentes NP metálicas e óxido metálicos, como Ag (MARANO et al., 2011), TiO<sub>2</sub> (UBOLDI et al., 2016), e óxido de níquel (NiO) e ZnO (MA; WILLIAMS; DIAMOND, 2013). No entanto, as respostas dependem das características físico-químicas distintas das NP (LI et al., 2016). Nos resultados apresentados no presente trabalho, as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> apresentaram efeitos apoptóticos óbvios, mas quase nenhum efeito necrótico óbvio nas células N2A e BEAS-2B.

Para verificar os resultados da coloração de LA/IP, a análise da atividade da caspase-3/7 foi usada como um marcador apoptótico adicional para estudar os efeitos das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nas células N2A e BEAS-2B, uma vez que as caspases são ativadas durante a apoptose celular e são conhecidas por desempenhar um papel importante no processo de apoptose (JÄNICKE et al., 1998). Após 24 e 48 h de exposição, o aumento significativo na atividade da caspase 3/7 foi observado apenas no caso das células N2A e BEAS-2B tratadas com 50 µg/mL (**Figura 11 F-H**). Contudo, após 72 h de exposição às NP η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a 0,5 µg/mL foi observado um aumento significativo na atividade da caspase 3/7 nas células BEAS-2B (**Figura 11 H**). Esses resultados sugerem que a citotoxicidade ocorre alterando a homeostase celular gerando estresse oxidativo induzido por radicais livres, produzindo apoptose (MORSY; ABOU EL-ALA; ALI, 2013). Além disso, foi relatado que as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> afetam negativamente a morfologia celular e os componentes celulares, levando à apoptose e danos ao DNA e às proteínas (JENG; SWANSON, 2006; CHEN et al., 2008; RADZIUN et al., 2011; ZHANG et al., 2011).

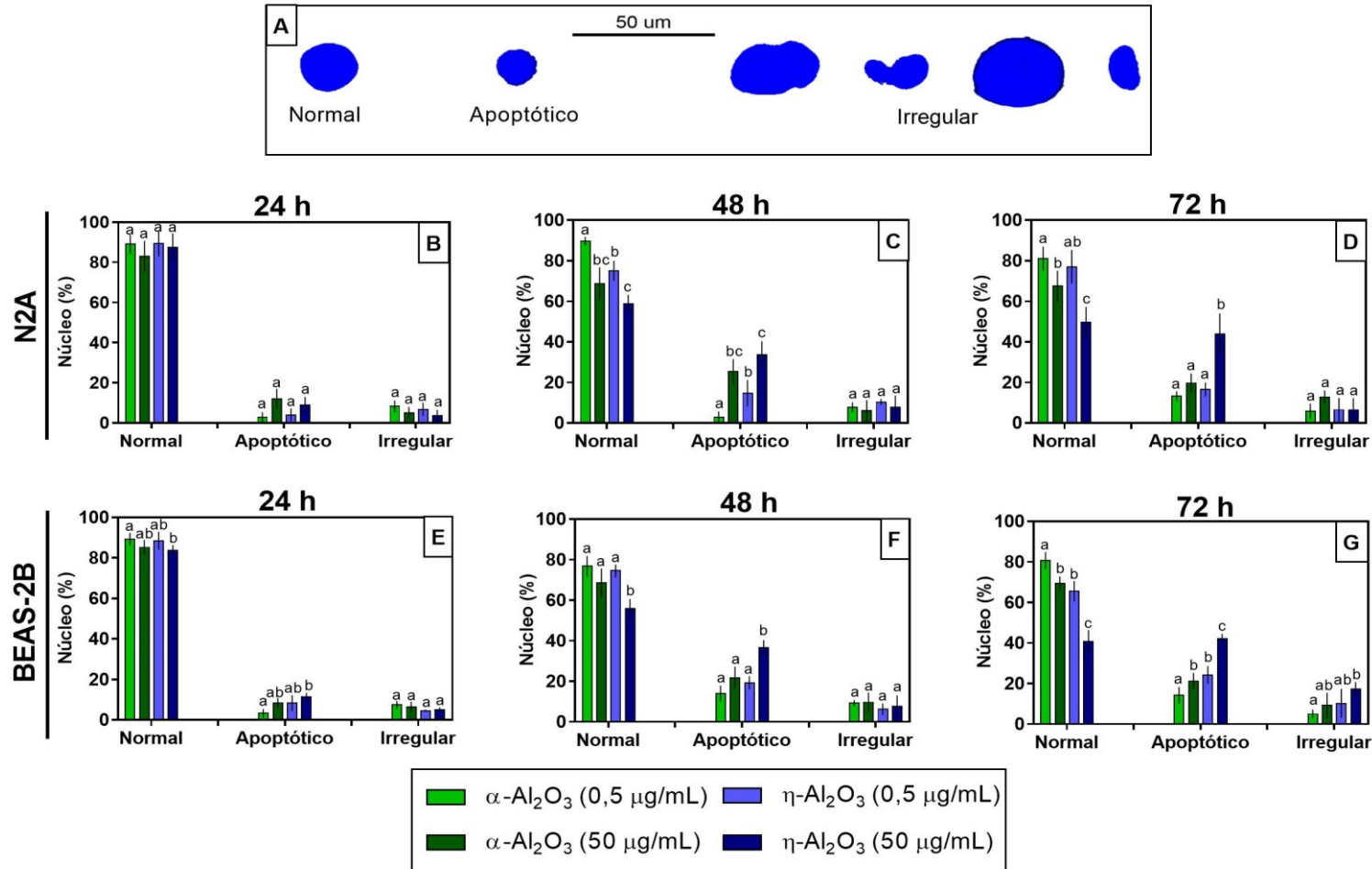
#### *4.2.1.4 Avaliação morfométrica nuclear*

Durante a apoptose ocorrem uma sequência de alterações morfológicas específicas como condensação nuclear, fragmentação de DNA, dissolução de cromatina e alterações na membrana celular, indicando uma desregulação no ciclo celular (BOLD; TERMUHLEN; MCCONKEY, 1997). Para analisar algumas dessas



alterações durante a apoptose induzida por NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nas células N2A e BEAS-2B, foi utilizado um ensaio com coloração por DAPI para distinguir as alterações no núcleo das células tratadas com NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Após a exposição por 24, 48 e 72 h, seguido pela coloração com DAPI foi observado o aumento na porcentagem de núcleos irregulares nas células N2A e BEAS-2B (**Figura 12 B-G**). Na concentração de 50  $\mu\text{g/mL}$ , após 72 h de exposição, o aumento de núcleos irregulares foi observado apenas para células BEAS-2B expostas as NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  (**Figura 12 G**).

Após 48 e 72 h, as NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  aumentaram consideravelmente a proporção de núcleos com condensação em uma forma quase esférica (**Figura 12 A**) nas células N2A e BEAS-2B. De acordo com Vamanu et al., (2008) a apoptose foi caracterizada por encolhimento citoplasmático, condensação de cromatina (forma quase esférica) e fragmentação de DNA, que é uma forma ativa de morte celular por parada do ciclo celular que ocorre em resposta a vários agentes, incluindo NP. Para compreender a dinâmica do ciclo celular é crucial não apenas em condições fisiológicas normais, mas também em condições de estresse, assim, entender se a diminuição da viabilidade mediada pelas NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  está associada à desregulação do ciclo celular. Um estudo recente de Periasamy, Athinarayanan e Alshatwi, (2016) demonstrou que as NP  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  aumentaram a proporção de células na fase G0/G1 e o número de células na fase G2/M diminuiu, conseqüentemente uma divisão celular mais lenta ocorre nas células expostas a longo prazo. Nesse sentido, as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  podem ser capazes de inibir a proliferação celular via parada do ciclo celular na fase G1/G0, resultando em uma redução total da viabilidade após exposição a curto prazo (24, 48 e 72 h) e a longo prazo (10 d) (MARANO et al., 2011).



**Figura 12** - Análise morfométrica dos núcleos das células N2A e BEAS-2B expostas as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. (A) Imagens de identificação e classificação da morfometria nuclear de células expostas e coradas com DAPI. (B-G) Porcentagem de núcleos normais, apoptóticos e irregulares. Os resultados estão expressos como média ± DP (n = 3). Letras diferentes indicam diferenças significativas nos mesmos grupos após os diferentes tempos de exposição, de acordo com a ANOVA de duas vias (p < 0,05).

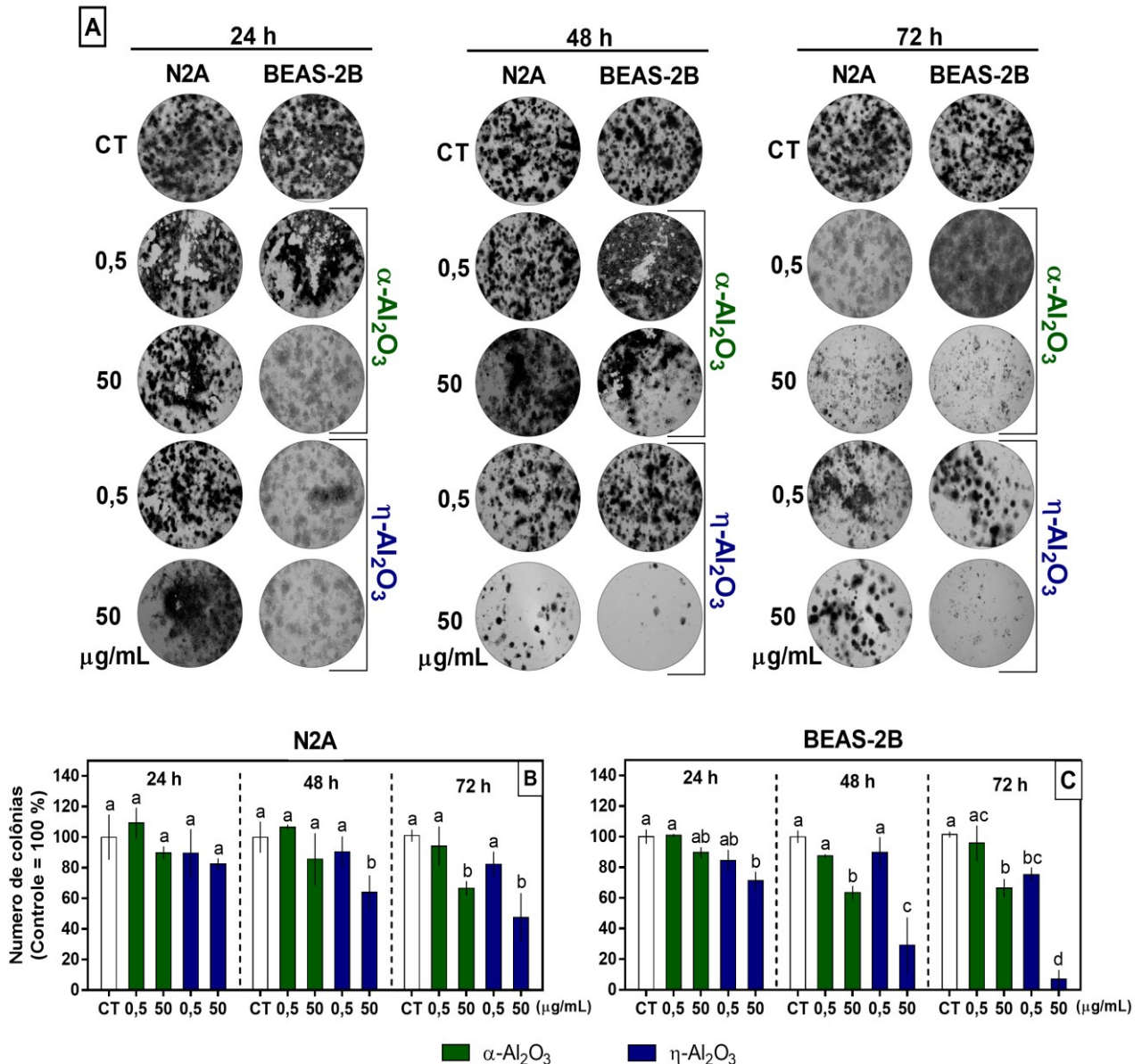
#### 4.2.1.5 Ensaio Clonogênico

O ensaio clonogênico, também chamado de ensaio de formação de colônias, é um ensaio baseado na sobrevivência celular, que mede a capacidade de uma única célula de formar uma colônia. Foi descrito pela primeira vez em 1956 por Puck e Marcus, (1956). Desde então, tem sido utilizado em uma variedade de estudos oncológicos para detectar células que mantêm a capacidade de produzir um grande número de descendentes após tratamentos que podem causar morte reprodutiva como resultado de danos aos cromossomos, apoptose, etc. (BROWN; ATTARDI, 2005).

Com o crescimento da nanotecnologia, também foi proposto como um método para determinar a sobrevivência celular após a exposição a diferentes NP (HERZOG et al., 2007; WEI et al., 2014; SOUZA et al., 2016; NOGUEIRA et al., 2019; SOUSA; SOARES; SOARES, 2019a). Nesse estudo, o ensaio clonogênico foi usado para avaliar os efeitos induzidos pela exposição prolongada. Os resultados demonstraram que as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> diminuem o potencial das células N2A e BEAS-2B de formar uma colônia (acima de 50 células) (**Figura 13 A**). Após a exposição (0,5 e 50  $\mu$ g/mL) por 24, 48 e 72 h, em seguida, semeadas sem exposição a nenhuma NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 10 dias, foi observado que as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> não afetaram a capacidade de formação de colônias das células N2A nos tempos de 24 e 48 h (**Figura 13 B**). Todavia, as NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> acarretaram inibição significativa ( $p < 0,05$ ) na concentração de 50  $\mu$ g/mL nas células expostas por 48 h. Após 72 h foi observado inibição para as células N2A e BEAS-2B expostas às NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**Figura 13 C**) com inibição da formação de colônias quase completa ocorrendo para 50  $\mu$ g/mL e uma inibição significativa para 0,5  $\mu$ g/mL (comparado ao controle) nas células BEAS-2B expostas as NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**Figura 13 C**).

Embora as concentrações utilizadas neste estudo sejam relativamente altas, elas são comparáveis às utilizadas em estudos anteriores com outras NP, além das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (KIM; BAEK; CHOI, 2010; WEI et al., 2014; SOUSA; SOARES; SOARES, 2019a). Por exemplo, Kim, Baek e Choi, (2010) observaram uma diminuição significativa no número de colônias após as células A549 serem expostas a 0,5

mg/mL de NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  por 10 dias. Wei et al., (2014) relataram que o tamanho e a concentração alta de NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  reduziram significativamente o número de colônias, mas não houve reduções significativas na viabilidade (número de clones) nas concentrações mais baixas de NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .



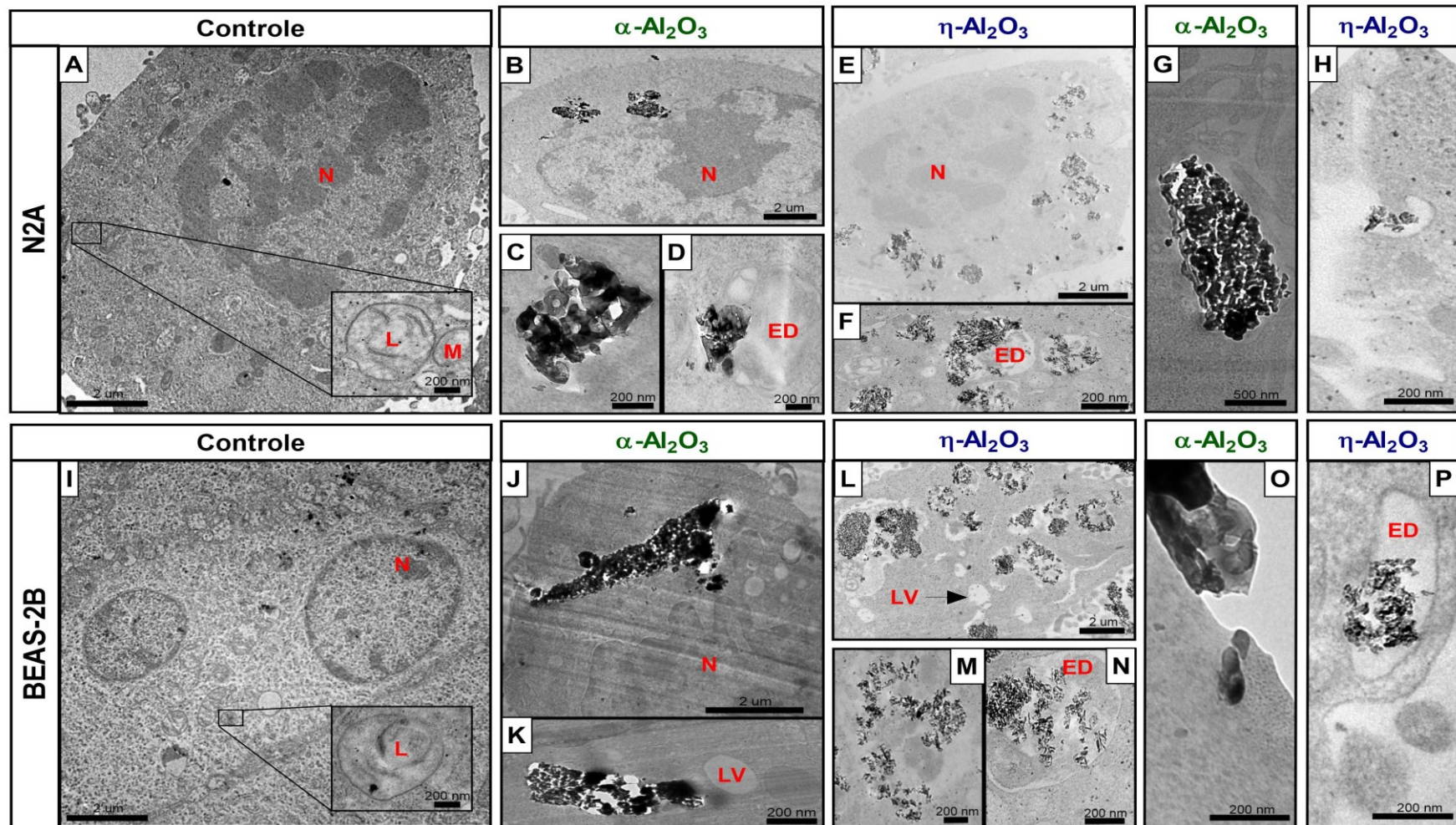
**Figura 13** - Ensaio clonogênico mostrando os efeitos a longo prazo das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  nas células N2A e BEAS-2B. (A) Imagens representativas da formação de colônias (contendo acima de 50 células) após exposição a diferentes concentrações de NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  por 10 dias. (B-C) gráfico mostrando os resultados para a porcentagem de número de colônias.

#### 4.2.1.6 Internalização e quantificação das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Quando as NP atingem a membrana externa de uma célula podem interagir com os componentes da membrana plasmática ou matriz extracelular e entrar na célula, principalmente através da endocitose (BEHZADI et al., 2017). Essa pode ser dividida em fagocitose (somente para algumas células especializadas, como macrófagos) e pinocitose (presente virtualmente em todas as células eucarióticas), a qual pode ser subdividida em endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina e macropinocitose (RADAIC et al., 2016). Os métodos mais amplamente utilizados incluem o corte das células, usando um micrótomo, e a imagem das células obtida a partir de microscopia eletrônica de transmissão (MET), que oferece uma resolução capaz de visualizar alterações em organelas, porém exige preparação da amostra mais elaborada (BEHZADI et al., 2017).

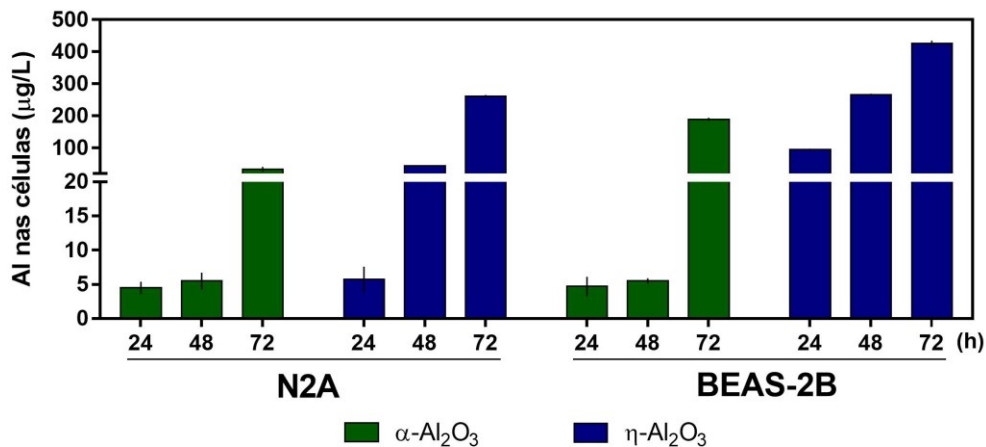
Para confirmar a internalização das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e localizá-las com precisão nas células N2A e BEAS-2B foram realizadas análises de MET. Após tratamento das imagens, a análise de MET das células N2A e BEAS-2B revelou NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> isoladas e agregadas de vários tamanhos interagindo com a membrana celular e internalizadas pelas células N2A (**Figura 14 7B-H**) e BEAS-2B (**Figura 14 J-P**) após 24, 48 e 72 h de exposição. As células controle mostraram membranas plasmáticas e nucleares intactas com uma distribuição normal das organelas intracelulares, ou seja, o núcleo com cromatina e citoplasma uniformemente dispersos, contendo organelas distribuídas aleatoriamente sem a presença de vesículas com NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**Figura 14 A e I**).

A partir da ampliação da membrana celular, as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**Figura 14 G e O**) e NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**Figura 14 H e P**) entraram nas células associadas a invaginações da superfície celular endotelial com alguns agregados internalizados nas vesículas ligadas à membrana. As imagens mostraram que as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**Figura 14 B, C, D, J e K**) e NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**Figura 14 E, F, L, M e N**) estavam confinadas em vesículas citoplasmáticas no lugar de estarem livres no citoplasma. Havia várias vesículas grandes sem conteúdo citoplasmático (**Figura 14 J e K**) e partículas isoladas não foram detectadas no citosol, núcleo celular ou em outras organelas.



**Figura 14** - Imagens de MET das células N2A e BEAS-2B após exposição as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . (A e I) Controle (não tratado), (B, C, D, G, J, K e O) mostrando internalização das NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e (E, F, H, L, M, N e P) mostrando internalização das NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  nas estruturas endossômicas e lisossomos (setas). A análise de MET (J, K e L) demonstrou sinais precoces de apoptose, como formato arredondado, vacuolização citoplasmática e sinais de formação de bolhas nas células expostas as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

Atualmente é bem entendido que as propriedades físico-químicas das NP (por exemplo, tamanho, formato e carga superficial) desempenham um papel fundamental no direcionamento de suas interações com as células. Especificamente, as NP com carga positiva apresentaram uma influência muito mais forte na membrana plasmática quando comparado as NP com carga negativa (LEROUEIL et al., 2008; LI; GU, 2010; ZHU et al., 2013). Embora a via de internalização seja fortemente dependente do tipo de célula (BEHZADI et al., 2017), o mecanismo de internalização celular das NP é influenciado principalmente pelas propriedades das NP (DOUGLAS; PICCIRILLO; TABRIZIAN, 2008; KIM et al., 2011). Assim, as diferenças na toxicidade das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  podem estar relacionadas as características superficiais distintas, isto é, para as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  (carga negativa) e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  (carga positiva), promovendo maior interação entre as células e as NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$ .



**Figura 15** - Quantificação das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  em células N2A e BEAS-2B determinada por ICP-MS. Os valores são médias  $\pm$  DP (n = 2).

Curiosamente, as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$ , apesar das diferenças entre suas fases cristalinas e, conseqüentemente nos formatos predominantes, seguiram as mesmas vias endocíticas de internalização, especialmente, macropinocitose (**Figura 14 H e P**). Além disso, a análise de MET mostrou que a internalização das NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  foi maior em comparação com as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ , provavelmente devido à formação de aglomerações menores das NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$ . Na quantificação do Al total nas amostras dos experimentos de MET por ICP-MS (**Figura 15**) foi verificado maior

internalização para a NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em comparação com à NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e, isso ocorreu em ambas as células para todos os tempos de exposição, sendo que, observou-se um aumento significativo na internalização das NP após 72 h de incubação.

## 4.2.2 Ensaio *in vivo*

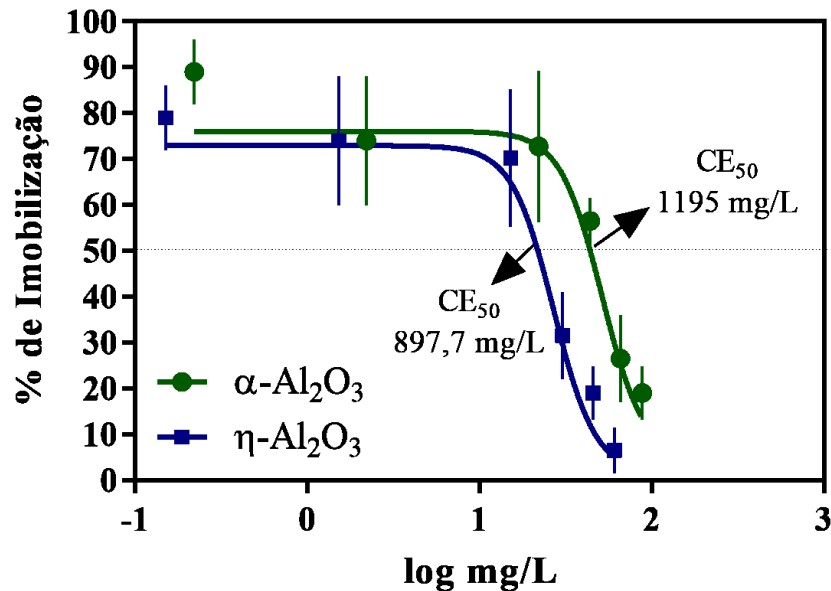
### 4.2.2.1 Ensaio de Toxicidade Aguda

As NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mostraram padrões de imobilização semelhantes após 48 h de exposição e exibiram toxicidade aguda na concentração limiar de 500 - 1500 mg/L. Isso é consistente com estudos anteriores realizados com NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (fases cristalinas  $\alpha$  e  $\gamma$ ), que exibiram toxicidade baixa a moderada para *D. magna* (ZHU et al., 2009; ATES et al., 2015; DEMIR et al., 2015; GOSTEVA et al., 2015; BROWN et al., 2018; KARIMI et al., 2018). Adicionalmente, os resultados indicaram um valor de CE<sub>50</sub> de 1195 (873,4 a 1946) mg/L para as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e 897,7 (693,3 a 1446) mg/L para as NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, dentro dos limites de confiança (intervalos de confiança de 95%), após 48 h, no teste de *D. magna* sem mortalidade observada no controle (**Figura 16**).

Existem vários fatores que influenciam a toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (OBERDÖRSTER et al., 2005; JIANG; MASHAYEKHI; XING, 2009; SADIQ et al., 2011). Ates et al., (2015) realizaram uma análise comparativa entre duas NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ( $\alpha$  e  $\gamma$ ) sobre a espécie *Artemia Salina*. Os resultados mostraram que as NP  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram tóxicos para as duas espécies de algas testadas, enquanto as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> apresentaram menos toxicidade. Os autores verificaram maior interação das NP  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com *A. Salina* devido a sua maior área superficial e diferente carga superficial em relação às NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Também, cabe ressaltar que a agregação das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> no meio de teste influencia diretamente na sua disponibilidade para o organismo modelo (BHUVANESHWARI et al., 2016). A disponibilidade das NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para as *D. magna* foi maior devido ao seu menor tamanho, carga superficial positiva e aglomeração menor, o que poderiam facilmente serem ingeridas e,



subsequentemente interagir com a membrana celular e, portanto, exibir mais toxicidade do que as NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ .



**Figura 16** - Curva dose-resposta das NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  na imobilização de *D. magna* após exposição após de 48 horas. Os valores representam médias  $\pm$  DP (n = 4).

#### 4.2.2.2 Ensaio de Toxicidade crônica

Até a última revisão (dezembro de 2019), apenas dois estudos foram encontrados avaliando os efeitos crônicos das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , especificamente, a fase cristalina gama em *D. magna* (KARIMI et al., 2018; VICENTINI et al., 2019a). Este estudo, é o primeiro relato dos efeitos crônicos das NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  exercidos sobre *D. magna*, após 21 dias de exposição. Os efeitos observados foram diminuição na longevidade, crescimento e reprodução dos organismos em concentrações, sendo esses inferiores aos valores de efeitos observados nos ensaios agudos, isto é, concentrações 195 e 290 vezes menores para as NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ , respectivamente (**Tabela 3**). Os efeitos tóxicos mais proeminentes foram observados para os organismos expostos as NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ , uma vez que, a CEO

foi de 3,12 mg/L para os parâmetros comprimento, idade da primeira ninhada e recém-nascidos por adultos sobreviventes, enquanto para as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> a CEO foi de 6,25 mg/L para longevidade, crescimento e reprodução (**Tabela 3**).

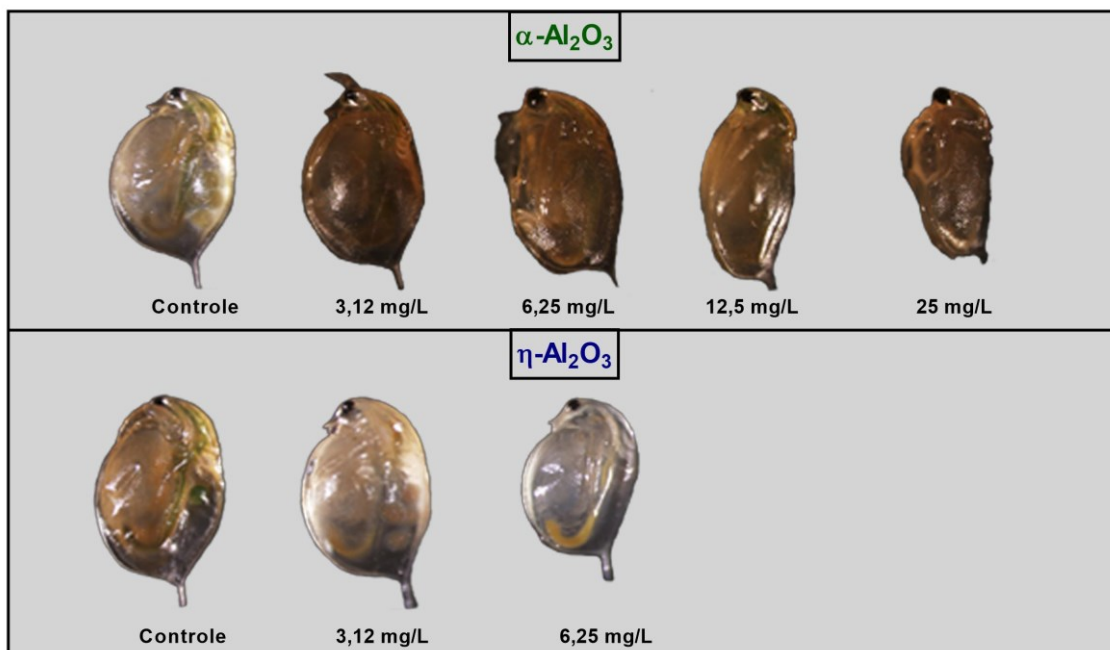
**Tabela 3** - Resultados para os ensaios de toxicidade crônica, CEO e CENO para parâmetros de longevidade, crescimento, reprodução de *D. magna* expostos a NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

NP	Concentração (mg/L)	Longevidade (%)	Comprimento do corpo (mm)	Idade da primeira ninhada (d)	Neonatos por adultos sobreviventes (n)
$\alpha$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Controle	100	2,7 ± 0,28 <sup>a</sup>	9,1 ± 0,19 <sup>a</sup>	10,10 ± 2,5 <sup>a</sup>
	3,12	90	2,5 ± 0,26 <sup>a</sup>	9,3 ± 0,72 <sup>a</sup>	10,80 ± 3,2 <sup>a</sup>
	6,25	80	1,7 ± 0,9 <sup>*a</sup>	10,2 ± 0,36 <sup>*a</sup>	7,0 ± 5,7 <sup>*b</sup>
	12,5	70	1,8 ± 0,87 <sup>*</sup>	10,2 ± 0,53 <sup>*</sup>	5,8 ± 2,9 <sup>*</sup>
	25	60 <sup>*</sup>	1,7 ± 0,1 <sup>*</sup>	11,3 ± 0,24 <sup>*</sup>	1,2 ± 1,5 <sup>*</sup>
	CEO (mg/L)	25	6,25	6,25	6,25
	CENO (mg/L)	< 25	3,12	3,12	3,12
$\eta$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Controle	100	2,8 ± 0,16 <sup>a</sup>	9,0 ± 0,03 <sup>a</sup>	11,20 ± 3,1 <sup>a</sup>
	3.12	100	2,37 ± 0,14 <sup>*a</sup>	11,5 ± 0,47 <sup>*b</sup>	3,7 ± 2,8 <sup>*b</sup>
	6.25	70 <sup>*</sup>	1,8 ± 0,17 <sup>*a</sup>	12,0 ± 0,65 <sup>*b</sup>	1,8 ± 0,17 <sup>*b</sup>
	12.5	-	-	-	-
	25	-	-	-	-
	CEO (mg/L)	6,25	3,12	3,12	3,12
	CENO (mg/L)	3,12	< 3,12	< 3,12	< 3,12

O asterisco (\*) representa diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre a amostra tratada e o respectivo controle e letras diferentes indicam diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) na mesma concentração entre as diferentes NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Além disso, embora não tenha ocorrido mortalidade total para as *D. magna* expostas as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, uma evidente mudança morfológica nos organismos expostos as concentrações mais altas foi observado (**Figura 17**). No estudo de foi observado a redução do tamanho do corpo (27%) e a diminuição da reprodução (45%) após 21 dias de exposição às NP  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (100 mg/L). Outro estudo (VICENTINI et al., 2019b) as NP  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram usadas como um núcleo metálico (sementes de nucleação) para síntese de nanopartículas de poliestireno. No ensaio

crônico com as NP  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  individuais, os resultados mostraram que as NP  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  acarretaram em efeito mais tóxico nos parâmetros crescimento e reprodução avaliados em uma concentração de 39 mg/L (NOEC). Nos dois estudos citados, os autores justificaram os efeitos atribuídos a uma baixa ingestão de alimentos, uma vez que, as algas podem interagir com as NP no intestino, o que leva à baixa eficiência da ingestão de alimentos (CUI; KIM; AN, 2017). Li, Czymmek e Huang, (2011) investigaram a ingestão das NP  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e a distribuição do provimento energético e constataram que uma redução no crescimento e na reprodução podem ser atribuídas ao comprometimento do suprimento de energia. Assim, as *C. dubia* são capazes de ajustar suas estratégias reprodutivas de acordo com as condições alimentares alteradas (PEREIRA; GONÇALVES, 2007).



**Figura 17** - Imagens dos organismos sobreviventes de *D. magna* após 21 dias no ensaio crônico com as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ .

Como existe uma diferença significativa entre as áreas de superfície entre as NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  ( $94,4 \text{ m}^2/\text{g}$ ) e NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  ( $167,0 \text{ m}^2/\text{g}$ ) foi investigada uma possível tendência de toxicidade quando os resultados são normalizados para suas respectivas áreas de superfície. Dessa forma, as concentrações de massa (mg/L) das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  foram convertidas em concentrações da área de superfície ( $\text{m}^2/\text{L}$ )

(**Tabela 4**), visto que, a concentração do número de partículas está relacionada às concentrações de massa via densidade e tamanho das partículas e, um número definido de partículas podem ser fornecidas para todo material testado com composição e tamanho conhecidos (HULL et al., 2012). As tendências de toxicidade relativa das NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> permaneceram as mesmas, ou seja, nos cenários de normalização da concentração (mg/L para m<sup>2</sup>/L), as NP demonstraram toxicidade significativamente maior nas condições de concentração mais alta. Esta diferença foi observada para a imobilização (ensaio agudo) e as reduções na longevidade, crescimento e reprodução (ensaio crônico), que foram expressos em concentração de massa ou concentração de área superficial, sugerindo que a área superficial sozinha não é responsável pela resposta aprimorada aos NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

**Tabela 4** - Número de partículas e área superficial total correspondente a cada concentração de massa das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

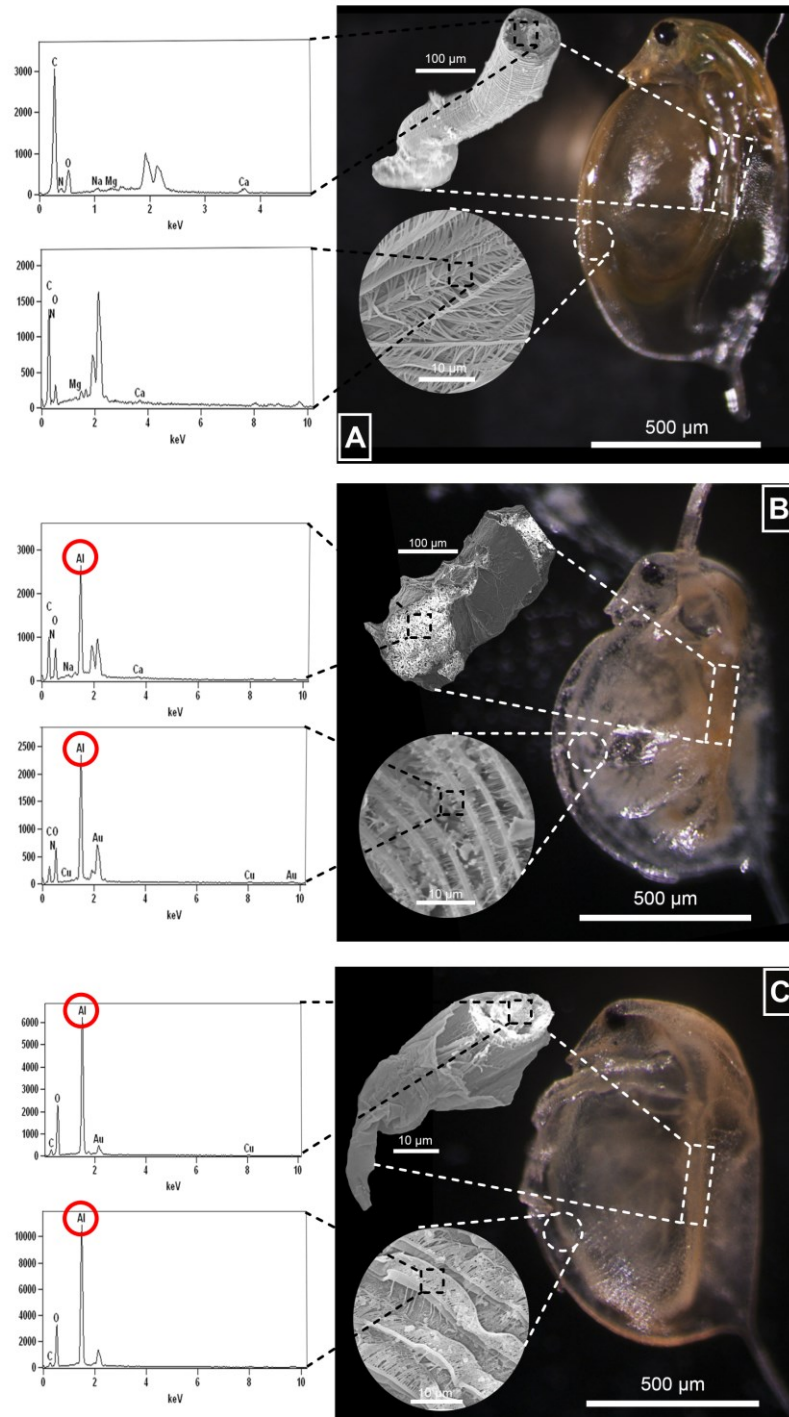
NP	Concentração de massa (mg/L)												
	Agudo						CE <sub>50</sub>		Crônico				
$\alpha$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> $\eta$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	5	50	500	1000	1500	2000	900	1200	3.1	6.2	12.5	25	50
	<b>Numero de partículas (N)</b>												
$\alpha$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	2,0E+13	2,0E+14	2,0E+15	4,0E+15	6,0E+15	8,0E+15	-	4,8E+15	1,24E+13	2,48E+13	5E+13	1E+14	4E+14
$\eta$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	6,0E+13	6,0E+14	6,0E+15	1,2E+16	1,8E+16	2,4E+16	1,08E+16	-	3,7E+13	7,44E+13	1,50E+14	$\frac{3,0E+14}{5}$	6,0E+14
	<b>Área superficial total (m<sup>2</sup>/L)</b>												
$\alpha$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,22	2,20	22	44	66	88	40,95	-	0,09	0,18	0,38	0,76	1,52
$\eta$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	0,15	1,52	15,20	30,40	45,60	60,80	-	36,60	0,14	0,28	0,56	1,11	2,22

#### 4.2.2.3 Localização e ingestão das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em *Daphnia magna*

As observações microscópicas indicaram que a maioria das *D. magna* estavam visualmente cobertas por NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nas carapaças, antenas, cerdas dos toracópodes e filamentos dos cílios filtradores com fusão parcial (**Figura 18 A - C**). Isso reflete na baixa atividade de natação, resultado da interferência física das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nas cerdas dos toracópodes e filamentos dos cílios filtradores, que são essenciais para a natação e a criação de correntes de água para a filtração do alimento (CHOI et al., 2014). Portanto, a obstrução dessas estruturas ocasionada pela presença das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pode levar a vários efeitos adversos no ciclo de vida desses organismos, ocasionando inibição do crescimento e reprodução de *D. magna* (VICENTINI et al., 2019a). Resultados semelhantes foram observados anteriormente no estudo de Svartz et al., (2017) com NP  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> sobre *Rhinella arenarum*. Os autores relataram a presença das NP  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nas cabeças e caudas, interrompendo funções essenciais como natação e alimentação, mesmo nas concentrações mais baixas.

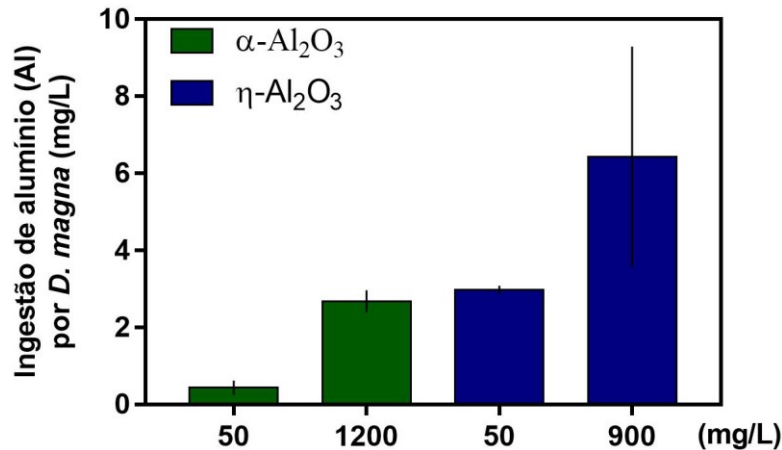
Outro efeito observado foi a ingestão das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pelas *D. magna*, pois a maioria dos intestinos pareciam ter sido preenchidos com as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**Figura 18 B e C**). As análises de EDS confirmaram a presença das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nos intestinos das *D. magna* (**Figura 18 B e C**). Adicionalmente, a presença do Al também foi confirmada apela análise de ICP-MS, que determinou as quantidades totais de Al acumuladas nas *D. magna* (**Figura 19**). Para as *D. magna* expostas a 900 mg/L de NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, a concentração de Al foi de 6,43  $\mu$ g/L, sendo assim, o Al total aumentou um fator de 5,9 a 3,7 vezes em comparação com a ingestão das *D. magna* expostas a 50 e 1200 mg/L de NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Além disso, para as *D. magna* expostas a 50 mg/L de NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, a concentração de Al foi de 2,98  $\mu$ g/L, o que aumentou o fator de Al total de 2,5 a 0,2 em comparação com as *D. magna* expostas a 50 e 1200 mg/L de NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Esses resultados sugerem que não apenas os tamanhos, mas as distintas cargas superficiais exercem influência na filtração das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pelas *D.*

*magna*, pois as NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  têm carga negativa, indicando maior interação entre as NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e *D. magna*.



**Figura 18** - *D. magna* exposta as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  por 24 h: o painel direito mostra imagens do tratamento de controle (A) e exposta as NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  (B) e NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  (C), no modo de iluminação de campo claro. Inseridas nessas imagens estão as imagens MEV, indicando a distribuição das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  no intestino (imagem superior) e cílios filtradores (imagem inferior); o painel esquerdo mostra os resultados da

composição química dos cílios do intestino e dos cílios obtidos por EDS. Os dados mostram picos intensos de Al (círculo vermelho) para as *D. magna* expostas as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.



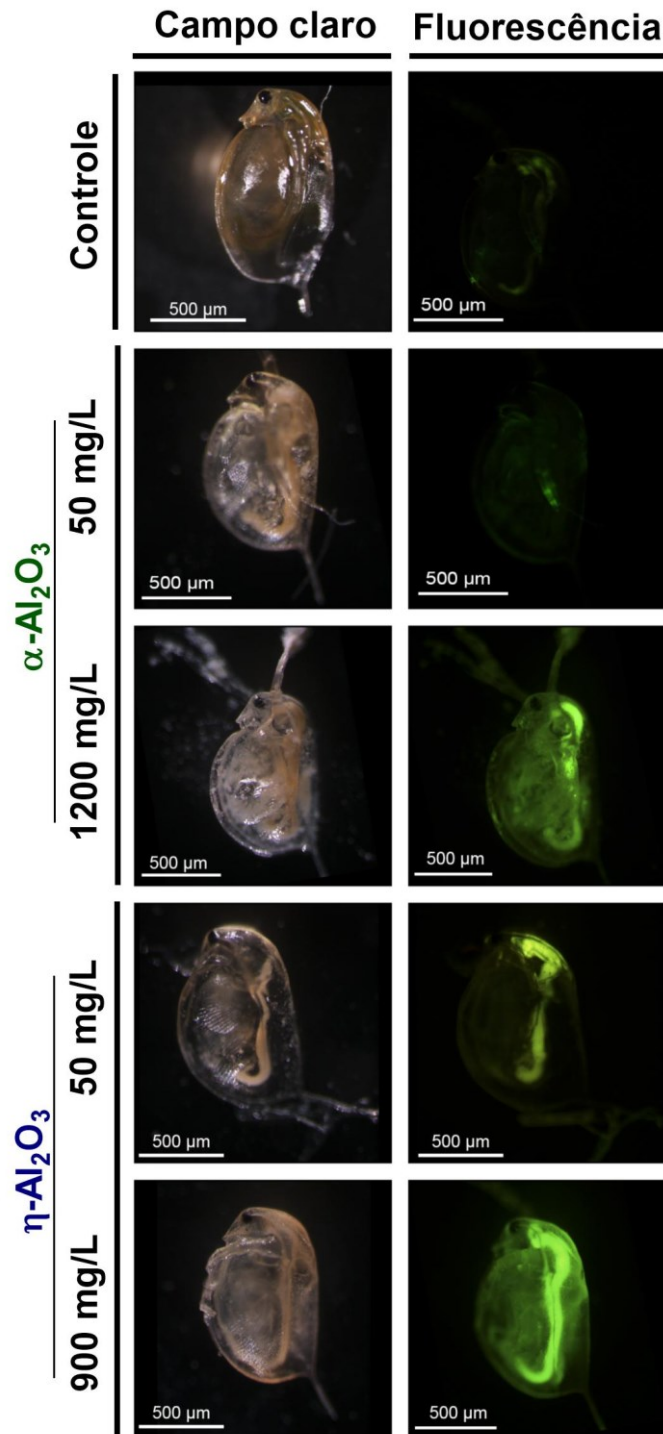
**Figura 19** – Quantificação da concentração de Al em *D. magna* determinada quantitativamente por ICP-MS. Os valores representam médias  $\pm$  DP (n = 2).

#### 4.2.2.4 Biomarcadores bioquímicos de estresse oxidativo (EROs, CAT, SOD, GSH e LPO)

Para explorar os efeitos das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, em termos de danos oxidativos gerados, determinou-se o nível de EROs e LPO, bem como a atividade de CAT, SOD e GSH para elucidar os mecanismos de toxicidade para *D. magna* (**Figura 20 e 21**). A geração de EROs apresentou um aumento significativo de 223,5% em relação ao grupo controle, após 48 h, para as *D. magna* expostas a 1200 mg/L de NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, e aumentos de 148,8% e 395,8% com exposição a concentrações de 50 e 900 mg/L, respectivamente, para as NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**Figura 21 A**). Para uma observação mais detalhada da geração de EROs foram obtidas imagens das *D. magna* após a exposição as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e, portanto, as imagens de intensidades das fluorescências mostraram a geração de EROs através do trato digestivo das *D. magna* (**Figura 20**). As NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induziram a geração de EROs, mais pronunciado para as NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em comparação com as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Esse

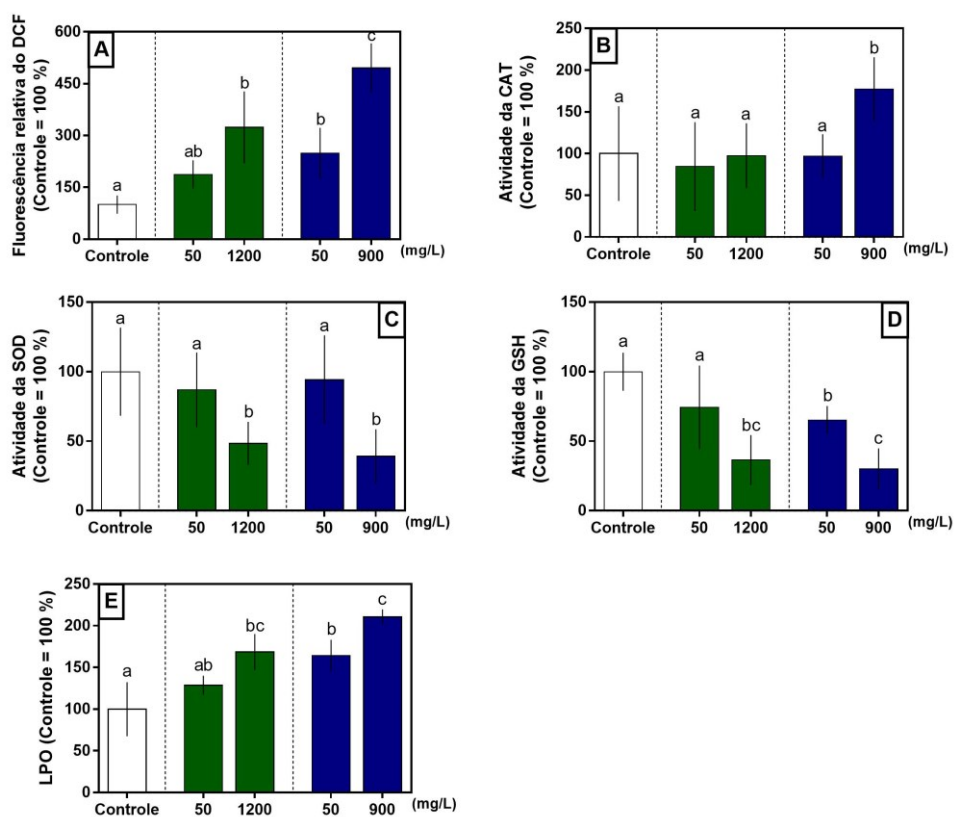


achado provavelmente se deve a um aumento na internalização celular das NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e a possível despolarização das membranas mitocondriais das células (AMIST et al., 2017; YE et al., 2018).



**Figura 20** - Imagens de campo claro das *D. magna* do tratamento controle, expostas as NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Painel esquerdo). Imagens de fluorescência das *D. magna* indicadas por fluorescência verde brilhante no controle, expostas as NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  (Painel direito).

Como mecanismo de defesa contra a geração EROs, as *D. magna* utilizam enzimas antioxidantes e uma ampla variedade de compostos antioxidantes não enzimáticos para manter o nível da EROs, limitando o estresse oxidativo celular (BORGERS; HESSEN, 2002). O limiar de atividade de CAT das *D. magna* foi superior a 1200 mg/L de NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e 50 mg/L de NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Por outro lado, a exposição a 900 mg/L de NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> levou a um aumento significativo em comparação com o controle (**Figura 21 B**). A atividade da SOD mostrou reduções significativas de 51,5% e 60,8% em comparação com o controle após 48 h de exposição a 1200 e 900 mg/L das NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, respectivamente (**Figura 21 C**). A atividade de GSH apresentou uma diminuição de 63,4% em relação ao controle após exposição a 1200 mg/L de NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e reduções significativas de 34,7% e 69,7% foram observadas com 50 e 900 mg/L de NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, em comparação ao controle (**Figura 21 D**).



**Figura 21** - Quantificação dos níveis intracelulares de EROs (A); Atividade de CAT (B), SOD (C) e GSH (D); Teores de MDA (E) em *D. magna* expostos as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> por 48 h. Os resultados estão expressos em porcentagem em relação ao controle (100%) como média  $\pm$  DP (n = 3). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos após a ANOVA de uma via (p <0,05).

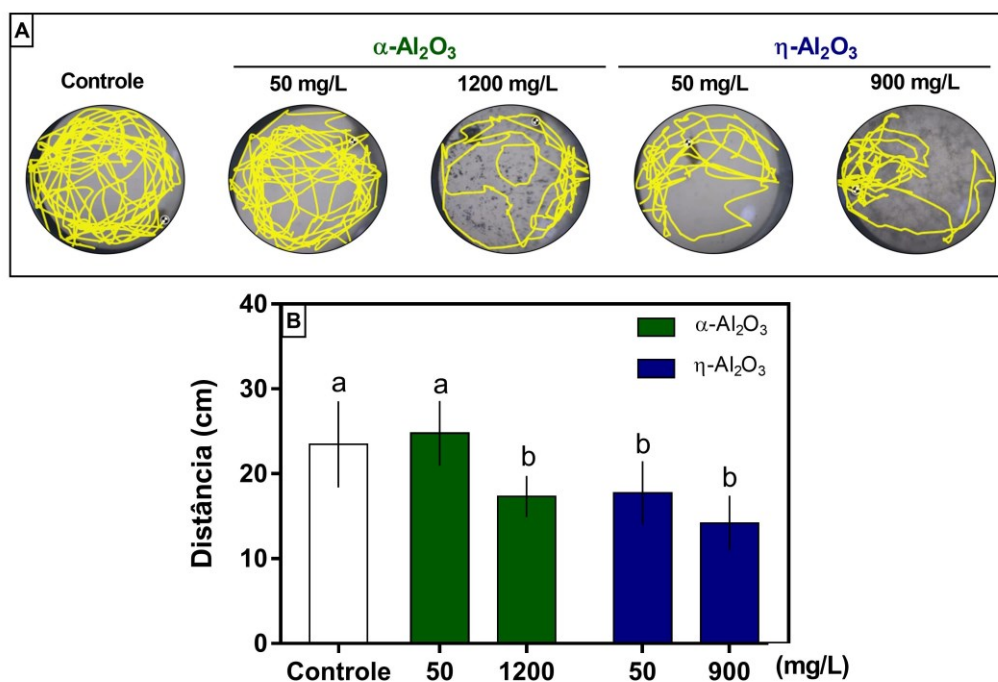
De acordo com os resultados obtidos, o acúmulo de EROs pode resultar do aumento da atividade da CAT devido a um mecanismo de compensação para remover o excesso de  $H_2O_2$  e a diminuição da atividade da SOD e GSH (ALSHATWI et al., 2013). A desregulação dos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos como consequência da superprodução de EROs pode ser interpretada como a capacidade antioxidante das *D. magna* em resposta a condições de estresse oxidativo após a exposição as NP  $Al_2O_3$  (MØLLER et al., 2010; ALSHATWI et al., 2013). Da mesma forma, a *A. salina* exposta a concentrações significativas de NP  $\alpha-Al_2O_3$  e NP  $\gamma-Al_2O_3$  mostrou uma diminuição na atividade antioxidante enzimático e não enzimático (SOD e GSH) com as NP  $\gamma-Al_2O_3$ , ocasionando maiores efeitos em comparação as NP  $\alpha-Al_2O_3$  (ATES et al., 2015). Dessa forma, quando existe um desequilíbrio entre a geração de EROs e a extensão em que os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (CAT, SOD e GSH) são capazes de eliminar as EROs observa-se peroxidação lipídica (LPO) e aumento do MDA (BECKER et al., 2011).

Assim, as *D. magna* expostas as NP  $\eta-Al_2O_3$  exibiram aumento considerável nos níveis de MDA, isto é, 64,3 e 110,5% em comparação com o controle após exposição a 50 e 900 mg/L, respectivamente. No caso de NP  $\alpha-Al_2O_3$ , houve um aumento de 68,5% após a exposição a 1200 mg/L em comparação com o controle (**Figura 21 E**). Isso indica que a *D. magna* está sujeita a estresse oxidativo, o que é consistente com nossos achados relatados anteriormente (ATES et al., 2015), resultando em menor toxicidade para as NP  $\alpha-Al_2O_3$ .

#### 4.2.2.5 Análise do comportamento de natação

Os resultados obtidos mostram que a toxicidade das NP  $Al_2O_3$  induziu um efeito mensurável no comportamento de natação das *D. magna*. Dessa forma, observou-se a diminuição na distância de natação ativa em relação ao controle após 48 h de exposição as NP  $\alpha-Al_2O_3$  a 1200 mg/L e para as NP  $\eta-Al_2O_3$  a 900 mg/L (**Figura 22 A e B**). Também foi observado um efeito claro na atividade de natação, aplicando a menor concentração (50 mg/L) de NP  $\eta-Al_2O_3$  (**Figura 22 A**). As *D. magna* nadaram ativamente em todas as regiões no tratamento controle e a

exposição à menor concentração de NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  está abaixo do limiar, ou seja, sem resposta significativa a 50 mg/L. Entretanto, este não foi o caso das concentrações mais altas das NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  e a menor concentração das NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$ , quando as taxas de natação foram mais lentas (**Figura 22 A**).



**Figura 22** - Trajetórias de natação das *D. magna* expostas as (A) NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$ . (B) Distância média de natação das *D. magna* após 48 h de exposição. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  DP (n = 20). Letras diferentes indicam diferenças significativas entre os grupos após a ANOVA de uma via (p < 0,05).

A menor distância cumulativa percorrida e a perda da orientação da trajetória da natação (**Figura 22 A e B**) pode estar relacionada à cobertura da carapaça das *D. magna* com as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (GAISER et al., 2011), alta demanda energética e distúrbios do sistema nervoso (BOWNIK, 2017). Estudos anteriores sobre a exposição de *D. magna* a outras NP corroboram com nossos resultados e sustentam a descoberta de que a atividade total de natação diminuiu após exposição as NP (ARTELLS et al., 2013; STANLEY et al., 2016). Tal diminuição atividade de natação poderia levar a efeitos adversos na aptidão e na sobrevivência do organismo, por exemplo, afetando a capacidade de escapar de predadores (BOWNIK, 2017). Como

a natação da *D. magna* depende da integração de mecanismos bioquímicos, fisiológicos, sistemas nervoso e muscular (PAROLINI et al., 2018), portanto, uma diminuição na atividade de natação após a exposição as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> pode indicar que as *D. magna* estão direcionando energia para conservar processos essenciais e tentando neutralizar a toxicidade das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (principalmente as NP η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), levando à redução da alimentação, diminuição do crescimento e da reprodução (BOWNIK, 2017).

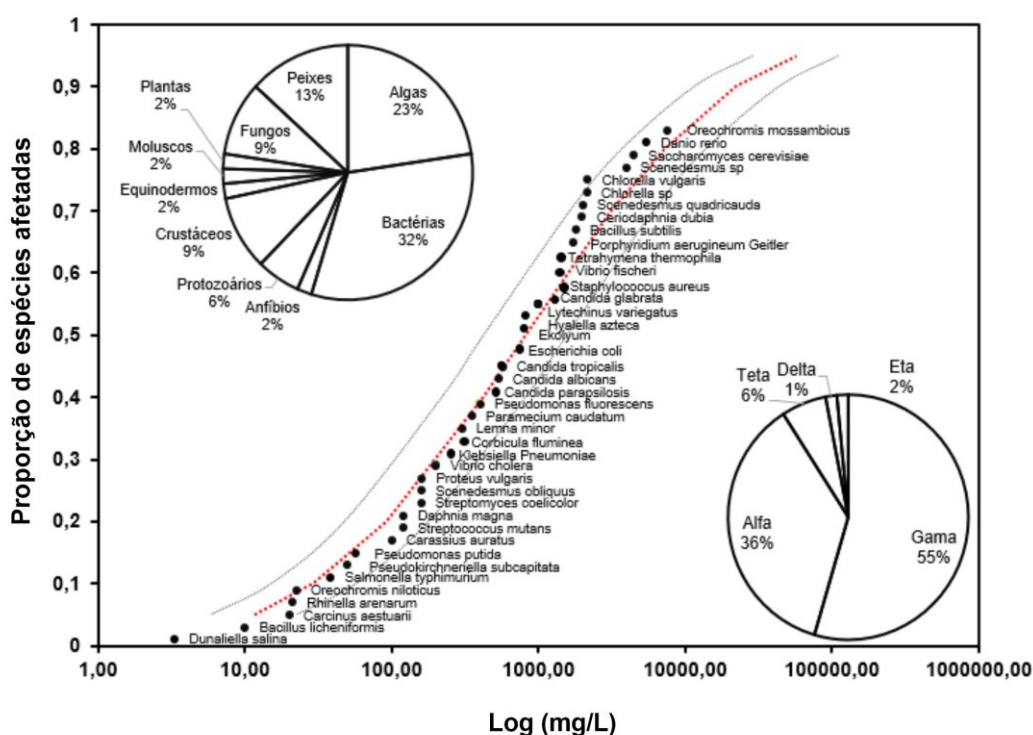
#### 4.3 AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL DAS NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

Primeiramente, foi analisado a disponibilidade de dados para a elaboração da curva da Distribuição de Sensibilidade de Espécies (DSE) para as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, focando apenas em estudos com organismos de ecossistemas aquáticos. Além disso, as composições de cada conjunto de dados foram separadas em termos de grupos superiores e espécies (**Quadro A1**). O total de 107 dados de toxicidade baseados em CE, LC, CEO, CMI, CI e CENO foram coletados para algas, bactérias, anfíbios, protozoários, crustáceos, equinodermos, moluscos, plantas, fungos e peixes. Sendo assim, obteve-se uma dominância de estudos realizados em bactérias (32%) e algas (23%) (**Figura 23**). As condições experimentais de cada estudo incluem: *endpoint*, efeito, exposição, tempo, fase cristalina, tamanho de partícula e concentração (**Quadro A1**). A análise mostrou que as NP γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> receberam a maior atenção dos estudos entre as fases cristalinas existentes para as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> que forneceram dados de toxicidade para 58,36% e 38,91% das espécies, respectivamente. Em geral as NP γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> são as principais fases cristalinas, possuindo muitas propriedades interessantes, por exemplo alta resistência mecânica, resistência ao desgaste, resistência à corrosão, resistência ao calor, alta constante dielétrica e alta transmitância (DOREMUS, 2008).

Por outro lado, há um número limitado de estudos relacionados aos dados de toxicidade com outras fases cristalinas de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, como a fase η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> testada *in vitro* e para *D. magna* em nosso estudo, NP δ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> testado para *C. dubia* (PAKRASHI et al., 2013) e NP θ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> testado para *E. coli*, *P. vulgaris*, *S. aureus*, *S.*

*mutans* (D.; P.; S. N., 2018). Até o momento, ou seja, até dezembro de 2019 não foram encontrados estudos com outras fases cristalinas e, portanto, do total dos estudos examinados, vários não puderam ser utilizados devido à falta de informações sobre a fase cristalina.

Subsequentemente aplicou-se a DSE para as NP  $Al_2O_3$  agrupadas por espécies individuais e grupos superiores (**Figuras 23 e 24**). As espécies mais sensíveis obtidas nos dados coletados foram a microalga unicelular *Dunaliella salina*, expostas às NP  $\gamma-Al_2O_3$ , e *Paramecium multimicronucleatum*, expostas às NP  $\alpha-Al_2O_3$  (**Tabela 5**). A sensibilidade relativa dos grupos taxonômicos com base na média cumulativa de suas informações de toxicidade (**Figura 24**) foi classificada na seguinte ordem: Anfíbios < Plantas < Crustáceos < Bactérias < protozoários ciliados < Molusco = Equinodermo < Algas < Peixes < Fungos.

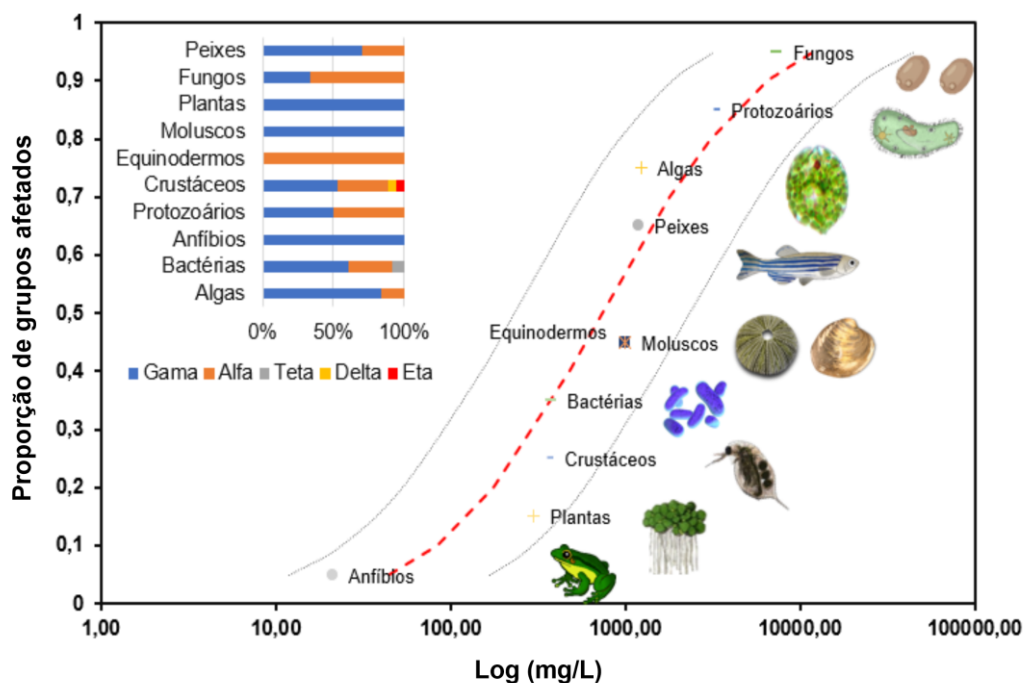


**Figura 23** - DSE para NP  $Al_2O_3$  ( $n = 53$ ) com base na distribuição das concentrações do limiar de toxicidade para diferentes organismos aquáticos com intervalos de confiança de 95% (linhas tracejadas). Composições dos grupos taxonômicos (inserção a esquerda) e fases cristalinas (inserção a direita).

Tabela 5 - Classificação de sensibilidades das espécies utilizadas para as análises de DSE.

<b>Táxons</b>	<b>Intensidade do estressor (mg/L)</b>	<b>Classificação</b>	<b>Proporção de táxons</b>	<b>Número de Observação</b>
<i>Dunaliella salina</i>	3,32	1	1%	1
<i>Bacillus licheniformis</i>	10	2	3%	1
<i>Carcinus aestuarii</i>	20	3	5%	1
<i>Rhinella arenarum</i>	21,04	4	7%	1
<i>Oreochromis niloticus</i>	22,36	5	9%	2
<i>Salmonella typhimurium</i>	38,23	6	11%	12
<i>Pseudomonas putida</i>	50	7	13%	1
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	56,04	8	15%	2
<i>Carassius auratus</i>	100	9	17%	1
<i>Streptococcus mutans</i>	120	10	19%	1
<i>Daphnia magna</i>	120,16	11	21%	9
<i>Streptomyces coelicolor</i>	158,11	12	23%	2
<i>Scenedesmus obliquus</i>	158,74	13	25%	3
<i>Proteus vulgaris</i>	160	14	27%	1
<i>Vibrio cholera</i>	200	15	29%	1
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	200	16	29%	1
<i>Corbicula fluminea</i>	200	17	29%	1
<i>Lemna minor</i>	300	18	35%	1
<i>Paramecium caudatum</i>	349,28	19	37%	2
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	400	20	39%	1
<i>Chlorella ellipsoids</i>	400	21	39%	1
<i>Candida albicans</i>	532,25	22	43%	2
<i>Candida tropicalis</i>	566,6	23	45%	1
<i>Candida parapsilosis</i>	566,6	24	45%	1
<i>Candida glabrata</i>	566,6	25	45%	1
<i>Escherichia coli</i>	797,51	26	51%	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	816,33	27	53%	3
<i>Tetrahymena thermophila</i>	1000	28	55%	1
<i>Porphyridium aeruginum</i> Geitler	1000	29	55%	1
<i>Lytechinus variegatus</i>	1000	30	55%	1
<i>Hyalella azteca</i>	1000	31	55%	1
<i>Ekolyum</i>	1000	32	55%	2
<i>Vibrio fischeri</i>	1729,16	33	65%	2

<i>Bacillus subtilis</i>	1786,92	34	67%	4
<i>Ceriodaphnia dubia</i>	1985,85	35	69%	4
<i>Scenedesmus quadricauda</i>	2000	36	71%	1
<i>Chlorella sp</i>	2130,72	37	73%	2
<i>Chlorella vulgaris</i>	2160,13	38	75%	2
<i>Scenedesmus sp</i>	3935	39	77%	1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4472,13	40	79%	2
<i>Danio rerio</i>	5428,83	41	81%	3
<i>Oreochromis mossambicus</i>	7589,46	42	83%	2
<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	9697,88	43	85%	3
<i>Clarias gariepinus</i>	10000	44	87%	2
<i>Artemia salina</i>	10000	45	87%	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	13679,80	46	91%	3
<i>Raphidocelis subcapitata</i>	100000	47	93%	1
<i>Bacillus altitudinis</i>	120000	48	95%	1
<i>Skeletonema costatum</i>	210100	49	97%	1
<i>Paramecium multimicronucleatum</i>	926920	50	99%	1



**Figura 24** - Curvas da DSE para NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e detalhes do ranking de sensibilidade das espécies, agrupados de acordo com seu grupo taxonômico. Composições de fases cristalinas (inserção).



De acordo com as **Figuras 23 e 24** a DSE indica claramente que houve diferença no potencial de risco das fases cristalinas de NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para as espécies individuais e grupos taxonômicos. Para determinar as concentrações e avaliar a ameaça toxicológica das fases cristalinas das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> em organismos aquáticos, os dados coletados neste estudo mostraram que para proteger 95% das espécies (HC5), a concentração das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nos ambientes aquáticos não pode exceder 31,54 mg/L para as NP α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 22,71 mg/L para as NP γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e 68,70 mg/L para as NP θ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, confirmando que as NP γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> apresentaram-se mais tóxica, enquanto menor toxicidade foi observado para as NP θ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> seguida das NP α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (**Tabela 6**). No entanto, as concentrações são altas e menos prováveis de serem encontradas em ambientes aquáticos conforme as estimativas recentes (WANG; NOWACK, 2018b; WIGGER; NOWACK, 2019).

**Tabela 6** - Concentração perigosa para 5% das espécies (HC5) e concentração sem efeito previsto (PNEC) para espécies reunidas por fases cristalinas das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Fases Cristalinas	N	Intercept	Slope	R <sup>2</sup>	HC5	PNEC
α-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	33	1,91	0.96	0,98	31,54 (16,33 – 60,93)	1,99 (1.53 – 2.45)
γ-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	68	1,98	1.01	0.97	22,71 (11,16 – 46,17)	1,40 (1.16 – 1,63)
η-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1	n.d	n.d	n.d	n.d	312**
δ-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1	n.d	n.d	n.d	n.d	74.300**
θ-Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	4	-10,88	7.75	0,99	68,70 (63,14 – 74,75)	4,29 (1,56 – 7,02)

n.d (não disponível): os estudos não foram suficientes para calcular a DSE. \*\*PNEC derivado de um AF de 100 para as NP η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e um AF de 1000 para as NP δ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Não foi possível calcular a HC5 para as NP η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e as NP δ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> devido aos estudos limitados com outras espécies comumente usadas em testes de toxicidade aquática para nossa análise. Além disso, os valores PNEC, isto é, o valor que garante não existir risco para organismos mostram diferenças consideráveis para as fases cristalinas (**Tabela 6**). As NP γ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> mostraram o menor valor médio de PNEC com 1,40 mg/L em comparação com as NP α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com 1,99 mg/L, as NP θ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com 4,29 mg/L, as NP η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com 321 mg/L e as NP δ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com 74,300 mg/L (**Tabela 6**). O PNEC para NP η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e NP δ-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foi derivado usando CE<sub>50</sub> e

CENO respectivamente, dividido por um FA de 100 e 1000 (ECHA, 2008), pois o método DSE não era aplicável para o conjunto de dados para as duas fases cristalinas. Dessa forma, os resultados apresentaram-se altos devido ao conjunto limitado de dados (**Tabela 6**).

Ao comparar as PNEC observou-se que, para as diferentes fases cristalinas das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , os dados foram consideravelmente maiores do que o encontrado por Wang e Nowack, (2018a), cujo valor de PNEC estabelecido foi de 0,12 mg/L. Tal diferença foi devido à limitação de estudos, que resultaram em estimativas grosseiras de DSE para duas fases cristalinas. Outro estudo de Wigger e Nowack, (2019) observou a diferença entre as fases cristalinas alfa e gama, obtendo uma PNEC de 9,34 mg/L para as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e 1,05 mg/L para as NP  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ , sendo assim, valores próximos aos encontrados em nosso estudo, essa diferença deveu-se à limitação dos dados nas fases cristalinas utilizadas no estudo, entretanto, os autores utilizaram a mesma estratégia, a qual foi utilizado para as NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\delta\text{-Al}_2\text{O}_3$  em nosso estudo, isto é, utilizar um FA de 1000 para obter a PNEC para as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ .

Na avaliação de risco ambiental, o risco é quantificado pela comparação da concentração ambiental prevista (PEC) e da concentração prevista sem efeito (PNEC), resultando na taxa de caracterização de risco (RCR) (ECHA, 2008). A partir das informações atualmente disponíveis, usando o modelo probabilístico de análise de fluxo de material, a concentração ambiental média teoricamente prevista (PEC) para as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  é de 0,53  $\mu\text{g/L}$  e para as NP  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$  é de 0,05  $\mu\text{g/L}$  em água superficial descrita por Wigger e Nowack, (2019). Já para as NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$ , NP  $\delta\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$  foi decidido usar resultados probabilísticos de PEC (0,22  $\mu\text{g/L}$ ) de Wang e Nowack, (2018a).

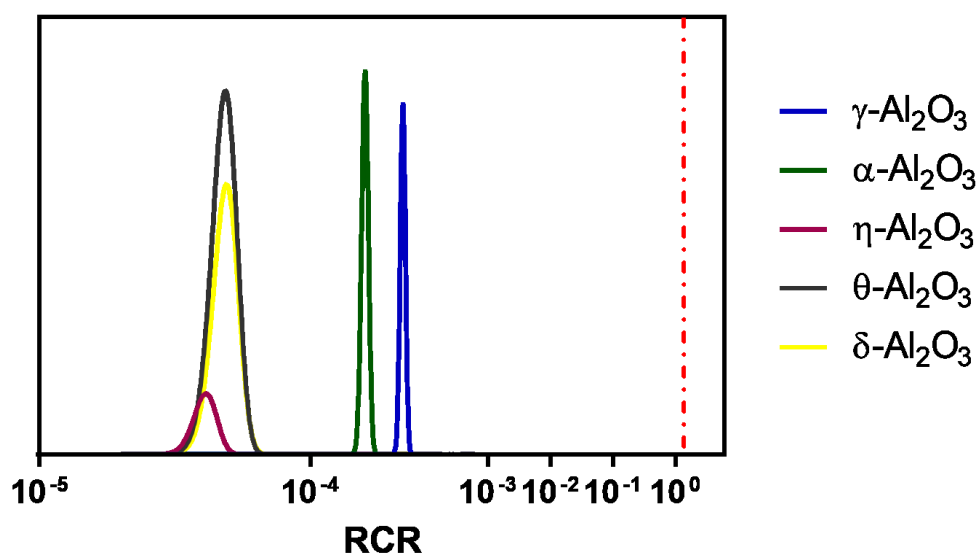
Os valores médios de RCR para todas as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  foram várias ordens de grandeza inferiores a 1 (**Tabela 7**). Como o valor previsto de PEC é menor que o valor calculado de PNEC, significa que, de acordo com as informações disponíveis, nenhum risco é previsto para as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  para o ambiente aquático (**Figura 25**). Os valores de RCR são decididos tanto pelo nível de exposição quanto pelo efeito e,

portanto, a NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com maior risco para os organismos (NP  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) não implica necessariamente o maior risco associado. Por exemplo, as curvas na **Figura 25** mostram o menor risco, mesmo sendo os mais tóxicos entre todas as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

**Tabela 7** - Caracterização de risco para fases cristalinas das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Fases cristalinas	PNEC	PEC	RCR
$\alpha$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,99 (1,53 – 2,45)	0,53 <sup>a</sup>	4,53E-04 (2,72E-04 – 6,34E-04)
$\gamma$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	1,40 (1,16 – 1,63)	0,05 <sup>a</sup>	1,29E-04 (1,11E-04 - 1,48E-04)
$\eta$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	312 <sup>**</sup>	0,22 <sup>b</sup>	6,67E-05 (2,88E-05 - 1,05E-04)
$\delta$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	74,300 <sup>**</sup>	0,22 <sup>b</sup>	4,92E-05 (3,48E-05 – 6,35E-05)
$\theta$ -Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	429 (1,56 – 7,02)	0,22 <sup>b</sup>	4,06E-05 (3,74E-05 - 4,37E-05)

<sup>\*\*</sup> valores para  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e  $\delta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> são baseados AF de 100 e 1000, respectivamente. Valores entre parênteses são intervalo de confiança de 95%. <sup>a</sup>PEC em águas superficiais em 2020 com base no modelo de Wigger e Nowack, (2019). <sup>b</sup>PEC em águas superficiais em 2020 com base no modelo de Wang e Nowack, (2018a).



**Figura 25** - Razões de caracterização de risco (RCR) calculadas para as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Linha tracejada (vermelho) representa risco potencial.

## CAPÍTULO V

### 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em resumo, foi realizada uma investigação sistemática dos efeitos associados a toxicidade aguda e crônica de diferentes fases cristalinas das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (alfa e eta) em relação a ensaios *in vitro* (linhagens celulares neuroblastoma (N2A) e epitélio Brônquico Humano (BEAS-2B)) e *in vivo* (microcrustáceo de água doce *Daphnia magna*). Embora numerosos estudos tenham fornecido uma base de informações sobre os efeitos toxicológicos *in vitro* e *in vivo* das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , o estudo aqui apresentado foi o primeiro a examinar os efeitos *in vitro* e *in vivo* das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  com diferentes fases cristalinas ( $\alpha$  e  $\eta$ ) e realizar uma avaliação abrangente dos riscos ambientais das NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ , NP  $\gamma\text{-Al}_2\text{O}_3$ , NP  $\theta\text{-Al}_2\text{O}_3$ , NP  $\delta\text{-Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  com ênfase nos organismos aquáticos com ênfase nas fases cristalinas.

Os resultados obtidos mostram claramente que os efeitos toxicológicos das NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  são dependentes das diferentes fases cristalinas, em destaque, verificou-se que as NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  são mais tóxicas em concentrações mais baixas do que as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  devido às diferenças nos rearranjos atômicos, que resultam em distintas fases cristalinas, isto é, células unitárias diferentes para as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Dessa forma, as distintas fases cristalinas definem e influenciam as propriedades físico-químicas finais de cada material, como estado de aglomeração, formato das partículas, área superficial e carga superficial. Mesmo que ainda seja um desafio correlacionar de maneira confiável uma resposta toxicológica específica com a fase cristalina, principalmente devido a diferentes fatores que podem alterar as propriedades das NP como, por exemplo, metodologia de síntese e razão combustível/oxidante, formato das partículas e o comportamento das NP em diferentes meios, entre outros.

As propriedades físico-químicas das NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  promoveram maior internalização das NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  pelas células N2A e BEAS-2B e a ingestão por *D. magna*, afetando uma variedade de parâmetros toxicológicos em menores concentrações e tempos testados quando comparado as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ . Além disso, o

risco que as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  podem representar para os organismos aquáticos pode ser separado de acordo com a fase cristalina, embora a evidência do efeito tóxico de cada fase seja limitada. A avaliação de risco indicou que as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  não representam ameaça direta aos organismos aquáticos, uma vez que, as concentrações perigosas encontradas estão bem acima das concentrações ambientais previstas. Portanto, as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  devem ser consideradas como uma opção para substituir outros materiais com as mesmas propriedades ou, ainda, semelhantes e que atualmente apresentam alto potencial toxicológico em pequenas concentrações.

## 6 CONCLUSÕES

As formas dos picos dos difratogramas de DRX indicaram diferentes graus de cristalização para as duas NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , apresentando uma estrutura cristalina romboédrica com empacotamento de célula unitária hexagonal para as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  e uma estrutura cristalina cúbica centrada na face para as NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$ ;

As NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  apresentaram diâmetros inferiores a 50 nm, morfologia irregular e aglomerada para ambas as NP, porém as NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  mostrou formato quase esférico, enquanto a NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  apresentou formato tendendo a bastonetes. As análises de DE confirmaram uma menor aglomeração para NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  em todos os meios testados e juntamente com o menor diâmetro de partículas determinado nas micrografias de MET confirmaram a maior área superficial determinada pelo BET e, conseqüentemente, maior disponibilidade de íons superficiais;

A inversão de carga superficial das NP  $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$  (Negativo) e NP  $\eta\text{-Al}_2\text{O}_3$  (Positivo) na análise de PZ indicou que as NP  $\text{Al}_2\text{O}_3$  possuem características superficiais distintas, as quais resultam das diferentes fases cristalinas;

As NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com carga positiva mostram ordens de magnitude mais tóxicas nos ensaios *in vitro* e *in vivo* em comparação com as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> com carga negativa, devido à maior adesão nas células e *D. magna*;

As NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induzem um estresse mais pronunciado nas células BEAS-2B em comparação com as células N2A observado usando múltiplos ensaios toxicológicos, ou seja, desestabilização da membrana lisossomal, geração de EROs, indução de apoptose, integridade reduzida da membrana celular, irregularidade do núcleo e inibição de proliferação celular. Os efeitos das NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nas células N2A e BEAS-2B dependem de uma variedade de fatores, incluindo, entre outros, o tempo de exposição e as concentrações;

Nos ensaios de toxicidade aguda com *D. magna*, a toxicidade está diretamente relacionada com a maior disponibilidade das NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> para as *D. magna* decorrentes do seu menor diâmetro e potencial de aglomeração, o que poderiam facilmente serem ingeridas e subsequentemente interagir com a membrana celular e, portanto, exibir mais uma CE<sub>50</sub> menor do que as NP  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>;

Nos ensaios de toxicidade crônica com *D. magna*, as NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> afetaram a longevidade, crescimento e reprodução, sendo esses efeitos maiores para os organismos expostos as NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, isso indicou que o ciclo de vida e a dinâmica populacional foram prejudicados;

Em menores concentrações, as NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induzem uma desregulação na atividade antioxidante e diminuição na distância de natação das *D. magna*, sugerindo que a energia foi desviada para a sobrevivência em vez de natação, crescimento ou reprodução. Com possíveis consequências prejudiciais para toda a cadeia trófica devido à função central dessa espécie nos ecossistemas de água doce;

A avaliação de risco indica que, de acordo com a abordagem probabilística, as NP  $\alpha$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ , NP  $\gamma$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ , NP  $\theta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$ , NP  $\delta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  e NP  $\eta$ - $\text{Al}_2\text{O}_3$  representam apenas um risco muito limitado para os organismos aquáticos.

## CAPÍTULO VI

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AAM, B. B.; FONNUM, F. Carbon black particles increase reactive oxygen species formation in rat alveolar macrophages in vitro. **Archives of Toxicology**, v. 81, n. 6, p. 441–446, 22 maio 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17119925>>. Acesso em: 22 maio. 2017.

ABDRAKHIMOV, V. Z. Use of Aluminum-Containing Waste in Production of Ceramic Materials for Various Purposes. **Refractories and Industrial Ceramics**, v. 54, n. 1, p. 7–16, 18 maio 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11148-013-9540-8>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

ABNT, A. B. D. N. T. **NBR 12.713: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com Daphnia spp. (Cladocera, Crustacea)**Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<https://www.abntcatalogo.com.br/norma.aspx?ID=57167>>. Acesso em: 1 mar. 2017.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1 jan. 1984. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0076687984050163?via%3Dihub>>. Acesso em: 10 fev. 2018.

ALSHATWI, A. A. et al. Aluminium oxide nanoparticles induce mitochondrial-mediated oxidative stress and alter the expression of antioxidant enzymes in human mesenchymal stem cells. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 30, n. 1, p. 1–10, jan. 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/19440049.2012.729160>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

AMIST, N. et al. Comparative studies of Al<sup>3+</sup> ions and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on growth and metabolism of cabbage seedlings. **Journal of Biotechnology**, v. 254, p. 1–8, 20 jul. 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168165617302833>>. Acesso em: 5 dez. 2017.

ANSARI, M. A. et al. Antibacterial potential of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles against multidrug resistance strains of Staphylococcus aureus isolated from skin exudates. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, n. 10, p. 1970, 21 out. 2013. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11051-013-1970-1>>. Acesso em: 30 maio. 2019.



ANSARI, M. A. et al. Interaction of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles with Escherichia coli and their cell envelope biomolecules. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 4, p. 772–783, 1 abr. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/jam.12423>>. Acesso em: 1 nov. 2017.

ANSARI, M. A. et al. Green synthesis of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles and their bactericidal potential against clinical isolates of multi-drug resistant Pseudomonas aeruginosa. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 31, n. 1, p. 153–164, 11 jan. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11274-014-1757-2>>. Acesso em: 8 jun. 2018.

ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and in vitro studies: The need of the hour. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, n. 2, p. 151–165, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X11004467>>. Acesso em: 5 abr. 2017.

ARTELLS, E. et al. Exposure to Cerium Dioxide Nanoparticles Differently Affect Swimming Performance and Survival in Two Daphnid Species. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. e71260, 15 ago. 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23977004>>. Acesso em: 9 maio. 2019.

ARUOJA, V. et al. Toxicity of 12 metal-based nanoparticles to algae, bacteria and protozoa. **Environmental Science: Nano**, v. 2, n. 6, p. 630–644, 26 nov. 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5EN00057B>>. Acesso em: 8 jul. 2019.

ASHTARI, M.; ASHRAFIZADEH, S. N.; BAYAT, M. Asphaltene removal from crude oil by means of ceramic membranes. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 82–83, p. 44–49, fev. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0920410512000058>>. Acesso em: 14 jan. 2020.

ASZTEMBORSKA, M. et al. Accumulation of Aluminium by Plants Exposed to Nano- and Microsized Particles of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. **International Journal of Environmental Research**, v. 9, n. 1, p. 109–116, 2015. Disponível em: <[https://journals.ut.ac.ir/article\\_880\\_2a044cb6721c3113491e0c23ab47c46d.pdf](https://journals.ut.ac.ir/article_880_2a044cb6721c3113491e0c23ab47c46d.pdf)>. Acesso em: 13 abr. 2017.

ATES, M. et al. Evaluation of alpha and gamma aluminum oxide nanoparticle accumulation, toxicity, and depuration in *Artemia salina* larvae. **Environmental Toxicology**, v. 30, n. 1, p. 109–118, jan. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/tox.21917>>. Acesso em: 11 abr. 2017.

AZOULAY, D.; SENJEN, R.; FOLADORI, G. Social and Environmental Implication of Nanotechnology Development in Asia-Pacific. **IPEN (International POPs Elimination Network)**, p. 80, 2014. Disponível em: <[http://ciel.org/Publications/Nano\\_AsiaPacific\\_Mar2014.pdf](http://ciel.org/Publications/Nano_AsiaPacific_Mar2014.pdf)>.

BALASUBRAMANYAM, A. et al. In vivo genotoxicity assessment of aluminium oxide nanomaterials in rat peripheral blood cells using the comet assay and micronucleus test. **Mutagenesis**, v. 24, n. 3, p. 245–251, 1 maio 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mutage/article-lookup/doi/10.1093/mutage/geb003>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

BALASUBRAMANYAM, A. et al. In vitro mutagenicity assessment of aluminium oxide nanomaterials using the Salmonella/microsome assay. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 6, p. 1871–1876, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233310001657>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

BARATA, C. et al. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 2, p. 175–186, fev. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1532045605000311>>. Acesso em: 26 jun. 2017.

BARILLET, S. et al. Toxicological consequences of TiO<sub>2</sub>, SiC nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes exposure in several mammalian cell types: an in vitro study. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 12, n. 1, p. 61–73, 8 jan. 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11051-009-9694-y>>. Acesso em: 22 maio. 2017.

BCC RESEARCH NANOTECHONOLOGY REPORT. **The Maturing Nanotechnology Market: Products and Applications**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<https://www.bccresearch.com/market-research/nanotechnology/nanotechnology-market-products-applications-report-nan031g.html>>. Acesso em: 16 fev. 2018.

BECKER, D. et al. Acute changes in temperature or oxygen availability induce ROS fluctuations in *Daphnia magna* linked with fluctuations of reduced and oxidized glutathione, catalase activity and gene (haemoglobin) expression. **Biology of the Cell**, v. 103, n. 8, p. 351–363, ago. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21592090>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

BEHZADI, S. et al. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. **Chem. Soc. Rev.**, v. 46, n. 14, p. 4218–4244, 2017. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6CS00636A>>.

BELYANSKAYA, L. et al. The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes–cell interaction. **Carbon**, v. 45, n. 13, p. 2643–2648, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008622307003867>>. Acesso em: 22 maio. 2017.

BENAVIDES, M. et al. Single and combined effects of aluminum (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) and zinc (ZnO) oxide nanoparticles in a freshwater fish, *Carassius auratus*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 24, p. 24578–24591, 27 out. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11356-016-7915-3>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

BERG, J. M. et al. The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to *in vitro* toxicological evaluations. **Nanotoxicology**, v. 3, n. 4, p. 276–283, 30 dez. 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/17435390903276941>>. Acesso em: 1 nov. 2017.

BERNHARDT, E. S. et al. An ecological perspective on nanomaterial impacts in the environment. **Journal of environmental quality**, v. 39, n. 6, p. 1954–65, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21284292>>. Acesso em: 23 maio. 2017.

BEUTLER, E.; DURON, O.; KELLY, B. M. Improved method for the determination of blood glutathione. **The Journal of laboratory and clinical medicine**, v. 61, p. 882–8, maio 1963. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13967893>>. Acesso em: 6 set. 2018.

BHUVANESHWARI, M. et al. Differential toxicity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles on Gram-positive and Gram-negative sediment bacterial isolates from freshwater. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 12, p. 12095–12106, 11 jun. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11356-016-6407-9>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **The World Allergy Organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, jan. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23268465>>. Acesso em: 29 out. 2018.

BÖHME, S. et al. Exploring LA-ICP-MS as a quantitative imaging technique to study nanoparticle uptake in *Daphnia magna* and zebrafish (*Danio rerio*) embryos. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 18, p. 5477–5485, 6 jul. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00216-015-8720-4>>. Acesso em: 4 jul. 2019.

BOLD, R. J.; TERMUHLEN, P. M.; MCCONKEY, D. J. Apoptosis, cancer and cancer therapy. **Surgical Oncology**, v. 6, n. 3, p. 133–142, 1997. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960740497000157?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 dez. 2019.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). **Journal of Tissue Culture Methods**, v. 9, n. 1, p. 7–9, mar. 1985. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF01666038>>. Acesso em: 19 out. 2017.

BORGERAAS, J.; HESSEN, D. O. Variations of antioxidant enzymes in *Daphnia* species and populations as related to ambient UV exposure. **Hydrobiologia**, v. 477, n. 1/3, p. 15–30, 2002. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1021056409446>>. Acesso em: 29 mar. 2019.

BOROWSKA, S.; BRZÓSKA, M. M. Metals in cosmetics: Implications for human health. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 6, p. 551–572, 2015. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/jat.3129>>.

BOUR, A. et al. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review. **Journal of Hazardous Materials**, v. 283, p. 764–777, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2014.10.021>>.

BOUZON, Z. L. Histoquímica e ultra-estrutura da ontogênese dos tetrasporângios de *Hypnea musciformis* (Wulfen) J. V. Lamour. (Gigartinales, Rhodophyta). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 2, p. 229–238, jun. 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-84042006000200004&lng=pt&nrm=iso&tling=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-84042006000200004&lng=pt&nrm=iso&tling=pt)>. Acesso em: 27 jun. 2017.

BOWEN, P.; CARRY, C. From powders to sintered pieces: forming, transformations and sintering of nanostructured ceramic oxides. **Powder Technology**, v. 128, n. 2–3, p. 248–255, dez. 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032591002001833>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

BOWNIK, A. *Daphnia* swimming behaviour as a biomarker in toxicity assessment: A review. **Science of The Total Environment**, v. 601–602, p. 194–205, 1 dez. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969717313062#bb0345>>. Acesso em: 26 mar. 2019.

BOXALL, A. et al. **Current and future predicted environmental exposure to engineered nanoparticles** York, UK, 15 mar. 2007. Disponível em: <[https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference\\_id/196111](https://hero.epa.gov/hero/index.cfm/reference/details/reference_id/196111)>. Acesso em: 20 jun. 2018.

BOYA, P.; KROEMER, G. Lysosomal membrane permeabilization in cell death. **Oncogene**, v. 27, n. 50, p. 6434–6451, 27 out. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18955971>>. Acesso em: 29 out. 2018.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 7 maio 1976. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269776905273?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

BRAYDICH-STOLLE, L. K. et al. Crystal structure mediates mode of cell death in TiO<sub>2</sub> nanotoxicity. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 6, p. 1361–1374, 12 ago. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11051-008-9523-8>>. Acesso em: 20 set. 2017.

BRIGGS, T.-M. D.; AMAEZE, N. H.; OBANYA, H. E. Comparative Assessment of Single and Joint Toxicity of Bulk and Nano Scale Heavy Metals (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO and SiO<sub>2</sub>) Using Haematological Parameters as Biomarker in Juvenile African Catfish (*Clarias gariepinus*). **Asian Journal of Fisheries and Aquatic Research**, v. 2, n. 3, p. 1–17, 2018. Disponível em: <<http://www.journalajfar.com/index.php/AJFAR/article/view/30013>>. Acesso em: 13 jul. 2019.

BROWN, D. M. et al. A cross-species and model comparison of the acute toxicity of nanoparticles used in the pigment and ink industries. **NanoImpact**, v. 11, p. 20–32, 1 jul. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2452074817301143?via%3Dihub#!>>. Acesso em: 6 jul. 2018.

BROWN, M. M.; ATTARDI, L. D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nature Reviews Cancer**, v. 5, n. 3, p. 231–237, mar. 2005. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrc1560>>. Acesso em: 26 dez. 2019.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309–319, fev. 1938. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01269a023>>. Acesso em: 18 jan. 2020.

BURKLEW, C. E. et al. Effects of Aluminum Oxide Nanoparticles on the Growth, Development, and microRNA Expression of Tobacco (*Nicotiana tabacum*). **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e34783, 11 maio 2012. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0034783>>. Acesso em: 16 mar. 2016.

CANLI, E. G.; CANLI, M. Nanoparticles (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO, TiO<sub>2</sub>) Decrease ATPase Activity in the Osmoregulatory Organs of Freshwater Fish (*Oreochromis niloticus*); Histopathological Investigations of Tissues by Transmission Electron Microscope. **EC Pharmacology and Toxicology**, v. 7, n. 9, p. 909–924, 2019.

CANLI, E. G.; DOGAN, A.; CANLI, M. Serum biomarker levels alter following nanoparticle (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO, TiO<sub>2</sub>) exposures in freshwater fish (*Oreochromis niloticus*). **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 62, p. 181–187, 1 set. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668918301649>>. Acesso em: 11 out. 2018.

CAO, G.; WANG, Y. **Nanostructures and nanomaterials: synthesis,**

**properties, and applications**. 2. ed. London: World Scientific, 2011.

CARREÑO, F. et al. Synthesis and characterization of superhydrophobic surfaces prepared from silica and alumina nanoparticles on a polyurethane polymer matrix. **Progress in Organic Coatings**, v. 135, p. 205–212, 1 out. 2019.

CASEY, J. R.; GRINSTEIN, S.; ORLOWSKI, J. Sensors and regulators of intracellular pH. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 11, n. 1, p. 50–61, 9 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrm2820>>. Acesso em: 31 out. 2018.

CHAKRABORTY, C. et al. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 65, 20 dez. 2016. Disponível em: <<http://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-016-0217-6>>. Acesso em: 6 jun. 2017.

CHALANSONNET, M. et al. Study of potential transfer of aluminum to the brain via the olfactory pathway. **Toxicology Letters**, v. 283, p. 77–85, 1 fev. 2018.

CHAN, T.-Y.; LIN, S.-T. Effects of Stearic Acid on the Injection Molding of Alumina. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 78, n. 10, p. 2746–2752, out. 1995. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1151-2916.1995.tb08050.x>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

CHEN, L. et al. Manufactured aluminum oxide nanoparticles decrease expression of tight junction proteins in brain vasculature. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 3, n. 4, p. 286–295, 2008.

CHEN, Y. et al. Surface interactions affect the toxicity of engineered metal oxide nanoparticles toward Paramecium. **Chemical Research in Toxicology**, 2012.

CHOI, J.-Y. et al. Population growth of the Cladoceran, *Daphnia magna*: a quantitative analysis of the effects of different algal food. **PloS one**, v. 9, n. 4, p. e95591, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24752042>>. Acesso em: 14 fev. 2019.

COLEMAN, J. G. et al. Assessing the fate and effects of nano aluminum oxide in the terrestrial earthworm, *Eisenia fetida*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 7, p. 1575–1580, 5 abr. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/etc.196>>. Acesso em: 12 abr. 2017.

COLL, C. et al. Probabilistic environmental risk assessment of five nanomaterials (nano-TiO<sub>2</sub>, nano-Ag, nano-ZnO, CNT, and fullerenes). **Nanotoxicology**, v. 10, n. 4, p. 436–444, 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/17435390.2015.1073812?journalCod>>

e=inan20>.

CUI, R.; KIM, S. W.; AN, Y.-J. Polystyrene nanoplastics inhibit reproduction and induce abnormal embryonic development in the freshwater crustacean *Daphnia galeata*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 12095, 21 dez. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-017-12299-2>>. Acesso em: 26 jul. 2018.

CULLITY, B. D.; STOCK, S. R. **Elements of X-Ray Diffraction**. 3rd. ed. New York, US: Prentice-Hall, 2001.

D., M.; P., K.; S. N., R. K. R. V. S. SYNTHESIS, CHARACTERIZATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ALUMINIUM OXIDE NANOPARTICLES. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 10, n. 1, p. 32, 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://innovareacademics.in/journals/index.php/ijpps/article/view/20636>>. Acesso em: 31 maio. 2019.

DALAI, S. et al. Toxic effect of Cr(VI) in presence of n-TiO<sub>2</sub> and n-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles towards freshwater microalgae. **Aquatic Toxicology**, v. 146, p. 28–37, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X13002993>>. Acesso em: 4 abr. 2017.

DALE, A. L. et al. Modeling Nanomaterial Environmental Fate in Aquatic Systems. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 5, p. 2587–2593, 3 mar. 2015. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/es505076w>>. Acesso em: 28 jun. 2018.

DAOUD ALI, D.; ALKAHTANI, S.; ALARIFI, S. Nanoalumina induces apoptosis by impairing antioxidant enzyme systems in human hepatocarcinoma cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, n. 1, p. 3751, 25 maio 2015. Disponível em: <<http://www.dovepress.com/nanoalumina-induces-apoptosis-by-impairing-antioxidant-enzyme-systems--peer-reviewed-article-IJN>>. Acesso em: 7 dez. 2017.

DE LUCA, L. T. et al. Burning of Nano-Aluminized Composite Rocket Propellants. **Combustion, Explosion and Shock Waves**, v. 41, n. 6, p. 680–692, nov. 2005. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10573-005-0080-5>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

DELORENZO, M. E. et al. Toxicity and bioconcentration potential of the agricultural pesticide endosulfan in phytoplankton and zooplankton. **Archives of environmental contamination and toxicology**, v. 42, n. 2, p. 173–81, fev. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11815808>>. Acesso em: 24 maio. 2017.

DEMIR, V. et al. Influence of Alpha and Gamma-Iron Oxide Nanoparticles on Marine Microalgae Species. **Bulletin of environmental contamination and**

**toxicology**, v. 95, n. 6, p. 752–7, dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26276558>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

DENNEKAMP, M. et al. Longitudinal analysis of respiratory outcomes among bauxite exposed workers in western Australia. **American Journal of Industrial Medicine**, v. 58, n. 8, p. 897–904, ago. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ajim.22492>>. Acesso em: 18 maio. 2017.

DHAND, C. et al. Methods and strategies for the synthesis of diverse nanoparticles and their applications: a comprehensive overview. **RSC Advances**, v. 5, n. 127, p. 105003–105037, 10 dez. 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5RA19388E>>. Acesso em: 30 maio. 2019.

DI VIRGILIO, A. L. et al. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. **Journal of Hazardous Materials**, v. 177, n. 1–3, p. 711–718, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389409020780?via%3Dihub>>.

DING, C. et al. Enhanced uptake of antibiotic resistance genes in the presence of nanoalumina. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 8, p. 1051–1060, 13 set. 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/17435390.2016.1161856>>. Acesso em: 8 ago. 2018.

DONOGHUE, A. M.; FRISCH, N.; OLNEY, D. Bauxite mining and alumina refining: process description and occupational health risks. **Journal of occupational and environmental medicine**, v. 56, n. 5 Suppl, p. S12-7, maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24806720>>. Acesso em: 18 maio. 2017.

DOREMUS, R. H. Alumina. In: **Ceramic and Glass Materials**. Boston, MA: Springer US, 2008. p. 1–26.

DOSKOCZ, N.; AFFEK, K.; ZAŁĘSKA-RADZIWIŁŁ, M. Effects of aluminium oxide nanoparticles on bacterial growth. In: Eko-Dok, **Anais...**2017. Disponível em: <[https://www.e3s-conferences.org/articles/e3sconf/pdf/2017/05/e3sconf\\_eko2017\\_00019.pdf](https://www.e3s-conferences.org/articles/e3sconf/pdf/2017/05/e3sconf_eko2017_00019.pdf)>. Acesso em: 25 maio. 2018.

DOUGLAS, K.; PICCIRILLO, C. A.; TABRIZIAN, M. Cell line-dependent internalization pathways and intracellular trafficking determine transfection efficiency of nanoparticle vectors. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 68, n. 3, p. 676–687, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17945472>>. Acesso em: 19 dez. 2017.



DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 421–31, 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2233309>>. Acesso em: 24 set. 2017.

DUAN, X. et al. Reinforcement mechanism and wear resistance of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Fe-Cr-Mo steel composite coating produced by laser cladding. **Surface and Coatings Technology**, v. 291, p. 230–238, 15 abr. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0257897216301049>>. Acesso em: 1 jun. 2018.

ECHA. **Guidance on information requirements and chemical safety assessment chapter R.10: Characterisation of dose [concentration]-response for environment**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<https://echa.europa.eu/guidance-documents/guidance-on-information-requirements-and-chemical-safety-assessment>>. Acesso em: 3 jul. 2019.

EISENBRAND, G. et al. Methods of in vitro toxicology. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 2–3, p. 193–236, 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691501001181?via%3Dihub>>.

EL-HUSSAINY, E.-H. M. A. et al. Effects of aluminum oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles on ECG, myocardial inflammatory cytokines, redox state, and connexin 43 and lipid profile in rats: possible cardioprotective effect of gallic acid. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 94, n. 8, p. 868–878, ago. 2016. Disponível em: <<http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/cjpp-2015-0446>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

EXBRAYAT, J.-M.; MOUDILOU, E. N.; LAPIED, E. Harmful Effects of Nanoparticles on Animals. **Journal of Nanotechnology**, v. 2015, p. 1–10, 2015. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jnt/2015/861092/>>. Acesso em: 2 jun. 2017.

EXLEY, C. A biogeochemical cycle for aluminium? **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 97, n. 1, p. 1–7, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0162013403002745>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

FANG, C. et al. Various nanoparticle morphologies and wettability properties of aluminum oxide films controlled by water content during the hydrothermal reaction. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 749, p. 180–188, 15 jun. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925838818311472>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

FEDERATION OF ALUMINUM CONSUMERS IN EUROPE. **Brazil ranks second as a net exporter of alumina**. Disponível em: <[http://www.facealuminium.com/ENG/other/news.asp?id\\_news=10895&FA=2](http://www.facealuminium.com/ENG/other/news.asp?id_news=10895&FA=2)>.

Acesso em: 22 mar. 2017.

FEREIDOON, S.; MORIYAMA, H.; BAGCHI, M. **Bio-nanotechnology : a revolution in food, biomedical, and health sciences**. 1. ed. Houston, USA: Wiley-Blackwell, 2013.

FERIN, J. et al. Increased pulmonary toxicity of ultrafine particles? I. Particle clearance, translocation, morphology. **Journal of Aerosol Science**, v. 21, n. 3, p. 381–384, jan. 1990. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0021850290900645>>. Acesso em: 5 abr. 2017.

FERREIRA, A. J.; CEMLYN-JONES, J.; ROBALO CORDEIRO, C. Nanoparticles, nanotechnology and pulmonary nanotoxicology. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, v. 19, n. 1, p. 28–37, 1 jan. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0873215912001316>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

FILIPPI-CHIELA, E. C. et al. Nuclear morphometric analysis (NMA): Screening of senescence, apoptosis and nuclear irregularities. **PLOS ONE**, v. 7, n. 8, 2012. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0042522>>.

FRACZEK-SZCZYPTA, A. et al. Effect of MWCNT surface and chemical modification on in vitro cellular response. **Journal of nanoparticle research : an interdisciplinary forum for nanoscale science and technology**, v. 14, n. 10, p. 1181, out. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23087595>>. Acesso em: 23 maio. 2017.

FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, dez. 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17406473>>. Acesso em: 9 fev. 2017.

FREY, A. et al. Immunization of mice with peptomers covalently coupled to aluminum oxide nanoparticles. **Vaccine**, v. 17, n. 23–24, p. 3007–3019, 6 ago. 1999. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X99001632>>. Acesso em: 8 jun. 2018.

FU, P. P. et al. Mechanisms of nanotoxicity: Generation of reactive oxygen species. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 64–75, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1021949814000064>>.

FUTURE MARKETS, I. **The global market for aluminium oxide nanoparticles**. Disponível em: <<http://www.nanotechmag.com/wp-content/uploads/2014/09/ALUMINIUM-OXIDE-NANOPARTICLES-2013-.pdf>>.

Acesso em: 14 maio. 2018.

GAISER, B. K. et al. Effects of silver and cerium dioxide micro- and nano-sized particles on *Daphnia magna*. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 5, p. 1227, 3 maio 2011. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c1em10060b>>. Acesso em: 9 maio. 2019.

GARCÍA-SAUCEDO, C. et al. Low toxicity of HfO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and CeO<sub>2</sub> nanoparticles to the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 192, n. 3, p. 1572–1579, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389411008569>>. Acesso em: 11 abr. 2017.

GATOO, M. A. et al. Physicochemical properties of nanomaterials: implication in associated toxic manifestations. **BioMed research international**, v. 2014, p. 498420, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25165707>>. Acesso em: 26 abr. 2017.

GHOSH, M. et al. Genotoxicity of engineered nanoparticles in higher plants. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, 11 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138357181830175X#sec0020>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

GHOSH, M.; CHAKRABORTY, A.; MUKHERJEE, A. Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 10, p. 1097–1110, out. 2013. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jat.2863>>. Acesso em: 18 dez. 2019.

GOJOVA, A. et al. Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. **Environmental health perspectives**, v. 115, n. 3, p. 403–9, mar. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17431490>>. Acesso em: 5 out. 2018.

GONÇALVES, R. A. et al. Comparative assessment of toxicity of ZnO and amine-functionalized ZnO nanorods toward *Daphnia magna* in acute and chronic multigenerational tests. **Aquatic Toxicology**, v. 197, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X18300912?via%3Dihub>>.

GOSTEVA, I. et al. Effect of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on aquatic organisms. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 98, n. 1, p. 012007, 6 nov. 2015. Disponível em: <<http://stacks.iop.org/1757-899X/98/i=1/a=012007?key=crossref.61e7bf7ac9a5aa3a313e88f5419396c9>>. Acesso em: 6 jul. 2018.

GOTTSCHALK, F. et al. Modeled Environmental Concentrations of

Engineered Nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions. **Environmental Science & Technology**, v. 43, n. 24, p. 9216–9222, 15 dez. 2009. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es9015553>>. Acesso em: 3 mar. 2018.

GOTTSCHALK, F.; NOWACK, B. The release of engineered nanomaterials to the environment. **Journal of Environmental Monitoring**, v. 13, n. 5, p. 1145, 3 maio 2011. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=c0em00547a>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

GOTTSCHALK, F.; SUN, T.; NOWACK, B. Environmental concentrations of engineered nanomaterials: Review of modeling and analytical studies. **Environmental Pollution**, v. 181, p. 287–300, 1 out. 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749113003205?via%3Dihub>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

GREENWOOD, N. N. (Norman N.); EARNSHAW, A. (Alan). **Chemistry of the elements**. [s.l.] Butterworth-Heinemann, 1997.

GUO, H. et al. Nano-enabled fertilizers to control the release and use efficiency of nutrients. **Current Opinion in Environmental Science & Health**, v. 6, n. 41, p. 77–83, dez. 2018. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201900249411>>. Acesso em: 22 ago. 2019.

GÜRKAN, M. Effects of three different nanoparticles on bioaccumulation, oxidative stress, osmoregulatory, and immune responses of *Carcinus aestuarii*. **Toxicological & Environmental Chemistry**, p. 1–24, mar. 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02772248.2019.1579818>>. Acesso em: 13 mar. 2019.

HANSEN, S. F.; MIKKELSEN, L.; JØRGENSEN, C. **The Nanodatabase**. Disponível em: <<http://nanodb.dk/en>>. Acesso em: 24 abr. 2018.

HARTUNG, T.; DASTON, G. Are In Vitro Tests Suitable for Regulatory Use? **Toxicological Sciences**, v. 111, n. 2, p. 233–237, out. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/toxsci/article-lookup/doi/10.1093/toxsci/kfp149>>. Acesso em: 15 jan. 2020.

HASHIMOTO, M.; SASAKI, J.-I.; IMAZATO, S. Investigation of the cytotoxicity of aluminum oxide nanoparticles and nanowires and their localization in L929 fibroblasts and RAW264 macrophages. **Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials**, v. 104, n. 2, p. 241–252, 1 fev. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jbm.b.33377>>. Acesso em: 8 ago. 2018.

HECKMANN, L.-H. et al. Limit-test toxicity screening of selected inorganic

nanoparticles to the earthworm *Eisenia fetida*. **Ecotoxicology**, v. 20, n. 1, p. 226–233, 1 jan. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10646-010-0574-0>>. Acesso em: 3 abr. 2017.

HEINLAAN, M. et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. **Chemosphere**, v. 71, n. 7, p. 1308–1316, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653507014919?via%3Dihub>>. Acesso em: 1 mar. 2017.

HERNÁNDEZ, T.; BAUTISTA, C.; MARTÍN, P. Synthesis and thermal evolution of Mn-doped alumina nanoparticles by homogeneous precipitation with urea. **Materials Chemistry and Physics**, v. 92, n. 2–3, p. 366–372, ago. 2005. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0254058405000696>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

HERZOG, E. et al. A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials-The clonogenic assay. **Toxicology Letters**, v. 174, n. 1–3, p. 49–60, 1 nov. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427407009216?via%3Dihub>>. Acesso em: 26 dez. 2019.

HIRANO, S.; KANNO, S.; FURUYAMA, A. Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 232, n. 2, p. 244–251, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X08002718>>. Acesso em: 23 maio. 2017.

HIRVIKORPI, T. et al. Atomic layer deposited aluminum oxide barrier coatings for packaging materials. **Thin Solid Films**, v. 518, n. 10, p. 2654–2658, 1 mar. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040609009013996>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

HOSSEINI, S. M. et al. Electrochemical characterization of mixed matrix heterogeneous cation exchange membrane modified by aluminum oxide nanoparticles: Mono/bivalent ionic transportation. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 4, p. 1241–1248, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1876107014000121>>. Acesso em: 14 jan. 2020.

HSIN, Y. H. et al. The apoptotic effect of nanosilver is mediated by a ROS- and JNK-dependent mechanism involving the mitochondrial pathway in NIH3T3 cells. **Toxicology Letters**, v. 179, n. 3, p. 130–139, 10 jul. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427408001252?via%3Dihub>>. Acesso em: 19 dez. 2019.

HU, J. et al. Quantifying the effect of nanoparticles on As(V) ecotoxicity exemplified by nano-Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (magnetic) and nano-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 12, p. 2870–2876, dez. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/etc.2013>>. Acesso em: 3 abr. 2017.

HULL, M. et al. Moving beyond Mass: The Unmet Need to Consider Dose Metrics in Environmental Nanotoxicology Studies. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 20, p. 10881–10882, 16 out. 2012. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/es3035285>>. Acesso em: 5 jun. 2019.

HWANG, G. et al. Adhesion of nano-sized particles to the surface of bacteria: Mechanistic study with the extended DLVO theory. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 97, p. 138–144, 1 set. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776512002433>>. Acesso em: 25 jan. 2018.

IANOȘ, R.; LAZĂU, I.; PĂCURARIU, C. The influence of combustion synthesis conditions on the  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> powder preparation. **Journal of Materials Science**, v. 44, n. 4, p. 1016–1023, 13 fev. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10853-008-3226-5>>. Acesso em: 21 fev. 2017.

ISO. **ISO 10706:2000 - Water quality - Determination of long term toxicity of substances to Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea)ISO/TC 147/SC5 - Water quality/Biological methods**. [s.l: s.n.].

ISO. **ISO/TR 11360:2010 - Nanotechnologies -- Methodology for the classification and categorization of nanomaterials**. 1. ed. [s.l: s.n.]

ISO. **ISO 6341:2012 - Water quality -- Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) - Acute toxicity test**. [s.l: s.n.].

ISO, I. O. F. S. **Water quality – Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Stratus (Cladocera, Crustacea) – Acute toxicity test: ISO 6341**. [s.l: s.n.]

IVASK, A. et al. Size-dependent toxicity of silver nanoparticles to bacteria, yeast, algae, crustaceans and mammalian cells in vitro. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, 2014. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0102108>>.

IVERSEN, T. G.; SKOTLAND, T.; SANDVIG, K. Endocytosis and intracellular transport of nanoparticles: Present knowledge and need for future studies. **Nano Today**, v. 6, n. 2, p. 176–185, abr. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1748013211000181>>. Acesso em: 26 dez. 2019.

JALAL, M. et al. Green synthesis and antifungal activity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs against fluconazole-resistant *Candida* spp isolated from a tertiary care hospital. **RSC Advances**, v. 6, n. 109, p. 107577–107590, 2016. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2016/ra/c6ra23365a#!divAbstract>>. Acesso em: 2 set. 2019.

JALILI, P. et al. In vitro and in vivo genotoxicity of nano aluminum, aluminum oxide and aluminum chloride: A comparative study. **Toxicology Letters**, v. 280, p. S119, 20 out. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427417305696?via%3Dihub#!>>. Acesso em: 28 jun. 2018.

JÄNICKE, R. U. et al. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 16, p. 9357–9360, 17 abr. 1998.

JENG, H. A.; SWANSON, J. Toxicity of metal oxide nanoparticles in mammalian cells. **J Environ Sci Health A Tox Hazard Subst Environ Eng**, v. 41, n. 12, p. 2699–2711, 2006. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17114101](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17114101)>.

JI, J.; LONG, Z.; LIN, D. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. **Chemical Engineering Journal**, v. 170, n. 2, p. 525–530, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1385894710011101>>. Acesso em: 11 abr. 2017.

JIANG, W.; MASHAYEKHI, H.; XING, B. Bacterial toxicity comparison between nano- and micro-scaled oxide particles. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 5, p. 1619–1625, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749108006957>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

JOGEE, P.; RAI, M. Application of nanoparticles in inhibition of mycotoxin-producing fungi. In: **Nanomycotoxicology**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 239–250.

JU-NAM, Y.; LEAD, J. R. Manufactured nanoparticles: An overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. **Science of The Total Environment**, v. 400, n. 1, p. 396–414, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969708006943>>. Acesso em: 23 maio. 2017.

JUHEL, G. et al. Alumina nanoparticles enhance growth of *Lemna minor*. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3, p. 328–336, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X11001883>>. Acesso em: 11 abr. 2017.

KANG, S. J. et al. Titanium dioxide nanoparticles trigger p53-mediated damage response in peripheral blood lymphocytes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 49, n. 5, p. 399–405, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18418868>>. Acesso em: 23 maio. 2017.

KARIMI, S. et al. Acute and chronic toxicity of metal oxide nanoparticles in chemical mechanical planarization slurries with *Daphnia magna*. **Environmental Science: Nano**, v. 5, n. 7, p. 1670–1684, 13 jul. 2018. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C7EN01079F>>. Acesso em: 8 ago. 2018.

KARMAKAR, A.; ZHANG, Q.; ZHANG, Y. Neurotoxicity of nanoscale materials. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 147–160, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2014.01.012>>.

KARUNAKARAN, G. et al. Toxicity evaluation based on particle size, contact angle and zeta potential of SiO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on the growth of green algae. **Advances in Nano Research**, v. 3, n. 4, p. 243, 2015. Disponível em: <<http://www.techno-press.org/content/?page=article&journal=anr&volume=3&num=4&ordernum=5>>. Acesso em: 25 jun. 2019.

KARWOWSKA, E. et al. Impact of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanopowders characterised by various physicochemical properties on growth of green alga *Scenedesmus quadricauda*. **Advances in Applied Ceramics**, v. 111, n. 3, p. 142–148, 22 abr. 2012. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1179/1743676111Y.0000000062>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

KEAR, B. H. et al. Plasma-sprayed nanostructured Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> powders and coatings. **Journal of Thermal Spray Technology**, v. 9, n. 4, p. 483–487, 2000. Disponível em: <[https://link.springer.com/article/10.1007%2F978-1-4020-0855-0\\_2](https://link.springer.com/article/10.1007%2F978-1-4020-0855-0_2)>. Acesso em: 14 jan. 2020.

KELLER, A. A.; LAZAREVA, A. Predicted Releases of Engineered Nanomaterials: From Global to Regional to Local. **Environmental Science and Technology Letters**, v. 1, n. 1, p. 65–70, 2013. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ez400106t>>.

KERMANI, Z. R. et al. Aluminium oxide nanoparticles induce structural changes in tau and cytotoxicity of the neuroblastoma cell line. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 120, p. 1140–1148, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018334536?via%3Dihub#bb0150>>. Acesso em: 22 set. 2018.

KESTON, A. S.; BRANDT, R. The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. **Analytical Biochemistry**, v. 11, n. 1, p. 1–5, 1965. Disponível em:



<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269765900345>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

KIM, I.-S.; BAEK, M.; CHOI, S.-J. Comparative cytotoxicity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CeO<sub>2</sub>, TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles to human lung cells. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 10, n. 5, p. 3453–8, maio 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20358977>>. Acesso em: 3 abr. 2017.

KIM, B. Il et al. Different shapes of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> particles induce differential cytotoxicity via a mechanism involving lysosomal destabilization and reactive oxygen species generation. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 58, n. 3, p. 433–442, 24 jun. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s13765-015-0038-6>>. Acesso em: 4 abr. 2017.

KIM, J. A. et al. Role of cell cycle on the cellular uptake and dilution of nanoparticles in a cell population. **Nature Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 62–68, 6 nov. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22056728>>. Acesso em: 19 dez. 2017.

KIM, Y. et al. Arsenic Removal Using Mesoporous Alumina Prepared via a Templating Method. **Environmental Science & Technology**, v. 38, n. 3, p. 924–931, fev. 2004. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es0346431>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

KLAINE, S. J. et al. NANOMATERIALS IN THE ENVIRONMENT: BEHAVIOR, FATE, BIOAVAILABILITY, AND EFFECTS. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 9, p. 1825, 2008. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1897/08-090.1>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

KOVRIŽNYCH, J. A. et al. Acute toxicity of 31 different nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) tested in adulthood and in early life stages – comparative study. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 6, n. 2, p. 67–73, 1 jan. 2013. Disponível em: <<http://www.degruyter.com/view/j/intox.2013.6.issue-2/intox-2013-0012/intox-2013-0012.xml>>. Acesso em: 3 abr. 2017.

KROLL, A. et al. Current in vitro methods in nanoparticle risk assessment: Limitations and challenges. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 72, n. 2, p. 370–377, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18775492>>. Acesso em: 22 maio. 2017.

KUMAR, R. et al. Green nanomaterials. In Nanomaterials in the Environment. In: American Society of Civil Engineers, **Anais...**2015. Disponível em: <<https://nebraska.pure.elsevier.com/en/publications/green-nanomaterials>>.

KWON, T. et al. Dermal Toxicity of Flake-Like  $\alpha$ -Alumina Pigments. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 2, p. 1636–1646, 2015. Disponível em: <<http://openurl.ingenta.com/content/xref?genre=article&issn=1533-4880&volume=15&issue=2&spage=1636>>.

LAH, N. A. C.; ZUBIR, M. N. M.; SAMYKANO, M. A. Engineered Nanomaterial in Electronics and Electrical Industries. In: **Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications**. Pahang, Malaysia: Elsevier, 2018. p. 324–364.

LAZAREVA, A.; KELLER, A. A. Estimating potential life cycle releases of engineered nanomaterials from wastewater treatment plants. **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, v. 2, n. 7, p. 1656–1665, 7 jul. 2014.

LEROUEIL, P. R. et al. Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers. **Nano Letters**, v. 8, n. 2, p. 420–424, fev. 2008. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nl0722929>>. Acesso em: 27 dez. 2019.

LEVIN, I.; BRANDON, D. Metastable Alumina Polymorphs: Crystal Structures and Transition Sequences. **Journal of the American Ceramic Society**, v. 81, n. 8, p. 1995–2012, 20 jan. 2005. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1151-2916.1998.tb02581.x>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

LI, H. et al. Alpha-alumina nanoparticles induce efficient autophagy-dependent cross-presentation and potent antitumour response. **Nature Nanotechnology**, v. 6, n. 10, p. 645–650, 18 out. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nnano.2011.153>>. Acesso em: 5 mar. 2018.

LI, M.; CZYMMEK, K. J.; HUANG, C. P. Responses of *Ceriodaphnia dubia* to TiO<sub>2</sub> and Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles: A dynamic nano-toxicity assessment of energy budget distribution. **Journal of Hazardous Materials**, v. 187, n. 1–3, p. 502–508, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.01.061>>.

LI, X. et al. Glia activation induced by peripheral administration of aluminum oxide nanoparticles in rat brains. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 5, n. 4, p. 473–479, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963409000513>>. Acesso em: 12 abr. 2017.

LI, X. et al. Integrative functional transcriptomic analyses implicate specific molecular pathways in pulmonary toxicity from exposure to aluminum oxide nanoparticles. **Nanotoxicology**, p. 1–13, 2016. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/17435390.2016.1149632>>.

LI, X. et al. Suppression of PTPN6 exacerbates aluminum oxide nanoparticle-induced COPD-like lesions in mice through activation of STAT pathway. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 14, n. 1, p. 53, 12 dez. 2017. Disponível em: <<https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12989-017-0234-0>>. Acesso em: 29 jan. 2018.

LI, X.; ZHOU, S.; FAN, W. Effect of Nano-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on the Toxicity and Oxidative Stress of Copper towards *Scenedesmus obliquus*. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 13, n. 6, p. 575, 9 jun. 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1660-4601/13/6/575>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

LI, Y. et al. Chronic Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-nanoparticle exposure causes neurotoxic effects on locomotion behaviors by inducing severe ROS production and disruption of ROS defense mechanisms in nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 219, p. 221–230, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389412003780>>. Acesso em: 4 abr. 2017.

LI, Y.; GU, N. Thermodynamics of charged nanoparticle adsorption on charge-neutral membranes: A simulation study. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 114, n. 8, p. 2749–2754, 4 mar. 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp904550b>>. Acesso em: 27 dez. 2019.

LIN, D.; XING, B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 2, p. 243–250, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749107000577>>. Acesso em: 11 abr. 2017.

LIU, X. et al. Interaction between Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and different sizes of GO in aqueous environment. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 1802–1809, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S026974911832685X?via%3Dihub>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

LIU, X. et al. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles promote secretion of antibiotics in *Streptomyces coelicolor* by regulating gene expression through the nano effect. **Chemosphere**, v. 226, p. 687–695, 1 jul. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653519306022?via%3Dihub#sec2>>. Acesso em: 5 jul. 2019.

LIU, Z. H. et al. Selective Laser Sintering of High-density Alumina Ceramic Parts. In: **Proceedings of the 35th International MATADOR Conference**. London: Springer London, 2007. p. 351–354.

LOJK, J. et al. Cell type-specific response to high intracellular loading of polyacrylic acid-coated magnetic nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 1449–1462, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4340463/>>.

LONG, T. C. et al. Nanosize Titanium Dioxide Stimulates Reactive Oxygen Species in Brain Microglia and Damages Neurons in Vitro. **Environmental Health**

**Perspectives**, v. 115, n. 11, p. 1631–1637, 3 ago. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18007996>>. Acesso em: 23 maio. 2017.

LU, H. et al. Synthesis of three crystalline forms of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> featuring rod-like fibers and their effect on the gaseous degradation of 1-chloronaphthalene. **Environ. Sci.: Nano**, v. 4, n. 5, p. 994–1004, 18 maio 2017. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6EN00662K>>. Acesso em: 23 out. 2017.

LU, S. et al. Efficacy of Simple Short-Term in Vitro Assays for Predicting the Potential of Metal Oxide Nanoparticles to Cause Pulmonary Inflammation. **Environmental Health Perspectives**, v. 117, n. 2, p. 241–247, fev. 2009. Disponível em: <<http://ehp.niehs.nih.gov/11811>>. Acesso em: 19 abr. 2017.

LUKIN, E. S.; TARASOVA, S. V.; KOROLEV, A. V. Application of Ceramics Based on Aluminum Oxide in Medicine (A Review). **Glass and Ceramics**, v. 58, n. 3/4, p. 105–107, 2001. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1023/A:1010999432041>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

M'RAD, I. et al. Aluminium oxide nanoparticles compromise spatial learning and memory performance in rats. **EXCLI journal**, v. 17, p. 200–210, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29743858>>. Acesso em: 28 jun. 2018.

MA, H.; WILLIAMS, P. L.; DIAMOND, S. A. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review. **Environmental Pollution**, v. 172, p. 76–85, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2012.08.011>>.

MAIORANO, G. et al. Effects of Cell Culture Media on the Dynamic Formation of Protein–Nanoparticle Complexes and Influence on the Cellular Response. **ACS Nano**, v. 4, n. 12, p. 7481–7491, 28 dez. 2010. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nn101557e>>. Acesso em: 31 out. 2017.

MANKE, A.; WANG, L.; ROJANASAKUL, Y. Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. **BioMed research international**, v. 2013, p. 942916, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24027766>>. Acesso em: 18 maio. 2017.

MARANO, F. et al. Nanoparticles: Molecular targets and cell signalling. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 7, p. 733–741, 2011. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00204-010-0546-4>>.

MARTINS, M. A.; TRINDADE, T. OS NANOMATERIAIS E A DESCOBERTA DE NOVOS MUNDOS NA BANCADA DO QUÍMICO. **Quim. Nova**, v. 35, n. 7, p. 1434–1446, 2012. Disponível em: <[http://quimicanova.sbgq.org.br/imagebank/pdf/Vol35No7\\_1434\\_25-RV11788.pdf](http://quimicanova.sbgq.org.br/imagebank/pdf/Vol35No7_1434_25-RV11788.pdf)>. Acesso em: 4 abr. 2018.

MCCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). **The Journal of biological chemistry**, v. 244, n. 22, p. 6049–55, 25 nov. 1969. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5389100>>. Acesso em: 13 ago. 2018.

MELEGARI, S. P. et al. Can the surface modification and/or morphology affect the ecotoxicity of zinc oxide nanomaterials? **Chemosphere**, v. 224, p. 237–246, 1 jun. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653519303157?via%3Dihub#sec3>>. Acesso em: 19 mar. 2019.

MELO JR., M. A. et al. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para a introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422012000900030&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000900030&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)>. Acesso em: 21 out. 2018.

METZLER, D. M. et al. Responses of Algal Cells to Engineered Nanoparticles Measured as Algal Cell Population, Chlorophyll a, and Lipid Peroxidation: Effect of Particle Size and Type. **Journal of Nanotechnology**, v. 2012, p. 1–12, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jnt/2012/237284/>>. Acesso em: 29 maio. 2017.

MIRSHAFI, A. et al. Size-Dependent Neurotoxicity of Aluminum Oxide Particles: a Comparison Between Nano- and Micrometer Size on the Basis of Mitochondrial Oxidative Damage. **Biological Trace Element Research**, v. 183, n. 2, p. 1–9, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs12011-017-1142-8>>.

MISHRA, R.; MILITKY, J. Nanoparticles and textile technology. In: **Nanotechnology in Textiles**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 181–217.

MØLLER, P. et al. Role of oxidative damage in toxicity of particulates. **Free Radical Research**, v. 44, n. 1, p. 1–46, 3 jan. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19886744>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

MORADI-SARDAREH, H. et al. Toxicity of silver nanoparticles on different tissues of Balb/C mice. **Life Sciences**, v. 211, p. 81–90, 15 out. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002432051830537X#s0095>>. Acesso em: 1 abr. 2019.

MORSY, G. M.; ABOU EL-ALA, K. S.; ALI, A. a. Studies on fate and toxicity of nanoalumina in male albino rats: lethality, bioaccumulation and genotoxicity. **Toxicology and industrial health**, v. 32, n. 2, p. 200–214, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24097360>>.

MORSY, G. M.; EL-ALA, K. S. A.; ALI, A. A. Studies on fate and toxicity of

nanoalumina in male albino rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, n. 2, p. 344–359, fev. 2016. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233713498449>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

MU, D. et al. Removing *Bacillus subtilis* from fermentation broth using alumina nanoparticles. **Bioresource Technology**, 2015.

MU, D. et al. Physiological and transcriptomic analyses reveal mechanistic insight into the adaption of marine *Bacillus subtilis* C01 to alumina nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 6, n. 29953, p. 10, 2016. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/srep29953>>. Acesso em: 17 jul. 2019.

MURALI, M. et al. Histological alterations in the hepatic tissues of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles exposed freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 44, p. 125–131, 1 dez. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0946672X17300147?via%3Dihub#sec0010>>. Acesso em: 26 jun. 2019.

MURALI, M. et al. Toxicological effect of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on histoarchitecture of the freshwater fish *Oreochromis mossambicus*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 59, p. 74–81, 1 abr. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668918300395#fig0005>>. Acesso em: 5 abr. 2018.

NAFISI, S.; MAIBACH, H. I. Nanotechnology in cosmetics. In: **Cosmetic Science and Technology: Theoretical Principles and Applications**. [s.l.] Elsevier Inc., 2017. p. 337–361.

NASROLLAHZADEH, M. et al. An Introduction to Nanotechnology. In: **Interface Science and Technology**. [s.l.] Elsevier B.V., 2019. 28p. 1–27.

NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE. **Nanotechnology 101: What It Is and How It Works | Nano**. Disponível em: <<http://www.nano.gov/nanotech-101/what>>. Acesso em: 9 mar. 2017.

NAVARRO, E. et al. Effects of Differently Coated Silver Nanoparticles on the Photosynthesis of *Chlamydomonas reinhardtii*. **Environmental Science and Technology**, v. 49, n. 13, p. 8041–8047, 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.est.5b01089>>.

NEL, A. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622–627, 3 fev. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1114397>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

NEWMAN, M. C. **Quantitative methods in aquatic ecotoxicology**. [s.l.] Lewis Publishers, 1995.

NEWMAN, M. C. et al. Applying species-sensitivity distributions in ecological risk assessment: Assumptions of distribution type and sufficient numbers of species. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 19, n. 2, p. 508–515, 2000. Disponível em: <<https://pubag.nal.usda.gov/catalog/1968521>>. Acesso em: 25 out. 2019.

NG, A. M. C. et al. Metal oxide nanoparticles with low toxicity. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 151, p. 17–24, 1 out. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1011134415002092?via%3Dihub#s0025>>. Acesso em: 20 mar. 2019.

NNAMDI, A. H. et al. Antagonistic effects of sublethal concentrations of certain mixtures of metal oxide nanoparticles and the bulk (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, CuO, and SiO<sub>2</sub>) on gill histology in clarias gariepinus. **Journal of Nanotechnology**, v. 2019, n. 7686597, p. 11, 2019. Disponível em: <<https://new.hindawi.com/journals/jnt/2019/7686597/>>. Acesso em: 2 set. 2019.

NOGUEIRA, D. J. et al. Comparison of cytotoxicity of  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles toward neuronal and bronchial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 61, p. 104596, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233319301225?via%3Dihub#s0110>>. Acesso em: 11 jul. 2019.

NOGUEIRA, F. G. E. et al. Alternative route for the synthesis of high surface-area  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>/Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> catalyst from aluminum waste. **Materials Chemistry and Physics**, v. 184, p. 23–30, 1 dez. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0254058416306320#bib32>>. Acesso em: 18 mar. 2019.

NOWACK, B. Evaluation of environmental exposure models for engineered nanomaterials in a regulatory context. **NanoImpact**, v. 8, n. March, p. 38–47, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.06.005>>.

NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. **Environmental Pollution**, v. 150, n. 1, p. 5–22, 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749107002734>>.

OBERDÖRSTER, G. et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. **Particle and fibre toxicology**, v. 2, n. 6–7, p. 8, 6 out. 2005. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16209704>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

OECD. **Test No. 202: Daphnia sp. Acute Immobilisation Test**. Paris:

OECD, 2004.

OESTERLING, E. et al. Alumina nanoparticles induce expression of endothelial cell adhesion molecules. **Toxicology Letters**, v. 178, n. 3, p. 160–166, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427408000799?via%3Dihub>>.

OMAR, I.; O'NEILL, T. M.; ROSSALL, S. Biological control of fusarium crown and root rot of tomato with antagonistic bacteria and integrated control when combined with the fungicide carbendazim. **Plant Pathology**, v. 55, n. 1, p. 92–99, fev. 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-3059.2005.01315.x>>. Acesso em: 8 jun. 2018.

OVENDEN, C.; XIAO, H. Flocculation behaviour and mechanisms of cationic inorganic microparticle/polymer systems. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 197, n. 1–3, p. 225–234, 4 fev. 2002. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927775701009037>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

PAKRASHI, S. et al. Cytotoxicity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> Nanoparticles at Low Exposure Levels to a Freshwater Bacterial Isolate. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, n. 11, p. 1899–1904, 21 nov. 2011. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/tx200244g>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

PAKRASHI, S. et al. Ceriodaphnia dubia as a Potential Bio-Indicator for Assessing Acute Aluminum Oxide Nanoparticle Toxicity in Fresh Water Environment. **PLoS ONE**, v. 8, n. 9, 2013. Disponível em: <<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0074003>>.

PAKRASHI, S. et al. Trophic transfer potential of aluminium oxide nanoparticles using representative primary producer (*Chlorella ellipsoides*) and a primary consumer (*Ceriodaphnia dubia*). **Aquatic Toxicology**, v. 152, p. 74–81, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X14001027>>. Acesso em: 11 abr. 2017.

PAN, X. et al. Mutagenicity evaluation of metal oxide nanoparticles by the bacterial reverse mutation assay. **Chemosphere**, v. 79, n. 1, p. 113–116, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653509014799>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

PARK, E.-J. et al. Biodistribution and toxicity of spherical aluminum oxide nanoparticles. **Journal of applied toxicology: JAT**, v. 2015, n. August 2015, p.



424–433, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26437923>>.

PAROLINI, M. et al. Benzoylecgonine exposure induced oxidative stress and altered swimming behavior and reproduction in *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, v. 232, p. 236–244, 1 jan. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749117338204#sec4>>. Acesso em: 9 maio. 2019.

PELTONEN, L. Practical guidelines for the characterization and quality control of pure drug nanoparticles and nano-cocrystals in the pharmaceutical industry. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 131, p. 101–115, 1 jun. 2018.

PEREIRA, J. L.; GONÇALVES, F. Effects of food availability on the acute and chronic toxicity of the insecticide methomyl to *Daphnia* spp. **Science of The Total Environment**, v. 386, n. 1–3, p. 9–20, 1 nov. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17727918>>. Acesso em: 22 mar. 2019.

PERIASAMY, V. S.; ATHINARAYANAN, J.; ALSHATWI, A. A. Aluminum oxide nanoparticles alter cell cycle progression through *CCND1* and *EGR1* gene expression in human mesenchymal stem cells. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 63, n. 3, p. 320–327, maio 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25779086>>. Acesso em: 16 jan. 2018.

PIKUDA, O. et al. Toxicity Assessments of Micro- and Nanoplastics Can Be Confounded by Preservatives in Commercial Formulations. **Environmental Science & Technology Letters**, v. 6, n. 1, p. 21–25, 8 jan. 2019. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.estlett.8b00614>>. Acesso em: 15 fev. 2019.

PLATONOV, O. I. et al. Analysis of the activity of an aluminum oxide Claus catalyst in commercial operation. **Russian Journal of Applied Chemistry**, v. 80, n. 12, p. 2031–2035, dez. 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1134/S1070427207120054>>. Acesso em: 16 mar. 2017.

PUCK, T. T.; MARCUS, P. I. Action of x-rays on mammalian cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 103, n. 5, p. 653–666, 1 maio 1956. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2136626/>>. Acesso em: 26 dez. 2019.

PUERARI, R. C. et al. Investigation of toxicological effects of amorphous silica nanostructures with amine-functionalized surfaces on Vero cells. **Chemosphere**, v. 214, p. 679–687, 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653518318319>>. Acesso em: 16 dez. 2019.

PUESCHEL, C. . **Biology of the red algae**. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1990.

RADAIC, A. et al. Como estudar interações entre nanopartículas e sistemas

biológicos. **Química Nova**, v. 39, n. 10, p. 1236–1244, 1 dez. 2016. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe\\_artigo.asp?id=6504](http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=6504)>. Acesso em: 27 dez. 2019.

RADZIUN, E. et al. Assessment of the cytotoxicity of aluminium oxide nanoparticles on selected mammalian cells. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 8, p. 1694–1700, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233311002128?via%3Dihub>>.

RAJ, S. et al. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. **Journal of pharmacy & bioallied sciences**, v. 4, n. 3, p. 186–93, jul. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22923959>>. Acesso em: 28 jun. 2018.

RAJENDRAN, V. et al. Influence of ZrO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on maize seed germination under different growth conditions. **IET Nanobiotechnology**, v. 10, n. 4, p. 171–177, 1 ago. 2016. Disponível em: <<http://digital-library.theiet.org/content/journals/10.1049/iet-nbt.2015.0007>>. Acesso em: 8 jun. 2017.

RAJESHWARI, A. et al. Cytotoxicity of aluminum oxide nanoparticles on Allium cepa root tip—effects of oxidative stress generation and biouptake. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 14, p. 11057–11066, 21 jul. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11356-015-4355-4>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

RANI, M.; SHANKER, U.; JASSAL, V. Recent strategies for removal and degradation of persistent & toxic organochlorine pesticides using nanoparticles: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 190, n. 1, p. 208–222, 1 abr. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479716310611>>. Acesso em: 22 ago. 2019.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887–913, 1 jul. 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670011000232>>. Acesso em: 11 out. 2018.

REN, W. et al. Size-dependent and shape-dependent algal toxicity of Aluminum oxide nanoparticles. In: Proceedings of the 2017 2nd International Conference on Materials Science, Machinery and Energy Engineering (MSMEE 2017), Paris, France. **Anais...** Paris, France: Atlantis Press, 2017. Disponível em: <<http://www.atlantis-press.com/php/paper-details.php?id=25877691>>. Acesso em: 29 jan. 2018.

REYNOLDS, E. S. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. **The Journal of cell biology**, v. 17, p. 208–12, abr. 1963. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13986422>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

REZAKAZEMI, M. et al. Aluminum Oxide Nanoparticles for Highly Efficient Asphaltene Separation from Crude Oil Using Ceramic Membrane Technology. **Oil & Gas Sciences and Technology – Revue d'IFP Energies nouvelles**, v. 72, n. 6, p. 34, 15 nov. 2017. Disponível em: <<http://ogst.ifpenergiesnouvelles.fr/10.2516/ogst/2017031>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

ROCO, M. C.; MIRKIN, C. A.; HERSAM, M. C. Nanotechnology research directions for societal needs in 2020: summary of international study. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 3, p. 897–919, 17 mar. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11051-011-0275-5>>. Acesso em: 17 maio. 2018.

SADHIK BASHA, J.; ANAND, R. B. Role of nanoadditive blended biodiesel emulsion fuel on the working characteristics of a diesel engine. **Journal of Renewable and Sustainable Energy**, v. 3, n. 2, p. 023106, 4 mar. 2011. Disponível em: <<http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.3575169>>. Acesso em: 8 jun. 2018.

SADIQ, I. M. et al. Antimicrobial sensitivity of Escherichia coli to alumina nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 5, n. 3, p. 282–286, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1549963409000082>>. Acesso em: 24 maio. 2017.

SADIQ, I. M. et al. Studies on toxicity of aluminum oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles to microalgae species: Scenedesmus sp. and Chlorella sp. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 13, n. 8, p. 3287–3299, 4 ago. 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11051-011-0243-0>>. Acesso em: 30 mar. 2017.

SADIQ, R. et al. In vitro toxicological assessment of iron oxide, aluminium oxide and copper nanoparticles in prokaryotic and eukaryotic cell types. **Drug and chemical toxicology**, v. 0545, n. December, p. 1–10, 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24896217>>.

SALEH, T. A.; GUPTA, V. K. Synthesis and characterization of alumina nano-particles polyamide membrane with enhanced flux rejection performance. **Separation and Purification Technology**, v. 89, p. 245–251, 22 mar. 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383586612000664>>. Acesso em: 14 jan. 2020.

SANTAMARIA, A. Nanotoxicity. In: J., R. (Ed.). **Historical Overview of Nanotechnology and Nanotoxicology**. [s.l.] Humana Press, Totowa, NJ, 2012. p.

1–12.

SAYES, C. M. The relationships among structure, activity, and toxicity of engineered nanoparticles. **KONA Powder and Particle Journal**, v. 31, n. 1, p. 10–21, 2014.

SCHIRMER, K.; BEHRA, R. Ecotoxicological Aspects of Nanomaterials in the Aquatic Environment. In: LUTHER, W.; ZWECK, A. (Ed.). **Safety Aspects of Engineered Nanomaterials**. [s.l.] Pan Stanford, 2013. 1p. 978–981.

SETIAWAN, H. et al. Synthesis of zeolite and  $\gamma$ -alumina nanoparticles as ceramic membranes for desalination applications. **Journal of the Australian Ceramic Society**, v. 53, n. 2, p. 531–538, 17 out. 2017. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s41779-017-0064-4>>. Acesso em: 5 mar. 2018.

SHADE, A. et al. Fundamentals of microbial community resistance and resilience. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 417, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23267351>>. Acesso em: 24 maio. 2017.

SHAH, S. A. et al. Nanoscale-alumina induces oxidative stress and accelerates amyloid beta ( $A\beta$ ) production in ICR female mice. **Nanoscale**, v. 7, n. 37, p. 15225–15237, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5NR03598H>>. Acesso em: 12 abr. 2017.

SHAJI, A.; ZACHARIAH, A. K. Surface Area Analysis of Nanomaterials. In: **Thermal and Rheological Measurement Techniques for Nanomaterials Characterization**. [s.l.] Elsevier, 2017. p. 197–231.

SHENASHEN, M. et al. Antifungal activity of fabricated mesoporous alumina nanoparticles against root rot disease of tomato caused by *Fusarium oxysporium*. **Pest Management Science**, v. 73, n. 6, p. 1121–1126, 1 jun. 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ps.4420>>. Acesso em: 5 mar. 2018.

SHIRAZI, A. et al. Toxic Effect of Aluminum Oxide Nanoparticles on Green Micro-Algae *dunaliella salina*. **Int. J. Environ. Res**, v. 9, n. 2, p. 585–594, 2015. Disponível em: <[https://ijer.ut.ac.ir/article\\_933\\_98c4f4e09daf835f91cd518d3a10eb04.pdf](https://ijer.ut.ac.ir/article_933_98c4f4e09daf835f91cd518d3a10eb04.pdf)>. Acesso em: 25 maio. 2018.

SIEG, H. et al. Uptake and molecular impact of aluminum-containing nanomaterials on human intestinal caco-2 cells. **Nanotoxicology**, p. 1–22, 14 out. 2018. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17435390.2018.1504999>>. Acesso em: 31 out. 2018.

SIKORA, P. et al. Antimicrobial Activity of  $Al_2O_3$ ,  $CuO$ ,  $Fe_3O_4$ , and  $ZnO$

Nanoparticles in Scope of Their Further Application in Cement-Based Building Materials. **Nanomaterials**, v. 8, n. 4, p. 212, 31 mar. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2079-4991/8/4/212>>. Acesso em: 7 ago. 2018.

SILVA, S. A. da. **Síntese química calcinação por microondas de pós nanoestruturados de alumina**. 2010. Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos, 2010.

SIMON-DECKERS, A. et al. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. **Toxicology**, v. 253, p. 137–146, 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X08004332?via%3Dihub>>.

SIQUEIRA, B. G. et al. Propriedades mecânicas e resistência à chama de composições SBR/negro de fumo/hidróxido de alumínio. **Polímeros**, v. 11, n. 2, p. 89–93, jun. 2001.

SMITA, S. et al. Nanoparticles in the environment: assessment using the causal diagram approach. **Environmental Health**, v. 11, n. Suppl 1, p. S13, 2012. Disponível em: <<http://ehjournal.biomedcentral.com/articles/10.1186/1476-069X-11-S1-S13>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

SNIS. **Diagnóstico AE 2016 - SNIS - Sistema Nacional de Informações Sobre Saneamento**. Disponível em: <<http://www.snis.gov.br/diagnostico-agua-e-esgotos/diagnostico-ae-2016>>. Acesso em: 19 jun. 2018.

SOUSA, C. A.; SOARES, H. M. V. M.; SOARES, E. V. Metal(loid) oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, Mn<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, SiO<sub>2</sub> and SnO<sub>2</sub>) nanoparticles cause cytotoxicity in yeast via intracellular generation of reactive oxygen species. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2019a. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00253-019-09903-y>>. Acesso em: 18 jul. 2019.

SOUSA, C. A.; SOARES, H. M. V. M.; SOARES, E. V. Chronic exposure of the freshwater alga *Pseudokirchneriella subcapitata* to five oxide nanoparticles: Hazard assessment and cytotoxicity mechanisms. **Aquatic Toxicology**, v. 214, p. 105265, set. 2019b. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X19303169>>. Acesso em: 31 out. 2019.

SOUZA, T. A. J. et al. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles of different sizes in CHO-K1 and CHO-XRS5 cell lines. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 795, p. 70–83, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1383571815002703?via%3Dihub>>.

SPURR, A. R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of ultrastructure research**, v. 26, n. 1, p. 31–43, jan. 1969. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4887011>>. Acesso em: 27 jun. 2017.

SRIKANTH, K. et al. Modulation of glutathione and its dependent enzymes in gill cells of *Anguilla anguilla* exposed to silica coated iron oxide nanoparticles with or without mercury co-exposure under in vitro condition. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 162, p. 7–14, maio 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24607655>>. Acesso em: 23 maio. 2017.

SRIKANTH, K. et al. Aluminium oxide nanoparticles induced morphological changes, cytotoxicity and oxidative stress in Chinook salmon (CHSE-214) cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 10, p. 1133–1140, out. 2015. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jat.3142>>. Acesso em: 19 abr. 2017.

SRIVASTAVA, V.; GUSAIN, D.; SHARMA, Y. C. Critical Review on the Toxicity of Some Widely Used Engineered Nanoparticles. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 24, p. 6209–6233, 24 jun. 2015. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.iecr.5b01610>>. Acesso em: 4 abr. 2017.

STADLER, T.; BUTELER, M.; WEAVER, D. K. Novel use of nanostructured alumina as an insecticide. **Pest Management Science**, v. 66, n. 6, p. n/a-n/a, 1 jun. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/ps.1915>>. Acesso em: 5 mar. 2018.

STANDER, L.; THEODORE, L. Environmental implications of nanotechnology--an update. **International journal of environmental research and public health**, v. 8, n. 2, p. 470–9, fev. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21556197>>. Acesso em: 23 maio. 2017.

STANLEY, J. K. et al. Sediment toxicity and bioaccumulation of nano and micron-sized aluminum oxide. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 2, p. 422–429, fev. 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/etc.52>>. Acesso em: 3 abr. 2017.

STANLEY, J. K. et al. Sublethal effects of multiwalled carbon nanotube exposure in the invertebrate *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 1, p. 200–204, 1 jan. 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/etc.3184>>. Acesso em: 9 maio. 2019.

STATNANO. **Nanotechnology published patent applications in USPTO ( Patent )**. Disponível em: <<http://statnano.com/report/s99>>. Acesso em: 1 jun. 2018.

STERN, S. T.; ADISESHIAH, P. P.; CRIST, R. M. Autophagy and

lysosomal dysfunction as emerging mechanisms of nanomaterial toxicity. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 9, n. 20, p. 10, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3441384/>>.

STRULLER, C. F.; KELLY, P. J.; COPELAND, N. J. Aluminum oxide barrier coatings on polymer films for food packaging applications. **Surface and Coatings Technology**, v. 241, p. 130–137, 25 fev. 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0257897213007755>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

SUBRAMANIAN, V. et al. Sustainable nanotechnology decision support system: bridging risk management, sustainable innovation and risk governance. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 18, n. 4, p. 89, 30 abr. 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11051-016-3375-4>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

SUN, T. Y. et al. Dynamic Probabilistic Modeling of Environmental Emissions of Engineered Nanomaterials. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 9, p. 4701–4711, 3 maio 2016. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.5b05828>>. Acesso em: 3 mar. 2018.

SURIYAPRABHA, R. et al. Effect of contact angle, zeta potential and particles size on the in vitro studies of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and SiO<sub>2</sub> nanoparticles. **IET Nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 27–34, 1 fev. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25650323>>. Acesso em: 30 maio. 2017.

SUZUKI, S. et al. Modeling the fate and end-of-life phase of engineered nanomaterials in the Japanese construction sector. **Waste Management**, v. 72, p. 389–398, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.wasman.2017.11.037>>.

SVARTZ, G. et al. Monitoring the ecotoxicity of  $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and Ni/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanomaterials by means of a battery of bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, n. December 2016, p. 200–207, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.029>>.

TAUROZZI, J. S.; HACKLEY, V. A.; WIESNER, M. R. Ultrasonic dispersion of nanoparticles for environmental, health and safety assessment – issues and recommendations. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 4, p. 711–729, 2 dez. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21073401>>. Acesso em: 8 nov. 2018.

TAYLOR, S. R. Abundance of chemical elements in the continental crust: a new table. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 28, n. 8, p. 1273–1285, ago. 1964. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0016703764901292>>. Acesso em: 1 fev. 2017.

TEMUJIN, J. et al. Thermal formation of corundum from aluminium hydroxides prepared from various aluminium salts. **Bulletin of Materials Science**, v. 23, n. 4, p. 301–304, ago. 2000. Disponível em:

<<http://link.springer.com/10.1007/BF02720086>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

THIPE, V. C. et al. Green nanotechnology. In: **Nanomycotoxicology**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 155–188.

TIAN, X. et al. Comparison of the Abilities of Ambient and Manufactured Nanoparticles To Induce Cellular Toxicity According to an Oxidative Stress Paradigm. 2006. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl061025k>>. Acesso em: 7 dez. 2017.

TONIOLO, J. .; LIMA, M. .; TAKIMI, A. S. Synthesis of alumina powders by the glycine–nitrate combustion process. **Materials Research Bulletin**, v. 40, n. 3, p. 561–571, 8 mar. 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025540804002454>>. Acesso em: 26 out. 2017.

TRAINOR, T. P. et al. Crystal truncation rod diffraction study of the  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (102) surface. **Surface Science**, v. 496, n. 3, p. 238–250, jan. 2002. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003960280101617X>>. Acesso em: 23 mar. 2017.

TYAGI, H. et al. Increased Hot-Plate Ignition Probability for Nanoparticle-Laden Diesel Fuel. **Nano Letters**, v. 8, n. 5, p. 1410–1416, maio 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18429638>>. Acesso em: 8 jun. 2018.

UBOLDI, C. et al. Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts. **Toxicology in Vitro**, v. 31, p. 137–145, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2015.11.005>>.

VAMANU, C. I. et al. Induction of cell death by TiO<sub>2</sub> nanoparticles: Studies on a human monoblastoid cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 7, p. 1689–1696, out. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233308001781?via%3Dihub>>. Acesso em: 24 dez. 2019.

VICENTINI, D. S. et al. Toxicological evaluation and quantification of ingested metal-core nanoplastic by *Daphnia magna* through fluorescence and ICP-MS methods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 24 jun. 2019a. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/etc.4528>>. Acesso em: 29 jun. 2019.

VICENTINI, D. S. et al. Toxicological Evaluation and Quantification of Ingested Metal-Core Nanoplastic by *Daphnia magna* Through Fluorescence and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Methods. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 38, n. 10, p. 2101–2110, 6 out. 2019b. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/etc.4528>>.



VILLENA DE FRANCISCO, E.; GARCÍA-ESTEPA, R. M. Nanotechnology in the agrofood industry. **Journal of Food Engineering**, v. 238, p. 1–11, 1 dez. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877418302279>>. Acesso em: 22 ago. 2019.

VOISIN, C. et al. Mineralogical analysis of the respiratory tract in aluminium oxide-exposed workers. **The European respiratory journal**, v. 9, n. 9, p. 1874–9, set. 1996. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8880105>>. Acesso em: 18 maio. 2017.

WAGNER, A. J. et al. Cellular Interaction of Different Forms of Aluminum Nanoparticles in Rat Alveolar Macrophages. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 111, n. 25, p. 7353–7359, jun. 2007. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/jp068938n>>. Acesso em: 13 jan. 2020.

WAGNER, S. et al. Spot the Difference: Engineered and Natural Nanoparticles in the Environment-Release, Behavior, and Fate. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 46, p. n/a-n/a, 27 out. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201405050>>. Acesso em: 28 jun. 2018.

WANG, H.; WICK, R. L.; XING, B. Toxicity of nanoparticulate and bulk ZnO, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and TiO<sub>2</sub> to the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 4, p. 1171–1177, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749108005903>>. Acesso em: 3 abr. 2017.

WANG, L.; HU, C.; SHAO, L. The antimicrobial activity of nanoparticles: present situation and prospects for the future. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 1227–1249, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28243086>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

WANG, Y.; NOWACK, B. Environmental risk assessment of engineered nano-SiO<sub>2</sub>, nano iron oxides, nano-CeO<sub>2</sub>, nano-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and quantum dots. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1387–1395, 2018a. Disponível em: <<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/etc.4080>>.

WANG, Y.; NOWACK, B. Dynamic probabilistic material flow analysis of nano-SiO<sub>2</sub>, nano iron oxides, nano-CeO<sub>2</sub>, nano-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, and quantum dots in seven European regions. **Environmental Pollution**, v. 235, p. 589–601, 2018b. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.01.004>>.

WEI, Z. et al. Effect of particle size on *in vitro* cytotoxicity of titania and alumina nanoparticles. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 9, n. 6, p. 625–638, 4 jul. 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/17458080.2012.683534>>. Acesso em: 29 maio. 2017.

WELLS, M. A. et al. Serum proteins prevent aggregation of Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and ZnO nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 6, p. 837–46, dez. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22149273>>. Acesso em: 31 out. 2017.

WIGGER, H.; NOWACK, B. Material-specific properties applied to an environmental risk assessment of engineered nanomaterials – implications on grouping and read-across concepts. **Nanotoxicology**, v. 13, n. 5, p. 1–21, fev. 2019. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17435390.2019.1568604>>. Acesso em: 3 jul. 2019.

WILEY, B. et al. Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver. **Chemistry - A European Journal**, v. 11, n. 2, p. 454–463, 2005. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/chem.200400927>>.

WU, S. et al. Aluminum nanoparticle exposure in L1 larvae results in more severe lethality toxicity than in L4 larvae or young adults by strengthening the formation of stress response and intestinal lipofuscin accumulation in nematodes. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 31, n. 1, p. 179–188, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668910001778>>. Acesso em: 4 abr. 2017.

XIE, F. et al. Assessment of the toxicity of mixtures of copper, 9,10-phenanthrenequinone, and phenanthrene to *Daphnia magna*: evidence for a reactive oxygen mechanism. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 25, n. 2, p. 613, 2006. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1897/05-256R.1>>. Acesso em: 20 abr. 2017.

XIE, H. et al. Thermal conductivity enhancement of suspensions containing nanosized alumina particles. **Journal of Applied Physics**, v. 91, n. 7, p. 4568–4572, 28 abr. 2002. Disponível em: <<http://aip.scitation.org/doi/10.1063/1.1454184>>. Acesso em: 1 jun. 2018.

XUE, C. et al. Nano titanium dioxide induces the generation of ROS and potential damage in HaCaT cells under UVA irradiation. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 10, n. 12, p. 8500–7, dez. 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21121359>>. Acesso em: 20 set. 2017.

YANG, L.; WATTS, D. J. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. **Toxicology Letters**, v. 158, n. 2, p. 122–132, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427405000871>>. Acesso em: 11 abr. 2017.

YANG, S.-T. et al. Bioavailability and preliminary toxicity evaluations of

alumina nanoparticles in vivo after oral exposure. **Toxicology Research**, v. 1, n. 1, p. 69, 2012. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/Content/ArticleLanding/TX/2012/C2TX20008B#!divAbstract>>

YANIK, F.; AYTÜRK, Ö.; VARDAR, F. Programmed cell death evidence in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots induced by aluminum oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles. **Caryologia**, v. 70, n. 2, p. 112–119, 3 abr. 2017. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00087114.2017.1286126>>. Acesso em: 7 dez. 2019.

YANIK, F.; VARDAR, F. Toxic Effects of Aluminum Oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) Nanoparticles on Root Growth and Development in *Triticum aestivum*. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 226, n. 9, p. 296, 13 set. 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11270-015-2566-4>>. Acesso em: 19 abr. 2017.

YANIK, F.; VARDAR, F. Oxidative stress response to aluminum oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles in *Triticum aestivum*. **Biologia**, v. 73, n. 2, p. 129–135, 7 fev. 2018. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.2478/s11756-018-0016-7>>. Acesso em: 25 maio. 2018.

YE, N. et al. Dissolved organic matter and aluminum oxide nanoparticles synergistically cause cellular responses in freshwater microalgae. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 53, n. 7, p. 651–658, 7 jun. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29469604>>. Acesso em: 11 jun. 2018.

YOUSEF, M. I.; MUTAR, T. F.; KAMEL, M. A. E. N. Hepato-renal toxicity of oral sub-chronic exposure to aluminum oxide and/or zinc oxide nanoparticles in rats. **Toxicology Reports**, v. 6, p. 336–346, 1 jan. 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6482313/>>. Acesso em: 22 ago. 2019.

YU, S. et al. Close association of intestinal autofluorescence with the formation of severe oxidative damage in intestine of nematodes chronically exposed to Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-nanoparticle. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 2, p. 233–241, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1382668911000950>>. Acesso em: 4 abr. 2017.

YU, X. et al. Vitamin E ameliorates neurodegeneration related phenotypes caused by neurotoxicity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-nanoparticles in *C. elegans*. **Toxicology Research**, v. 4, n. 5, p. 1269–1281, 18 ago. 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5TX00029G>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

ZHANG, Q. et al. Alumina at 50 and 13 nm nanoparticle sizes have potential genotoxicity. **Journal of Applied Toxicology**, v. 37, n. 9, p. 1053–1064, 1 set. 2017.

Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/jat.3456>>. Acesso em: 12 fev. 2018.

ZHANG, Q. L. et al. In vivo toxicity of nano-alumina on mice neurobehavioral profiles and the potential mechanisms. **International journal of immunopathology and pharmacology**, v. 24, n. 1 Suppl, p. 23S-29S, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21329562>>. Acesso em: 12 abr. 2017.

ZHANG, T. et al. Comparison of cytotoxic and inflammatory responses of pristine and functionalized multi-walled carbon nanotubes in RAW 264.7 mouse macrophages. **Journal of Hazardous Materials**, v. 219–220, p. 203–212, 15 jun. 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22534157>>. Acesso em: 23 maio. 2017.

ZHANG, X. et al. Sex-Dependent Depression-Like Behavior Induced by Respiratory Administration of Aluminum Oxide Nanoparticles. **International journal of environmental research and public health**, v. 12, n. 12, p. 15692–705, 9 dez. 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26690197>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

ZHONG, M.; ZHUANG, G. Construction and Immunological Evaluation of Immunostimulatory Nanocomposites with Vaccine Potential. **Journal of Infectious Diseases and Therapy**, v. 05, n. 05, p. 1–4, 23 out. 2017. Disponível em: <<https://www.omicsonline.org/open-access/construction-and-immunological-evaluation-of-immunostimulatory-nanocomposites-with-vaccine-potential-2332-0877-1000339-94581.html>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

ZHU, M. et al. Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 622–631, 19 mar. 2013. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ar300031y>>. Acesso em: 27 dez. 2019.

ZHU, X. et al. Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 43, n. 3, p. 278–284, 22 jan. 2008. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10934520701792779>>. Acesso em: 3 abr. 2017.

ZHU, X. et al. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 1, p. 67–75, 10 jan. 2009. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11051-008-9426-8>>. Acesso em: 1 mar. 2017.

## CAPÍTULO VII

## APÊNDICES

A1 Dados de toxicidade aquática para NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>Quadro A1 - Dados de toxicidade aquática para NP Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

Grupos taxonômicos	Espécies	Endpoint	Efeitos	Exposição	Tempo	Fase cristalina	Tamanho (nm)	Toxicidade (mg/L)	Sensibilidade (mg/L)	AF - sem efeito	AF - tempo time	Referencia
Algas	<i>Chlorella ellipsoids</i>	CEO	Bioacumulação	Estático	48 h	Gama	50	20	400	2	10	(PAKRASHI et al., 2014)
	<i>Chlorella pyenoidosa</i>	CE50	Inibição de crescimento	Estático	48 h	Gama	8	64,57	6457	10	10	(REN et al., 2017)
	<i>Chlorella pyenoidosa</i>	CE50	Inibição de crescimento	Estático	48 h	Gama	200	95,5	9550	10	10	
	<i>Chlorella pyenoidosa</i>	CE50	Inibição de crescimento	Estático	48 h	Gama	300	147,91	14791	10	10	
	<i>Chlorella sp</i>	CE50	Inibição de crescimento	Estático	72 h	Gama	50	45,4	4540	10	10	(SADIQ et al., 2011)
	<i>Chlorella sp</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	240 h	Gama	50	1000	1000	10	1	(JI; LONG; LIN, 2011)
	<i>Dunaliella salina</i>	CE10	Inibição de crescimento	Estático	1680 h	Gama	20	1,66	3.32	2	1	(SHIRAZI et al., 2015)
	<i>Porphyridium aeruginosum Geitler</i>	CE50	Inibição de crescimento	Estático	360 h	Gama	50	100	1000	10	1	(KARUNAKARAN et al., 2015)

Grupos taxonômicos	Espécies	Endpoint	Efeitos	Exposição	Tempo	Fase cristalina	Tamanho (nm)	Toxicidade (mg/L)	Sensibilidade (mg/L)	AF - sem efeito	AF - tempo time	Referencia
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CE20	Inibição de crescimento	Estático	240 h	Gama	16	5,1	10.2	2	1	(METZLER et al., 2012)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CE50	Inibição de crescimento	Estático	72 h	Gama	30.8	95	308	10	1	(ARUOJA et al., 2015)
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	CE50	Inibição de crescimento	Estático	72 h	Gama	50	9,4	94	10	1	(SOUSA; SOARES; SOARES, 2019b)
	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	72 h	Gama	40	10000	100000	1	10	(BROWN et al., 2018)
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	72 h	Gama	20	10	100	1	10	(LI; ZHOU; FAN, 2016)
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	CENO	Estresse oxidativo	Estático	72 h	Gama	50	10	100	1	10	(DALAI et al., 2014)
	<i>Scenedesmus obliquus</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	96 h	Alfa	40	40	400	1	10	(YE et al., 2018)
	<i>Scenedesmus quadricauda</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	1260 h	Gama	-	1000	2000	2	1	(KARWOWSKA et al., 2012)
	<i>Scenedesmus sp</i>	CE50	Inibição de crescimento	Estático	72 h	Gama	50	39,35	3935	10	10	(SADIQ et al., 2011)
	<i>Skeletonema costatum</i>	CE50	Inibição de crescimento	Estático	72 h	Alfa	40	2101	210100	10	10	(NG et al., 2015)
	<i>Chlorella vulgaris</i>	CE50	Inibição de crescimento	Estático	-	Alfa	70	30,8	3080	10	10	(GOSTEVA et al., 2015)

Grupos taxonômicos	Espécies	Endpoint	Efeitos	Exposição	Tempo	Fase cristalina	Tamanho (nm)	Toxicidade (mg/L)	Sensibilidade (mg/L)	AF - sem efeito	AF - tempo time	Referencia
	<i>Chlorella vulgaris</i>	CE50	Inibição de crescimento	Estático	-	Gama	7	15,15	1515	10	10	(GOSTEVA et al., 2015)
<b>Anfíbios</b>	<i>Rhinella arenarum</i>	CEO	Sobrevivência	Estático	504 h	Gama	25	10,52	21,04	2	1	(SVARTZ et al., 2017)
<b>Bactérias</b>	<i>Bacillus altitudinis</i>	CE50	Inibição de crescimento	Estático	4 h	Gama	13	1200	120000	10	10	(BHUVANESHWARI et al., 2016)
	<i>Bacillus licheniformis</i>	CEO	Inibição de crescimento	Estático	2 h	Alfa	20	0,5	10	2	10	(PAKRASHI et al., 2011)
	<i>Bacillus subtilis</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Alfa	40	250	2500	1	10	(SADIQ et al., 2014)
	<i>Bacillus subtilis</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Alfa	40	1000	10000	1	10	(MU et al., 2015)
	<i>Bacillus subtilis</i>	CENO	Estresse oxidativo	Estático	24 h	Alfa	40	101,96	1019,5	1	10	(MU et al., 2016)
	<i>Bacillus subtilis</i>	CEO	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Gama	60	20	400	2	10	(JIANG; MASHAYEKHI; XING, 2009)
	<i>Candida albicans</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Gama	50	100	1000	1	10	(SIKORA et al., 2018)
	<i>Ekolyum</i>	CENO	Luminescência	Estático	-	Gama	7	100	1000	1	10	(GOSTEVA et al., 2015)
	<i>Ekolyum</i>	CENO	Luminescência	Estático	-	Alfa	70	100	1000	1	10	(GOSTEVA et al., 2015)
	<i>Escherichia coli</i>	CIM	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Teta	35	4	80	2	10	(D.; P.; S. N., 2018)
	<i>Escherichia coli</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Gama	180	100	1000	1	10	(SADIQ et al., 2009)
	<i>Escherichia coli</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Gama	60	20	200	1	10	(JIANG; MASHAYEKHI; XING, 2009)
<i>Escherichia coli</i>	CENO	Mutagenicidade	Estático	72 h	Gama	50	10	10	1	1	(PAN et al., 2010)	

Grupos taxonômicos	Espécies	Endpoint	Efeitos	Exposição	Tempo	Fase cristalina	Tamanho (nm)	Toxicidade (mg/L)	Sensibilidade (mg/L)	AF - sem efeito	AF - tempo time	Referencia
	<i>Escherichia coli</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	16 h	Alfa	40	250	2500	1	10	(SADIQ et al., 2014)
	<i>Escherichia coli</i>	CIM	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Gama	50	1600	32000	2	10	(ANSARI et al., 2014)
	<i>Escherichia coli</i>	CIM	Inibição de crescimento	Estático	22 h	Gama	50	100	1000	1	10	(SIKORA et al., 2018)
	<i>Escherichia coli</i>	CE50	Inibição de crescimento	Estático	72 h	Gama	30	101,96	101,6	1	10	(DING et al., 2016)
	<i>Escherichia coli</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Alfa	40	100	10000	10	10	(NG et al., 2015)
	<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	CL50	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Alfa	23	10	200	2	10	(PAKRASHI et al., 2011)
	<i>Proteus vulgaris</i>	CIM	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Teta	35	8	160	2	10	(D.; P.; S. N., 2018)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CE50	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Gama	13	400	40000	10	10	(BHUVANESHWARI et al., 2016)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CIM	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Alfa	50	1600	32000	2	10	(ANSARI et al., 2015)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CEO	Inibição de crescimento	Estático	16 h	Gama	50	100	1000	1	10	(SIKORA et al., 2018)
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	10 h	Gama	60	20	400	2	10	(JIANG; MASHAYEKHI; XING, 2009)
	<i>Pseudomonas putida</i>	CL50	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Gama	50	0.5	50	10	10	(DOSKOCZ; AFFEK; ZAŁĘSKA-RADZIWIŁŁ, 2017)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CEO	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Alfa	23	1000	20000	2	10	(PAKRASHI et al., 2011)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CEO	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Alfa	40	1000	20000	2	10	(SADIQ et al., 2014)
	<i>Salmonella</i>	CENO	Inibição de	Estático	12 h	Gama	50	0,5	5	1	10	(ZHANG et al.,



Grupos taxonômicos	Espécies	Endpoint	Efeitos	Exposição	Tempo	Fase cristalina	Tamanho (nm)	Toxicidade (mg/L)	Sensibilidade (mg/L)	AF - sem efeito	AF - tempo time	Referencia
	<i>typhimurium</i>		crescimento									2017)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CENO	Mutagenicidade	Estático	72 h	Gama	50	10	10	1	1	(PAN et al., 2010)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	12 h	Gama	50	0,5	5	1	10	(ZHANG et al., 2017)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	48 h	Gama	40	2,5	25	1	10	(BALASUBRAMAN YAM et al., 2010)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	48 h	Gama	50	2,5	25	1	10	(BALASUBRAMAN YAM et al., 2010)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	12 h	Gama	50	0,5	5	1	10	(ZHANG et al., 2017)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	48 h	Gama	40	2,5	50	2	10	(BALASUBRAMAN YAM et al., 2010)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CEO	Mutagenicidade	Estático	72 h	Gama	50	25	5	2	1	(PAN et al., 2010)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CEO	Inibição de crescimento	Estático	48 h	Gama	40	2,5	25	1	10	(BALASUBRAMAN YAM et al., 2010)
	<i>Salmonella typhimurium</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	12 h	Gama	50	0,5	5	1	10	(ZHANG et al., 2017)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	CIM	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Gama	50	1700	34000	2	10	(ANSARI et al., 2013)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	CIM	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Teta	35	4	80	2	10	(D.; P.; S. N., 2018)
	<i>Staphylococcus aureus</i>	CEO	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Gama	50	100	200	2	1	(SIKORA et al., 2018)
	<i>Streptococcus mutans</i>	CIM	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Teta	35	6	120	2	10	(D.; P.; S. N., 2018)
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	48 h	Alfa	30	50	500	1	10	(LIU et al., 2019)
	<i>Streptomyces coelicolor</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	48 h	Alfa	80	5	50	1	10	
	<i>Vibrio cholera</i>	CEO	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Alfa	23	10	200	2	10	(PAKRASHI et al., 2011)

Grupos taxonômicos	Espécies	Endpoint	Efeitos	Exposição	Tempo	Fase cristalina	Tamanho (nm)	Toxicidade (mg/L)	Sensibilidade (mg/L)	AF - sem efeito	AF - tempo time	Referencia
	<i>Vibrio fischeri</i>	CE50	Luminescência	Estático	30 min	Gama	25	29,9	2990	10	10	(SVARTZ et al., 2017)
	<i>Vibrio fischeri</i>	CENO	Luminescência	Estático	30 min	Gama	95	100	1000	1	10	(ARUOJA et al., 2015)
Protozoários	<i>Paramecium caudatum</i>	CENO	Luminescência	Estático	4 h	Gama	7	100	1000	1	10	(GOSTEVA et al., 2015)
	<i>Paramecium multimicronucleatum</i>	CL50	Sobrevivência	Estático	48 h	Alfa	83,5	9269,2	926920	10	10	(CHEN et al., 2012)
	<i>Paramecium caudatum</i>	CE50	Luminescência	Estático	24 h	Alfa	70	1,22	122	10	10	(GOSTEVA et al., 2015)
	<i>Tetrahymena thermophila</i>	CENO	Sobrevivência	Estático	24 h	Gama	95	100	1000	1	10	(ARUOJA et al., 2015)
Crustáceos	<i>Artemia salina</i>	CL50	Sobrevivência	Estático	24 h	Alfa	50	100	10000	0	0	(ATES et al., 2015)
	<i>Artemia salina</i>	CL50	Sobrevivência	Estático	24 h	Gama	5	100	10000	0	0	
	<i>Carcinus aestuarii</i>	CEO	Morfologia	Estático	840 h	Alfa	40	1	20		0	(GÜRKAN, 2019)
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CENO	Sobrevivência	Estático	48 h	Gama	5	50	500		0	(HU et al., 2012)
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CL50	Sobrevivência	Estático	48 h	Gama	17	45	4500	0	0	(LI; CZYMMEK; HUANG, 2011)
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CL50	Sobrevivência	Estático	72 h	Delta	50	74,3	74,300	1000*		(PAKRASHI et al., 2013)
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	CENO	Reprodução	Estático	48 h	Gama	50	80	800	1	0	(PAKRASHI et al., 2014)
	<i>Daphnia magna</i>	CE50	Imobilização	Estático	48 h	Alfa	80	114,3	11430	10	0	(ZHU et al., 2009)
	<i>Daphnia magna</i>	CEO	Crescimento	Estático	1260 h	Gama	80	0,75	15	2	10	(KARIMI et al., 2018)
	<i>Daphnia magna</i>	CEO	Bioacumulação	Estático	48 h	Gama	127	10	20	2	1	(BÖHME et al.,

Grupos taxonômicos	Espécies	Endpoint	Efeitos	Exposição	Tempo	Fase cristalina	Tamanho (nm)	Toxicidade (mg/L)	Sensibilidade (mg/L)	AF - sem efeito	AF - tempo time	Referencia
												2015)
	<i>Daphnia magna</i>	CENO	Imobilização	Estático	48 h	Gama	7	100	1000	1	0	(GOSTEVA et al., 2015)
	<i>Daphnia magna</i>	CENO	Imobilização	Estático	48 h	Alfa	70	100	1000	1	0	(GOSTEVA et al., 2015)
	<i>Daphnia magna</i>	CENO	Sobrevivência	Estático	48 h	Alfa	50	1195	119500	10	0	Esse estudo
	<i>Daphnia magna</i>	CE50	Sobrevivência	Estático	504 h	Eta	35	3,12	312	100*		Esse estudo
	<i>Daphnia magna</i>	CENO	Sobrevivência	Estático	1680 h	Gama	13	39	119500	10	0	(VICENTINI et al., 2019a)
	<i>Daphnia magna</i>	CENO	Imobilização	Estático	48 h	Alfa	40	50	500	1	0	(BROWN et al., 2018)
	<i>Hyalella azteca</i>	CL50	Crescimento	Estático	600 h	Gama	11	100	1000	10	1	(STANLEY et al., 2010)
<b>Equinodermos</b>	<i>Lytechinus variegatus</i>	CENO	Sobrevivência	Estático	96 h	Alfa	40	100	1000	1	10	(BROWN et al., 2018)
<b>Fungos</b>	<i>Candida albicans</i>	CIM	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Alfa	58	283,3	5666	2	10	(JALAL et al., 2016)
	<i>Candida glabrata</i>	CIM	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Alfa	58	566,6	11332	2	10	
	<i>Candida parapsilosis</i>	CIM	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Alfa	58	566,6	11332	2	10	
	<i>Candida tropicalis</i>	CIM	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Alfa	58	566,6	11332	2	10	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CEO	Inibição de crescimento	Estático	10 h	Gama	50	1000	1000	1	10	(GARCIA-SAUCEDO et al., 2011)
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CENO	Inibição de crescimento	Estático	24 h	Gama	50	100	20000	2	10	(SOUSA; SOARES; SOARES, 2019a)
<b>Peixes</b>	<i>Carassius auratus</i>	CENO	Estresse oxidativo	Estático	420 h	Gama	20	100	1000	1	10	(BENAVIDES et al., 2016)

Grupos taxonômicos	Espécies	Endpoint	Efeitos	Exposição	Tempo	Fase cristalina	Tamanho (nm)	Toxicidade (mg/L)	Sensibilidade (mg/L)	AF - sem efeito	AF - tempo time	Referencia
	<i>Clarias gariepinus</i>	CENO	Histopatologia	Estático	96	Gama	40	100	10000	10	10	(NNAMDI et al., 2019)
	<i>Clarias gariepinus</i>	CENO	Parâmetros hematológicos	Estático	1680 h	Gama	-	100	1000	10	10	(BRIGGS; AMAEZE; OBANYA, 2018)
	<i>Danio rerio</i>	CENO	Sobrevivência	Estático	96 h	Alfa	80	1000	2000	2	10	(ZHU et al., 2008)
	<i>Danio rerio</i>	CEO	Sobrevivência	Estático	48 h	Gama	127	100	2000	2	10	(BÖHME et al., 2015)
	<i>Danio rerio</i>	CENO	Sobrevivência	Estático	96 h	Gama	50	800	8000	1	10	(KOVRIŽNYCH et al., 2013)
	<i>Oreochromis mossambicus</i>	CL50	Sobrevivência	Estático	96 h	Alfa	40	240	24000	10	10	(MURALI et al., 2017)
	<i>Oreochromis mossambicus</i>	CEO	Morfologia	Estático	96 h	Alfa	40	120	2400	2	10	(MURALI et al., 2018)
	<i>Oreochromis niloticus</i>	CEO	Metabolismo	Estático	840 h	Gama	40	5	10	2	1	(CANLI; CANLI, 2019)
	<i>Oreochromis niloticus</i>	CENO	Metabolismo	Estático	840 h	Gama	50	5	50	1	10	(CANLI; DOGAN; CANLI, 2018)
<b>Moluscos</b>	<i>Corbicula fluminea</i>	CEO	Bioacumulação	Estático	1680 h	Gama	11	100	200	2	1	(STANLEY et al., 2010)
<b>Plantas</b>	<i>Lemna minor</i>	CENO	Inibição do crescimento	Estático	420 h	Gama	-	30	300	1	10	(JUHEL et al., 2011)

\*Para as NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e NP  $\delta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> foram encontrados apenas um *endpoint*, por esse motivo um FA padrão de 100 foi aplicado para converter a CENO para as NP  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> e um FA padrão de 1000 foi aplicado para converter a CL50 para as NP  $\delta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, conforme descrito anteriormente na literatura (ECHA, 2008)

## A2 Artigo publicado referente à tese 1

Toxicology in Vitro 61 (2019) 104596



Contents lists available at ScienceDirect

Toxicology in Vitro

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/toxinvit](http://www.elsevier.com/locate/toxinvit)

## Comparison of cytotoxicity of $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles toward neuronal and bronchial cells



Diego J. Nogueira<sup>a</sup>, Miriam Arl<sup>a</sup>, Jéssica S. Köerich<sup>a</sup>, Carmen Simioni<sup>b</sup>, Luciane C. Ouriques<sup>b</sup>, Denice S. Vicentini<sup>a</sup>, William G. Matias<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88040-970, Brazil

<sup>b</sup> Laboratory of Plant Cell Biology, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC 88049-900, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Aluminum oxide  
Alpha phase  
Eta phase  
Nanoparticles  
Cytotoxicity  
Crystalline structure

## ABSTRACT

The role of the crystalline structure on the toxicity of two phases of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs, alpha ( $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs) and eta ( $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs), was investigated in this study. Different techniques were employed for the characterization of the Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs and multiple toxicological endpoints were used to assess the toxicity toward mouse neuroblastoma (N2A) and human bronchial epithelial (BEAS-2B) cells. Based on the results of the multiple toxicological endpoints, revealed differences in the toxic potential results for  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs and  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs, with the latter showing a more pronounced effect. These effects could be due to the high uptake of the  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs in the cytoplasmic vesicles, as evidenced by TEM and ICP-MS. Hence, the results demonstrate the potential toxicity of both  $\alpha$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs and  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs, although the N2A and BEAS-2B cells showed greater susceptibility toward  $\eta$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs. Thus, our study demonstrates the important role of the crystalline structure in relation to the nanotoxicity of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs.

## 1. Introduction

The number of commercially-available products containing nanoparticles (NPs) worldwide exceeds 1800 (Vance et al., 2015). Among the NPs available on the market are metal oxides, including titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>), iron oxide (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>, Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), copper oxide (CuO), zinc oxide (ZnO) and aluminum oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) (Balasubramanyam et al., 2009a; Janrao et al., 2014; Miralles et al., 2012). Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs can have different crystalline structures:  $\alpha$  (alpha),  $\beta$  (beta),  $\gamma$  (gamma),  $\delta$  (delta),  $\eta$  (eta),  $\theta$  (teta),  $\kappa$  (kappa) and  $\chi$  (chi), which can influence their physicochemical properties. For this reason they are widely used in different areas of engineering and in consumer products (Doremus, 2008; Federation of Aluminum Consumers in Europe, 2017).

The high production volume suggests an increased likelihood of human and environmental exposure to Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs from fugitive emissions, accidental spills, and disposal of materials after use. When in contact with the human body, these nanoparticles can easily cross the various biological barriers and may reach the most sensitive organs (Wang and Nowack, 2018). Several *in vivo* studies have shown that Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs, after inhalation and through oral exposure, are distributed to the brain as well as to the lungs and gastrointestinal tract, causing

pronounced effects (El-Hussainy et al., 2016; Li et al., 2017; Morsy et al., 2016). In addition, *in vitro* studies have shown that Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs can induce inflammation, genotoxicity, cytotoxicity, and cell death (Balasubramanyam et al., 2009b; Di Virgilio et al., 2010; Li et al., 2009; Prabhakar et al., 2012).

The physicochemical properties that are important with regard to understanding the toxic effects of NPs include particle size, agglomeration/aggregation state, particle shape, crystalline structure, chemical composition, dissolution, surface chemistry, surface area, surface charge and porosity. Aspects of these properties have been discussed in several reviews of nanotoxicology, for example, the particle size, surface area and degree of aggregation of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs have been shown in some cases to affect toxicity *in vitro*, mainly due to aggregation in the culture medium (Bour et al., 2015; Ma et al., 2013; Nemmar et al., 2013; Tsaousi et al., 2010; Vinardell et al., 2015; Yoon et al., 2011). With respect to uptake, mechanisms causing dissolution of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs in different medium is of high importance. For example, most endocytic pathways include lysosomes, after cellular uptake and lysosomal entrapment could causing dissolution of the NPs in response to the low pH of lysosomes, performing a play the crucial role in toxicity (Borm et al., 2006; Casey et al., 2010; Fröhlich, 2012; Kim et al., 2015). The

\* Corresponding author at: Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Mailbox 476, CEP 88.010-970 Florianópolis, SC, Brazil.

E-mail address: [william.g.matias@ufsc.br](mailto:william.g.matias@ufsc.br) (W.G. Matias).

<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2019.104596>

Received 12 February 2019; Received in revised form 10 June 2019; Accepted 5 July 2019

Available online 08 July 2019

0887-2333/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

## A3 Artigo publicado referente à tese 2

Environmental Research 182 (2020) 108987



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Research

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/envres](http://www.elsevier.com/locate/envres)

## Crystalline phase-dependent toxicity of aluminum oxide nanoparticles toward *Daphnia magna* and ecological risk assessment



Diego José Nogueira<sup>a</sup>, Vitor Pereira Vaz<sup>a</sup>, Oswaldo Savoldi Neto<sup>a</sup>, Marlon Luiz Neves da Silva<sup>a</sup>, Carmen Simioni<sup>b</sup>, Luciane Cristina Ouriques<sup>b</sup>, Denice Shulz Vicentini<sup>a</sup>, William Gerson Matias<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88040-970, Brazil

<sup>b</sup>Laboratory of Plant Cell Biology, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, SC, 88049-900, Brazil

## ARTICLE INFO

## Keywords:

Aluminum oxide  
Nanoparticles  
Toxicity  
Crystalline phase  
Risk assessment

## ABSTRACT

Aluminum oxide nanoparticles (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs) can be found in different crystalline phases, and with the emergence of nanotechnology there has been a rapid increase in the demand for Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs in different engineering areas and for consumer products. However, a careful evaluation of the potential environmental and human health risks is required to assess the implications of the release of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs into the environment. Thus, the objective of this study was to investigate the toxicity of two crystalline phases of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs, alpha (α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs) and eta (η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs), toward *Daphnia magna* and evaluate the risk to the aquatic ecology of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs with different crystalline phases, based on a probabilistic approach. Different techniques were used for the characterization of the Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs. The toxicity toward *Daphnia magna* was assessed based on multiple toxicological endpoints, and the probabilistic species sensitivity distribution (PSSD) was used to estimate the risk of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs to the aquatic ecology. The results obtained verify the toxic potential of the NPs toward *D. magna* even in sublethal concentrations, with a more pronounced effect being observed for η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs. The toxicity is associated with an increase in the reactive oxygen species (ROS) content and deregulation of antioxidant enzymatic/non-enzymatic enzymes (CAT, SOD and GSH). In addition, changes in MDA levels were observed, indicating that *D. magna* was under oxidative stress. The most prominent chronic toxic effects were observed in the organisms exposed to η-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs, since the lowest LOEC was 3.12 mg/L for all parameters, while for α-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs the lowest LOEC was 6.25 mg/L for longevity, growth and reproduction. However, the risk assessment results indicate that, based on a probabilistic approach, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs (alpha, gamma, delta, eta and theta) only a very limited risk to organisms in surface waters.

## 1. Introduction

The global demand for products based on nanotechnology has been increasing continuously due to their differentiated properties, which result mainly from the small particle size and large surface area (Schirmer and Behra, 2013). Among the different forms of materials produced at the nanoscale are nanoparticles (NPs), seen as one of the main facilitators for a whole new generation of industrialized products, such as cosmetics, clothing, electronics, pigments, pharmaceuticals, pesticides and fertilizers (Vilchez et al., 2015). Metal NPs can be obtained through physical (bottom-up) or chemical (top-down) methods; however, most NPs are obtained by chemical methods (Cao and Wang, 2011). In addition, NPs can be produced from polymers (polystyrene)

(Rao and Geckeler, 2011), metals (Ag and Au) (Melo et al., 2012) or metal oxides (Subramanian et al., 2016).

Notable NPs produced from metal oxides are those obtained from aluminum oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), which present different crystalline phases: α (alpha), β (beta), γ (gamma), δ (delta), η (eta), θ (theta), κ (kappa) and χ (chi). Initially, the research and application of Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs were focused only on abrasives and resistant coatings in the automotive and metallurgy industry, but in recent decades research has been carried out in several areas seeking new applications for Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs, including personal care products, fire retardants, antifungal agents, insecticides and catalysts (Federation of Aluminum Consumers in Europe, 2017). Analysis of the consumer market for Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs indicates a growth in production, with 42,000 tonnes Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> NPs produced in 2010 and

\* Corresponding author. Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Mailbox 476, CEP 88.010-970, Florianópolis, SC, Brazil.

E-mail address: [william.g.matias@ufsc.br](mailto:william.g.matias@ufsc.br) (W.G. Matias).

<https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108987>

Received 26 September 2019; Received in revised form 29 November 2019; Accepted 29 November 2019

Available online 02 December 2019

0013-9351 / © 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

## A4 Artigos publicados em coautoria

*Environmental Toxicology and Chemistry*—Volume 38, Number 10—pp. 2101–2110, 2019  
 Received: 3 May 2019 | Revised: 2 June 2019 | Accepted: 19 June 2019

2101

## Environmental Chemistry

## Toxicological Evaluation and Quantification of Ingested Metal-Core Nanoplastic by *Daphnia magna* Through Fluorescence and Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometric Methods

Denice Schulz Vicentini,<sup>a</sup> Diego José Nogueira,<sup>a</sup> Sílvia Pedrosa Melegari,<sup>b</sup> Miriam Arl,<sup>a</sup> Jéssica Schweitzer Köerich,<sup>a</sup> Luiza Cruz,<sup>a</sup> Naiara Mottim Justino,<sup>a</sup> Bianca Vicente Oscar,<sup>a</sup> Rodrigo Costa Puerari,<sup>a</sup> Marlon Luiz Neves da Silva,<sup>a</sup> Carmen Simioni,<sup>c</sup> Luciane Cristina Ouriques,<sup>c</sup> Marcelo Seleme Matias,<sup>d</sup> Armando Borges de Castilhos Junior,<sup>d</sup> and William Gerson Matias<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Environmental Toxicology, Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

<sup>b</sup>Center for Marine Studies, Federal University of Paraná, Pontal do Paraná, Paraná, Brazil

<sup>c</sup>Laboratory of Plant Cell Biology, Department of Cell Biology, Embryology and Genetics, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

<sup>d</sup>Solid Waste Research Laboratory, Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Santa Catarina, Brazil

**Abstract:** There are few studies on nanoplastic that propose quantification of the amount ingested combined with evaluation of the toxic effects on aquatic organisms. We propose 2 methods to quantify the amount of polystyrene nanoplastic (PSNP) ingested by *Daphnia magna*: fluorescence intensity, where a fluorescent monomer (F) is added to the PSNP and quantified through fluorescence light microscopy, and total aluminum quantification, where PSNP is synthesized with Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> metal-core nanoparticles and used for quantification of the nanoplastic ingested by the organism *Daphnia magna* using inductively coupled plasma-mass spectrometry. In addition, the PSNP was functionalized with palmitic acid to simulate the environmental conditions leading to biological and chemical transformations. Acute and chronic toxicity tests were performed with fluorescent PSNP (PSNP/F) and palmitic acid-functionalized PSNP/F (PSNP/F-PA). The ingestion quantified was higher by factors of 2.8 and 3.0 for PSNP/F-PA and 1.9 and 1.7 for PSNP/F applying the fluorescence intensity and total Al quantifying methods, respectively, when compared to PSNP. These results are consistent with the data obtained in the toxicity tests, which showed an approximately 3 times increase in the adverse effect of PSNP/F-PA on the mobility and reproduction of the organisms. Thus, the strong inhibition of *D. magna* reproduction caused by PSNP/F-PA in the chronic toxicity tests could be associated with a greater amount of this nanoplastic being ingested by the organisms. *Environ Toxicol Chem* 2019;38:2101–2110. © 2019 SETAC

**Keywords:** Nanoplastic; Polystyrene; Palmitic acid; Ingestion quantification; *Daphnia magna*; Toxicity

### INTRODUCTION

The impact of plastic pollutants is recognized as a threat to ecosystems and to the sustainability of life on earth. Most plastics are composed of synthetic polymers, additives, and other chemicals (polymerization catalysts, initiators, and accelerators) used during the plastic production process (da Costa et al. 2016; Wan et al. 2018). Plastics are widely used in transportation, packaging, construction, and the medical and

health-care industries because of their ease of manufacture, low cost, and unique properties (durability, light weight, transparency, low toxicity, and resistance to water, impact, corrosion, chemicals, and temperature; da Costa et al. 2016; Wan et al. 2018).

However, concerns have been raised about the ecotoxicology not only of the macroform of plastic but also the plastic debris products in the form of micro- and nanometric scale particles (Martins and Guilhermino 2018; Mattsson et al. 2018). There are divergences regarding the definition of particle size applied to classify microplastics and nanoplastics (Alimi et al. 2018; Hartmann et al. 2019). However, a broad classification defines particles <5 mm as microplastics and <1 μm as nanoplastics (da Costa et al. 2016; Rist et al. 2017; Alimi et al. 2018;

This article contains online-only Supplemental Data.  
 \* Address correspondence to william.g.matias@ufsc.br  
 Published online 24 June 2019 in Wiley Online Library  
 (wileyonlinelibrary.com).  
 DOI: 10.1002/etc.4528



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Hazardous Materials

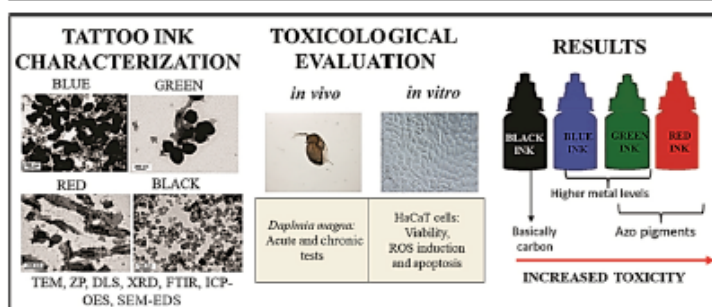
journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jhazmat](http://www.elsevier.com/locate/jhazmat)Tattoo inks: Characterization and *in vivo* and *in vitro* toxicological evaluation

Miriam Ari, Diego José Nogueira, Jéssica Schweitzer Köerich, Naiara Mottim Justino, Denice Schulz Vicentini, William Gerson Matias\*

Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina State, Florianópolis, Brazil



## GRAPHICAL ABSTRACT



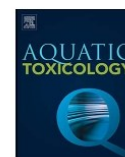
## ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Tattoo ink  
Nanoparticles  
Characterization  
Toxicology  
HaCaT cells  
*Daphnia magna*

## ABSTRACT

Tattoo inks represent a growing market in the world economy, but this growth is associated with an increase in reports of adverse effects caused by the use of this product. In this study, four commercial tattoo inks (blue, green, red and black) were studied to characterize the composition and particle size and identify possible *in vivo* and *in vitro* toxicological effects on *Daphnia magna* and HaCaT cells, respectively. Compositional analysis confirmed the functional groups in the vehicles and organic pigments. The presence of nanoparticles was confirmed by image analysis. The toxicological evaluation indicated distinct results for blue and green inks for the parameters tested, despite the presence of similar levels of metals. The red ink, followed by the green, presented the highest toxicity, which may be related to pigments containing azo compounds and not to the metal fraction. Black ink was found to be the safest toxicologically. This paper provides an overview of the composition of tattoo inks and their toxicological effects in epidermal cells and in the environment.





## Comparative assessment of toxicity of ZnO and amine-functionalized ZnO nanorods toward *Daphnia magna* in acute and chronic multigenerational tests



Renata Amanda Gonçalves, Ana Letícia de Oliveira Franco Rossetto, Diego José Nogueira, Denice Schulz Vicentini, William Gerson Matias\*

Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Nanotoxicology  
Zinc oxide  
Nanorods  
Amine-functionalization  
*Daphnia magna*  
ROS generation  
Multigenerational effects

### ABSTRACT

Zinc oxide nanomaterials (ZnO NM) have been used in a large number of applications due to their interesting physicochemical properties. However, the increasing use of ZnO NM has led to concerns regarding their environmental impacts. In this study, the acute and chronic toxicity of ZnO nanorods (NR) bare (ZnONR) and amine-functionalized (ZnONR@AF) toward the freshwater microcrustacean *Daphnia magna* was evaluated. The ZnO NR were characterized by transmission electron microscopy (TEM), X-Ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and the zeta potential and hydrodynamic diameter (HD). The acute EC50(48h) values for *D. magna* revealed that the ZnONR@AF were more toxic than the ZnONR. The generation of reactive oxygen species (ROS) was observed in both NM. Regarding the chronic toxicity, the ZnONR@AF were again found to be more toxic than the ZnONR toward *D. magna*. An effect on longevity was observed for ZnONR, while ZnONR@AF affected the reproduction, growth and longevity. In the multigenerational recovery test, we observed that maternal exposure can affect the offspring even when these organisms are not directly exposed to the ZnO NR.

### 1. Introduction

Due to the fast growth of the nanotechnology domain, nanomaterials (NM) are being used in a wide variety of applications in the industrial, domestic and health sectors (Nel et al., 2006). These NM can be applied in their pure form or following surface functionalization with NM, polymers, surfactants or ligands, which modify the physicochemical properties and enhance the performance of the material (Kango et al., 2013). However, the surface modification of NM can also alter their toxicological properties, resulting in an increase of the toxicity (Perreault et al., 2012; Vicentini et al., 2017), reduction of the toxicity (Božič et al., 2017; Rossetto et al., 2014b) or in some cases, it does not influence in the toxicity of the NM (Wallin et al., 2017).

At the nanoscale, the properties of materials may differ significantly from those of the respective bulk materials (Rossetto et al., 2014a). The same particular characteristics of NM that permit their application in many products, such as small size, high surface area and capacity for agglomeration or dispersion, can facilitate their translocation between environmental compartments, biological transport, and cellular

interactions, highlighting the importance of researching the bioavailability, degradability, reactivity and toxicity of NM (Khanna et al., 2015).

The toxicity effects of NM are associated with several factors, including: (a) the NM themselves, which can be toxic when taken up by organisms (Griffitt et al., 2009); (b) the enhanced solubility of NM into toxic metal ions in the case of metal and metal oxide NM (Blinova et al., 2010; Melegari et al., 2013; Rossetto et al., 2014a); (c) the combined effects of the NM and the released ions, enhancing the toxicity (Poynton et al., 2011); and (d) a “Trojan horse effect”, due to the possibility of the nanoparticles (NP) entering the cell through mechanisms of internalization and causing damage inside the cell (Limbach et al., 2007; Sabella et al., 2014).

Due to its specific optical, magnetic, semiconducting, piezoelectric, antibacterial properties and diverse growth morphologies (Vaseem et al., 2010), ZnO is one of the most commonly used metal oxide NM in industry and in everyday products, such as personal care products, polymeric membranes for water treatment, coatings and antifouling paints (Vaseem et al., 2010), with an estimated production of 30,000

\* Corresponding author at: Laboratório de Toxicologia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Caixa Postal 476, CEP 88.010-970, Florianópolis, SC, Brazil.  
E-mail address: [william.g.matias@ufsc.br](mailto:william.g.matias@ufsc.br) (W.G. Matias).

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.002>

Received 20 September 2017; Received in revised form 1 February 2018; Accepted 2 February 2018

Available online 05 February 2018

0166-445X/© 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

## A5 Trabalhos publicados em congressos

**Nogueira, D. J.**; Vaz, V. P.; Koerich, J. S.; Vicentini, D. S.; Matias, W. G. Crystalline phase-dependent ecotoxicity of aluminum oxide nanoparticles forward *Daphnia magna*. In: XVII Congresso Brasileiro de Limnologia & 2º Congresso Ibero-americano de Limnologia, 2019, Florianópolis. XVII Congresso Brasileiro de Limnologia & 2º Congresso Ibero-americano de Limnologia, 2019.

Vaz, V. P. ; **Nogueira, D. J.** ; Poeschmann, L. M. R. ; Vicentini, D. S. ; Matias, W. G. The acute toxicity and swimming behavior effects of the co-exposure of polystyrene nanoplastics and 17 $\alpha$ -ethinyl estradiol on the test organism *Daphnia magna*. In: XVII Congresso Brasileiro de Limnologia & 2º Congresso Ibero-americano de Limnologia, 2019, Florianópolis. XVII Congresso Brasileiro de Limnologia & 2º Congresso Ibero-americano de Limnologia, 2019.

**Nogueira, D. J.**; Arl, M.; Justino, N. M.; Vicentini, D. S.; Matias, W. G. Acute and chronic effects of aluminum oxide nanoparticles on *Daphnia magna*. In: 12th SETAC Latin America Biennial Meeting, 2017, Santos-SP. 12th SETAC Latin America Biennial Meeting, 2017.

Arl, M.; **Nogueira, D. J.**; Justino, N. M.; Ferrari, E.; Matias, W. G. Are tattoo inks safe? In vitro and in vivo toxicological evaluation. In: 12th SETAC Latin America Biennial Meeting, 2017, Santos-SP. Contaminants of emerging concern (CECs) in the environment: current knowledge and future challenges, 2017.

ARL, M.; **Nogueira, D.J.**; Puerari, R. C.; Toledo-silva, G.; Rossetto, A. L. O. F.; Vicentini, D. S.; Matias, W. G. Tinta de tatuagem: identificação de nanomateriais presentes e avaliação toxicológica. In: XIV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2016, Curitiba. XIV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia, 2016.