

Avaliação toxicológica de nanopartículas de óxido de cromo (III) em microcrustáceo *Daphnia magna*, bactéria *Aliivibrio fischeri* e semente de *Lactuca sativa*

Rodrigo Costa Puerari

Orientadora: Ma. Cristina Henning da Costa
Coorientador: Dr. William Gerson Matias

2014/1

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA SANITÁRIA E
AMBIENTAL**

RODRIGO COSTA PUERARI

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE CROMO (III) EM MICROCRUSTÁCEO *Daphnia
magna*, BACTÉRIA *Aliivibrio fischeri* E SEMENTE DE *Lactuca
sativa***

**FLORIANÓPOLIS
JULHO 2014**

Rodrigo Costa Puerari

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS DE
ÓXIDO DE CROMO (III) EM MICROCRUSTÁCEO *Daphnia
magna*, BACTÉRIA *Aliivibrio fischeri* E SEMENTE DE *Lactuca
sativa***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Engenharia Sanitária e
Ambiental da Universidade Federal
de Santa Catarina como requisito à
obtenção do título de Engenheiro
Sanitarista e Ambiental.

Orientadora: Cristina Henning da Costa
Co-orientador: William Gerson Matias

Florianópolis
Julho 2014

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

Puerari, Rodrigo Costa

Avaliação toxicológica de nanopartículas de óxido de cromo (III) em microcrustáceo *Daphnia magna*, bactéria *Aliivibrio fischeri* e semente de *Lactuca sativa* / Rodrigo Costa Puerari ; orientadora, Cristina Henning da Costa ; coorientador, William Gerson Matias. - Florianópolis, SC, 2014.

63 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico.
Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia Sanitária e Ambiental. 2. Toxicologia ambiental. 3. Nanopartícula. 4. Óxido de cromo III. I. Costa, Cristina Henning da. II. Matias, William Gerson. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental. IV. Título.

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS
DE ÓXIDO DE CROMO III

RODRIGO COSTA PUERARI

Trabalho submetido à Banca Examinadora como
parte dos requisitos para Conclusão do Curso de
Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental –
TCC II

BANCA EXAMINADORA:



Ma. Cristina Henning da Costa
(Orientadora)



Dr. José Julio Barrios Restrepo
(Membro de Banca)



Ma. Ana Letícia de Oliveira Franco Rossetto
(Membro de Banca)

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho não seria possível sem a colaboração de diversas pessoas. Meus agradecimentos são direcionados:

À minha família e em especial aos meus pais, Fernando e Noêmia, que se esforçam diariamente para tentar atender às necessidades de seus filhos no âmbito material e principalmente emocional. Todas as minhas conquistas dedico a vocês dois.

À Cristina Henning da Costa pela orientação, ajuda, apoio e paciência inesgotáveis.

Ao professor William Gerson Matias pela oportunidade de pesquisa e desenvolvimento pessoal, pela confiança depositada e pelo conhecimento repassado.

Aos membros da banca, José Julio Barrios Restrepo e Ana Leticia de Oliveira Franco Rossetto pela disponibilidade e contribuições para a melhoria deste trabalho.

Ao CNPq, agência de fomento à pesquisa, que possibilitou apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu namorado Vilmar Michereff Junior por toda sua paciência, companheirismo, compreensão e amor.

À equipe do Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) pela amizade e ajuda ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

Aos membros de laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina pelo auxílio nas análises.

À Bianca Vicente Oscar, amiga e companheira de laboratório pelo apoio, divertimento e conselhos importantes.

Às amigas construídas ao longo da graduação, em especial a Amanda Luiza Buerger, Franciele dos Santos, Jaqueline Botamelli e Mônica Nassar Machuca, e a todos os amigos, antigos e novos, que não puderam ser citados, mas que marcaram minha vida significativamente.

*“Every answer contains a new
quest. A quest to non existence, a
journey with no end”*

(Epica - Sensorium)

RESUMO

A nanotecnologia é um ramo da ciência que desenvolve materiais em escala nanométrica. Entre esses materiais, destacam-se as nanopartículas. Com seu tamanho reduzido (entre 1 e 100 nm), as nanopartículas vêm sendo amplamente utilizadas em indústrias e na medicina. A partir da introdução no cotidiano das pessoas, os possíveis destinos finais destes materiais são o ambiente aquático ou a inadequada deposição no solo. Dessa maneira, estudos toxicológicos são necessários para compreender os efeitos destas novas substâncias sobre organismos. As nanopartículas de óxido de cromo III (NP Cr₂O₃) são utilizadas em pigmentações de materiais cerâmicos, equipamentos eletrônicos, cromagens e corantes para tintas. Contudo na literatura são encontrados poucos trabalhos que propõem investigar os potenciais tóxicos dessa nanopartícula. Assim, o presente estudo teve como objetivos avaliar toxicologicamente a NP Cr₂O₃ através de testes de toxicidade aguda com o microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* e a bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*, teste de toxicidade crônica com *D. magna* e teste de germinação com a semente de alface *Lactuca sativa* L. A amostra de NP Cr₂O₃ foi caracterizada através das técnicas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Difração de Raios-X (DRX), Potencial Zeta (PZ), área superficial e quantificação de cromo através de FAAS. A CE_{50,48h} do teste agudo com *D. magna* foi de 6,79 mg/L, apresentando cromo em concentração inferior à máxima permitida pela legislação brasileira para lançamento de efluentes. A CE_{50,15min} para *A. fischeri* foi de 16,10 mg/L e a CE_{50,30min} foi de 12,91 mg/L. Ambos valores também apresentaram concentrações de cromo inferiores à máxima permitida pela legislação. Em relação ao teste crônico com *D. magna*, foram observados efeitos sobre a longevidade em concentrações inferiores às permitidas pela legislação. Não foi observado efeito significativo na germinação das sementes, porém o crescimento das plântulas foi afetado conforme aumento na concentração de NP Cr₂O₃.

Palavras-chave: Toxicologia Ambiental. Nanopartícula. Óxido de Cromo III. *Daphnia magna*. *Aliivibrio fischeri*. *Lactuca sativa* L.

ABSTRACT

Nanotechnology is a branch of science that develops nanoscale materials. Among these materials, stand out the nanoparticles. With its small size (between 1 and 100 nm), nanoparticles have been widely used in industry and medicine. From the introduction in daily life, the possible final destinations of these products are the aquatic environment or the inadequate deposition in soil. Thus, toxicological studies are necessary to understand the effects of these new substances on organisms. Chromium III oxide nanoparticles (NP Cr₂O₃) are mostly used in ceramic pigmentation, electronics devices, chromium-plating and as dye inks. However, in the literature, few studies propose to investigate the toxic potential of this nanoparticle. Thus, the present study aimed to toxicologically evaluate the NP Cr₂O₃ through acute toxicity tests on freshwater microcrustacean *Daphnia magna* and marine bacteria *Aliivibrio fischeri*, chronic toxicity test on *D. magna* and germination test on *Lactuca sativa* L. seed. The sample of NP Cr₂O₃ was characterized through the techniques of Transmission Electron Microscopy (TEM), X-Ray Diffraction (XRD), Zeta Potential (ZP), surface area and quantification of chromium through FAAS. The EC_{50,48h} of the acute test on *D. magna* is 6.79 mg/L with concentration of chromium below the maximum allowed by Brazilian legislation for effluent disposal. The EC_{50,15min} to *A. fischeri* is 16.10 mg/L and the EC_{50,30min} is 12.91 mg/L. Both values showed concentrations of chromium lower than the allowed by Brazilian legislation. Regarding the chronic test, effects on longevity were observed in lower concentrations than the allowed by legislation. No significant effect in germination on seeds was observed, but the seedling growth was affected as increased the NP Cr₂O₃ concentration.

Keywords: Environmental toxicology. Nanoparticle. Chromium III Oxide. *Daphnia magna*. *Aliivibrio fischeri*. *Lactuca sativa* L.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Concentração de metais solúveis em mol/L em função do pH	22
Figura 2 - Diâmetro das partículas para cada cor de tinta de tatuagem analisada	25
Figura 3 - <i>Daphnia magna</i> em imagem com escala de 200µm	29
Figura 4 - Aparelho Zetasizer.....	33
Figura 5 - Montagem de teste agudo com NP Cr ₂ O ₃	35
Figura 6 - Montagem de teste crônico com NP Cr ₂ O ₃	36
Figura 7 – Digestão ácida das amostras de NP Cr ₂ O ₃	40
Figura 8 - Equipamento utilizado para quantificação de cromo	41
Figura 9 – Micrografia por MET da NP Cr ₂ O ₃	42
Figura 10 – Difratoograma NP Cr ₂ O ₃	43
Figura 11 - Alterações morfológicas em <i>D. magna</i> expostas à NP Cr ₂ O ₃ . A: <i>D. magna</i> controle negativo. B e C: <i>D. magna</i> com redução de espinho apical (em destaque)	45
Figura 12 - Resultado para o parâmetro longevidade	46
Figura 13 - Resultado para o parâmetro comprimento	47
Figura 14 – Resultado para o parâmetro reprodução	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Padrões de referência brasileiros para cromo.....	26
Tabela 2 - Valores de referência internacionais para o cromo	26
Tabela 3 – Concentrações de NP Cr ₂ O ₃ em cada meio para o procedimento da digestão ácida	39
Tabela 4 - Parâmetros de caracterização de NP Cr ₂ O ₃	43
Tabela 5 - Resultados dos testes agudos com <i>D. magna</i>	44
Tabela 6 – Resultados de CEO e CENO para teste crônico.....	48
Tabela 7 - Resultados para teste com <i>A. fischeri</i>	49
Tabela 8 - Porcentagem de germinação de <i>L. sativa</i> L.	50
Tabela 9 - Comprimento médio (cm) das radículas para cada diluição	50
Tabela 10 - Concentrações de Cr em diferentes diluições de NP Cr ₂ O ₃ em meio ISO	51
Tabela 11 - Concentrações de Cr em diferentes diluições de NP Cr ₂ O ₃ em meio M4	52
Tabela 12 - Concentrações de Cr em diferentes diluições de NP Cr ₂ O ₃ em meio diluyente NaCl.....	52

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS	19
2.1.	OBJETIVO GERAL	19
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1.	NANOTECNOLOGIA	20
3.2.	CROMO.....	21
3.2.1.	Toxicidade do Cromo	23
3.2.2.	Nanopartículas de Óxido de Cromo III	23
3.2.3.	Legislação	25
3.3.	TOXICOLOGIA AMBIENTAL	26
3.3.1.	Testes Ecotoxicológicos.....	27
3.3.2.	Microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	28
3.3.3.	Bactéria <i>Aliivibrio fischeri</i>	30
3.3.4.	Sementes de alface (<i>Lactuca sativa</i> L.)	30
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.2.	PREPARO DA AMOSTRA DE NP Cr ₂ O ₃	31
4.3.	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	31
4.3.1.	Forma e Tamanho.....	31
4.3.2.	Estrutura cristalina.....	32
4.3.3.	Estabilidade em Suspensão	32
4.3.4.	Área Superficial	33
4.4.	CULTIVO DE <i>Daphnia magna</i>	33
4.5.	TESTE AGUDO COM <i>Daphnia magna</i>	34
4.6.	TESTE CRÔNICO COM <i>Daphnia magna</i>	35

4.7.	TESTE DE SENSIBILIDADE COM <i>Daphnia magna</i>	36
4.8.	TESTE AGUDO COM <i>Aliivibrio fischeri</i>	37
4.9.	TESTE DE GERMINAÇÃO <i>Lactuca sativa</i> L.	37
4.10.	QUANTIFICAÇÃO DE CROMO	38
4.10.1.	Preparação das amostras para cromo total	39
4.10.2.	Preparação das amostras para cromo biodisponível	40
4.10.3.	Espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS) ..	41
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA	42
5.2.	TESTES TOXICOLÓGICOS.....	44
5.2.1.	Teste Agudo com <i>D. magna</i>	44
5.2.2.	Teste Crônico com <i>D. magna</i>	45
5.2.3.	Teste com <i>A. fischeri</i>	49
5.2.4.	Testes com <i>L. sativa</i> L.	49
5.3.	QUANTIFICAÇÃO DE CROMO	51
6.	CONCLUSÕES	54
7.	RECOMENDAÇÕES	55
BIBLIOGRAFIA	56

1. INTRODUÇÃO

A sociedade moderna, construída a partir da Revolução Industrial iniciada no século XVIII na Europa, tem como meta a busca constante por melhorias nas eficiências dos diversos segmentos produtivos. O refinamento dos processos industriais e o desenvolvimento de novos materiais, contudo, nem sempre compreendem as questões referentes à saúde humana e ambiental.

Nos últimos anos, a nanotecnologia, ciência que estuda e desenvolve materiais em escala nanométrica, ganhou destaque através dos benefícios que proporcionam no meio industrial. As nanopartículas são pequenas estruturas cujo tamanho pode corresponder a 70.000 vezes menor que um fio de cabelo (ABDI, 2011). Os principais tipos de nanopartículas atualmente utilizadas são os nanotubos de carbono e os óxidos de metais. Produtos que vão desde cosméticos e protetores solares até computadores e eletrodomésticos utilizam deste material para melhorar suas eficiências. Uma vez que as nanopartículas podem possuir ações de efeito bactericida, sendo aplicadas em roupas, por exemplo, e em eletrônicos quando têm caráter anticorrosivo, a tendência é de se imaginar que este avanço tecnológico não representa ameaças à saúde humana e ao meio ambiente.

Relacionadas à medicina, inúmeras são as aplicações destes materiais, tais como indução de crescimento ósseo e deslocamento de fármacos no interior do organismo para o tratamento localizado de doenças. Porém, o mesmo segmento que aplica as nanopartículas para o beneficiamento da saúde, também alerta para os efeitos destas substâncias. Relatos de efeitos carcinogênicos e disfunções cerebrais devidos ao contato com nanopartículas têm crescido entre o meio médico (AHAMED et al., 2013; RAGHUNATHAN et al., 2013; TROUILLER et al., 2009).

As principais vias de contaminação por nanopartículas são respiratória, dérmica e através de ingestão (PASCHOALINO et al., 2010). Os pulmões, brônquias e intestino são importantes órgãos de absorção, e através do sistema circulatório essas nanopartículas podem ser transportadas, atingindo diversos tecidos e órgãos incluindo o fígado, rins e cérebro (NEMMAR et al., 2002; SHIMADA et al., 2006).

Desta maneira, além das inúmeras perspectivas oriundas do desenvolvimento de uma gama de novos materiais, há o potencial risco de contaminação ambiental dadas as características intrínsecas das nanopartículas, como tamanho reduzido, grande área superficial e capacidade de aglomeração ou dispersão, as quais podem facilitar a

translocação destas pelos compartimentos ambientais e ocasionar, de forma acumulativa, danos à cadeia trófica. Estes aspectos justificam a importância da investigação sobre a disponibilidade, degradabilidade, reatividade e toxicidade dos nanomateriais (PASCHOALINO, 2010).

Dentro do panorama mundial, o Brasil tem seu lugar de destaque em nanociência, ocupando a 20ª posição do ranking entre os países com mais produções científicas sobre o tema (ABDI, 2011). Ainda de acordo com ABDI (2011), o governo brasileiro investiu 160 milhões de reais em pesquisas sobre nanotecnologia que, somados aos investimentos privados, ultrapassam os 320 milhões de reais. Esses investimentos se devem aos interesses que o país tem nas áreas de produtos farmacêuticos, químicos e cosméticos, além de agroindustrial. Acompanhando este contexto, as indústrias do Estado de Santa Catarina também fazem uso dos nanomateriais em suas etapas produtivas. Segundo dados da FIESC – Federação das Indústrias de Santa Catarina, o Estado ocupa posição privilegiada no segmento de produção cerâmica, sendo líder no continente latino americano na produção de matrizes para a indústria cerâmica e possuindo a segunda maior cerâmica quando se leva em conta o faturamento. Ainda de acordo com a FIESC, o Estado também se destaca nos segmentos tecnológico e eletrônicos. Assim sendo, optou-se por realizar a avaliação toxicológica da nanopartícula de óxido de cromo III (NP Cr₂O₃) por esta ser passível de aplicação nestas indústrias devido às características que fornece.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade da nanopartícula de Óxido de Cromo III para diferentes organismos-teste.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterização da NP de Cr_2O_3 ;
- Determinar CE_{50} do teste de toxicidade aguda com microcrustáceo *Daphnia magna* exposta à NP Cr_2O_3 ;
- Identificar efeitos da exposição crônica à NP Cr_2O_3 em concentrações subletais para *Daphnia magna*;
- Determinar CE_{50} do teste de toxicidade aguda com bactéria *Aliivibrio fischeri* exposta à NP Cr_2O_3 ;
- Determinar o percentual de germinação e avaliar os efeitos nas radículas de sementes de *Lactuca sativa* L. expostas à NP Cr_2O_3 .

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. NANOTECNOLOGIA

De acordo com Ferreira & Rangel (2009), o termo nanotecnologia foi introduzido em 1974 pelo engenheiro japonês Norio Taniguchi para designar uma nova tecnologia que ia além do controle de materiais e da engenharia em microescala. Porém, os primeiros conceitos de nanotecnologia foram introduzidos pelo físico americano Richard Feynman em 1959. A nanotecnologia é o estudo e a manipulação da matéria em dimensões aproximadamente entre 1 e 100 nm, sendo que fenômenos exclusivos e intrínsecos permitem novas aplicações que não são possíveis quando trabalhado com materiais maiores ou com átomos e moléculas (NNI, 2013). De maneira simplificada, a nanotecnologia é a área da ciência que conduz pesquisas e desenvolvimentos de nanopartículas, sintetizando, modificando e manipulando estas partículas (SANTOS, 2008; FERREIRA & RANGEL, 2009).

A síntese e a caracterização de nanomateriais, nanopartículas e nanocompósitos são o resultado da nanotecnologia (ZARBIN, 2007), sendo esta uma nova ciência de manipulação molecular. Essa tecnologia tem sido mais explorada nos últimos 10 anos principalmente devido ao avanço tecnológico, como dos microscópicos de alta resolução e dos processos químicos capazes de rearranjar e moldar átomos e moléculas. Tais métodos permitem a criação de substâncias com características diferenciadas àquelas na natureza, o que dá uma ampla possibilidade em aplicações tecnológicas. Efeitos da redução de tamanho, mudança de dimensionalidade e da mistura de diferentes elementos químicos estão diretamente relacionados com a ativação e controle das novas propriedades destes compostos (CAMPOS, 2005).

As nanopartículas podem ser classificadas em nanopartículas naturais, por exemplos nanopartículas de sal marinho, poeiras vulcânicas e algumas moléculas encontradas no interior de organismos primitivos, como a magnetita biogênica e a proteína ferritina, de 12 nm (OBERDÖRSTER et al., 2010) e nanopartículas engenheiradas ou artificiais, que são sintetizadas pelo homem, sendo exemplos fulereno, nanotubos, nanopartículas de óxidos metálicos, nanocompósitos, entre outras.

A nanotecnologia está presente em vários setores fabris e em diversos produtos utilizados no dia-a-dia. Superfícies de vidro e tecidos que repelem água, revestimentos que impedem a corrosão, blocos cerâmicos que absorvem moléculas de odor, roupas que não mancham,

partículas que auxiliam no combate ao câncer e pinturas de veículos resistentes a riscos. Estes são alguns exemplos de produtos desenvolvidos com nanotecnologia. Trata-se de uma ciência interdisciplinar, a qual reúne e retrabalha conhecimentos e conceitos desenvolvidos pela física, química e biologia. (BOSSARDI, 2007).

Os segmentos mais beneficiados com o surgimento de estruturas tão pequenas são alimentício, eletrônico, farmacêutico, biotecnológico, cosmético, médico-hospitalar, agrícola e de segurança nacional. Segundo Lima (2004), pode-se, ainda, citar um exemplo vindo da indústria de vestuário, em que nanopartículas de prata e de óxido de titânio desenvolvem ação antibacteriana em meias quando ativadas por radiação solar.

No entanto, essa nova tecnologia traz uma preocupação ambiental, pois a alteração dos materiais para a escala nano pode, conseqüentemente, provocar alteração do seu potencial toxicológico. O estudo deste problema é uma das necessidades prioritárias no campo da nanotoxicologia (MONSERRAT, 2010). Também, deve-se atentar para a falta de procedimentos e técnicas analíticas com sensibilidade suficiente para detectar as nanopartículas no ambiente.

De acordo com Paschoalino (2010), alguns estudos sugerem que os nanomateriais, por sua pequena dimensão, podem ter uma permeabilidade maior através da pele, mucosa e membranas celulares, podendo ter efeito tóxico magnificado, já que possuem uma reatividade superior, principalmente devido ao aumento da área superficial.

3.2. CROMO

O cromo é um elemento traço de relativa abundância na crosta terrestre, sendo encontrado naturalmente como mineral cromita. Na indústria, o cromo pode ser utilizado em ligas metálicas, catalisadores, pigmentos e na impregnação de madeiras para conservação. É também usado em produtos de tingimento. No continente americano, o Brasil é praticamente o único produtor de cromo, possuindo 0,4% das reservas do metal e 1,2% da oferta mundial (SILVA et al., 2008).

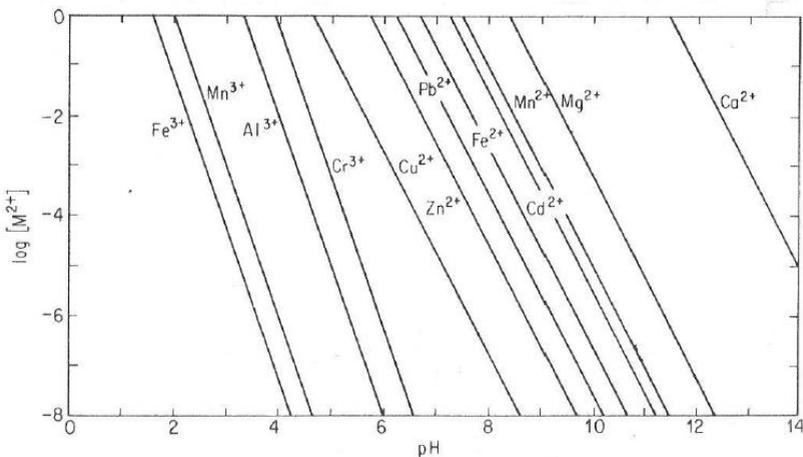
O elemento cromo existe nos estados de oxidação 0, 2, 3, 4 e 6. Porém, apenas o Cr (III) e Cr (VI) são estáveis e estão presentes no ambiente (MATOS et al., 2008). O cromo hexavalente é carcinogênico, sendo o mais tóxico entre as duas formas (NEWMAN & UNGER, 2003). O cromo trivalente é o estado de oxidação em maior abundância na natureza, sendo um micronutriente essencial ao ser humano que auxilia na ocorrência da ação da glicose, potencializando a ação de insulina

(SILVA et al., 2008). A absorção do cromo depende do seu estado de oxidação e do pH do meio. Por exemplo, no aparelho gastrointestinal, a absorção de cromo VI está em torno de 2 a 6% e de cromo III em 1%. O Conselho Nacional de Pesquisa dos Estados Unidos recomenda que a porção diária para animais e homens é de 50-200 μg (ATSDR, 2000). Esse metal possui a potencialidade de bioacumular nos órgãos devido a propriedade de se ligar às proteínas plasmáticas.

No ambiente aquático, o cromo existe prioritariamente na forma de cromato. A forma trivalente é hidrolisada por completo em águas naturais e o cromo precipita como hidróxido, deixando pequenas quantidades em solução (SAWYER, 1978). Baired & Cann (2011) afirmam que em condições anaeróbias, o cromo existe no estado trivalente. No entanto, a solubilidade aquosa do Cr(III) não é alta, sendo o íon precipitado como seu hidróxido ($\text{Cr}(\text{OH})_3$) sob condições alcalinas, neutras ou ligeiramente ácidas. No estado hexavalente, os compostos mais importantes são os cromatos (CrO_4^{2-}) e os dicromatos ($\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$) (SILVA et al., 2008), e sua ocorrência no meio ambiente está relacionada com a ação antrópica.

A partir de Loyaux-Lawniczak et al. (2000), sabe-se que o Cr(III) é relativamente imóvel, sendo seus óxidos e hidróxidos caracterizados por produtos de baixa solubilidade. Através da Figura 1, percebe-se que a solubilidade do Cr(III) se encontra na faixa de pH entre aproximadamente 4,0 a 6,5.

Figura 1 - Concentração de metais solúveis em mol/L em função do pH



Fonte: SAWYER, 1978

Segundo Barros & Souza-Aguiar (2001), o estado mais estável do cromo é o trivalente, sendo que o íon (Cr^{3+}) está presente quando o pH se encontra entre 4,0 e 8,0. Também afirmam que a elevação do pH intensifica a hidrolização do metal, diminuindo a sua solubilidade.

3.2.1. Toxicidade do Cromo

De acordo com Araujo & Santos-Filho (2008), os compostos de cromo trivalente são absorvidos pelos organismos por difusão passiva ou fagocitose, sendo que a velocidade de absorção depende do diâmetro da partícula, da solubilidade do composto nas membranas celulares, entre outros fatores. Sabe-se, ainda, que o Cr(III) ao entrar no organismo se concentra no fígado, no rim, no pulmão ou no baço. Dados da ATSDR – *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* (2000) confirmam que o cromo hexavalente é rapidamente reduzido a cromo trivalente no organismo, tornando mais complexa a diferenciação dos efeitos nocivos de cada espécie isoladamente. Através de Silva & Pedrozo (2001), sabe-se que o contato com grandes quantidades de Cr(VI) pode acarretar em ulceração e perfuração do septo nasal, irritação no trato respiratório, possíveis efeitos cardiovasculares, gastrintestinais, hematológicos, hepáticos e renais, além de elevado risco de câncer pulmonar. A ATSDR (2000) afirma que o contato com Cr(VI) pode causar eritema facial, tosse e asma. O contato com Cr(III) pode produzir dispneia, tosse e espirros.

Baired & Cann (2011) indicam que o íon cromato (CrO_4^{2-}) entra nas células biológicas pela semelhança com o íon sulfato (SO_4^{2-}). Os compostos de cromo penetram nas células e são reduzidos a Cr(III) causando danos a estrutura celular (SILVA et al., 2008). Com a entrada nas células e consequente redução, a concentração de Cr(III) aumenta, desequilibrando o meio e tornando-o tóxico. Ainda de acordo com o mesmo autor, a intoxicação torna-se séria quando há a adsorção pelo trato intestinal.

Para Silva et al. (2008), os produtos da redução de Cr(VI) a Cr(III) compreendem o Cr(V) e Cr(IV) e radicais livres, sendo estes os possíveis responsáveis pelos efeitos carcinogênicos observados.

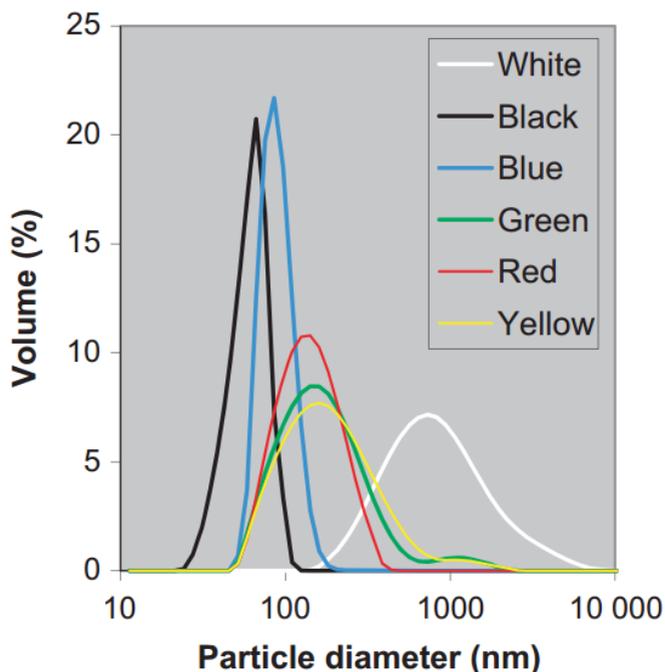
3.2.2. Nanopartículas de Óxido de Cromo III

Em relação às nanopartículas de óxido de cromo III (NP Cr_2O_3), estas vêm sendo usadas em equipamentos eletrônicos devido ao grande

potencial anticorrosivo e da alta condutividade dos óxidos de cromo, segundo dados de *Global Knowledge Partnerships in e-Waste Recycling* (2013). De acordo com a ATSDR (2011), o cromo é utilizado também em cromagens, como corante para tintas, no curtimento de couro e na pigmentação de materiais cerâmicos, fornecendo materiais com características refratárias. Outra fonte de óxido de cromo III é em fábrica de eletrodos, na etapa de soldagem, onde se apresenta como fumo metálico (SILVA & PEDROZO, 2001). Em curtimentos, o Cr(III) se liga à proteína na pele do animal para formar o couro resistente à água, ao calor e a bactérias, portanto, como consequência da emissão industrial, é um poluente aquático comum, sendo o segundo contaminante inorgânico mais abundante de águas subterrâneas sobre locais com resíduos perigosos (BAIRED & CANN, 2011). O cromo trivalente também pode ser encontrado como produto do processo de remoção de cromo hexavalente de efluentes industriais, uma vez que para este procedimento deve-se reduzir Cr(VI) em Cr(III) (BAIRED & CANN, 2011).

As NP Cr₂O₃ também são utilizadas na pigmentação de tintas para tatuagens (SACKS & BARCAUI, 2004), oferecendo tonalidade esverdeada. Høgsberg et al. (2011) caracterizaram as nanopartículas utilizadas em tintas comerciais para tatuagens. O resultado para o diâmetro das partículas se encontra na Figura 2. Nota-se que todas as tintas, excetuando-se a de cor branca, possuem quantidades consideráveis de pigmentos menores que 100 nanômetros em sua composição, inclusive a tinta verde. Esta teve variação entre 75 e 289 nm.

Figura 2 - Diâmetro das partículas para cada cor de tinta de tatuagem analisada



Fonte: HØGSBERG et al., 2011

3.2.3. Legislação

As legislações existentes de lançamento de efluentes e potabilidade de água de abastecimento não fazem referência ao cromo em nanocomposições. Estas indicam somente a quantidade permitida da forma iônica do cromo, os íons trivalente e hexavalente ou de cromo total.

Dessa maneira, as legislações brasileiras compreendem a Resolução CONAMA 430/2011 referente a Padrões de Lançamentos de Efluentes e a Portaria Nº 2.914/2011 do Ministério da Saúde referente a Padrões de Potabilidade de Água. Na legislação referente a limite de exposição ocupacional, NR-15 – ATIVIDADES E OPERAÇÕES INSALUBRES do Ministério do Trabalho, encontra-se valor para o Cr(VI) na forma de ácido crômico (névoa). Os valores permitidos nas três legislações se encontram descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Padrões de referência brasileiros para cromo

LEGISLAÇÃO	COMPONENTE	LIMITE	UNIDADE
CONAMA 430/2011	Cr(III)	1,0	mg/L
	Cr(VI)	0,1	mg/L
MINISTÉRIO DA SAÚDE 2914/2011	Cr total	0,05	mg/L
NR-15 MINISTÉRIO DO TRABALHO	Ácido Crômico (névoa)	0,04	mg/m ³

Fonte: o autor

Baired & Cann (2011) também apresentam os limites pertinentes à quantidade de cromo nas legislações americana e canadense e o valor de referência fornecido pela OMS – Organização Mundial da Saúde, como pode ser observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Valores de referência internacionais para o cromo

LEGISLAÇÃO	COMPONENTE	LIMITE	UNIDADE
EPA <i>Environmental Protection Agency</i>	Cr	0,1	mg/L
<i>Environment Canada</i>	Cr	0,05	mg/L
OMS	Cr	0,05	mg/L

Fonte: adaptado de Baired & Cann, 2011

3.3. TOXICOLOGIA AMBIENTAL

A toxicologia é uma ciência ampla e que envolve diferentes disciplinas como matemática, bioquímica, física, química, entre outras. Pode-se afirmar de que se trata de um conhecimento multidisciplinar. Mais especificamente, tem-se por definição que a toxicologia é a ciência dos venenos (toda substância que destrói ou altera as funções vitais) (MATIAS, 2005).

A partir de biotestes, a toxicologia ambiental é capaz de identificar efeitos ocasionados pelo contato, ingestão ou outra forma de acesso de substâncias específicas no interior dos organismos, avaliando seus potenciais tóxicos quando liberadas no meio ambiente. Assim, esta ciência estuda as interações tóxicas de substâncias químicas no ecossistema e sua capacidade de afetar a fisiologia normal de organismos vivos (BRILHANTE & CALDAS, 1999). Em outras palavras, a toxicologia ambiental é o estudo dos impactos de poluentes sobre a estrutura e o funcionamento de sistemas ecológicos (do molecular ao ecossistema) (LANDIS & YU, 2003).

Para Newman & Unger (2003), o uso dos termos toxicologia ambiental e ecotoxicologia possuem convergência de significados, porém o primeiro geralmente faz referência a efeitos de poluentes ambientais exclusivamente em humanos e o segundo é aplicado tanto para humanos quanto para outras entidades ecológicas. A ecotoxicologia, então, é definida como a ciência dos contaminantes na biosfera e seus efeitos nos constituintes da biosfera, incluindo seres humanos. Matias (2005) diz que a toxicologia tradicional trata dos efeitos tóxicos sobre organismos individualmente; já a ecotoxicologia estuda o impacto sobre as populações de organismos vivos ou sobre ecossistemas. Com esta definição, entende-se que em um agravo ambiental o efeito sobre um indivíduo não necessariamente será o mesmo observado em sua população ou para o ecossistema presente. Isto se dá principalmente pelas interações da substância tóxica, dos organismos e do ambiente, proporcionando ações de bioacumulação ou não, degradabilidade e mobilidade das substâncias, bem como bioamplificação.

A ecotoxicologia é uma área especializada da toxicologia ambiental, cujos objetivos dos estudos estão baseados nos efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre a dinâmica das populações e comunidades integrantes de ecossistemas definidos (RONCO et al., 2004). A partir disto, pode-se afirmar que a toxicologia ambiental e a ecotoxicologia são indissociáveis, sendo que ambas focam no estudo da interação de substâncias químicas geralmente antrópicas sobre os ecossistemas.

3.3.1. Testes Ecotoxicológicos

Segundo Knie & Lopes (2004), os testes ecotoxicológicos podem ser utilizados para diversos setores, entre eles licenciamento de produtos químicos, fiscalização de efluentes, monitoramento de qualidade de águas, entre outros. Para Matias (2005), os ensaios toxicológicos atualmente praticados são destinados a pesquisar se um produto apresenta ou não efeitos tóxicos ou nocivos e, se for o caso, qual é a natureza destes efeitos e seu grau de toxicidade.

Em ecotoxicologia, ao focar especificamente os efeitos, reporta-se àqueles evidenciados por testes de toxicidade que visam prever o impacto de determinado xenobiótico ao meio ambiente (CHASIN & AZEVEDO, 2003). A toxicidade depende da concentração e das propriedades da substância química à qual o organismo é exposto bem como do tempo de exposição (RAND, WELLS & McCARTY, 1995).

A seleção dos organismos para os testes ecotoxicológicos segue alguns critérios apresentados por Matias (2005):

- Facilidade de reprodução;
- Facilidade de cultivo;
- Velocidade de crescimento e desenvolvimento;
- Disponibilidade no mercado;
- Facilidade de manipulação.

Os testes ecotoxicológicos podem ser divididos quanto à característica temporal de modo que testes agudos são aqueles em que são observadas as manifestações de um efeito em um curto espaço de tempo após administração de uma dose única de uma substância e testes crônicos aqueles em que o objetivo é caracterizar o perfil toxicológico de uma substância em uma espécie, após uma exposição repetida e prolongada, cobrindo o ciclo de vida de forma representativa (MATIAS, 2005).

3.3.2. Microcrustáceo *Daphnia magna*

Daphnia magna é um microcrustáceo planctônico de água doce, com tamanho médio de 5 a 6 mm. Vulgarmente conhecidas como pulgas d'água, a *D. magna* atua na cadeia alimentar aquática como consumidora primária entre os metazoários, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado, principalmente de algas unicelulares. Em condições

ambientais favoráveis reproduz-se assexuadamente por partenogênese, originando apenas fêmeas (KNIE & LOPES, 2004).

Daphnia magna STRAUS, 1820 (Cladocera, Crustácea) não é naturalmente encontrada no Brasil, sendo encontrada em grande escala em lagoas, lagos e represas das regiões temperadas (hemisfério norte) (MATSUMURA-TUNDISI, 1984 *apud*. COSTA, 2010). As condições ideais do meio físico, segundo Clare (2007), compreendem temperatura entre 18 e 22°C, pH entre 6,5 e 9,5, sendo o ótimo considerado entre 7,2 e 8,5 e águas duras, geralmente com dureza acima de 150 mg/L de CaCO₃.

Segundo Knie & Lopes (2004), as vantagens desse organismo ser utilizado em bioensaios normatizados são: fácil cultivo em laboratório; ciclo de vida e reprodução curtos; produz descendentes geneticamente idênticos garantindo a uniformidade nos testes; reage sensivelmente a vários agentes nocivos.

Figura 3 - *Daphnia magna* em imagem com escala de 200µm



Fonte: adaptado de HANEY et al., 2013

A Figura 3 mostra a *Daphnia magna* fêmea em condições ambientais normais. Em destaque, nota-se a presença do espinho apical.

Segundo Haney et al. (2013), partículas com diâmetro inferior a 50 µm na água são filtradas pelo organismo, sendo que a ingestão das mesmas ocorre sem nenhum mecanismo seletivo.

3.3.3. Bactéria *Aliivibrio fischeri*

É uma bactéria marinha luminescente, gram-negativa, anaeróbia facultativa. Em condições ambientais favoráveis, essas bactérias emitem luz naturalmente, necessitando para isto oxigênio em concentrações acima de 0,5 mg/L (KNIE & LOPES, 2004). É considerada uma enterobactéria e pertencente à família Vibrionaceae. Esta família consiste de muitas espécies que são caracterizadas pela cooperação e interação com tecidos de outros animais (FUZINATTO, 2009).

Segundo Rossetto (2012), os ensaios laboratoriais utilizando a bactéria *Aliivibrio fischeri* como organismo-teste apresentam algumas vantagens. Entre elas a realização com pequenos volumes de amostras de água doce ou salina, a facilidade na execução do teste e a rápida obtenção de resultados, entre 15 e 30 minutos após a exposição à amostra. Desta maneira, permite uma resposta rápida em casos de acidentes ambientais.

3.3.4. Sementes de alface (*Lactuca sativa* L.)

Souza et al. (2005) afirmam que sementes são excelentes organismos para bioensaios. Ao serem reidratadas, elas entram em processo de germinação, onde sofrem rápidas mudanças fisiológicas e tornam-se altamente sensíveis ao estresse ambiental. Para Costa (2010), as vantagens da utilização de sementes para testes toxicológicos são relacionadas ao baixo custo, à simplicidade e a pouca quantidade de amostra necessária.

Para testes de germinação e crescimento de raízes, muitas espécies de plantas têm sido utilizadas. Entre elas, podem-se destacar repolho, cebola, tomate, pepino, cevada e alface. Esta última é recomendada por órgãos americanos e europeus como USEPA (*United States Environmental Protection Agency*), FDA (*Federal Drug Administration*), ASTM (*American Society for Testing and Materials*) e OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*) (BARROS, 2007). Sabe-se que a alface é a hortaliça folhosa mais comercializada no Brasil (FERNANDES et al., 2002), fazendo com que os resultados obtidos nos testes sejam representativos e de importância para a sociedade.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos foram conduzidos nas dependências do Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) do departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e em demais laboratórios integrados da universidade.

4.1. SÍNTESE DA NP Cr₂O₃

As nanopartículas de Cr₂O₃ foram sintetizadas a partir do método sol-gel proposto por Bañobre-López et al. (2003) com algumas adaptações (VICENTINI, 2014). Foram pesados 5,0 g de Cr(NO₃)₃.9H₂O e 1,5 g de NaOH e adicionados em 100 ml de água destilada, sob agitação por 30 minutos, para obtenção de Cr(OH)₃. O Cr(OH)₃ foi separado e lavado por centrifugação diversas vezes com água destilada. Em seguida, foi seco em estufa por 24 horas a 90 °C. Por fim, o Cr(OH)₃ foi calcinado a 400 °C por 3 horas para obtenção da NP de Cr₂O₃.

4.2. PREPARO DA AMOSTRA DE NP Cr₂O₃

Para a realização dos testes toxicológicos previstos, a NP Cr₂O₃ em pó foi pesada em balança de precisão analítica e diluída nos meios de teste específicos para cada organismo-teste. Após preparo, a amostra foi suspensa e homogeneizada com aparelho ultrassônico com haste metálica e micropona (modelo *Q500 Sonicator*, 500W, da marca *QSonica*, EUA) utilizando 50% da potência por 5 minutos. Este processo teve o objetivo de quebrar possíveis aglomerados existentes na amostra, uma vez que se buscava efeitos tóxicos da nanopartícula em si. Dessa forma, evita-se resultados provenientes da decantação de aglomerados sobre organismos.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A NP Cr₂O₃ foi caracterizada quanto a sua forma e tamanho, estrutura cristalina, estabilidade em suspensão e área superficial a fim de averiguar se a confecção da amostra em laboratório condiz com as características básicas de uma nanopartícula.

4.3.1. Forma e Tamanho

A forma e o tamanho da NP Cr₂O₃ suspensa em água ultrapura foram avaliados através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Foi utilizado o microscópio modelo TEM JEM 1011 (JEOL Ltd., Tokyo, Japan), localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. O objetivo foi averiguar, através das imagens obtidas pelo MET, se a amostra se apresenta em escala nanométrica, a sua forma e se há a presença ou não de formações de aglomerados.

4.3.2. Estrutura cristalina

A avaliação da estrutura cristalina da NP Cr₂O₃ foi realizada no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) do departamento de Engenharia Mecânica através do aparelho DRX da marca *Phillips*, utilizando o método de Difração de Raios X. Utilizou-se radiação Cu-K α ($\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$). Com o difratograma obtido na análise é possível verificar a pureza da amostra bem como se calcula o diâmetro médio do cristalito através da equação de *Debye-Scherrer* (Equação 1).

$$D = \frac{K \cdot \lambda}{\beta \cdot \cos \theta} \quad (\text{Equação 1})$$

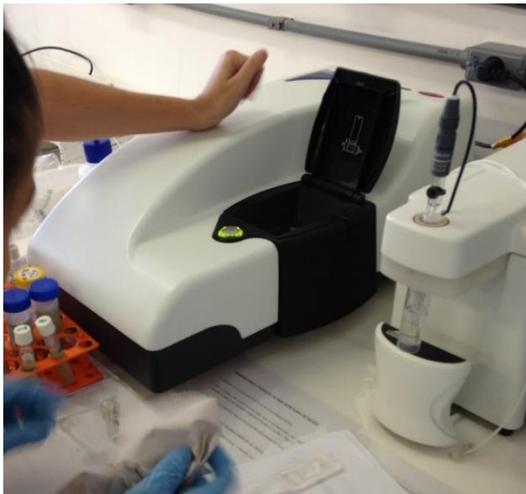
Em que D é o diâmetro médio das partículas; K é uma constante que depende da forma das partículas; λ é o comprimento de onda da radiação eletromagnética; β é a largura na metade da altura do pico de difração e θ é o ângulo de difração.

4.3.3. Estabilidade em Suspensão

A estabilidade da NP suspensa em água ultrapura foi caracterizada no LaCBio, Laboratório de Catálise Biomimétrica, situado no departamento da Química da Universidade Federal de Santa Catarina. O parâmetro avaliado foi o Potencial Zeta através da técnica de mobilidade eletroforética. O equipamento utilizado é o *Zetasizer Nano ZS* (Figura 4). O resultado é parametrizado em relação ao valor do potencial zeta em

mV. Sabe-se que quanto maior o módulo deste valor, maior é a estabilidade em suspensão da amostra estudada.

Figura 4 - Aparelho Zetasizer



Fonte: o autor

4.3.4. Área Superficial

A análise da área superficial foi realizada no Laboratório de Materiais Elétricos (LaMatE) do departamento de Engenharia Elétrica. O método utilizado para essa análise foi o método BET (ou Teoria de Adsorção Multimolecular) que permite explicar a adsorção física e a realizar a medição da área superficial. O aparelho utilizado para esta caracterização é o *NOVA® Surface Area Analyzer*, modelo NOVA 1200e (marca *Quantachrome Instruments*).

4.4. CULTIVO DE *Daphnia magna*

O cultivo do microcrustáceo *D. magna* no LABTOX é realizado seguindo as prescrições da ABNT NBR 12.713/2010. Os organismos são mantidos em béqueres de vidro de 2 litros cada que ficam armazenados em estufa com temperatura controlada à $18 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz. Cada recipiente é preenchido com volume aproximado de 1200 ml de meio de cultura M4 (NBR 12.713, 2010), onde são mantidos

até 30 indivíduos. O meio M4 é renovado três vezes por semana, sendo os organismos transferidos para o novo meio e alimentados, descartando o meio antigo. A alimentação é feita no mesmo dia da troca do meio e o alimento utilizado é a alga *Scenedesmus subspicatus*, inoculada em meio nutriente preparado no laboratório em conformidade com a norma NBR 12.713/2010.

Na troca, somente os indivíduos adultos são transferidos para o novo recipiente, enquanto que os filhotes ou são descartados em um recipiente com hipoclorito de sódio (NaClO) ou são reservados para a utilização em testes do laboratório.

4.5. TESTE AGUDO COM *Daphnia magna*

Este teste é realizado em laboratório sob condições específicas e controladas visando a avaliar a toxicidade de um agente nocivo sobre o organismo-teste quando este é exposto a um curto período de tempo. Os ensaios seguem de acordo com a NBR 12.713/2010.

Em cada recipiente de teste foram colocados 10 indivíduos jovens de *D. magna* e, ao final das 48 horas correspondentes à duração do teste, contaram-se quantos organismos se encontravam imóveis em cada diluição. Os resultados foram tratados estatisticamente pelo método de *Trimmed Spearman-Kärber* e os valores obtidos foram expressos CE_{50} , ou seja, Concentração Efetiva que causa imobilidade a 50% da população exposta.

Cada recipiente utilizado no teste possui capacidade máxima de 50 ml. As diluições inseridas em cada béquer possuem volume máximo de 25 ml. Não há alimentação nem troca do meio. Os testes foram realizados em réplicas e possuíram um teste controle somente com água reconstituída ISO capaz de validar o ensaio (Figura 5). Caso houvesse mortalidade acima de 10% neste teste controle, o ensaio não seria validado, conforme norma. O controle positivo foi realizado com diluições de dicromato de potássio.

Para a realização destes testes, foi confeccionada uma solução mãe de 500 mg/L. A partir de testes preliminares, optou-se por investigar a faixa de concentrações de 0,5 mg/L a 8 mg/L. Os resultados foram tratados por análise estatística *Trimmed Spearman-Kärber*.

Figura 5 - Montagem de teste agudo com NP Cr₂O₃

Fonte: o autor

4.6. TESTE CRÔNICO COM *Daphnia magna*

A avaliação dos efeitos subletais de uma amostra é realizada a partir de ensaios em que o período de exposição compreende parte significativa do ciclo de vida do organismo. No caso de testes crônicos com *Daphnia magna*, o período de tempo em que os organismos são submetidos à amostra é de 21 dias.

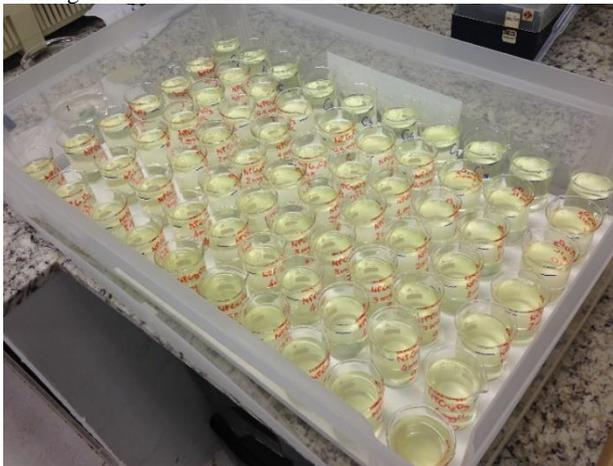
Ao final do período do teste, os resultados foram tratados estatisticamente e os valores obtidos foram CENO – Concentração de Efeito Não-Observado – e CEO – Concentração de Efeito Observado.

Os parâmetros analisados em um ensaio crônico com *D. magna* são: longevidade, reprodução e crescimento. É possível também observar alterações morfológicas. O parâmetro de reprodução consistiu em contar o número de filhotes por *D. magna* ao longo dos 21 dias. A média de filhotes por réplica foi realizada dividindo o número de filhotes pelo número de posturas de uma *D. magna*. O parâmetro de crescimento consistiu em medir através de lupa de aumento e régua milimetrada o comprimento de cada *D. magna* sobrevivente após 21 dias de ensaio. Já o parâmetro de longevidade consistiu em realizar a contagem de

indivíduos adultos sobreviventes após 21 dias. Os valores para estes três parâmetros foram comparados com os do teste controle e, após análise estatística, foram obtidos a CENO e a CEO, Concentração de Efeito Não Observado e Concentração de Efeito Observado, respectivamente.

A disposição do teste crônico consistiu em 10 béqueres por diluição enfileirados, bem como no teste controle, sendo que havia um organismo recém-nascido por béquer, conforme Figura 6. Houve a troca do meio e alimentação 3 vezes por semana. O teste com *D. magna* é uma adaptação da ISO 10.706/2000 e da NBR 13.373/2010.

Figura 6 - Montagem de teste crônico com NP Cr₂O₃



Fonte: o autor

As diluições escolhidas para o teste crônico foram selecionadas partir da CE₅₀ encontrada nos testes agudos, uma vez que apresentariam efeitos subletais. Dessa maneira, as concentrações investigadas foram as seguintes: 5,0 mg/L; 4,0 mg/L; 3,0 mg/L; 2,0 mg/L; 1,0 mg/L; 0,5 mg/L; 0,25 mg/L; 0,10 mg/L e 0,05 mg/L. O controle negativo foi realizado somente com meio M4, o meio de cultivo da *D. magna*.

4.7. TESTE DE SENSIBILIDADE COM *Daphnia magna*

Para validação dos testes agudo e crônico, foi realizado teste com substância de referência para averiguar a sensibilidade dos organismos *D. magna* utilizados nos ensaios toxicológicos. A sensibilidade consiste em

realizar um teste expondo por 24 horas indivíduos jovens a diluições de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) em meio ISO. A metodologia aplicada a este teste é a mesma do teste agudo, porém as concentrações já são pré-definidas, sendo 0,5; 0,7; 0,9; 1,1 e 1,3 mg/L. A faixa adequada da sensibilidade para *D. magna* é entre 0,6 e 1,7 mg/L (NBR 12.713, 2010).

4.8. TESTE AGUDO COM *Aliivibrio fischeri*

O teste de toxicidade para *Aliivibrio fischeri* é baseado na ISO 11.348-3 e na ABNT NBR 15.411-3 – Ecotoxicologia aquática – Determinação de efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Aliivibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente), para bactérias liofilizadas pelo equipamento *Microtox*®. O resultado obtido é $CE_{50,15min}$, ou seja, concentração efetiva que causa a inibição de 50% da luminescência em 15 minutos. Obteve-se, também, a $CE_{50,30min}$ correspondente a uma exposição por 30 minutos.

A temperatura para a realização do teste é controlada pelo equipamento, sendo que as séries de diluição são mantidas em $15^{\circ}C \pm 1^{\circ}C$ e o reagente bacteriano em $3^{\circ}C$. A medição da intensidade luminosa emitida pelas bactérias é realizada em três momentos: antes da bactéria entrar em contato com amostra a ser testada, 15 e 30 minutos após o contato da bactéria com a amostra, sendo que 15 minutos é o tempo mais usual. Os procedimentos a serem executados para a realização do teste são controlados pelo software *Microtox Omni 4.0* que é gerenciado pelo próprio equipamento (FUZINATTO, 2009).

Antes da realização do teste, o pH da amostra foi verificado, estando entre 6,0 e 8,5, faixa estabelecida pela norma para realização do teste. Assim, não foi realizada a correção do pH.

Para a validação do teste agudo com *A. fischeri* deve ser realizado teste de sensibilidade. O lote de bactérias e a metodologia foram os mesmos utilizados no teste agudo. A substância de referência utilizada para os testes de sensibilidade é o sulfato de zinco heptahidratado ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$). A $CE_{50,15min}$ para o sulfato de zinco deve ser um valor entre 2 – 10 mg/L.

4.9. TESTE DE GERMINAÇÃO *Lactuca sativa* L.

Para a realização dos testes, adquiriram-se pacotes de sementes de alface da espécie *Lactuca sativa* L. em um único estabelecimento comercial de Florianópolis/SC. As sementes utilizadas foram da marca FELTRIN® com 99,7% de pureza e validade até Fevereiro de 2015.

Os testes realizados se basearam nas Regras para análise sementes (RAS) fornecidas por Brasil (2009). Para *L. sativa*, as condições propostas nas RAS possibilitam a realização do teste sobre papel filtro no interior de placas tipo petri, sob temperatura entre 15°C e 20°C. A duração do teste foi de sete dias, sendo que se procedeu com uma contagem inicial de sementes germinadas, isto é, daquelas que apresentaram emergência e desenvolvimento das estruturas essenciais do embrião, no 4º dia de teste. A contagem final é dada no 7º dia, em que é calculada a porcentagem de sementes germinadas em relação às sementes do controle negativo (somente água destilada). Ainda, mediu-se o tamanho da radícula (raiz primária da planta) a fim de analisar estatisticamente se há comprometimento no desenvolvimento.

Os testes foram realizados em placas tipo petri de vidro com dimensões de 15 cm de diâmetro e 2,5 cm de altura. Optou-se por realizar 5 réplicas por concentração estudada. Forrou-se cada placa petri com dois discos de papel filtro com porosidade 28 µm, sendo dispostas 10 sementes espaçadas igualmente. Os papéis foram umedecidos com a solução de NP Cr₂O₃ em água destilada no início e na metade do teste. A quantidade de amostra (em ml) aplicada estava dentro da faixa recomendada pela RAS, sendo de 2 a 3 vezes o peso do substrato (em mg).

A partir de testes preliminares, optou-se por investigar as seguintes diluições: 50 mg/L; 100 mg/L; 250 mg/L e 500 mg/L. O controle negativo foi realizado somente com água destilada e o controle positivo com 100 mg/L de dicromato de potássio. Após os sete dias de teste, contabilizou-se a quantidade de sementes germinadas em cada diluição investigada, bem como nos controles negativo e positivo. Também foi realizada a medição do comprimento das radículas com auxílio de papel milimetrado. As médias obtidas foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, garantindo 95% de confiança no resultado.

4.10. QUANTIFICAÇÃO DE CROMO

A quantificação de metais em suspensão é realizada através do método de espectrometria de absorção atômica (AAS). Este método

envolve a medida da absorção da intensidade da radiação eletromagnética por átomos gasosos no estado fundamental (KRUG et al., 2004).

Segundo Krug et al. (2004), existem dois tipos de espectrometrias de absorção atômica, sendo uma com chama (FAAS) e outra com forno de grafite (GFAAS). A primeira envolve medições em mg/L enquanto que a segunda analisa na escala de $\mu\text{g/L}$. Devido a testes preliminares, optou-se por realizar somente a quantificação por FAAS. Esta análise quantifica o cromo total da amostra, porém considerou-se que as amostras eram compostas por íons Cr^{3+} , uma vez que se supõe que a NP Cr_2O_3 seja fonte somente do íon cromo neste estado de oxidação.

Foram realizadas as quantificações do cromo total e o cromo biodisponível.

4.10.1. Preparação das amostras para cromo total

Como etapa de preparação da amostra para as leituras de cromo total em FAAS, fez-se a digestão ácida das soluções de NP Cr_2O_3 em meios utilizados nos testes toxicológicos, ou seja, meio ISO para testes agudos com *D. magna*, meio M4 para testes crônicos com *D. magna*, meio diluente (NaCl) para testes com *A. fischeri*. O controle positivo foi realizado com dicromato de potássio ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$). Também foram realizados controles negativos a partir dos meios de cultura. Todas as leituras foram realizadas em triplicatas. Para o branco, foi utilizada somente água ultrapura. As concentrações da amostra estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 – Concentrações de NP Cr_2O_3 em cada meio para o procedimento da digestão ácida

MEIO	CONCENTRAÇÕES (mg/L)		
ISO	2,0	4,0	10,0
DILUENTE (NaCl)	2,0	4,0	10,0
M4	0,25		2,0

Fonte: o autor

A digestão ácida foi adaptada da EPA – 3010A (*Acid digestion of aqueous samples and extracts for total metals for analysis by FLAA or*

ICP spectroscopy). Consistiu em acidificar com 1,5 ml de ácido nítrico (HNO_3) concentrado 50 ml das amostras, transferi-las a béqueres de *teflon* e colocá-las em chapa de aquecimento a 200°C . Todo o procedimento foi realizado em capela química, conforme Figura 7. Após as amostras reduzirem para aproximadamente metade do volume original, foram retiradas da chapa para esfriar até temperatura ambiente. Foi então adicionado 1 ml de ácido clorídrico (HCl) (1:1) e 1,5 ml de HNO_3 concentrado em cada béquer e, realocando-os na chapa até aquecerem em ponto de fervura. Com isso, completou-se o volume para 50 ml com água ultrapura. Quando as amostras reduziram-se novamente para 25 ml, foram retiradas da chapa para novo resfriamento. A última etapa realizada foi a filtração das amostras (em filtro de $28\ \mu\text{m}$) digeridas e adição de água ultrapura até completar 50 ml.

Figura 7 – Digestão ácida das amostras de NP Cr_2O_3



Fonte: o autor

4.10.2. Preparação das amostras para cromo biodisponível

Para a quantificação do cromo biodisponível, a NP Cr_2O_3 foi suspensa nas mesmas concentrações utilizadas para cromo total, em cada meio de teste. A avaliação do cromo biodisponível no meio diluente de teste para sementes foi realizada apenas na concentração mais alta, 500 mg/L.

A digestão parcialmente ácida foi adaptada de American Public Health Association (1998). Consistiu em filtrar uma alíquota de 50 ml da

amostra em filtro de seringa 0,45 μm e ajustar os valores de $\text{pH} < 2$ com ácido clorídrico (HCl) (1:1).

4.10.3. Espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS)

A quantificação de cromo foi realizada nas dependências do Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA) no departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, através do aparelho *Varian 50-B* (Figura 8).

Figura 8 - Equipamento utilizado para quantificação de cromo



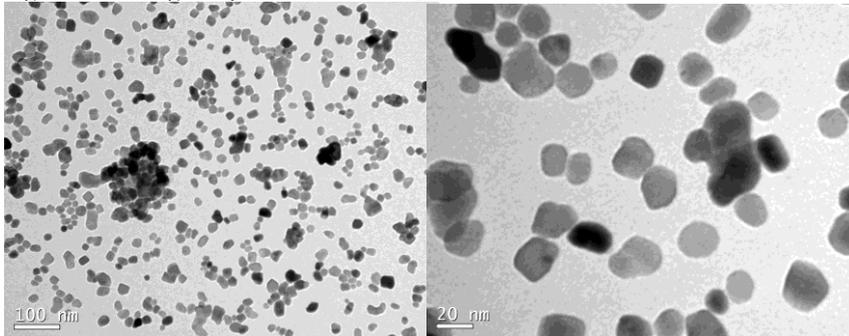
Fonte: o autor

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA

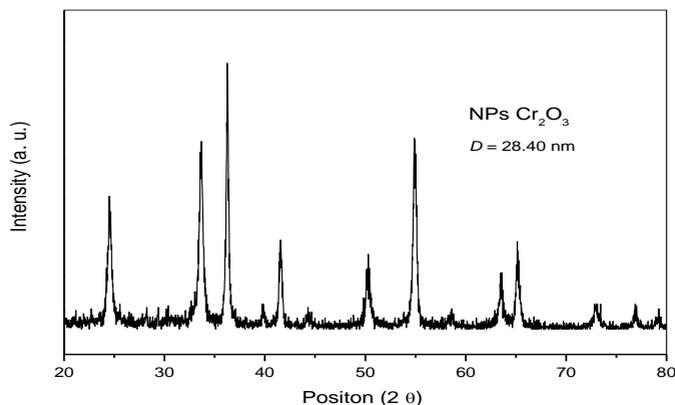
Através da microscopia eletrônica de transmissão – MET (Figura 9), pode-se observar que a amostra de NP Cr_2O_3 possui morfologia irregular com rara formação de aglomerados. O tamanho estimado da amostra varia entre 15 e 30 nm, estando dentro escala considerada nanométrica.

Figura 9 – Micrografia por MET da NP Cr_2O_3



Fonte: o autor

O difratograma obtido do DRX (Figura 10) apresenta os mesmos picos encontrados na literatura (JCPDS card, n° 85-0869), identificando a amostra como óxido de cromo III e indicando sua pureza. O diâmetro médio do cristalito obtido pela equação de Debye-Sherrer foi de 28,40 nm.

Figura 10 – Difratoograma NP Cr₂O₃

Fonte: o autor

Ao realizar a comparação entre os valores de diâmetro obtidos visualmente pelo MET com o diâmetro médio do cristalito calculado através do DRX, pode-se supor que na amostra utilizada uma nanopartícula de Cr₂O₃ é formada por um cristalito.

Os resultados provenientes das outras técnicas de caracterização são encontrados na Tabela 4.

Tabela 4 - Parâmetros de caracterização de NP Cr₂O₃

PARÂMETRO	RESULTADO
Potencial Zeta	-19,65 ± 0,27 mV
Área Superficial	16,008 m ² /g
pH em meio de cultivo <i>D. magna</i>	7,23
pH em água ultrapura	6,87

Fonte: o autor

Em relação ao potencial Zeta, o valor encontrado (-19,65 mV) demonstra pouca estabilidade da amostra em suspensão. Um estudo realizado por Wiśniewska & Szewczuk-Karpisz (2013) mostrou que uma

amostra de Cr_2O_3 em $\text{pH} = 3$ apresentou potencial zeta igual a 40 mV, sendo considerado estável. Em $\text{pH} = 6$, observou-se que o óxido de cromo III apresentava instabilidade, promovendo a coagulação das partículas em suspensão (WIŚNIEWSKA & SZEWCZUK-KARPISZ, 2013).

Segundo o manual do equipamento utilizado no ensaio, para a solução ser considerada estável, o potencial zeta deve apresentar valor absoluto acima de 30 mV (MALVERN, 2004).

5.2. TESTES TOXICOLÓGICOS

5.2.1. Teste Agudo com *D. magna*

O resultado obtido pelo teste agudo pode ser observado na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados dos testes agudos com *D. magna*

pH	CE ₅₀	Controle Negativo	Controle Positivo
7,83	6,79 mg/L	Não houve efeito tóxico	0,833 mg/L

Fonte: o autor

Freitas (2006) testou a exposição aguda de *Daphnia similis* a cloreto de cromo III para avaliar o efeito das micropartículas de Cr(III), chegando a CE₅₀ igual a 3,24 mg/L. Este valor é cerca de duas vezes mais tóxico do que o obtido para a NP Cr_2O_3 utilizada no presente estudo. Kühn et al. (1989) apresentam resultados para testes agudos com *D. magna* expostas a Cr(III) (usando cloreto de cromo III) e a Cr(VI) (usando dicromato de potássio) por um período de 24 horas. As CE₅₀ são respectivamente 22 mg/L e 0,93 mg/L. A diferença significativa entre os resultados pode ser explicado pela maior sensibilidade dos organismos *D. similis* em comparação com *D. magna*. Esta hipótese é corroborada por Beatrice (2004) que em seu estudo comparou os dois organismos expostos a dicromato de potássio, concluindo que *D. magna* é a espécie mais resistente ao composto.

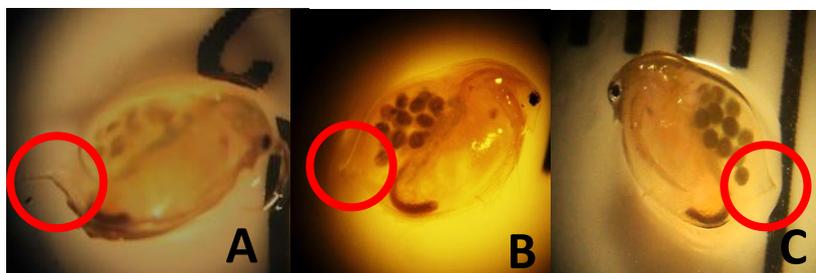
Já Xia et al. (2013) realizou testes agudos com *D. magna* expostas a nanopartículas de metal cromo (tamanho do grão 800 nm), chegando a CE₅₀ equivalente a 0,96 mg/L. Como foi testada a NP Cr em estado puro,

a maior toxicidade observada no ensaio pode estar associada ao estado de oxidação do cromo e não ao seu tamanho.

5.2.2. Teste Crônico com *D. magna*

Para a realização do teste crônico, os organismos utilizados foram retirados de cultura que apresentou sensibilidade igual a 1,03 mg/L para dicromato de potássio. Considerando a CE_{50} proveniente do teste agudo, equivalente a 6,79 mg/L, era de se esperar que não houvesse mortalidade de todos os organismos expostos a concentrações de NP Cr₂O₃ inferiores a esta. Contudo, em testes preliminares, foi observado mortalidade antes dos 21 dias (duração do teste crônico) para as concentrações 0,50 mg/L; 1,0 mg/L; 2,0 mg/L; 3,0 mg/L; 4,0 mg/L e 5,0 mg/L. Nesta última, inclusive, houve a mortalidade de todos os organismos antes de completados dez dias de exposição. Também observou-se efeito crônico sobre a morfologia dos organismos. Ambas as *D. magnas* mostradas na Figura 11-B e C apresentaram encurtamento do espinho apical em relação ao controle (Figura 11-A) quando submetidas à concentração de 0,5 mg/L, cerca de 13 vezes menor que a concentração que causa efeito agudo.

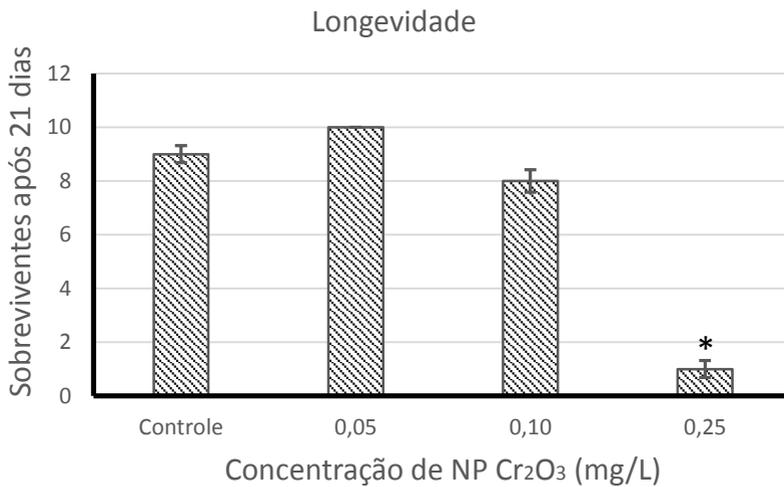
Figura 11 - Alterações morfológicas em *D. magna* expostas à NP Cr₂O₃. A: *D. magna* controle negativo. B e C: *D. magna* com redução de espinho apical (em destaque)



Fonte: o autor

As figuras 12, 13 e 14 apresentam os gráficos correspondentes à longevidade, ao crescimento e à reprodução, respectivamente. Nestes gráficos estão apresentadas somente as concentrações em que houve organismos sobreviventes em 21 dias de exposição.

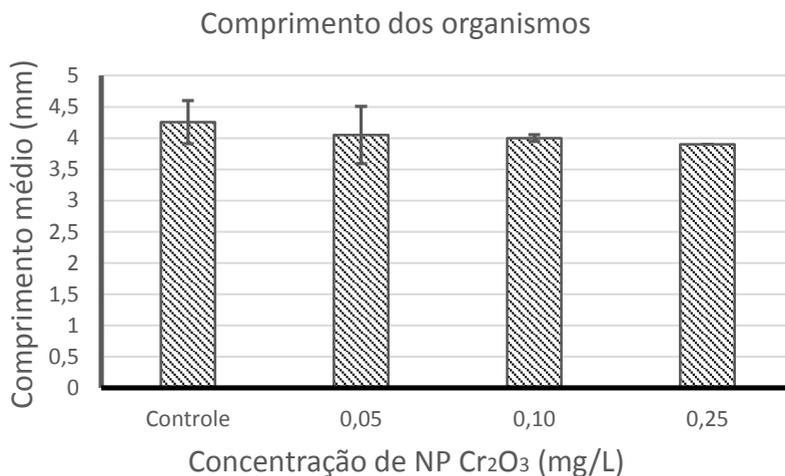
Figura 12 - Resultado para o parâmetro longevidade



Fonte: o autor

Nas diluições 0,10 mg/L e 0,25 mg/L sobraram 8 e 1 organismos respectivamente. Na menor diluição testada, 0,05 mg/L, não ocorreu mortalidade. A única morte observada no controle pode significar descuido no manuseio, sendo que ocorreu no 19º dia de exposição.

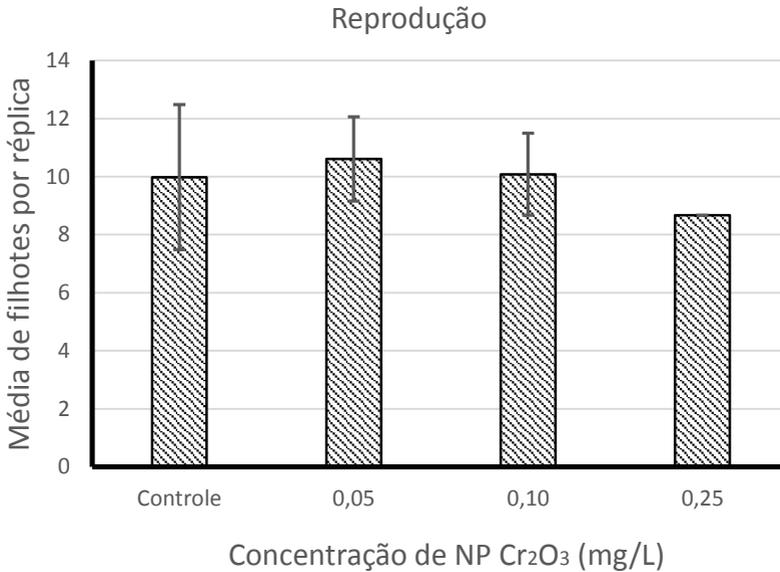
Figura 13 - Resultado para o parâmetro comprimento



Fonte: o autor

Para o crescimento, o comprimento médio dos organismos do controle negativo foi equivalente a $4,25 \pm 0,34$ mm, enquanto que para as outras diluições foram $4,1 \pm 0,46$ mm para 0,05 mg/L, $4,00 \pm 0,05$ mm para 0,10 mg/L e 3,9 mm para 0,25 mg/L. Sendo que nesse parâmetro não foi observado diferença significativa entre os tratamentos e o controle.

Figura 14 – Resultado para o parâmetro reprodução



Fonte: o autor

A reprodução observada no controle negativo foi equivalente a $9,98 \pm 2,50$ filhotes por réplica, enquanto que nas diluições foram $10,61 \pm 1,45$ filhotes por réplica para 0,05 mg/L, $10,08 \pm 1,42$ filhotes por réplica para 0,10 mg/L e 8,7 filhotes por réplica para 0,25 mg/L.

Após análise estatística dos valores através do software Dunnet, chegou-se aos resultados para CEO e CENO, contidos na Tabela 6.

Tabela 6 – Resultados de CEO e CENO para teste crônico

Parâmetro	Longevidade	Crescimento	Reprodução
CEO	0,25 mg/L	> 0,25 mg/L	> 0,25 mg/L
CENO	0,10 mg/L	0,25 mg/L	0,25 mg/L

Fonte: o autor

Xia et al. (2013) também realizaram a exposição crônica de *D. magna* a NP de cromo. A CENO obtida foi equivalente a 0,002 mg/L. Outro dado relevante é que na concentração 0,01 mg/L, ocorreu inibição da reprodução. Kühn et al. (1989) realizaram teste crônico com *D. magna* expostas a cloreto de cromo III a fim de averiguar a toxicidade do Cr³⁺. A CENO encontrada foi igual a 0,70 mg/L, referente ao parâmetro de reprodução.

5.2.3. Teste com *A. fischeri*

Para a sensibilidade dos organismos, foi utilizado o lote de bactérias 12B4010 e a CE_{50,15min} resultante foi igual a 3,01 mg/L, garantindo confiabilidade de resultados.

Utilizando o mesmo lote de bactérias, o resultado encontrado de duas leituras, uma com exposição da NP por 15 minutos (CE_{50,15min}) e outra por 30 minutos (CE_{50,30min}), está descrito na Tabela 7.

Tabela 7 - Resultados para teste com *A. fischeri*

pH	CE _{50,15min}	CE _{50,30min}
6,09	16,10 mg/L	12,91 mg/L

Fonte: o autor.

Os resultados encontrados estão próximos a CE₅₀ encontrado para o organismo *D. magna*, indicando que a amostra é tóxica para o organismo *A. fischeri*.

5.2.4. Testes com *L. sativa* L.

Os resultados referentes à taxa de germinação estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Porcentagem de germinação de *L. sativa* L.

	Controle Negativo	50 mg/L	100 mg/L	250 mg/L	500 mg/L	Controle Positivo
Porcentagem de Germinação	100%	98,0%	100%	100%	98,0%	96,3%

Fonte: o autor

A não germinação de sementes nas diluições 50 mg/L e 500 mg/L pode estar atribuída à má qualidade das mesmas, uma vez que não houve ocorrência semelhante nas concentrações intermediárias.

Os resultados dos tamanhos das plântulas com respectivos desvios padrão se encontram na Tabela 9.

Tabela 9 - Comprimento médio (cm) das radículas para cada diluição

Controle Negativo	8,00 ± 2,43 cm
50 mg/L	5,90 ± 1,73 cm
100 mg/L	4,20 ± 1,39 cm
250 mg/L	2,90 ± 0,74 cm
500 mg/L	2,10 ± 0,51 cm
Controle Positivo	1,60 ± 0,49 cm

Fonte: o autor

A comparação das médias dos comprimentos das radículas pelo teste de Tukey (através do software *Action*) indicou que os valores para as diluições 250 mg/L e 500 mg/L não possuem diferença significativa entre elas. Também não foi constatada diferença significativa entre as médias da concentração 500 mg/L e do controle positivo.

A significativa diferença entre o comprimento médio do controle negativo (água destilada) e do controle positivo ($K_2Cr_2O_7$) é corroborada por Gorsuch, Ritter & Anderson (1995), que relacionam a presença de Cr(VI) com a redução do tamanho das radículas das sementes de alface testadas.

5.3. QUANTIFICAÇÃO DE CROMO

As médias de quantificação em meio ISO de cromo total, pela digestão ácida, e do cromo biodisponível, pela digestão parcialmente ácida, são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Concentrações de Cr em diferentes diluições de NP Cr₂O₃ em meio ISO

	CROMO TOTAL	CROMO BIODISPONÍVEL
Controle Negativo	0,166 ± 0,006 mg/L	0,104 ± 0,003 mg/L
2 mg/L	0,254 ± 0,025 mg/L	0,215 ± 0,008 mg/L
4 mg/L	0,369 ± 0,020 mg/L	0,345 ± 0,021 mg/L
10 mg/L	0,643 ± 0,019 mg/L	0,555 ± 0,038 mg/L

Fonte: o autor

A partir do Teste de Tukey, sabe-se que todas as concentrações de cromo em meio ISO possuem diferenças significativas entre si, tanto as de cromo total quanto de cromo biodisponível.

Para todas as concentrações de NP Cr₂O₃ investigadas, os valores de cromo se encontram abaixo do valor limite de Cr(III) permitido pela resolução CONAMA 430/2011, que é de 1,0 mg/L. Assim, para a CE₅₀ = 6,79 mg/L apresentada no teste agudo com *D. magna*, presume-se que a concentração de cromo total na diluição esteja entre os valores de 0,369 mg/L e 0,643 mg/L. Utilizou-se o método de regressão linear para a obtenção da concentração aproximada de cromo para a CE₅₀ 6,79 mg/L de NP Cr₂O₃, resultando em 0,492 mg/L. Da mesma maneira, considerando os resultados de cromo biodisponível, a CE₅₀ apresenta concentrações de cromo entre 0,345 mg/L e 0,555 mg/L, com valor aproximado de 0,429 mg/L. Assim sendo, pode-se afirmar que há possibilidade de efeitos deletérios nos organismos mesmo quando estes estão submetidos a efluentes com concentrações de cromo inferiores ao limite máximo indicado pela legislação.

O controle positivo foi realizado com 10 mg/L de dicromato de potássio em meio ISO e em água ultrapura. Optou-se por realizar somente a digestão ácida. Em meio ISO o resultado foi igual a 3,80 ± 0,82 mg/L enquanto que em água ultrapura a quantificação extrapolou a curva de calibração realizada no aparelho, indicando que os íons de cromo são mais

facilmente dissolvidos quando não há presença de sais dissolvidos na água de diluição.

A quantificação de cromo no meio M4 é apresentada na Tabela 11.

Tabela 11 - Concentrações de Cr em diferentes diluições de NP Cr₂O₃ em meio M4

	CROMO TOTAL	CROMO BIODISPONÍVEL
Controle Negativo	0,119 ± 0,015 mg/L	0,124 ± 0,004 mg/L
0,25 mg/L	0,171 ± 0,020 mg/L	0,158 ± 0,014 mg/L
2,0 mg/L	0,251 ± 0,024 mg/L	0,251 ± 0,019 mg/L

Fonte: o autor

A menor CEO encontrada no teste crônico com *D. magna* foi 0,25 mg/L. Nesta diluição, a concentração de cromo total encontrada foi igual a 0,171 mg/L, ou seja, inferior ao limite máximo permitido para lançamento de efluentes na resolução CONAMA 430/2011 em cerca de 6 vezes. Já a concentração de cromo biodisponível, para a mesma diluição, foi igual a 0,158 mg/L.

Os resultados da quantificação de cromo em meio diluente NaCl são apresentados na Tabela 12.

Tabela 12 - Concentrações de Cr em diferentes diluições de NP Cr₂O₃ em meio diluente NaCl

	CROMO TOTAL	CROMO BIODISPONÍVEL
Controle Negativo	0,037 ± 0,005 mg/L	0,030 ± 0,020 mg/L
2 mg/L	0,109 ± 0,015 mg/L	0,098 ± 0,019 mg/L
4 mg/L	0,168 ± 0,004 mg/L	0,155 ± 0,033 mg/L
10 mg/L	0,344 ± 0,005 mg/L	0,429 ± 0,040 mg/L

Fonte: o autor

A partir do teste com *A. fischeri*, presume-se que ambas CE_{50,15min} e CE_{50,30min} (16,10 mg/L e 12,91 mg/L respectivamente) tenham concentrações de cromo inferiores à permitida pela legislação CONAMA 430/2011. Utilizando o método de regressão linear, obtém-se que para 16,10 mg/L de NP Cr₂O₃, a concentração de cromo total seja

aproximadamente igual a 0,531 mg/L. Da mesma maneira, para 12,91 mg/L de NP Cr₂O₃, a concentração aproximada é de 0,434 mg/L de cromo total. Porém, para o cromo biodisponível, tem-se que para CE_{50,15min} a concentração é 0,665 mg/L e para CE_{50,30min} é 0,536 mg/L. Estes valores são superiores aos resultados oriundos de cromo total. Isto pode ser decorrente da confecção do meio diluente NaCl, realizado em dias diferentes, e da calibração do equipamento.

Na concentração mais alta utilizada no teste com sementes de alface, ou seja, 500 mg/L em água destilada, não foi possível a quantificação, pois esta também extrapolou a curva de calibração realizada no equipamento. Nas análises feitas somente com água destilada (branco) não foi detectada presença de cromo.

6. CONCLUSÕES

Os resultados encontrados neste estudo permitem concluir que:

A NP Cr₂O₃ apresentou toxicidade aguda ao organismo *Daphnia magna* em concentração de cromo inferior à máxima permitida na legislação CONAMA 430/2011;

A NP Cr₂O₃ apresentou toxicidade aguda ao organismo *Aliivibrio fischeri* em concentração de cromo inferior à máxima permitida na legislação CONAMA 430/2011;

Quanto ao teste crônico, a NP Cr₂O₃ apresentou efeito deletério sobre a longevidade dos organismos *D. magna* expostos a concentrações bem inferiores às permitidas na legislação.

Na avaliação realizada com sementes de alface, não foi observado nenhum efeito significativo na germinação destas nas concentrações investigadas. Quanto ao crescimento das radículas, houve efeito tóxico em todas as concentrações investigadas em comparação ao controle negativo. Em 500 mg/L foi observada toxicidade semelhante à proveniente de dicromato de potássio.

7. RECOMENDAÇÕES

A partir da pesquisa realizada, percebe-se a importância da toxicologia ambiental na avaliação dos produtos da nanotecnologia.

Para estudos futuros recomenda-se:

Realização de novos ensaios crônicos com *Daphnia magna* para obtenção de CEO e CENO para os parâmetros de reprodução e crescimento.

Realização de teste com sementes de *Lactuca sativa* abrangendo concentrações superiores às investigadas para determinar a concentração que causa efeito na germinação. Também realizar teste com concentrações inferiores às investigadas para determinar a concentração que não gera diferença significativa sobre os tamanhos das plântulas com o controle negativo.

Investigar o efeito de bioacumulação nos organismos a partir de ensaios de toxicidade em diferentes níveis tróficos.

Investigar a toxicidade da NP Cr₂O₃ em nível celular a fim de compreender os efeitos da exposição da amostra no interior dos organismos.

BIBLIOGRAFIA

ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **Nanotecnologias: subsídios para a problemática dos riscos e regulação**. Brasília. 2011.

AHAMED, M. et al. **Nickel oxide nanoparticles exert cytotoxicity via oxidative stress and induce apoptotic response in human liver cells (HepG2)**. *Chemosphere*, v. 93, issue 10, 2514-2522. 2013.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION. **Standard methods for the examination of water and wastewater**. 20 ed. Washington: APHA, 1998.

ARAÚJO, T.S.; SANTOS-FILHO, J.B. **Hidroxiapatita pura e dopada com Cr³⁺**. 1ª edição, Aracajú, 2008.

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS: **NBR 15.411-3** – Ecotoxicologia aquática – Determinação do efeito inibitório de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bactéria luminescente) Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. 2006.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry, 2011. Disponível em:
<<http://www.atsdr.cdc.gov/substances/toxsubstance.asp?toxid=17>>, acessado em Agosto de 2013.

ATSDR - Agency for Toxic Substances and Disease Registry. **Toxicological profile for chromium**. Syracuse: U.S. Department of Health & Human Services, 2000.

BAIRD, C.; CANN, M. **Química ambiental**. Tradução de Marco Tadeu Grassi. 4. ed., Porto Alegre: Bookman, 2011.

BAÑOBRE-LÓPEZ, M., et. al. **Magnetic proprierts of Chromium (III) oxide nanoparticles**. Nanotechnology 14, p318-322. 2003.

BARROS, D. **Avaliação da ecotoxicidade de solos contaminados por hidrocarbonetos**. 2007. Monografia (Graduação em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Escola de Química, Rio de Janeiro. 2007.

BARROS, M. A. S. D.; SOUZA-AGUIAR, E. F. **O processamento de peles**. Maringá: Departamento de Engenharia Química da UEM, 2001.

BEATRICI, A. C. **Avaliação da fertilidade e sensibilidade de *Daphnia similis* e *Daphnia magna* (crustacea, cladocera) submetidas a diferentes tipos de dietas e meios de cultivo**. Dissertação (Mestrado em Ecologia) – Programa de Pós-Graduação em Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Regras para análise de sementes**. Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília, 2009.

BOSSARDI, K. **Nanotecnologia aplicada a tratamentos superficiais para o aço carbono 1020 como alternativa ao fosfato de zinco**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais. Área de Concentração: Ciência dos Materiais) – Departamento de Materiais da Escola de Engenharia da UFRGS, Porto Alegre. 2007.

BRILHANTE, O. M.; CALDAS, L.Q.A. **Gestão e avaliação de risco em saúde ambiental**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 155 p. 1999.

CAMPOS, C. E. M. **Estudo de propriedades físicas de nanomateriais produzidos por síntese mecânica**. Tese de Doutorado. Programa de Pós-Graduação em Física da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2005.

CHASIN, A. A. da M.; AZEVEDO, F. A. **Intoxicação e avaliação da toxicidade**. As bases toxicológicas da Ecotoxicologia. Rima, São Paulo, São Carlos, 2003.

CLARE, J. **Daphnia: Na aquarist's guide**. Disponível em:
<<http://www.caudata.org/daphnia/>> Acesso em 17/11/2013.

COSTA, C. H. **Estudo ecotoxicológico para valorização do resíduo produzido no processo de polimento de piso porcelanato na indústria cerâmica**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC), 2010.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY: **EPA 3010A** - Acid digestion of aqueous samples and extracts for total metals for analysis by FLAA or ICP spectroscopy. 1992.

FERNANDES, A.A.; MARTINEZ, H.E.P.; PEREIRA, P.R.G.; FONSECA, M.C.M. **Produtividade, acúmulo de nitrato e estado nutricional de cultivares de alface, em hidroponia, em função de fontes de nutrientes**. Horticultura Brasileira, Brasília, v. 20, n. 2, p. 195-200, junho 2002.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. **Nanotecnologia: Aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise**. Quim. Nova, Vol. 32, No. 7, 1860-1870, 2009.

FIESC - FEDERAÇÃO DAS INDÚSTRIAS DE SANTA CATARINA. **Santa Catarina Industrial**. Disponível em:
<http://www2.fiescnet.com.br/web/pt/site_topo/pei/info/santa-catarina-industrial>. Acesso em 16/11/2013.

FREITAS, T. C. M. **O cromo na indústria de curtumes de Mato Grosso do Sul, Brasil: Aspectos ecológicos**. Tese (Doutorado) - Programa Multiinstitucional de Pós-Grduação em Ciências da Saúde - Rede Centro-Oeste, convênio Universidade de Brasília, Universidade Federal de Goiás e Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2006.

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

Global Knowledge Partnerships in e-Waste Recycling programme, 2013. Disponível em: < <http://ewasteguide.info/node/219>>, acessado em Junho de 2013.

GORSUCH, J. W.; RITTER, M. L. & ANDERSON, E. R. **Comparative toxicities of six heavy metals using root elongation and shoot growth of three plants species.** Environmental Toxicology and Risk Assessment - Third Volume, ASTM STP 1218. 1995.

HANEY, J.F. et al. **An-Image-based Key to the Zooplankton of North America.** Version 5.0 released 2013. University of New Hampshire Center for Freshwater Biology <cfb.unh.edu> 27 Mar 2014.

HØSBERG, T., LOESCHNER, K., LÖF, D. & SERUP, J. **Tattoo inks in general usage contain nanoparticles.** The British Journal of Dermatology. 2011;165(6):1210-1218. 2011.

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

KRUG, F. J.; NÓBREGA, J. A. & OLIVEIRA, P. V. **Espectrometria de Absorção Atômica.** Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP. São Paulo. 2004. Disponível em: <http://apostilas.cena.usp.br/Krug/AAS%20geral%20parte%201%20revisada.pdf>. Acesso em 07/04/2014.

KÜHN, R. et al. **Results of the harmful effects of water pollutants to *Daphnia magna* in the 21 day reproduction test.** Wat. Res. Vol. 23, No. 4, pp. 501-510. 1989.

LANDIS, W. G. & YU, M. **Introduction of environmental toxicology: impacts of chemical upon ecological systems**. 3^a Ed. Lewis Publishers. 2003.

LIMA, M. I.; **Nanotecnologias**. CNI, SENAI: Brasília, 2004.

LOYAUX-LAWNICZAK, S. et al. **Trapping of Cr by formation of ferrihydrite during the reduction of chromate ions by Fe(II) - Fe(III) hydroxysalt green rusts**. Environ. Sci. Technol. 34, 438-443. 2000.

MALVERN. **Zeta size nano series: User manual**. Malvern Instruments Ltd. 2004.

MATIAS, W. G. **Introdução a Toxicologia**. Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFSC, Florianópolis. 2005.

MATOS, W. O. et al. **Especiação redox de cromo em solo acidentalmente contaminado com solução sulfocrômica**. Química Nova, vol. 31, n. 6, 1450-1454, 2008.

MONSERRAT, J. M. **Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how**. Environ. Int., 36: 226 – 235. 2010.

NEMMAR, A. et al. **Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans**. Circulation 105, 411–414. 2002.

NEWMAN, M. C.; UNGER, M.A. **Fundamentals of Ecotoxicology**. 2nd ed. Florida: Lewis Publishers, 458p. 2003.

NNI – National Nanotechnology Initiative. **What is nanotechnology?** United States National Nanotechnology Initiative, 2013. Disponível em: < <http://www.nano.gov/nanotech-101/nanotechnology-facts> > Acesso em 21/11/2013.

OBERDÖRSTER, G. et al. **Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles**. Environ Health

Perspect, National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine. 2010.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. **Os Nanomateriais e a Questão Ambiental**. Quím. Nova, vol.33, no.2, São Paulo. 2010.

RAGHUNATHAN, V. K. et al. **Influence of particle size and reactive oxygen species on cobalt chrome nanoparticle-mediated genotoxicity**. Biomaterials, v. 34, issue 14, 3559-3570. 2013.

RAND, G. M.; WELLS, P. G. & MCCARTY, L. S. **Introduction to aquatic toxicology**. In: RAND, G.M. (ed.). Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment. 2nd edition. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis. 1.125p. 1995.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. **Ensayos Toxicológicos Y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas – Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones**; Morales, G. C., Ed.: Centro Internacional de Investigaciones para El Desarrollo: Ottawa, cap. I, 2004.

ROSSETTO, A. L. O. F. **Estudo comparativo entre os efeitos tóxicos agudos e crônicos do óxido de cobre na forma de nanopartícula e micropartícula**. 2012. Dissertação (Mestrado em Engenharia Ambiental) – Programa de Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis (SC), 2012.

SACKS, T.; BARCAUI, C. **Laser e luz pulsada de alta energia - indução e tratamento de reações alérgicas relacionadas a tatuagens**. An bras Dermatol, Rio de Janeiro, 79(6):709-714, nov/dez. 2004.

SANTOS, M. A. P. F. d. **Avaliação da qualidade da água e sedimento da sub-bacia do Rio Corumbataí (SP) por meio de testes ecotoxicológicos**. Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2008.

SAWYER, C. N. **Chemistry for environmental engineering**. McGraw-Hill series in water resources and environmental engineering, Third Edition, 1978.

SHIMADA, A. et al. **Translocation pathway of the intratracheally instilled ultrafine particles from the lung into the blood circulation in the mouse**. *Toxicol Pathol* 34:949-957. 2006.

SILVA, E. et al. **Propostas à prevenção de riscos ambientais relacionados ao tratamento de superfície com cromato**. Cadernos UniFOA, Volta Redonda, ano 3, Edição Especial, maio. 2008. Disponível em: <http://www.unifoa.edu.br/pesquisa/caderno/especiais/pos-graduacao/01/48.pdf>. Acesso em 17/11/2013.

SILVA, C. S.; PEDROZO, M. F. M. **Ecotoxicologia de cromo e seus compostos**. Cadernos de Referência Ambiental, v. 5. Salvador, 2001.

SOUZA, S. A. M. et al. **Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais**. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, vol. 5 nº. 001. 2005. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=50050101>> Acesso em: 14 de Setembro de 2013.

TROUILLER, B. et al. **Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability *In vivo* in Mice**. *Cancer Res*, November 15, 2009 69; 8784. 2009.

VICENTINI, D. **Tópicos Avançados - Síntese e Caracterização de Nanomateriais Aplicados a Engenharia Ambiental**. Notas de aula. 2014.

WIŚNIEWSKA, M. & SZEWCZUK-KARPISZ, K. **Removal possibilities of colloidal chromium (III) oxide from water using polyacrylic acid**. *Environ Sci Pollut Res Int*. Jun 2013; 20(6): 3657–3669. 2013.

XIA, J. et al. **Acute and chronic effects of metal nanoparticles on *Daphnia magna***. The European Conference on Sustainability, Energy and the Environment 2013. 2013.

ZARBIN, A. J. G. **Química de (nano)materiais**. Quim. Nova, Vol. 30, No. 6, 1469-1479. 2007.