

Avaliação da toxicidade da nanopartícula de
óxido de zinco em microcrustáceo *Daphnia
magna*, bactéria bioluminescente *Aliivibrio
fischeri*, célula de neuroblastoma murino e
sementes de alface *Lactuca sativa*

Isabella Alessandra Nascimento

ISABELLA ALESSANDRA NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DA NANOPARTÍCULA DE
ÓXIDO DE ZINCO EM MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna*,
BACTÉRIA BIOLUMINESCENTE *Aliivibrio fischeri*, CÉLULAS DE
NEUROBLASTOMA MURINO E SEMENTES DE ALFACE *Lactuca
sativa*

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Universidade Federal de Santa Catarina como
parte dos requisitos necessários para obtenção
do Grau de Bacharel em Ciências Biológicas.
Sob orientação do Engenheiro Rodrigo Costa
Puerari

Florianópolis
2016

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que, de certa forma, participaram na elaboração deste trabalho, direta ou indiretamente, especialmente:

À minha família, principalmente meus pais, Altemar e Izabel; o melhor irmão do mundo, Gustavo e; meus gatos, Marie e Gordo, por todo o apoio material e psicológico, todas as conversas e conselhos que recebi, não só durante a graduação, mas sempre.

Ao meu namorado, Gui, pelo suporte emocional, positividade neste momento e a ajuda prestada na confecção e formatação deste trabalho.

Aos amigos que compartilharam momentos bons e ruins comigo e que vão ser sempre lembrados.

Aos membros da banca, pela disponibilidade.

Ao doutorando Rodrigo, pela orientação, dedicação e pelas inúmeras contribuições para a melhoria deste trabalho.

A todos os membros do LABTOX, que fizeram companhia e/ou auxiliaram durante as pesquisas.

“Se os animais pudessem falar, o cão seria um rapaz franco e desajeitado, mas o gato teria a graça rara de nunca dizer muitas palavras”

(Mark Twain)

RESUMO

A nanotecnologia é a ciência que estuda e desenvolve materiais cuja escala extremamente pequena permite um aproveitamento diferenciado dos mesmos. Porém ainda não há regulamentação específica para o uso e descarte de nanopartículas (NP) no Brasil. A nanopartícula de óxido de zinco (NP ZnO) tem chamado atenção devido ao seu uso em cosméticos que possuem fator de proteção solar, entre outras aplicações. Para melhor conhecimento dos possíveis danos causados por essa NP, ao meio ambiente e à saúde, optou-se por realizar testes de toxicologia ambiental em microcrustáceo *Daphnia magna*, bactéria *Aliivibrio fischeri*, célula de neuroblastoma murino (N2A) e semente de alface (*Lactuca sativa*). Através de MET, as NP ZnO observadas possuíam tamanhos entre 20 e 50 nm; a área superficial, que foi obtida através do método BET, foi 4,766 m².g⁻¹. Além disso, avaliou-se o potencial zeta e o tamanho hidrodinâmico das NP ZnO nos diferentes meios de teste, o que indicou baixa estabilidade em suspensão. Para o teste agudo com *D. magna*, obteve-se uma CE_{50,48h} de 4,2 ± 0,7 mg.L⁻¹, sendo classificada com tóxica. Já no teste crônico com *D. magna*, foram observados efeitos sobre a longevidade, reprodução e crescimento das *Daphnia*, sendo obtidas, respectivamente, CEO igual a 1,0; 0,5 e; 1,0 mg.L⁻¹. O ensaio com *A. fischeri* apresentou CE_{50,15min} de 73,55 mg.L⁻¹ e CE_{50,30min} de 23,88 mg.L⁻¹. No ensaio MTT com células N2A, o efeito da nanopartícula de óxido de zinco sobre a viabilidade celular se mostrou dose-dependente, apresentando uma CE_{50,24h} igual a 0,9 ± 0,02 mg.L⁻¹. Os resultados da quantificação do zinco em cada amostra, evidenciaram que, exceto para os testes de crescimento das plântulas de alface e de inibição da bioluminescência de *A. fischeri*, todas as amostras apresentaram quantidades de zinco total abaixo do limite permitido na legislação brasileira e, ainda assim, causaram efeitos tóxicos sobre os organismos testados.

Palavras-chave: Toxicologia ambiental. Nanopartículas. Óxido de zinco. *Daphnia magna*. *Aliivibrio fischeri*. Célula N2A. *Lactuca sativa*.

ABSTRACT

Nanotechnology is the science that studies and develops materials whose extremely small scales allows for differentiated use of them. However, there is still no specific legislation for the use and disposal of nanoparticles (NP) in Brazil. Zinc oxide nanoparticles (NP ZnO) has attracted attention duo to its use in cosmetics that have sunscreen properties, among other applications. To better understand the possible damages caused by this NP, to the environment and health, it was decided to carry out toxicological tests in microcrustacean *Daphnia magna*, *Aliivibrio fischeri* bacterium, murine neuroblastomal cell (N2A) and lettuce seeds (*Lactuca sativa*). Through TEM, observed ZnO NPs were measured between 20 and 50 nm; its surface area, obtained through BET method, was 4,766 m².g⁻¹. Moreover, we evaluated ZnO NPs zeta potential and hydrodynamic size in different media, which indicated low suspension stability. For acute test with *D. magna*, we obtained an EC_{50,48h} of 4,2 ± 0,7 mg.L⁻¹, being classified as toxic. As for the chronic test, we observed effects over longevity, reproduction and growth of *D. magna*, with LOEC results as follow, respectively: 1,0; 0,5 and; 1,0 mg.L⁻¹. *A. fischeri* assay showed EC_{50,15min} of 73,55 mg.L⁻¹ and EC_{50,30min} of 23,88 mg.L⁻¹. For the MTT assay with N2A cells, the effects of ZnO NPs over cell viability proved to be dose-dependent, showing an EC_{50,24h} equal to 0,9 ± 0,02 mg.L⁻¹. Results from zinc quantification in each sample showed that, except for lettuce seedlings growth and *A. fischeri*'s bioluminescence inhibition tests, all samples had total zinc amounts below the allowed threshold by brazilian legislation and, nevertheless, caused toxic effects on the tested organisms.

Keywords: Environmental toxicology. Nanoparticles. Zinc Oxide. *Daphnia magna*. *Aliivibrio fischeri*. N2A cell. *Lactuca sativa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Teste com sementes de alface já germinadas.....	33
Figura 2 – Imagens obtidas por MET: A – ZnO bulk; B – NP ZnO.....	37
Figura 3 – Resultado do parâmetro “Longevidade”.....	41
Figura 4 – Resultado do parâmetro “Reprodução”.....	42
Figura 5 – Médias dos comprimentos das <i>Daphnia</i> após 21 de teste.....	43
Figura 6 – Em A, fotografia de <i>Daphnia</i> com espinho apical sem alteração no tamanho e; em B, fotografia de <i>Daphnia</i> apresentando encurtamento do espinho apical.....	44
Figura 7 – Resultado das médias dos comprimentos das plântulas.....	46
Figura 8 – Viabilidade celular resultante do ensaio MTT com NP ZnO, utilizando célula N2A.....	47

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Quantidades de zinco total permitidas segundo a legislação brasileira.....	21
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de potencial zeta (mV) e diâmetro hidrodinâmico (nm) correspondentes à amostra de NP ZnO diluída em cada meio de teste.....	38
Tabela 2 – Parâmetros do teste crônico e resultados da CEO e CENO.....	40
Tabela 3 – Dados da quantificação do zinco nos respectivos meios de teste.....	48

LISTA DE SIGLAS

AAS – Atomic Absorption Espectrometry/Espectrometria de Absorção Atômica
ABCarb – Associação Brasileira de Carbono
ABDI – Associação Brasileira de Desenvolvimento Industrial
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATP – Adenosina Trifosfato
BET – Brunauer–Emmett–Teller
CE₅₀ – Concentração Efetiva Mediana
CEO – Concentração de Efeito Observado
CENO – Concentração de Efeito Não Observado
CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente
DH – Diâmetro Hidrodinâmico
DMSO – Dimetilsulfóxido
EPA – Environment Protection Agency/ Agência de Proteção Ambiental (dos Estados Unidos)
FAAS – Espectrometria de Absorção Atômica em Chama
FPS – Fator de Proteção Solar
GFAAS – Espectrometria de Absorção Atômica de Forno de Grafite
HDL – High Density Lipoproteína/Proteína de Alta Densidade
HGAAS – Espectrometria de Absorção Atômica de Vapor Gelado
ISO – International Organization for Standardization/Organização Internacional para Padronização
MTT – 3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl) -2,5- difenil brometo de tetrazolina
NNI – National Nanotechnology Initiative/Iniciativa Nacional de Nanotecnologia
NP – Nanopartícula
NP ZnO – Nanopartícula de Óxido de Zinco
OR – Osmose Reversa
OXS – Oxidative Stress/Estresse Oxidativo
PZ – Potencial Zeta
RAS – Regras para Análise de Sementes
ROS – Reactive Oxygen Species/Espécies Reativas de Oxigênio
UE – União Europeia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
2.1. OBJETIVO GERAL.....	17
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
3.1. NANOTECNOLOGIA.....	19
3.2. ZINCO.....	19
3.2.1. Toxicidade do zinco	20
3.2.2. Nanopartícula de óxido de zinco.....	21
3.2.3. Legislação	21
3.3. TOXICOLOGIA AMBIENTAL	22
3.3.1. TESTES TOXICOLÓGICOS	23
3.3.1. Bactéria marinha <i>Aliivibrio fischeri</i>	24
3.3.2. Células de neuroblastoma murino (N2A)	25
3.3.3. Microcrustáceo <i>Daphnia magna</i>	25
3.3.4. Alface <i>Lactuca sativa</i>	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1. SÍNTESE DA NP ZnO	27
4.2. Preparo da amostra de NP ZnO	27
4.3. CARACTERIZAÇÃO DA NP ZnO.....	28
4.3.1. Área superficial	28
4.3.2. Estabilidade em suspensão e diâmetro hidrodinâmico .	28
4.3.3. Forma e tamanho	29
4.4. CULTIVO DE <i>Daphnia magna</i>	29
4.5. TESTE DE SENSIBILIDADE COM <i>Daphnia magna</i>	30
4.6. TESTE AGUDO COM <i>Daphnia magna</i>	30

4.7.	TESTE CRÔNICO COM <i>Daphnia magna</i>	30
4.8.	TESTE COM <i>Aliivibrio fischeri</i>	31
4.9.	TESTE COM SEMENTE DE ALFACE (<i>Lactuca sativa</i>)....	32
4.10.	CULTURA DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA MURINO	33
4.11.	ENSAIO MTT.....	33
4.12.	QUANTIFICAÇÃO DO ZINCO	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DA NP ZnO	37
5.2.	TESTES TOXICOLÓGICOS	39
5.2.1.	Teste agudo com <i>Daphnia magna</i>	39
5.2.2.	Teste crônico com <i>Daphnia magna</i>	40
5.2.3	Teste com <i>Aliivibrio fischeri</i>	44
5.2.4.	Teste com semente de alface (<i>Lactuca sativa</i>)	44
5.2.5.	Teste MTT	46
5.3.	QUANTIFICAÇÃO DE ZINCO	48
6.	CONCLUSÕES	51
7.	RECOMENDAÇÕES	53
	REFERÊNCIAS	55

1. INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma ciência com crescimento expressivo e busca estudar e desenvolver materiais em escala extremamente pequena (ABDI, 2010), ou seja, de 1 a 100 nanômetros ($1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$) e com alterações em alguma de suas propriedades, como modificações superficiais ou de carga, por exemplo (ISO, 2005).

Devido ao tamanho reduzido, os nanomateriais possuem uma área superficial muito maior do que as partículas macroscópicas. Isso lhes confere propriedades físicas e químicas distintas, já que possuem maior contato com a matriz em que estão inseridas (ASSIS et al., 2012). Isto permite um aproveitamento diferenciado dessas partículas (QUINA, 2004).

Esse tipo de tecnologia está presente em diversos setores industriais (ABDI, 2010) e uma de suas possibilidades de aplicação é no desenvolvimento de nanomateriais para o diagnóstico e terapias no âmbito clínico. Porém, os riscos que as populações estão submetidas a partir da exposição a esses materiais a longo prazo ainda carecem de estudos. O que se sabe é que por conta das suas pequenas dimensões, os nanomateriais têm alta capacidade penetrar nos organismos (CANCINO; MARAGONI; ZUCALOTTO, 2014). Os pulmões e intestinos são as vias mais comuns de absorção e de uma consequente contaminação, mas os nanomateriais podem entrar na circulação e atingir outros órgãos como o fígado e rins (HOET; BRÜSKE-HOHLFELD; SALATA, 2004).

Em se tratando de meio ambiente, há risco de contaminação, visto que as nanopartículas possuem grande área superficial, boa capacidade de dispersão, aglomeração e penetram os organismos por difusão e adesão celular (KLAINÉ et al., 2008), podendo causar danos cumulativos nas teias alimentares (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010), já que possui alta resistência à degradação (QUINA, 2004).

O descarte inadequado soma outro fator de risco para o meio ambiente. (SANTOS, 2014), pois o pequeno tamanho dessas partículas, que favorece sua difusão e transporte na atmosfera, águas e solos também dificulta sua remoção por técnicas usuais de filtração (QUINA, 2004).

O óxido de zinco (ZnO) foi, tradicionalmente, muito utilizado na indústria de borracha, adesivos, cosmética, farmacêutica, têxtil, eletrônica, eletrotecnológica e de fotocatalise (KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA; JESIONOWSKI, 2014), propiciando estudos para sua aplicação em nanofios, nanotubos, nanodiscos, nanoplacas, entre outros (MAYRINCK et al., 2014). As nanopartículas de óxido de zinco (NP

ZnO) têm características elétricas e magnéticas promissoras e vêm sendo muito utilizadas na indústria de cosméticos, atuando como fator de proteção solar (REIS, 2014).

Lin e Xing (2007) expuseram sementes de canola, rabanete, azevém, alface, milho e pepino às NP ZnO, concluindo que todas as espécies vegetais apresentaram inibição na germinação das sementes e no crescimento da raiz. Em microcrustáceo *Daphnia magna*, Adam et al. (2015) demonstraram que esse organismo, quando exposto por um período de 10 dias a concentrações subletais de NP ZnO, consegue regular rapidamente a quantidade interna de zinco. O mesmo ocorre quando, subsequentemente, esse mesmo organismo é transferido para um meio sem o contaminante. Portanto, a velocidade de regulação do zinco interno é muito semelhante tanto na fase de exposição à NP quanto na fase de não exposição. Mortimer (2008) realizou teste de toxicidade aguda com a bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*, encontrando alta toxicidade para a exposição ao ZnO, tanto em forma nanométrica quanto em forma bulk (macrométrica). Já os possíveis efeitos causados pela exposição de NP ZnO às células epidérmicas humanas são citotoxicidade, estresse oxidativo e possível peroxidação lipídica (SHARMA et al., 2009).

Apesar da grande utilização das NP e de seus potenciais benefícios para os diversos segmentos da sociedade, ainda não há uma legislação que regule a comercialização dessas (ABDI, 2011). Sabendo disso e da carência de informação acerca dos possíveis efeitos tóxicos das NP, optou-se, neste trabalho, por analisar os efeitos de toxicidade da NP ZnO em organismos que representam diferentes cenários, como água doce (*D. magna*) água salgada (*A. fischeri*), solo (*L. sativa*), bem como os danos à nível celular dentro de um organismo.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a toxicidade das nanopartículas de óxido de zinco em diferentes organismos-teste.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a NP ZnO;
- Avaliar os efeitos da toxicidade aguda para os microcrustáceos *Daphnia magna*, quando estes são expostos à NP ZnO;
- Observar os efeitos subletais quando as *D. magna* são expostas às NP ZnO em teste de toxicidade crônica;
- Avaliar os efeitos da exposição de NP ZnO a sementes de alface (*Lactuca sativa* L.) quanto ao crescimento das plântulas;
- Avaliar a toxicidade da NP ZnO a partir das medidas da inibição de luminescência emitida pela bactéria *Aliivibrio fischeri*;
- Avaliar a viabilidade celular de células de neuroblastoma murino (N2A) expostas à NP ZnO através do teste MTT.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. NANOTECNOLOGIA

Materiais nanoestruturados não são uma descoberta recente. Os romanos já utilizavam, desde o século IV d.C., metais em escala nanométrica para decoração. O exemplo mais antigo e mais famoso é o Copo de Lycurgus. Este era feito a partir de nanopartículas de ouro e prata embebidas em vidro, o qual mudava sua coloração dependendo da escala em que se encontravam as partículas de metais e do local de incidência de luz. Essa técnica também foi muito utilizada em vidraças de janelas (LOGOTHETIDIS, 2011).

A possibilidade de se manusear átomos individualmente (ABCARB, 2014) foi proposta pela primeira vez por Richard Philips Feynman durante um encontro anual de física, em 29 de dezembro de 1959, onde ministrou uma palestra intitulada “There’s Plenty of Room at the Bottom” (TOUMEY, 2008). Mais tarde, em 1974, Norio Taniguchi introduziu o termo “nanotecnologia” (CASANOVA, 2010), mas só em 1986, Kim Eric Drexler publica o livro “Engines of Creation” no qual faz uso do termo de uma forma mais semelhante à atual (LEINONEN; KIVISAARI, 2010).

O prefixo nano significa, em grego, um bilionésimo de qualquer coisa, no caso deste trabalho, a medida em questão é o metro (SCHULZ, 2005). Por terem uma dimensão tão diminuta, os materiais em escala nano promovem inovação na ciência e permitem a criação de novos produtos pela capacidade crescente de se poder manipular átomos.

A nanotecnologia permite a obtenção de materiais mais leves, fortes, duráveis e até melhores condutores de eletricidade, tendo ampla possibilidade de aplicações como filmes finos, em nanoescala, óculos, janelas e visores de computador. Também na área de cosméticos, usam-se nanomateriais para produção de loções, xampus e maquiagens (NNI, 2013). Isso tudo é possível não só por envolver uma partícula nanométrica, mas por ser interdisciplinar, juntando conhecimentos da área da física, biologia, engenharia eletrônica e ciências de materiais (ALICE; RUPPENTHAL, BECK, 2011).

3.2. ZINCO

O zinco é um metal ferroso, sendo o terceiro mais consumido do mundo. É obtido por meio de processos hidrometalúrgicos e tem sua

principal utilização na indústria de galvanização para proteger processos de corrosão e na produção de ligas e produtos químicos (SANTOS, 2009).

É encontrado, principalmente, na forma de sulfetos (combinado ao enxofre) e óxidos (combinado ao oxigênio) ou associado ao chumbo, cobre, prata ou ferro. O zinco também pode estar sob a forma de minérios como a zincita (ZnO), a willemita (Zn_2SO_4) e outros (MEDEIROS, 2012).

No corpo humano, são encontrados cerca de 2 g de zinco, estando 60% presente nos músculos e 30% nos ossos. Há quantidades pequenas presentes no sangue e no suor, quando o zinco é eliminado (MAUGHAN, BURKE, 2004). Participa na estrutura de várias proteínas, tem função imunológica, antioxidante e também ajuda na adaptação da visão noturna.

A deficiência desse metal pode causar diarreia, hipogeusia, atrofia tímica, linfopenia, entre outras complicações (MAFRA; COZZOLINO, 2004), porém há também a questão do excesso desse mineral, nesse caso podendo alterar os níveis plasmáticos normais de cobre, reduzir os níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL), bem como a resposta imunológica (CRUZ; SOARES, 2011).

3.2.1. Toxicidade do zinco

O zinco é um átomo pequeno, que se comporta como ácido de Lewis, pois é capaz de receber um par de elétrons. Ele pode atravessar as membranas celulares tanto por transporte passivo quanto ativo e consegue, inclusive, chegar à corrente sanguínea (HENRIQUES; HIRATA; COZZOLINO, 2003).

Esse metal possui efeito citotóxico quando em altas concentrações (NOLTE et al., 2004) e apresenta potencial de causar danos em neurônios, células da glia e outros tipos celulares, porém não possui efeitos mutagênicos ou carcinogênicos para as células humanas (NRIAGU, 2011).

Segundo Wolff et al. (2009), o zinco apresenta toxicidade significativa, quando testado na planta aquática salvinia (*Salvinia auriculata*), em concentrações entre 2,5 e 10 $mg.L^{-1}$, observando-se clorose nas folhas, ou seja, deficiência na formação dos cloroplastos e, conseqüentemente, na síntese de clorofila, bem como baixo desenvolvimento de raízes e até a morte de alguns indivíduos.

3.2.2. Nanopartícula de óxido de zinco

A NP ZnO é um material semicondutor, isto é, fica entre condutor elétrico e um isolante (LEÃO, 2009), pois possui banda proibida alta, em torno de 3,37 eV, já que os semicondutores se encontram na faixa entre 0,2 e 4,0 eV (BÜRGER, 2011). É, portanto, um sólido cristalino que possui propriedades fotoelétricas, piezoelétricas e estabilidade química (AZEVEDO; WINNISCHOFER, 2002).

O zinco, quando na forma nanométrica, assume novas propriedades como a capacidade de absorver um amplo espectro de radiação, entre elas a radiação ultravioleta (UV), propiciando a inclusão das NP ZnO em protetores solares ou em cosméticos que possuam fator de proteção solar (FPS) em suas fórmulas. Em contrapartida, em ratos, a administração parentérica dessas NP mostrou provocar danos no fígado, coração, baço, pâncreas e ossos. Quando administradas pela traqueia, podem levar ao desenvolvimento pneumonia e até anemia (BOGUTSKA; SKLYAROV; PRYLUTSKYY, 2013).

3.2.3. Legislação

As legislações apenas regulamentam as quantidades de zinco total presentes na água destinada ao consumo humano e as quantidades permitidas no lançamento em efluentes, como mostra o Quadro 1, não tratando, portanto, da forma de nanopartícula.

O Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) possui uma resolução referente aos padrões de lançamento de efluentes (CONAMA, 2011). O Ministério da Saúde, por sua vez, apresenta uma portaria que se refere à qualidade da água para consumo humano e potabilidade – padrão organoléptico de potabilidade (BRASIL, 2004). E a Agência Nacional de Vigilância Sanitária também possui uma portaria referente à quantidade diária máxima recomendada para a ingestão de zinco, no que diz respeito à alimentação humana (ANVISA, 1999).

Quadro 1 – Quantidades de zinco total permitidas segundo a legislação brasileira.

LEGISLAÇÃO	ZINCO TOTAL MÁXIMO
ANVISA 593/2005	7 mg dia ⁻¹
CONAMA 430/2011	5 mg.L ⁻¹

3.3. TOXICOLOGIA AMBIENTAL

Segundo Costa et al. (2008), a toxicologia pode ser dividida em 3 partes: (i) toxicologia clínica, que avalia a toxicidade de drogas, fármacos ou medicamentos em pacientes; (ii) toxicologia forense, que tem finalidade de encontrar toxinas ilegais e; (iii) toxicologia ambiental que procura identificar o destino desses agentes tóxicos, o impactos destes nas teias alimentares e como esses contaminantes podem interferir nos indivíduos ou até na população como um todo.

Para a realização do estudo de toxicologia ambiental é necessário que haja um grande entendimento das estruturas dos organismos utilizados nos testes, pois só assim será possível entender como ocorre a absorção ou intoxicação por um determinado poluente (GALVÃO et al., 2009).

A definição original de toxicologia ambiental foi cunhada por René Truhaut, durante uma reunião do Conselho Internacional das Uniões Científicas, em Julho de 1969. Esta ficou definida como um ramo da toxicologia que estuda os efeitos causados em qualquer organismo vivo por qualquer substância natural ou não. Não obstante, a toxicologia engloba respostas emocionais e psicológicas, além das físicas. Por isso, merece ser estudada em contexto integral (TRUHAUT, 1977).

Os estudos de toxicologia ambiental começaram a ganhar força apenas depois que se associou o surgimento de alguns problemas, como a Doença de Minamata e o enfraquecimento de cascas de ovos, causados pelo envenenamento por mercúrio e o DDT, respectivamente (NEWMAN, 2009).

Desde 1930, a Companhia Chisso, situada na baía de Minamata, no Japão, mantinha uma indústria de fertilizantes e um dos processos envolvia a síntese do acetaldeído (C_2H_4O), que por sua vez liberava um subproduto denominado metilmercúrio (MeHg). Este era despejado no efluente e acabou por contaminar a biota marinha, além de toda a população que se alimentasse de peixes ou outros animais marinhos da região. Apenas 20 anos depois, surgiu o primeiro caso de envenenamento por MeHg, já que essa substância se acumula no organismo mesmo em pequenas quantidades, causando efeito tóxico a longo prazo para o indivíduo e todo o ecossistema (HARADA, 1995; ETO, 2000; MICARONI; BUENO; JARDIM, 2000).

No caso do DDT, ornitólogos analisaram cascas de ovos de museus particulares e foi observada uma queda, repentina, de 17% na espessura de ovos de gavião-da-Europa (*Accipiter nisus*) no ano de 1947,

data que coincide com o início da utilização do DDT na agricultura. Mais tarde foi observado que o afinamento das cascas de ovos também pode ter sido causado pela chuva ácida, formada pela liberação de óxidos de enxofre e nitrogênio, na atmosfera (TOWNSEND; BEGON; HARPER, 2010).

A partir de então, a toxicologia ambiental tornou-se um ramo importante no monitoramento dos ecossistemas e a qualidade destes (VINDIMIAN, 2001).

3.3.1. TESTES TOXICOLÓGICOS

São testes que permitem avaliar a qualidade do meio em questão, como, por exemplo, a água ou solo. Nesses testes, são utilizados organismos vivos sensíveis a baixas concentrações de poluentes, pois assim respondem até às menores alterações no meio em que estão inseridos. Também mostram se os poluentes estão biodisponíveis ou não, quais as possíveis fontes de poluentes ou que medidas tomar para amenizar os possíveis danos causados pela substância (ASKER, 2011).

As toxicidades podem ser subdivididas em (i) aguda, quando o organismo responde a doses altas em curtos espaços de tempo; (ii) crônica, quando um organismo responde apenas à exposição continuada de uma substância e; (iii) recôndita, que provoca sintomas no organismo-teste apenas quando a substância testada se acumula nesse organismo (CARVALHO; PIVOTO, 2011). Para se avaliar a toxicidade de uma substância em um dado período, são realizados testes que permitem encontrar a concentração capaz de causar letalidade ou imobilidade de 50% dos organismos. A essa concentração, dá-se o nome de Concentração Letal Mediana (CL_{50}) ou Concentração Efetiva Mediana (CE_{50}) (CONAMA, 2011). Além disso, diversos parâmetros podem ser observados a partir da realização de testes toxicológicos como alterações morfológicas, efeito sobre reprodução e crescimento, entre outros.

Entre alguns dos critérios mencionados por Martins (2008) para a escolha de um organismo teste estão a alta sensibilidade a substâncias; ser um organismo abundante e de fácil cultivo em laboratório e; possuir um ciclo de vida curto. Além disso, deve-se fazer uma avaliação da sensibilidade desse organismo frequentemente.

Uma das classes de agentes potencialmente nocivos, utilizados em testes, são os metais, que apresentam efeito tóxico sobre organismos aquáticos e têm poder de se acumular ao longo das teias alimentares, podendo ocasionar sérios problemas para a saúde e meio ambiente e, por isso, têm ganhado uma atenção especial (KAHRU et al., 2005).

Bayer e Storm (1995) descreveram uma situação, em Blue Montain, em que foi lançada uma grande quantidade de zinco no ar, pelas fundições, o que levou à inibição do alongamento dos caules de mudas de árvores da região. Radić et al. (2009) observou, em *Lemna minor* (lentilha d'água), que o zinco é capaz de inibir o crescimento, causar diminuição do conteúdo de clorofilas a e b e de carotenoides além de ser capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Em se tratando da nanopartícula de zinco, experimentos realizados com o caracol *Biomphalaria alexandrina*, mostraram que há indução do estresse oxidativo (oxidative stress – OXS) e alterações bioquímicas, levantando questionamentos referentes às implicações ambientais causadas pelas NP ZnO (FAHMY et al., 2014).

3.3.1. Bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*

Aliivibrio fischeri é uma bactéria marinha (VENTURA et al., 2012) e capaz de produzir bioluminescência. Isso é possível porque possui enzimas da classe Luciferase, que são capazes de transformar energia química em luz (BOETTCHER; RUBY, 1990). Essas enzimas são ativadas pelo acúmulo de metabólitos espécie-específicos e podem ser visualizadas em meio de cultura (KAPLAN; GREENBERG, 1985).

À primeira vista, para um ser vivo invisível a olho nu, parece ser irrelevante e um gasto desnecessário de energia produzir essa luz. Entretanto quando um grupo considerável dessas células se juntam, a emissão de bioluminescência é tão significativa que organismos eucariotos complexos, como peixes e lulas, ao longo de sua evolução, desenvolveram órgãos para armazenar tais bactérias, o que os ajuda na caça e provê camuflagem durante a noite (MIYASHIRO; RUBY, 2012).

Heinlaan et al. (2008) avaliou, pela primeira vez em *A. fischeri*, a toxicidade do dióxido de titânio (TiO₂), óxidos de cobre (CuO) e de zinco (ZnO), mostrando que esse último é o mais tóxico dos três, tanto na forma nano quanto na forma bulk (macrométrica). Todos os compostos de zinco se mostraram muito tóxicos para a bactéria *A. fischeri*, sendo que os óxidos de zinco apresentaram toxicidade muito similar ao do o sulfato de zinco (ZnSO₄). Dessa maneira, a toxicidade dos materiais pode estar relacionada à liberação de íons de Zn²⁺ no meio. Para Bondarenko et al. (2013), o zinco deve ser classificado como muito tóxico.

Essa bactéria é um bom modelo de estudo de toxicologia ambiental, pois além de ser sensível a baixas concentrações de tóxicos, a

toxicidade dos componentes testados pode ser avaliada pela inibição da bioluminescência emitida pela bactéria (HWANG et al., 2009).

3.3.2. Células de neuroblastoma murino (N2A)

As células de neuroblastoma murino (N2A) são derivadas de um tumor cujos tecidos tumorais podem ser obtidos de amostras de tumores primários, sendo aspirados da medula óssea ou sangue periférico. A partir disso, as amostras são colocadas em meio de cultura.

Muitas evidências sugerem que essa linhagem de células expressa propriedades neuronais e neuroendócrinas. Além disso, essas células têm a capacidade de se diferenciar de formas distintas, dependendo do estímulo que recebem, o que propiciou o seu uso como modelo em estudos de desenvolvimento de células neuronais e neuroendócrinas (THIELE, 1998).

Para essas células, optou-se por realizar o ensaio MTT, pois o mesmo é eficiente na avaliação de viabilidade celular (SILVA et al., 2015).

3.3.3. Microcrustáceo *Daphnia magna*

Daphnia magna Straus, 1920, é uma espécie de crustáceo de água doce, da classe Branchiopoda (atualmente um grupo parafilético), subclasse Phyllopoda, ordem Diplostraca e subordem Cladocera (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005; ROGERS, 2009).

Os Cladocera são os Phyllopoda mais bem-sucedidos do táxon, pois ao contrário dos Phyllopoda grandes, os Cladocera não estão restritos apenas a ambientes sujeitos a grandes variações temporais. Essa subordem possui 11 famílias, contendo cerca de 600 espécies de microcrustáceos conhecidos como “pulgas-d’água”.

A maioria dos Cladocera mede cerca de 0,5 a 3 mm e possuem, geralmente, uma carapaça de quitina cobrindo todo o corpo, mas não a cabeça (BRUSCA, G. J.; BRUSCA, R. C., 2007). Sendo assim, o corpo fica dividido em cabeça, tórax e abdome. Porém os filopódios são restritos ao tórax e o que realiza a locomoção é o segundo par de antenas, que funciona como remos e também como paraquedas dentro da água. Já os últimos 4 pares de apêndices do tronco, a *Daphnia* utiliza para capturar o alimento (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). Estes apêndices variam entre 1 e 50 µm de comprimento.

Para a distinção entre machos e fêmeas, devem ser observadas as antenas, que são maiores nos machos e o tamanho do corpo que é maior nas fêmeas, além de os machos possuírem um pós-abdome modificado e membros anteriores modificados em ganchos para segurar a fêmea no momento da cópula.

Esses organismos podem se reproduzir sexuadamente, mas também assexuadamente, por partenogênese, se as condições ambientais permitirem, podendo colocar uma ninhada de até mais de 100 ovos a cada 3 dias. Os ovos eclodem, mas os filhotes permanecem na câmara abdominal das fêmeas ovígeras, onde permanecem até a hora de serem liberados para o meio, cerca de 3 dias depois (EBERT, 2005; KATO et al., 2011).

É um animal de fácil cultivo em laboratório, reage a agentes nocivos, possui ciclo de vida e de reprodução curtos e produz descendentes geneticamente idênticos, devido à reprodução assexuada, e isso garante a uniformidade das análises (KNIE; LOPES, 2004). Por isso, a *Daphnia magna* foi utilizada nos testes crônico e agudo.

3.3.4. Alface *Lactuca sativa*

A alface é uma planta de dia longo, ou seja, precisa de um período de iluminação acima do fotoperíodo crítico (WAYCOTT, 1995), e suas sementes são, originalmente, do tipo fotoblástica positivas, pois precisam de luz para que aconteça a germinação (GABRIEL et al., 2002), ainda que hoje em dia já existam muitos cultivares que independem da luz para germinar (SARNO; SILVA; PASIN, 2014).

Não foram encontradas, em órgãos nacionais (Brasil), informações sobre recomendações do uso de sementes em testes toxicológicos, porém Lin e Xing (2007), relatam que a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (EPA) recomenda o uso de algumas sementes para testes toxicológicos, dentre elas, a semente de alface.

Sendo a hortaliça folhosa mais importante no mundo e a mais consumida do Brasil (SALA; COSTA, 2012), suas sementes são amplamente utilizadas para bioensaios na detecção de compostos tóxicos, pois preenchem os critérios de possibilitar um teste rápido, sensível, de fácil execução e de alta confiabilidade (DREWES; SMITH; STADEN, 1995).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi feito no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) e suas dependências, com auxílio dos pesquisadores que deles fazem parte, situado no departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

4.1. SÍNTESE DA NP ZnO

A síntese foi realizada nas dependências do LABTOX pela pesquisadora Dra. Denice Schulz Vicentini.

As nanopartículas de óxido de zinco (NP ZnO) foram preparadas pelo método dos precursores poliméricos (COSTA, et al., 2007) com algumas adaptações. Foram dissolvidos 36,8 mmol de ácido cítrico em água com aquecimento da solução a 60°C. Adicionou-se à solução 18,4 mmol de ZnO com aquecimento de 70 °C. Após, 55,3 mmol de etilenoglicol foram adicionados. A temperatura da reação foi elevada a 80 °C para promover formação de resina polimérica, etapa conhecida como poliesterificação.

A resina polimérica formada foi aquecida em mufla a 350 °C por 1 h, resultando em um *puff* (resina expandida). Triturou-se o *puff* e o pó resultante deste processo passou por uma etapa de calcinação a 500 °C por 1 h com o intuito de eliminar a matéria orgânica.

4.2. Preparo da amostra de NP ZnO

Para cada teste, foi utilizada uma solução contendo NP ZnO com concentrações diferentes para cada tipo de organismo e de teste. Para o preparo de cada amostra foi levado em consideração a anatomia e fisiologia de cada organismo e o tempo de duração dos testes.

Em cada teste, o preparo das amostras envolveu a pesagem em balança de precisão analítica da NP ZnO e diluição nos meios específicos de cada organismo-teste. Após a diluição, as suspensões foram homogeneizadas em ultrassom com haste metálica (modelo *Q500 Sonicator*, 500 W, marca Qsonica, EUA). Cada amostra foi ultrassonicada durante 2 min 30 s a uma amplitude de 33% (equivalente a 165 W), a fim de suspender as partículas presentes na amostra, mas também quebrar aglomerados, evitando que estes se concentrassem sobre os organismos e atuassem como interferentes. Dessa maneira, garante-se que os organismos estejam em contato com o material na forma nanométrica.

4.3. CARACTERIZAÇÃO DA NP ZnO

A caracterização da NP ZnO foi necessária para garantir que a amostra analisada possuía algumas características básicas de uma nanopartícula, como (i) área superficial, (ii) estabilidade em suspensão (iii), forma e tamanho (ROSSETO et al., 2014; PUERARI et al., 2016) e (iv) diâmetro hidrodinâmico (ROSSETTO, 2016).

4.3.1. Área superficial

Para a análise da área superficial, foi utilizado o método de BET (Brunauer, Emmett and Teller), em que se determina o parâmetro físico da superfície de materiais inorgânicos a partir da adsorção de gases. A área superficial pode ser obtida a partir da equação:

$\frac{P}{V_a \cdot P_o} = \frac{1}{V_m C} + \frac{C-1}{V_m C} \left(\frac{P}{P_o} \right)$, sendo V_a o volume de gás adsorvido na pressão P ; P_o na pressão de vapor do gás, V_m o volume aparente da monocamada e C é uma constante (SANTANA et al., 2012).

A análise foi realizada a partir do aparelho *NOVA® Surface Area Analyzer*, modelo NOVA 1200e (Quantachrome Instruments), localizado no Laboratório de Materiais Elétricas (LaMatE), do Departamento de Engenharia Elétrica da UFSC.

4.3.2. Estabilidade em suspensão e diâmetro hidrodinâmico

A estabilidade em suspensão foi averiguada diluindo a NP ZnO em cada meio de teste, sendo esta caracterização realizada nas dependências do LABTOX. Para isso, avaliou-se o [Potencial Zeta](#) (ζ) da amostra por meio do aparelho da marca Brookhaven, modelo *NanoBrook 90 Plus PALS*.

Essa caracterização permite medir a carga eletrostática superficial da NP. Quanto maior o valor do Potencial Zeta, em módulo (entre -100 e -60 mV e entre +60 e +100 mV), maior a chance de não formar aglomerados, logo, maior a estabilidade dessa partícula. Valores baixos (entre -10 e +10 mV) tendem a formar aglomerados, fazendo com que a estabilidade em suspensão seja baixa (DINGER, 2006).

As concentrações empregadas para as leituras foram obtidas a partir das realizações dos testes toxicológicos. Optou-se por utilizar apenas as concentrações em que foram observados efeitos tóxicos, sendo elas: 4,2 mg L⁻¹ de NP ZnO em meio ISO (ensaio agudo *D. magna*), 1

mg L⁻¹ e 0,5 mg L⁻¹ de NP ZnO em meio M4 (ensaio crônico *D. magna*), 73,55 mg L⁻¹ e 23,88 mg L⁻¹ de NP ZnO meio diluente 2% NaCl (ensaio *A. fischeri*), 0,9 mg L⁻¹ de NP ZnO em meio RPMI (ensaio MTT) e 100 mg L⁻¹ de NP ZnO em água de OR (ensaio com *L. sativa*)

Para as leituras dos diâmetros hidrodinâmicos, foram utilizados os mesmos meios nas mesmas concentrações de NP ZnO e também o mesmo equipamento e software. Segundo Ashkarran, Davoudi e Ahmady-Asbchin (2016), o diâmetro hidrodinâmico compreende não só o tamanho da partícula em si, mas também o a camada elétrica que se adere ao redor dessa partícula, quando em meio líquido

4.3.3. Forma e tamanho

A morfologia e tamanho das NP foram analisadas através de microscopia eletrônica de transmissão (MET), pois este permite a visualização de materiais em escala nanométrica. Foi utilizado o equipamento de modelo TEM JEM (JEOL Ltd., Tokyo, Japan), do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), situado na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), a fim de se certificar se a amostra obtida estava dentro da escala nanométrica e, ainda, se apresentava aglomerados.

Foi realizada diluição da NP ZnO em água ultrapura em concentração de 1 g L⁻¹. Após, a solução foi gotejada sobre grid de cobre recoberto por carbono. O mesmo procedimento foi realizado com o ZnO bulk (forma microscópica).

4.4. CULTIVO DE *Daphnia magna*

O cultivo deste microcrustáceo foi feito de acordo com as recomendações da ABNT NBR 12.713/2016. Os organismos foram mantidos em béqueres de vidro de 2 litros cada, ficando armazenados em estufa com temperatura controlada à 18 ± 2 °C e fotoperíodo de 16 h de luz (8 h de escuro). Cada recipiente foi preenchido com volume aproximado de 1200 mL de meio de cultura M4, onde são mantidos até 30 indivíduos.

O meio M4 foi trocado três vezes por semana, sendo os organismos transferidos para o novo meio e alimentados, descartando o meio antigo. A alimentação foi feita no mesmo dia da troca do meio, utilizando a alga *Scenedesmus subspicatus* como alimento. Esta foi introduzida em meio nutriente preparado no laboratório em conformidade com a norma NBR 12.713/2016.

Na troca, apenas foram transferidos para o novo recipiente os indivíduos adultos, assim os filhotes foram descartados em um recipiente com hipoclorito de sódio (NaClO) ou então reservados para a utilização em testes do laboratório.

4.5. TESTE DE SENSIBILIDADE COM *Daphnia magna*

Foi utilizado o dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) como substância de referência, pois é o recomendado pela norma ISO 6341 (ISO, 2012), sendo que os valores devem estar na faixa entre 0,6 mg.L⁻¹ e 1,7 mg.L⁻¹ para a CE_{50,24 h} (adaptado KNIE; LOPES, 2004).

4.6. TESTE AGUDO COM *Daphnia magna*

Para determinar a CE_{50,48h}, foi realizado o teste agudo utilizando *D. magna*. Estes foram os testes utilizados para avaliar a toxicidade sobre as *Daphnia* em um intervalo curto de tempo (48 h) para serem comparadas com o grupo controle, portanto, sem NP ZnO (COSTA et al., 2008). Para manter o grupo controle, foi utilizado o meio ISO, apenas com água de diluição, como descrito pela norma ISO 6.341 (ISO, 2012). Esta norma também recomenda, para o teste agudo, 20 organismos para cada diluição.

Ao todo, foram realizados 4 testes. As concentrações de solução de NP ZnO variaram de 0,630 mg.L⁻¹ até 50 mg.L⁻¹, sendo que a solução-mãe empregada foi de 50 mg.L⁻¹.

A grande variação entre as diluições foi necessária para verificar qual faixa de concentração seria mais adequada para ser analisada nesse tipo de ensaio, mas servindo também como parâmetro para os testes realizados posteriormente neste trabalho.

Esses ensaios foram todos realizados sob condições laboratoriais controladas de acordo com a NBR 12.713/2016 e, ao final de cada teste (após o período de 48 h), foi contabilizado o número de organismos imóveis. Com esse resultado foi possível calcular a CE_{50,48h} a partir de análises estatísticas pelo método *Trimmed Spearman-Kärber*.

4.7. TESTE CRÔNICO COM *Daphnia magna*

Para testes de toxicidade crônica, foram observados os efeitos cumulativos sobre as *D. magna* em um período de tempo de 21 dias. Foram feitas diluições a partir da solução-mãe (500 mg.L⁻¹) a fim de se testar as concentrações de 0,125; 0,25; 0,50 e; 1 mg.L⁻¹.

Ao final desse período, foi contabilizado o número de organismos sobreviventes (que corresponde ao parâmetro Longevidade) e avaliados os parâmetros reprodução e crescimento. Para o parâmetro Reprodução, foi contabilizado o número de filhotes por postura. Já o comprimento dos organismos foi avaliado através de lupa de aumento e papel milimetrado. Pode-se, então calcular os valores de CENO (concentração de efeito não observado) e CEO (concentração de efeito observado) e realizou-se o teste de Dunnett para se obter a significância dos resultados obtidos.

Esse teste foi realizado de acordo com o método ISO 10706 com algumas adaptações (ISO, 2000).

4.8. TESTE COM *Aliivibrio fischeri*

O teste com a bactéria *Aliivibrio fischeri* foi realizado de acordo com a norma ISO 11348-3/2007. A ISO 11348 se refere à avaliação da qualidade da água a partir da determinação do efeito inibidor de amostras de água sobre a emissão de luz da bactéria *Aliivibrio fischeri*. Sendo a parte 3 referente ao teste ser realizado com bactérias liofilizadas (ISO, 2007).

Neste teste utilizou-se o aparelho Microtox® 500 e a metodologia desenvolvida para o uso desse. Com esse aparelho, foi possível medir a luminescência emitida pelas bactérias, devido a existência de um luminômetro que mede e registra a luz emitida pelos organismos (FUZINATTO, 2009).

A temperatura do equipamento é controlada pelo próprio, ficando a série de diluições em $15\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o reagente bacteriano em $3\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tanto o pH como a salinidade e a concentração de O_2 dissolvido são fatores interferentes do teste. Portanto, para que haja sucesso no teste, o pH das amostras deve estar entre 6 e 8,5, a salinidade precisa ser de 2% de cloreto de sódio (NaCl) e não deve haver menos que $0,5\text{ mg.L}^{-1}$ de O_2 dissolvido na amostra. Outro fator importante é a turbidez da amostra, pois se a amostra estiver corada poderá ocorrer perda da luminescência, interferindo na leitura feita pelo aparelho (KNIE; LOPES, 2004; FUZINATTO, 2009).

Primeiramente foi feito o teste de sensibilidade. Neste teste, avalia-se a redução da luminescência das bactérias quando expostas à substância de referência sulfato de zinco (ZnSO_4) após 15 min de incubação. Para validação do teste, são aceitos valores de $\text{CE}_{50,15\text{min}}$ entre 2 e 10 mg.L^{-1} (KNIE; LOPES, 2004). Feito isso, foi realizado o teste com

NP ZnO (solução-mãe: 500 mg.L⁻¹ em meio diluente NaCl), sendo feita a leitura após 15 e 30 min de contato com as bactérias. Para o cálculo da CE_{50,15min} e CE_{50,30min} foi utilizado o software do equipamento, Microtox Omni 4.0.

4.9. TESTE COM SEMENTE DE ALFACE (*Lactuca sativa*)

Os testes foram realizados em placa de petri de vidro, sendo o fundo forrado com papel filtro de 28 µm de porosidade. Foram colocadas 10 sementes por placa, espaçadas igualmente. Os papéis foram umedecidos com solução de NP ZnO (solução-mãe: 1000 mg.L⁻¹) diluída em água de osmose reversa (OR) no início e na metade do teste, de acordo com as Regras para Análise de Sementes – RAS (BRASIL, 2009). A quantidade de solução empregada estava dentro do recomendado pela RAS, sendo de 2 a 3 vezes o peso do substrato (em mg). Esse teste teve duração de 7 dias.

As concentrações utilizadas no ensaio foram consideravelmente mais elevadas que as utilizadas nos ensaios anteriores, uma vez que as sementes possuem a casca de celulose para proteger o embrião, tornando-as mais resistentes ao contaminante empregado.

Com base nisso, as concentrações de NP ZnO utilizadas nas diluições foram de 50 mg.L⁻¹; 100 mg.L⁻¹; 250 mg.L⁻¹; 500 mg.L⁻¹; 1000 mg.L⁻¹. Já para o controle positivo utilizou-se ZnSO₄ (com concentração igual a 100 mg L⁻¹) por ser uma substância de toxicidade melhor conhecida.

Ao final do teste, mostrado na Figura 1, com o auxílio de uma régua e papel milimetrado, as radículas das sementes germinadas foram medidas a fim de observar se houve efeito no seu crescimento.

Figura 1 – Teste com sementes de alface já germinadas.



Fonte: o autor.

4.10. CULTURA DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA MURINO

As células de neuroblastoma murino Neuro 2-A (N2A) foram mantidas a 37 °C e atmosfera contendo 5% de CO₂. O meio de cultura denomina-se “completo” e consiste em um meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) 1640 complementado com 10% de soro de feto bovino, 2% de L-glutamina (200 mM), 1% de penicilina (50 U/mL) e estreptomicina (50 µg/mL) e 1% de piruvato de sódio. Todo esse lote de células foi obtido da Coleção de Cultura Celular Europeia, catálogo número 89121404 (Porton Down, UK) (MELEGARI, 2010).

4.11. ENSAIO MTT

O ensaio consiste em um análise colorimétrica baseada na conversão do sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl) -2,5- difenil brometo de tetrazolina (MTT) em azul de formazan, graças a presença de enzimas mitocondriais que se faz presente apenas em células metabolicamente ativas (SILVA et al., 2015).

As células do cultivo precisaram ser incubadas por 24 h em microplacas de 96 poços, em meio de cultura completo a 37 °C, a 5% de CO₂.

Foram feitas diluições em cascata, em meio RPMI, a partir da solução-mãe (10 mg.L⁻¹), a fim de se obter concentrações de 0,08; 0,16; 0,31; 0,63; 1,25; 2,50; 5,00 e; 10,00 mg.L⁻¹ de NP ZnO. Além disso, foi utilizado um grupo controle positivo (ZnSO₄) e um negativo (apenas com meio RPMI) como parâmetro. As células foram, então, expostas por um período de 24 h.

Ao término desse período, retirou-se o meio contaminante e adicionou-se solução de MTT a uma concentração de 0,5 g.L⁻¹ diluído em RPMI. A placa foi envolvida por papel alumínio e as células expostas à solução de MTT foram incubadas por mais 2 h à 37 °C e 5% CO₂. Após esse tempo, o meio foi removido por inversão da microplaca e adicionou-se 200 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) em cada poço.

Foi, então, utilizada uma leitora automática de microplacas no comprimento de onda de 570 nm para realizar a leitura da absorbância, o que permitiu obter a porcentagem da viabilidade celular e, a partir da curva “Viabilidade Celular x Log da Concentração” foi possível calcular a CE_{50,24h}.

4.12. QUANTIFICAÇÃO DO ZINCO

A quantificação de metais é feita a partir de técnicas de espectrometria de absorção atômica (AAS). Algumas delas são a espectrometria de absorção atômica: de forno de grafite (GFAAS); em chama (FAAS); de formação de hidretos (HGAAS) e a de vapor gelado (CVAAS) (WELZ; SPERLING, 1998).

O processo que consiste na emissão e absorção da energia emitida por átomos na chama foi descrito por Kirchhoff e Bunsen, em 1860 (BROEKAERT, 2002), e, baseado nesse processo, é que 100 anos depois, Walsh desenvolveu uma técnica analítica denominada FAAS (AMORIM et al., 2008).

Essa técnica foi escolhida para a quantificação do zinco neste trabalho, devido aos resultados de ensaios anteriores.

4.12.1. Espectrometria de absorção atômica por chama (FAAS)

A quantificação do zinco (Zn) foi realizada no departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC, no Laboratório Integrado de

Meio Ambiente (LIMA) e, para a realização do procedimento, utilizou-se o Espectrômetro de Absorção Atômica, *Varian 50-B*.

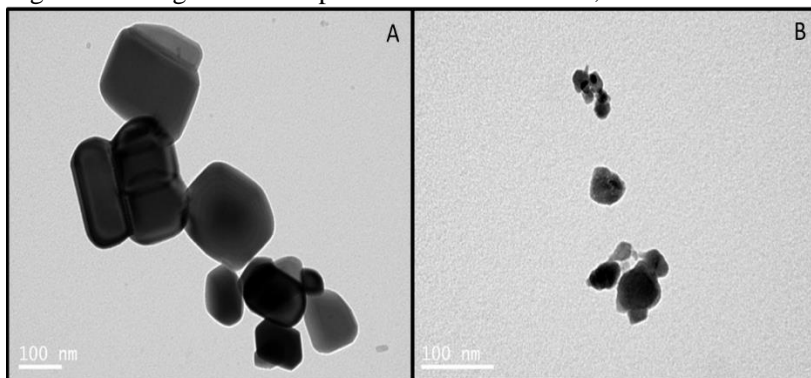
Para a realização da leitura, a NP ZnO foi suspensa nos meios de cultura de cada teste nas concentrações correspondentes à CE_{50} de cada ensaio. Assim, após pesagem em balança de precisão, as soluções foram submetidas ao aparelho de ultrassom por 2,5 min a 165 W de potência. Após, as soluções foram acidificadas a $pH < 2,0$ com ácido nítrico concentrado.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DA NP ZnO

Na Figura 2 são apresentadas micrografias obtidas por MET, onde foi possível observar que na amostra referente à partícula bulk comercial (Figura 2-A), há a presença de partículas com tamanhos de 200 nm e algumas já com dimensões nanométricas (20 a 100 nm). Isto leva a concluir que as nanopartículas sintetizadas a partir desse precursor também se encontram em escala nanométrica. Isso pode ser confirmado pela Figura 2-B, em que são observadas partículas com as dimensões entre 20 a 50 nm.

Figura 2 – Imagens obtidas por MET: A – ZnO bulk; B – NP ZnO



Fonte: o autor.

O valor obtido para a área superficial foi de $4,766 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. Segundo Adams, Lyon e Alvarez (2006), considerações teóricas sugerem que quanto menor o tamanho da partícula, maior a sua área superficial e, conseqüentemente, maior seu efeito tóxico, porém em seu estudo com nanopartículas de TiO_2 , SiO_2 e ZnO , não foi encontrada essa relação. Portanto, deve-se levar em consideração fatores como a química da partícula, sua morfologia, entre outros. O trabalho de Warheit et al. (2006) corrobora com esse dado, pois também não foi observada a relação entre a toxicidade, das nanopartículas e nanobastões, de TiO_2 e o seu tamanho ou área superficial.

Os valores obtidos para o potencial zeta (PZ), diâmetro hidrodinâmico (DH) e pH nos diferentes meios são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de potencial zeta (mV) e diâmetro hidrodinâmico (nm) correspondentes à amostra de NP ZnO diluída em cada meio de teste.

Meio	PZ (mV)	DH (nm)	pH
OR	-17,65 ± 1,33	1732,52 ± 135,21	6,96
ISO	-18,96 ± 2,02	403,60 ± 59,80	6,75
RPMI	-17,05 ± 1,74	872,84 ± 54,94	8,15
M4 (0,5 g.L ⁻¹)	-13,34 ± 1,79	438,99 ± 15,46	7,01
M4 (1 g.L ⁻¹)	-11,84 ± 0,39	511,06 ± 63,63	6,99
Diluyente NaCl (15')	-19,78 ± 0,93	1671,32 ± 83,35	7,08
Diluyente NaCl (30')	-14,93 ± 1,07	539,40 ± 40,24	7,11

O pH da amostra em questão, a concentração, o tipo de íon envolvido e outras partículas presentes na amostra (como é o caso dos meios que contêm sais dissolvidos) afetam na leitura e resultado do potencial zeta (ROSSETTO, 2016).

Os valores obtidos referentes ao potencial zeta foram negativos em todos os meios de teste, sendo, portanto, partículas carregadas positivamente (ROSSETTO, 2016).

Sabe-se que partículas positivas possuem maior tendência a causar efeitos tóxicos devido à interação com membranas celulares que possuem carga negativa, pois quando a NP é carregada negativamente, há a formação de uma barreira eletrostática que limita a interação entre a NP e a célula. Entretanto, quanto mais alto o valor das cargas de uma NP, menor se torna essa barreira eletrostática, permitindo maior interação entre célula e NP, o que resulta em um maior efeito tóxico (BADAWY, 2010),

O módulo dos valores para o potencial zeta foram todos abaixo de 20 mV, o que significa que a nanopartícula testada apresenta uma baixa estabilidade em suspensão (GOUVÊA; MURAD, 2001) e devido à baixa estabilidade, Essas NP ZnO têm tendência em formar aglomerados (HUANG et al., 2010), portanto as leituras do tamanho hidrodinâmico

podem ter sido influenciadas. Isto pode ser observado a partir dos resultados apresentados na Tabela 1 e da Figura 2-B.

Khare et al. (2011) encontraram DH de 250~350 nm para NP ZnO menores que 25 e 100 nm em meio NGM (Nematoid Growth Medium/Meio de Crescimento de Nematóide) e Huang et al. (2010), utilizando NP ZnO de aproximadamente 20 nm, encontraram um diâmetro hidrodinâmico de 300 nm quando os nanomateriais estavam em concentração de 0,1 g.L⁻¹ suspensas em meio de cultura celular. Estes valores se aproxima ao encontrado neste trabalho (403,60 ± 59,80 nm), se comparado ao teste realizado em meio ISO.

Porém Huang et al. (2010) obtiveram área superficial de 47,47 m².g⁻¹. Essa diferença observada, quando comparada a área superficial obtida no presente estudo (4,766 m².g⁻¹) pode ser devido à disparidade de tamanhos das NP utilizadas em cada trabalho, já que, segundo Neville (2015), a área superficial é inversamente proporcional ao tamanho da partícula.

5.2. TESTES TOXICOLÓGICOS

5.2.1. Teste agudo com *Daphnia magna*

O pH das amostras desse teste ficou entre 6,81 e 7,43. A CE_{50,24h} do teste de sensibilidade com dicromato de potássio foi 0,82 mg L⁻¹, estando dentro da faixa recomendada. Para o controle negativo, não houve efeito tóxico.

A CE_{50,48h} obtida a partir dos testes feitos sob a exposição à NP ZnO foi de 4,2 ± 0,7 mg.L⁻¹, o que segundo a classificação da DIRETIVA 67/548/CEE, da União Europeia (UE), qualifica a amostra como tóxica, por apresentar uma CE_{50,48h} entre 1 e 10 mg.L⁻¹ (EUROPEAN UNION, 1967).

Este resultado é corroborado pelo estudo realizado por Wiench et al. (2009), em que foram encontrados valores entre 1 e 10 mg.L⁻¹ para a CE_{50,48h} para o teste agudo com *D. magna*. No estudo de Heinlaan et al. (2008), a CE_{50,48h} encontrada da exposição de NP ZnO comercial (tamanho entre 50 e 70 nm) a *D. magna* foi igual a 3,2 mg L⁻¹. Para Santo et al. (2014), NP ZnO com tamanhos menores que 50 nm apresentaram valor de CE_{50,48h} igual a 1,9 mg L⁻¹ e NP ZnO com tamanhos menores que 100 nm apresentaram valores de CE_{50,48h} igual a 3,1 mg L⁻¹ para ensaios com *D. magna*. Todos estes valores indicam a alta toxicidade da NP ZnO para este organismo.

5.2.2. Teste crônico com *Daphnia magna*

Neste teste foram utilizadas as *Daphnia* neonatas da cultura que apresentou sensibilidade de $0,82 \text{ mg.L}^{-1}$. Na Tabela 2, tem-se os valores, de CEO e CENO, obtidos a partir do teste estatístico. A significância dos resultados foi avaliada através do teste de Dunnett.

Tabela 2 - Parâmetros do teste crônico e resultados da CEO e CENO.

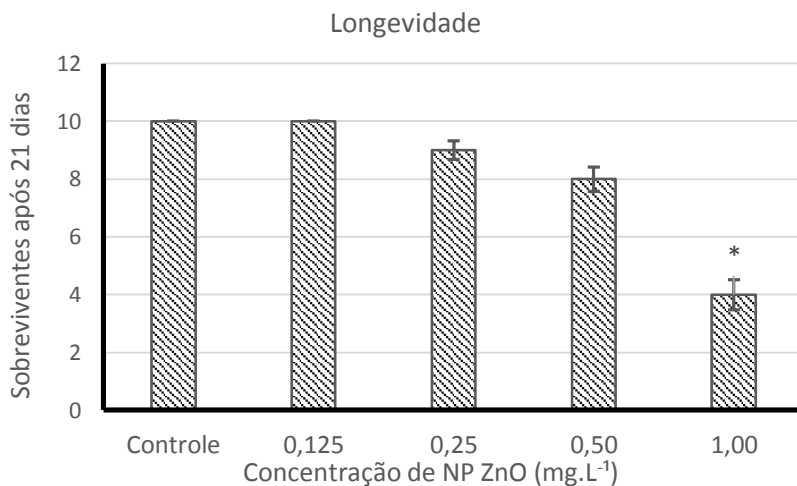
Parâmetro	CEO (mg.L^{-1})	CENO (mg.L^{-1})
Longevidade	1,0	0,50
Reprodução	0,5	0,25
Comprimento	1,0	0,50

Longevidade

A mortalidade da geração parental (P1) só não foi observada na concentração mais baixa ($0,125 \text{ mg.L}^{-1}$), porém foi na concentração mais elevada (1 mg.L^{-1}) onde houve o maior índice de mortalidade (60% dos indivíduos). Nesta concentração, as primeiras mortes de organismos observadas ocorreram a partir do 7º dia de exposição. No grupo controle não foi observado efeito sobre a longevidade. Esse resultado pode ser observado na Figura 3.

Bacchetta et al. (2017) também registraram significante relação entre a diminuição longevidade das *Daphnia* e o aumento da concentração de NP ZnO no meio. Na concentração mais baixa ($0,1 \text{ mg.L}^{-1}$) avaliada pelos autores, foi obtida uma média de longevidade de aproximadamente 64 dias, contra uma média de longevidade de cerca de 56 dias na concentração mais alta ($0,3 \text{ mg.L}^{-1}$).

Figura 3 - Resultado do parâmetro “Longevidade”



Reprodução

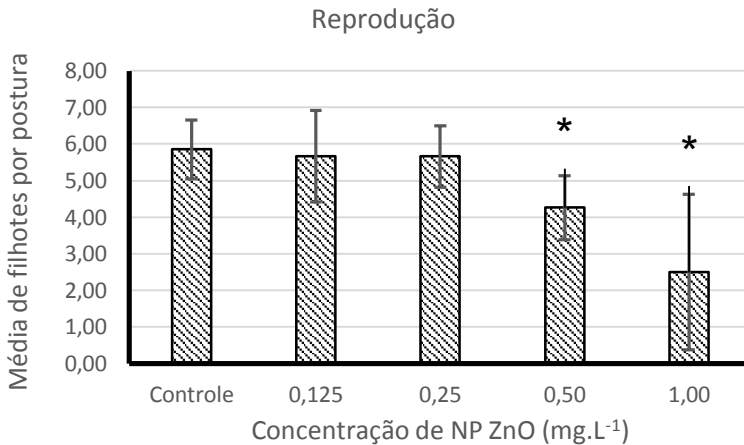
As médias de postura de filhotes por *Daphnia* se mostraram dose-dependentes, ou seja, quando houve aumento na concentração da amostra, houve um decréscimo na postura de filhotes por *Daphnia*, o que mostra que a NP ZnO tem efeito no ciclo reprodutivo desse organismo (como pode ser observado na Figura 4). O mesmo foi encontrado nos resultados de Zhao et al. (2012), em que testaram a toxicidade de NP ZnO em *Daphnia* e, na concentração de 0,0008 mg.L⁻¹, obtiveram média de 7,87 filhotes por *Daphnia*, enquanto à concentração de 0,5 mg.L⁻¹, uma média de 3,42 filhotes. No presente trabalho, foi encontrada uma CEO de 0,5 mg.L⁻¹ e, nesta concentração, foi obtida uma média de 4,26 filhotes por postura por *Daphnia*.

A diluição de 1,0 mg.L⁻¹ apresentou desvio padrão alto ($\pm 2,12$ mg.L⁻¹) por ter havido um número muito alto de mortalidade de organismos. Também vale ressaltar que grande parte dos organismos sobreviventes desta concentração não se reproduziram ao longo dos 21 dias e esta inibição na reprodução pode ter ocorrido devido à presença das NP ZnO.

Nas réplicas em que se supunha a presença de organismos que se comportaram como machos, não houve nascimento de filhotes ao longo de 21 dias. O desvio padrão, portanto, faz com que a diferença das médias de posturas de filhotes entre as diluições de 0,5 mg.L⁻¹ e 1,0 mg.L⁻¹ seja ínfima, $4,26 \pm 0,88$ filhotes/postura e $2,50 \pm 2,12$ filhotes/postura,

respectivamente. Assim não é possível afirmar que uma concentração de $1,0 \text{ mg.L}^{-1}$ traga mais danos na reprodução das *Daphnia* do que uma concentração de $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$. Contudo, em relação ao controle negativo, a reprodução das *D. magna* expostas a ambas as concentrações apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$).

Figura 4 - Resultado do parâmetro “Reprodução”



Comprimento

As médias dos comprimentos das *Daphnia* sobreviventes após os 21 dias de teste foram pouco afetadas pela presença das NP ZnO, sendo que o desvio padrão suavizou ainda mais as diferenças entre as médias. Esse mesmo padrão foi descrito por Adam et al. (2013) em seu trabalho com NP ZnO. Porém, para Zhao e Wang (2011), o comprimento caiu de $3,35 \text{ mm}$ (controle) para $3,13 \text{ mm}$ ($0,05 \text{ mg.L}^{-1}$) após 21 dias de exposição à NP Ag de 20 nm ($p < 0,001$, teste t).

. O grupo controle teve média menor ($3,16 \pm 0,11 \text{ mm}$) do que a média obtida para a diluição de $0,125 \text{ mg.L}^{-1}$ ($3,26 \pm 0,14 \text{ mm}$), $0,25 \text{ mg.L}^{-1}$ ($3,16 \pm 0,17 \text{ mm}$) e $0,50 \text{ mg.L}^{-1}$ ($3,10 \pm 0,19 \text{ mm}$), porém levando em conta o desvio padrão de grupo controle ($0,11 \text{ mm}$), essa médias se sobrepõem, como pode ser visto na Figura 5. Dessa maneira, não é possível afirmar que a presença da NP ZnO no meio contribuiu para o aumento de tamanho dos organismos. A concentração mais alta foi a que apresentou maior efeito inibitório no crescimento, sendo o comprimento

obtido de $2,70 \pm 0,14$ mm estatisticamente diferente em relação ao controle negativo.

Também foi observado o não desenvolvimento do espinho apical (Figura 6-B) nas diluições de 0,25 e 0,50 mg.L⁻¹, porém, nos organismos sobreviventes à concentração mais alta, o mesmo não foi observado.

Figura 5 - Médias dos comprimentos das *Daphnia* após 21 de teste.

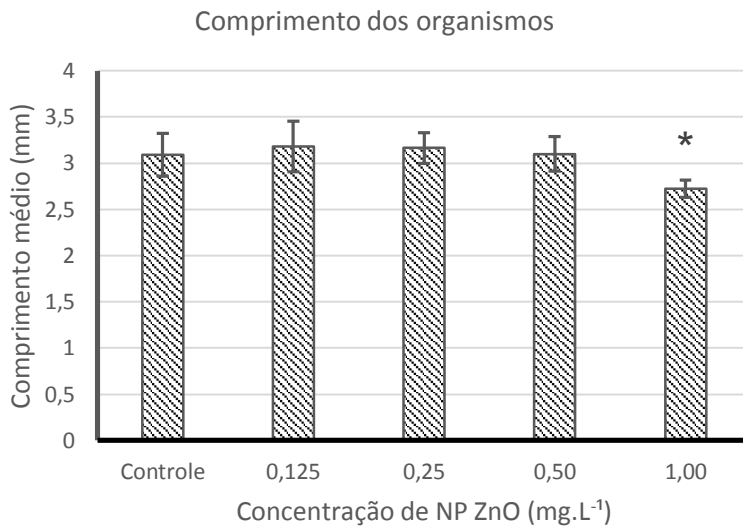
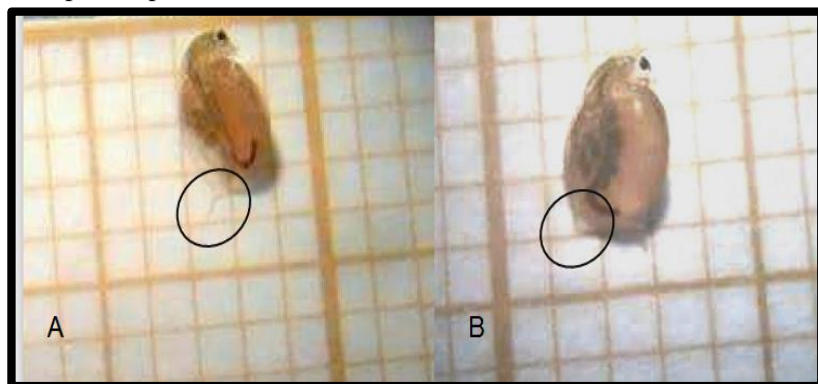


Figura 6 - Em A, fotografia de *Daphnia* com espinho apical sem alteração no tamanho e; em B, fotografia de *Daphnia* apresentando encurtamento do espinho apical.



Fonte: o autor.

5.2.3 Teste com *Aliivibrio fischeri*

No teste de sensibilidade com ZnSO_4 foi obtida uma $\text{CE}_{50,15\text{min}}$ de $4,65 \text{ mg L}^{-1}$. Segundo Knie e Lopes (2004) são aceitáveis valores entre 2 e 10 mg.L^{-1} e, portanto, o teste foi validado. Quando as bactérias foram expostas à NP ZnO, foi obtida uma $\text{CE}_{50,15\text{min}}$ igual a $73,55 \text{ mg.L}^{-1}$ e uma $\text{CE}_{50,30}$ igual a $23,88 \text{ mg.L}^{-1}$. Heinlaan et al. (2008) encontraram $\text{CE}_{50,30\text{min}}$ de $1,9 \pm 0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ quando trabalharam com NP ZnO. Essa diferença pode ter ocorrido devido às diferentes metodologias utilizadas em cada um dos testes, sendo que Heinlaan et al. (2008) utilizou o *Flash Assay*, que consiste em avaliar a inibição da bioluminescência cinética de *A. fischeri*, considerando a cor e a turbidez da amostra.

Por outro lado, Oscar (2015) encontrou um valor um pouco mais alto ($\text{CE}_{50,15\text{min}} = 50,4 \text{ mg.L}^{-1}$), no teste de toxicidade aguda de nanobastão de óxido de zinco (NB ZnO) na bactéria *A. fischeri*, se aproximando mais do valor encontrado no presente trabalho.

5.2.4. Teste com semente de alface (*Lactuca sativa*)

As medidas dos comprimentos das radículas das sementes de alface mostraram que a NP ZnO apresenta efeitos significativos sobre este parâmetro a partir da concentração 500 mg L^{-1} . A Figura 7 apresenta o

gráfico de tamanho das radículas em relação à concentração a que a semente foi exposta. O controle negativo apresentou tamanho médio de $6,09 \pm 1,11$ cm enquanto que o controle positivo, isto é, com 100 mg L^{-1} de ZnSO_4 apresentou comprimento médio de $4,82 \pm 0,83$ cm.

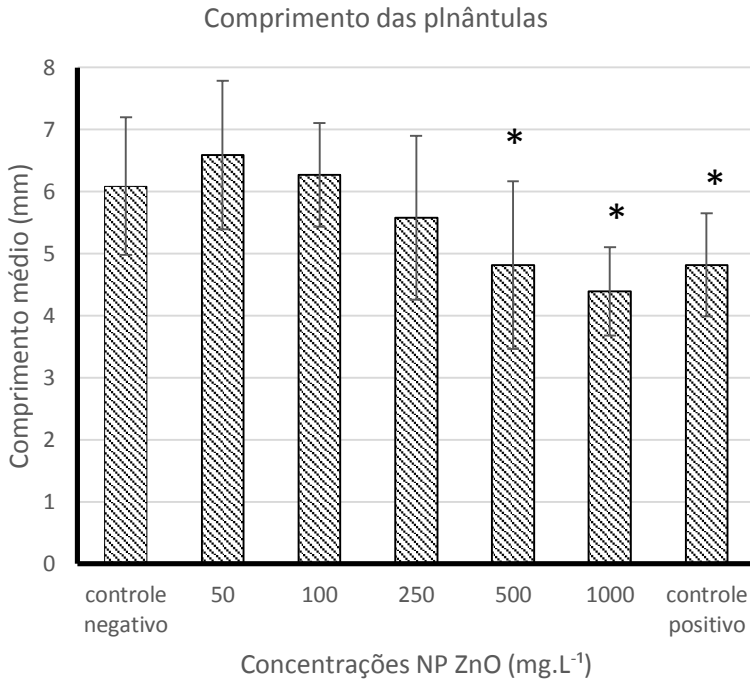
Houve ligeiro incremento no tamanho dos organismos expostos às menores concentrações de NP ZnO (50 mg L^{-1} e 100 mg L^{-1}) quando comparados aos do controle negativo. Porém, da mesma maneira que o parâmetro de crescimento do teste crônico com *D. magna*, este aumento não foi estatisticamente significativo. Logo, não é possível afirmar que houve um efeito de favorecimento de crescimento.

Os comprimentos médios das radículas das sementes expostas a 500 mg L^{-1} e 1000 mg L^{-1} de NP ZnO foram $4,82 \pm 1,36$ cm e $4,39 \pm 0,71$ cm, respectivamente. Estes valores são significativamente diferentes ($p < 0,05$) do controle negativo. Além disso, estes comprimentos são inferiores até mesmo ao comprimento das radículas expostas ao controle positivo, apesar de não ter sido observada diferença significativa entre eles.

Zhao et al. (2013) avaliaram o efeito tóxico da NP ZnO (10 nm) em plantas de pepino (*Cucumis sativus*) em uma concentração de 400 a 800 mg.Kg^{-1} de solo durante 53 dias de estudo, e não foi relatado nenhum sinal visível de toxicidade nem efeito sobre o crescimento das plantas.

Lin e Xing (2007) não observaram inibição significativa do crescimento de raízes de nabo e azevém pela NP ZnO (20 nm) a concentrações inferiores a 10 mg.L^{-1} nem das raízes de rabanete, quando em concentrações inferiores a 20 mg.L^{-1} . Por outro lado, relataram inibição da germinação de sementes de milho pela NP ZnO (20 nm), evidenciando a fitotoxicidade.

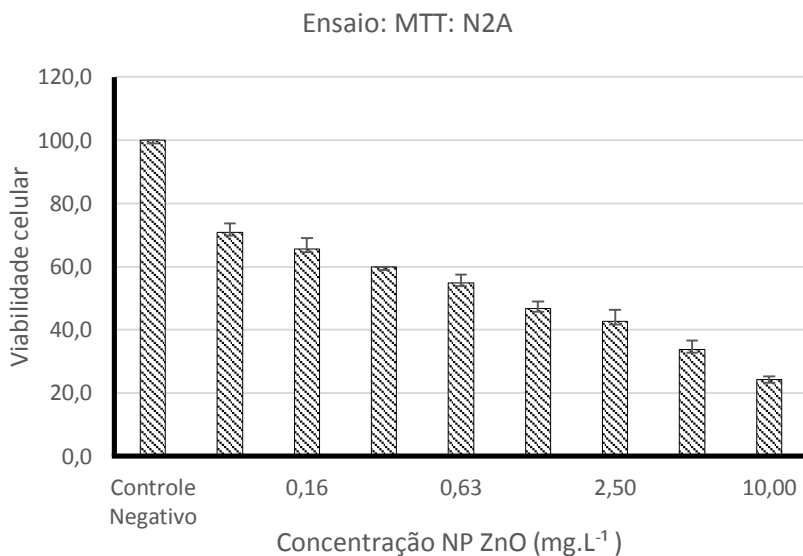
Figura 7 - Resultado das médias dos comprimentos das plântulas



5.2.5. Teste MTT

Nesses ensaios, foi obtida uma $CE_{50,24h} = 0,90 \pm 0,02$ mg.L⁻¹. Já a viabilidade celular pode ser observada na Figura 8.

Figura 8 - Viabilidade celular resultante do ensaio MTT com NP ZnO, utilizando célula N2A.



O ensaio de MTT fornece indícios de danos à mitocôndria. Esta organela é responsável por manter a estrutura e função celular através da produção aeróbica de ATP, sendo um alvo vulnerável quando exposta a substâncias tóxicas (JENG; SWANSON, 2006). Dessa forma, pode-se avaliar a citotoxicidade a partir do comportamento da mitocôndria quando a célula é exposta a uma substância.

Os resultados se mostraram dose-dependentes, ou seja, quanto maior a concentração da NP ZnO, maior o dano à viabilidade celular. O mesmo fenômeno é observado nos trabalhos de Taccola et al. (2011), Deng et al. (2009) e Sharma et al. (2009).

Como pode ser visto, a viabilidade celular foi afetada mesmo na concentração mais baixa da NP ZnO (0,078 mg.L⁻¹). À concentração de 10 mg.L⁻¹ é possível observar que a viabilidade celular cai para 24% em média, diferentemente do dado obtido no estudo de Taccola et al. (2011) em que a uma concentração de 10 mg.L⁻¹ não é possível observar nenhum dano celular. Essa diferença nos resultados pode ter ocorrido devido: à utilização da linhagem de células de neuroblastoma humano (SH - SY5Y), ao invés da célula da linhagem N2A; ao meio de cultura celular não ser o mesmo, já que foi empregado o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Meio de Eagle Modificado por Dulbecco) e; também,

em razão da forma de síntese de NP ZnO ser diferente, resultando em partículas de tamanhos diferentes. No trabalho de Taccola et al. (2011), a NP ZnO apresentou tamanho de 90 a 200 nm, ou seja maior do que a obtida para o presente estudo (20-50 nm).

Jeng e Swanson (2006) realizaram o ensaio MTT e expuseram células da linhagem N2A a diferentes nanopartículas comerciais, sendo TiO_2 , Al_2O_3 , Fe_3O_4 e ZnO. O estudo deles demonstrou que as NP de óxido metálicos possuem efeitos significativos na redução do MTT, especialmente a NP ZnO, sendo este o material que apresentou os efeitos mais citotóxicos entre todos os outros.

5.3. QUANTIFICAÇÃO DE ZINCO

Os resultados obtidos na quantificação do zinco, através do método FAAS permitem avaliar as quantidades de zinco total, liberada pela NP ZnO, presente em cada meio de teste e podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3 – Dados da quantificação do zinco nos respectivos meios de teste.

MEIO	NP ZnO (mg L^{-1})	ZINCO total (mg L^{-1})	Branco (mg L^{-1})
OR	500,00	115,4	N.D.*
ISO	4,20	3,062	N.D.*
RPMI	0,90	0,8138	N.D.*
M4	0,50	0,423	
M4	1,00	0,958	0,0023
Diluyente NaCl (15')	73,55	33,23	
Diluyente NaCl (30')	23,88	9,483	N.D.*

Sabendo que o valor máximo de zinco total permitido para lançamento de efluentes, pela resolução CONAMA 430/2011, é de 5 mg.L⁻¹, observa-se que houve efeito tóxico em concentrações de zinco total quando já estavam muito acima do permitido pelo CONAMA, como é o caso do teste com semente de alface e os testes com a bactéria *Aliivibrio fischeri*.

Por outro lado, no testes agudo com *D. magna*, presume-se que a uma CE_{50,48h} de 4,2 mgL⁻¹ a quantidade de zinco total liberada por essa amostra seja de 3,062 mg.L⁻¹; no teste crônico à 0,5 e 1,0 mg.L⁻¹, haja 0,423 e 0,0958 mg.L⁻¹ de zinco total, respectivamente; também no teste utilizando célula N2A onde se encontrou uma CE_{50,24h} de 0,9 mg.L⁻¹, houve 0,8138 mg.L⁻¹ de zinco total presente na amostra. Portanto, apesar destes valores estarem todos abaixo do permitido pelo CONAMA, é possível observar efeito tóxico da nanopartícula de zinco, sendo então possível que haja efeitos deletérios para os organismos mesmo quando estes estão submetidos a concentrações abaixo daquela permitida na legislação.

Alguns estudos sugerem que a toxicidade da NP ZnO se deve aos íons Zn⁺⁺ liberados no meio, porém não há um consenso na literatura (LOPES, 2012).

6. CONCLUSÕES

Para *Daphnia magna*, a NP ZnO apresentou toxicidade aguda mesmo em concentração abaixo da concentração de zinco total presente em efluentes permitida pela legislação CONAMA 430/2011.

Com base no teste agudo com *D. magna*, a NP ZnO pode ser qualificada como tóxica segundo a classificação da DIRETIVA 67/548/CEE da UE.

Quanto à toxicidade crônica, observada em *D. magna*, a NP ZnO mostrou efeitos deletérios na longevidade e reprodução e efeitos inibitórios no crescimento em concentração de zinco muito inferior à concentração máxima permitida na legislação CONAMA 430/2011.

Para a bactéria *Aliivibrio fischeri*, a NP ZnO apresentou toxicidade aguda apenas quando em quantidades de zinco total muito acima daquelas permitidas na legislação.

Foi observado também, efeito dose-dependentes na viabilidade das células N2A, ocorrendo a diminuição da viabilidades dessas células, mesmo em quantidades bem menores àquelas permitidas na legislação

Quanto aos testes utilizando semente de alface, foi observado efeito inibitório no crescimento das plântulas apenas nas concentrações de 500 e 1000 mg.L⁻¹, ou seja, concentrações onde há quantidade de zinco total bem acima da permitida na legislação. Já o teste de germinação apresentou dados inconclusivos.

7. RECOMENDAÇÕES

Com base nos dados obtidos a partir dos testes realizados neste trabalho e na literatura apresentada, é possível observar que os ensaios toxicológicos são de extrema relevância para o desenvolvimento de novas tecnologias a fim de conhecer os impactos ambientais oferecidos por estas.

Recomenda-se para os próximos estudos:

Realização de testes crônicos com *D. magna* avaliando não só a longevidade da parental, mas também da prole;

Realização de testes que permitam a avaliação da bioamplificação dos efeitos da NP ZnO quando presente em alimento de *D. magna*;

Ensaio com semente de alface em concentrações maiores que 500 – 1000 mg.L⁻¹ a fim de se observar efeitos na germinação;

Ensaio de genotoxicidade utilizando células, a fim de avaliar a interação das NP ZnO com o DNA celular e possíveis alterações na estrutura e função do mesmo.

REFERÊNCIAS

- ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **Nanotecnologias: estudo prospectivo de nanotecnologia**. Brasília. 2010.
- ABDI – Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **Nanotecnologias: subsídios para a problemática dos riscos e regulação**. Brasília. 2011.
- ABCcarb - Associação Brasileira de Carbono. Rio de Janeiro. 2014
- ADAM, N. et al. The uptake and elimination of ZnO and CuO nanoparticles in *Daphnia magna* under chronic exposure scenarios. **Water Research**, p. 249-261, out. 2015.
- ADAM, N. et al. The chronic toxicity of ZnO nanoparticles and ZnCl₂ to *Daphnia magna* and the use of different methods to assess nanoparticle aggregation and dissolution. **Nanotoxicology**, p.1-9, 29 jul. 2013.
- ADAMS, L. K.; LYON, D. Y.; ALVAREZ, P. J. J. Comparative ecotoxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. **Water Research**, v. 40, p.3527-3532, 29 set. 2006.
- ALICE, L.; RUPPENTHAL, J. E.; BECK, R. C. R. A Inovação Em Nanotecnologia Farmacêutica no Bloco Econômico do BRIC. **Revista Ciência e Tecnologia**, p.65-76, jan./dez. 2011.
- AMORIM, F. A. C. et al. Espectrometria de absorção atômica: o caminho para determinações multi-elementares. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p.1784-1790, 11 set. 2008.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 3.029, de 16 de abril de 1999 – Propõe adotar ao regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais, constante do Anexo desta Resolução. 2005
- ASHKARRAN, A. A.; DAVOUDI, S.; AHMADY-ASBCHIN, S. A comparative study of silver nanoparticles and corona discharge for environmental and antibacterial applications. **Journal of Environment & Biotechnology Research**, v. 4, n. 1, p.17-23, 01 jul. 2016.

ASKER, S. **Ecotoxicological test methodology for environmental screening of the european water framework directive's priority substances adjusted to swedish regional conditions**. 2011. 113 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Biology Education Centre, Uppsala University, Karlskrona, 2011.

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

ASSIS, L. M, et al. Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journey of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, abr. /jun. 2012.

AZEVEDO, C. M.; WINNISCHOFER, H. **Nanopartículas de ZnO: síntese a partir da decomposição hidrotérmica de acetato de zinco e caracterização**. In: REUNIÃO ANUAL DA SBQ, 25. Poços de Caldas, MG. Resumos. Curitiba. 2002. 1 p.

EL BADAWY, A. M. et al. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 1, p.283-287, jan. 2010.

BACCHETTA, R. et al. Chronic toxicity effects of ZnSO₄ and ZnO nanoparticles in *Daphnia magna*. **Environmental Research**, v. 152, p.128-140, jan. 2017.

BAYER, W. N; STORM, G. **Ecotoxicological damage from zinc smelting at Palmerton, Pennsylvania**. Boca Raton: Lewis Publishers, 1995. 12 p.

BOETTCHER, K. J.; RUBY, E. G. Depressed light emission by symbiotic *Vibrio fischeri* of the sepiolid squid *Euprymna scolopes*. **Journal of Bacteriology**, California, v. 172, n. 7, p.3701-3706, jul. 1990.

BOGUTSKA, K. I.; SKLYAROV, Y. P.; PRYLUTSKYY, Y.I. Zinc and zinc nanoparticles: biological role and application in biomedicine. **Ukrainica Bioorganica Acta**, v. 11, n. 1, p.9-16, dez. 2013.

BONDARENKO, O. et al. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. **Archives of Toxicology**. v. 87, n. 7, p.1181-1200, jun. 2013

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária. **Portaria nº 2.914, de 12 de dezembro de 2011**. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Diário Oficial da União; Poder Executivo, 2004.

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

BROEKAERT, J. A. C. **Analytical Atomic spectrometry with flames and plasmas**. Leipzig: Wiley-VCH, 2002. 347 p.

BRUSCA, G. J.; BRUSCA, R.C. 2007. **Invertebrados**. 2ª ed. Editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro. 968 p.

BÜRGER, T. S. **Desenvolvimento de filmes de ZnO para aplicação em fotocatalise**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Instituto de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

CANCINO, J.; MARAGONI, V. S.; ZUCALOTTO, V. Nanotecnologia em medicina: aspectos fundamentais e principais preocupações. **Química Nova**. São Paulo, Vol. 37, No. 3, 521-526. 2014.

CARVALHO, N. L.; PIVOTO, T. S. Ecotoxicologia: Conceitos, abrangência e importância agrônômica. **Monografias Ambientais**, Santa Maria, v. 2, n. 2, p.176-192, 2011.

CASANOVA, M. C. R. **Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis**. 2010. 86 f. Dissertação (Mestrado em Química Analítica) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2010.

CONAMA – Conselho Nacional do Meio Ambiente (2005). **Resolução nº 357, de 17 de março de 2005**. Ministério do Meio Ambiente, 23p. 2011.

COSTA, A. C. F. M. et al. Avaliação do tamanho da partícula do ZnO obtido pelo método Pechini. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, Campina Grande, v. 2, p.14-19, dez. 2007

COSTA, C. R. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p.1820-1830, 24 set. 2008.

CRUZ, J. B. F.; SOARES, H. F. Uma revisão sobre o zinco. **Ensaio e Ciências: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, Campo Grande, v. 15, n. 1, p.207-222. 2011.

DENG, X. et al. Nanosized zinc oxide particles induce neural stem cell apoptosis. **Nanotechnology**, Shanghai, v. 20, n. 11, p.1-7, 24 fev. 2009.

DINGER, D. Medidas de pontos isoelétricos sem o uso de analisador de Potencial Zeta. **Cerâmica Industrial**, Clemson, v. 11, n. 3, p.23-24, jun. 2006.

DREWES, F. E.; SMITH, M. T.; van STADEN, J. The effect of a plant-derived smoke extract on the germination of light-sensitive lettuce seed. **Plant Growth Regulation**, Scottsville, v. 16, n. 2, p.205-209, mar. 1995.

EBERT, D. Introduction to *Daphnia* biology. In: EBERT, D. **Ecology, epidemiology, and evolution of parasitism in *Daphnia***. Basel: Bethesda, 2005. Cap. 2. p. 5-18.

ETO, K. Minamata disease. **Neuropathology**, v. 20, n. 1, p.14-19, set. 2000.

EUROPEAN UNION – Diretiva nº 67/548/CEE, do Conselho, de 27 de junho de 1967, relativa à aproximação das disposições legislativas, regulamentares e administrativas respeitantes à classificação, embalagem e rotulagem das substâncias perigosas. Jornal Oficial nº 196, p.0001-0098, 16 ago. 1967.

FAHMY, S. R. et al. Ecotoxicological effect of sublethal exposure to zinc oxide nanoparticles on freshwater snail *Biomphalaria alexandrina*. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 67, n. 2, p.192-202, 16 abr. 2014.

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. 245 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

GABRIEL, A. J. A. et al. Germinação de sementes de alface e de duas ervas invasoras com a aplicação de um novo análogo do estrigol, sintetizado a partir do safrol. **Horticultura Brasileira**, v. 20, n. 4, p.544-546, dez. 2002.

GALVÃO, P. M. A. et al. Bioacumulação de metais em moluscos bivalves: aspectos evolutivos e ecológicos a serem considerados para a biomonitoração de ambientes marinhos. **Brazilian Journal of Aquatic Science and Technology**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 13, p.59-66, 27 nov. 2009.

GOUVÊA, D.; MURAD, B. B. S. Influência das características ácido-básicas da superfície dos óxidos na estabilidade de suspensões cerâmicas de Al_2O_3 ou SnO_2 com dispersantes comerciais. **Cerâmica**, São Paulo, v. 47, n. 301, p.51-56, mar. 2001.

HARADA, M. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. **Critical Reviews In Toxicology**, v. 25, n. 1, p.1-24, jan. 1995.

HEINLAAN, M. et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. **Chemosphere**, v. 71, n. 7, p.1308-1316, abr. 2008.

HENRIQUES, G S; HIRATA, M H; COZZOLINO, S. M. F. Aspectos recentes da absorção e biodisponibilidade do zinco e suas correlações com a fisiologia da isoforma testicular da enzima conversora de angiotensina. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 16, n. 3, p.333-345, set. 2003.

HOET, P. H. M.; BRÜSKE-HOHLFELD, I.; SALATA, O. V. Nanoparticles – known and unknown health risks. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 2, n. 1, p.1-15, 2004.

HUANG, C. C. et al. Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 1, p.45-55, fev. 2010.

HWANG, H. et al. Avaliação de toxicidade em sedimentos do Rio Juqueri (SP) com *Vibrio fischeri* e *Hyaella azteca*. **Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade**, São Paulo, v. 2, n. 2, p.18-28, jun. 2009.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10706**: Water quality -- Determination of long-term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). 2000. 17 p.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 11348-3**: Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (Luminescent bacteria test) -- Part 3: Method using freeze-dried bacteria. 2007. 21 p.

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

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. ISO/TC 229. Technical committees. Nanotechnologies. International Organization for Standardization. 2005.

JENG, H. A.; J.SWANSON. Toxicity of Metal Oxide Nanoparticles in Mammalian Cells. **Journal of Environmental Science and Health**, Part A, v. 41, n. 12, p.2699-2711, dez. 2006.

KAHRU, A. et al. Biotests and biosensors in ecotoxicological risk assessment of field soils polluted with zinc, lead, and cadmium. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n. 11, p.2973-2982, maio 2005.

KHARE, P. et al. Adverse effects of TiO₂ and ZnO nanoparticles in soil nematode, *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p.116-117, 1 jan. 2011.

KLAINÉ, S. J. et al. Nanomaterials in the environment: behavior, fate, bioavailability and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 9, p.1825-1851, 2008

KAPLAN, A. B.; GREENBERG, E. P. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. **Journal of Bacteriology**, v. 163, n. 3, p.1210-1214, 24 jun. 1985.

KATO, Y. et al. Environmental sex determination in the branchiopod crustacean *Daphnia magna*: deep conservation of a doublesex Gene in the sex-determining pathway. **Plos Genetics**, v. 7, n. 3, p.1-12, 24 mar. 2011. Public Library of Science (PLoS).

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

KOŁODZIEJCZAK-RADZIMSKA, A.; JESIONOWSKI, T. Zinc oxide – From synthesis to application: a review. **Materials**, v. 7, n. 4, p.2833-2881, 9 abr. 2014.

LEÃO, A. F. **Abordagem teórico-experimental do efeito do tunelamento quântico em dispositivos semicondutores**. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciência dos Materiais, Universidade Federal do Vale do São Francisco, Juazeiro, 2009.

LEINONEN, A.; KIVISAARI, S. Nanotechnology perceptions: Literature review on media coverage, public opinion and NGO perspectives. **Vtt Research Notes**. Espoo, p. 1-55. nov. 2010.

LIN, D.; XING, B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. **Environmental Pollution**, p. 243-250. Out 2007.

LOGOTHETIDIS, S. Nanotechnology: principles and applications. In: LOGOTHETIDIS, S. **Nanostructured materials and their applications**. Thessaloniki: Springer, 2011. Cap. 1. p. 1-22.

LOPES, S. F. **Efeito de nanopartículas de óxido de zinco em *Daphnia magna***. 2012. 90 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Aplicada, Universidade de Aveiro, Aveiro, 2012.

MARTINS, D. von R. **Avaliação ecotoxicológica de efluentes de celulose branqueada de eucalipto ao longo do tratamento biológico**. 2008. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Civil, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

MAUGHAN, R. J.; BURKE, L. M. **Nutrição esportiva**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 190 p.

MAFRA, D.; COZZOLINO, S. M. F. Importância do zinco na alimentação humana. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 1, p.79-88, Jan./Mar. 2004.

MAYRINCK, C. et al. Síntese, Propriedades e Aplicações de Óxido de Zinco Nanoestruturado. **Revista Virtual de Química**, Minas Gerais, vol. 6, No. 5, 1185-1204, Set./Out. 2014.

MEDEIROS, M. de A. Zinco. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 3, p.159-160, ago. 2012. Seção: Elemento Químico.

MELEGARI, S. P. **Estudo do mecanismo de ação tóxica da saxitocina e avaliação de sua adsorção em materiais alternativos para aplicação em sistemas de tratamento de água**. 2010. 205 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

MICARONI, R. C. da C. M.; BUENO, M. I. M. S.; JARDIM, W. de F. Compostos de mercúrio. Revisão de métodos de determinação, tratamento e descarte. **Química Nova**, São Paulo, v. 23, n. 4, p.487-495, ago. 2000.

MIYASHIRO, T; RUBY, E. G. Shedding light on bioluminescence regulation in *Vibrio fischeri*. **Molecular Microbiology**, v. 84, n. 5, p.795-806, 2 maio 2012.

MORTIMER, M. et al. High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p.1412-1417, 2008.

NNI - National Nanotechnology Initiative. **Benefits and Applications**. United States National Nanotechnology Initiative, 2013. Disponível em <<http://www.nano.gov/you/nanotechnology-benefits>> Acesso em: 20/04/2016

NEVILLE, A. M. **Propriedades do concreto**. 5. ed. São Paulo: Bookman, 2015. 912 p.

NEWMAN, M. C. **Fundamentals of ecotoxicology**. 3. ed. Boca Raton: CRC Press, 2009. 571 p.

NRIAGU, J. O. Zinc Toxicity in Humans, in: J.O. Nriagu, Encyclopedia of Environmental Health, Elsevier Inc., Burlington, 2011, pp. 801

NOLTE, C. et al. ZnT-1 expression in astroglial cells protects against zinc toxicity and slows the accumulation of intracellular zinc. **Glia**, p.145-155, 15 jun. 2004.

OSCAR, B. V. **Avaliação toxicológica de nanoestruturas de óxido de zinco aplicadas em argamassas**. 2015. 88 f. TCC (Graduação) - Curso de Engenharia Sanitária e Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, vol.33, no.2, São Paulo. 2010.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, São Paulo, Vol. 27, No. 6, 1028-1029, Dez. 2004.

PUERARI, R. C. et al. Synthesis, characterization and toxicological evaluation of Cr₂O₃ nanoparticles using *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Florianópolis, v. 128, p.36-43, jun. 2016.

RADIĆ, S. et al. Ecotoxicological effects of aluminum and zinc on growth and antioxidants in *Lemna minor* L. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 73, n. 3, p.336-342, nov. 2009.

REIS, É. de M. **Avaliação do potencial genotóxico de nanopartículas de óxido de zinco e dióxido de titânio pelo ensaio do micronúcleo em células V79 e teste da mancha da asa em *Drosophila melanogaster***. 2014. 129 f. Tese (Doutorado) - Curso de Genética, Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

ROGERS, D. C. Branchiopoda (Anostraca, Notostraca, Laevicaudata, Spinicaudata, Cyclestherida). In: LIKENS, G. E. **Encyclopedia of Inland Waters**. Elsevier, 2009. p. 242-249.

ROSSETTO, A. L. de O. F. et al. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. **Science of the Total Environment**, Florianópolis, v. 490, p.807-814, ago. 2014.

ROSSETTO, A. L. de O. F.; **Avaliação dos efeitos tóxicos da nanopartícula e micropartícula de óxido de cobre em diferentes organismos aquáticos**. 2016. 166 f. Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. São Paulo: Roca, 2005. 1168 p.

SALA, F. C.; COSTA, C. P da. Retrospectiva e tendência da alfacicultura brasileira. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 2, p.187-194, jun. 2012.

SANTANA, M. F. S et al. Área superficial e porosidade da fibra alimentar do albedo de laranja. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v. 14, n. 3, p.261-274, 2012.

SANTO, N. et al. Toxic effects and ultrastructural damages to *Daphnia magna* of two differently sized ZnO nanoparticles: Does size matter? **Water Research**, v. 53, p.339-350, abr. 2014.

SANTOS, J. F. dos (Org.). Secretaria de geologia, mineração e transformação mineral-SGM. **Relatório Técnico 65: Perfil do Zinco**. Belo Horizonte: 2009. 33 p.

SANTOS, P. C. dos. **Nanopartículas: toxicidade biológica**. 2014. 55 f. TCC (Graduação) - Curso de Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

SARNO, A. R. R.; SILVA, T. da; PASIN, L. A. A. P. Análise da influência da luz na germinação de sementes. **Revista Científica da FEPI**, Itajubá, v. 6. 2014.

SILVA, E. M. F. et al. Estudo in vitro do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Maceió, v. 36, n. 2, p.277-283, 2015.

SCHULZ, Peter A. B. O que é nanociência e para que serve a nanotecnologia? **Física na Escola**, Campinas, v. 6, n. 1, p.58-62, maio 2005.

SHARMA, V. et al. DNA damaging potential of zinc oxide nanoparticles in human epidermal cells. **Toxicology Letters**, v. 185, n. 3, p.211-218, mar. 2009.

TACCOLA, L. et al. Zinc oxide nanoparticles as selective killers of proliferating cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 6, p.1129-1140, maio 2011.

THIELE, C. J. Neuroblastoma cell lines. In: MASTERS, J. **Human cell culture**. Lancaster: Kluwer Academic Publishers, 1998. p. 21-53.

TOUMEY, C. Reading Feynman into nanotechnology: a text for a new science. **Techné**, 13 (3), p.133-168. 2008.

TOWNSEND, C. R.; BEGON, M.; HARPER, J. L. **Fundamentos em ecologia**. 3. ed. São Paulo: Artmed, 2010. 576 p.

TRUHAUT, R. Ecotoxicology - a new branch of toxicology: a general survey of its aims methods, and prospects. In: MCINTYRE, A. D.; MILLS, C. F. **Ecological toxicology research: effects of heavy metals**

and organohalogen compounds. Aberdeen: Plenum Press, 1977. Cap. 1. p. 3-23.

VENTURA, S. P. M. et al. Toxicity assessment of various ionic liquid families towards *Vibrio fischeri* marine bacteria. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Aveiro, v. 76, p.162-168, 1 fev. 2012.

VINDIMIAN, E. The role of ecotoxicology for monitoring ecosystem health. *Freshwater Forum*, v. 16, p.91-97, 26 nov. 2001.

WARHEIT, D. B. et al. Pulmonary instillation studies with nanoscale TiO₂ rods and dots in rats: toxicity is not dependent upon particle size and surface area. *Toxicological Sciences*, v. 91, n. 1, p.227-236, 16 fev. 2006.

WAYCOTT, W. Photoperiodic response of genetically Diverse lettuce accessions. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, p. 460-467. maio 1995.

WELZ, B.; SPERLING, M. **Atomic absorption spectrometry**. 3. ed. Weinheim: Wiley-vch, 1998. 941 p.

WIENCH, K. et al. Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere*, v. 76, n. 10, p.1356-1365, set. 2009.

WOLFF, G. et al. Efeitos da toxicidade do zinco em folhas de *Salvinia auriculata* cultivadas em solução nutritiva. *Planta Daninha*, v. 27, n. 1, p.133-137, mar. 2009.

ZHAO, C. M.; WANG, W. X. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology And Chemistry*, v. 30, n. 4, p.885-892, 8 fev. 2011.

ZHAO, H. Z. et al. Toxicity of nanoscale CuO and ZnO to *Daphnia magna*. *Chemical Research in Chinese Universities*, v. 28, n. 2, p.209-213. 2012

ZHAO, L. et al. Influence of CeO₂ and ZnO Nanoparticles on cucumber physiological markers and bioaccumulation of Ce and Zn: a life cycle

study. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 61, n. 49, p.11945-11951, 11 dez. 2013.