

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL-MG

KARLA PALMIERI TAVARES

**Avaliação da toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre e de óxido de cromo
para *Daphnia similis* e *Brachionus calyciflorus*.**

Alfenas – MG

2014

KARLA PALMIERI TAVARES

**Avaliação da toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre e de óxido de cromo para
Daphnia similis e *Brachionus calyciflorus*.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ecologia e Tecnologia
Ambiental pela Universidade Federal de Alfenas. Área
de concentração: Tecnologia Ambiental.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Kummrow

Co-orientador: Prof. Dr. Sandro Barbosa

Colaboradores: Prof. Dra. Gisela de Aragão Umbuzeiro

Prof. Dr. Willian Gerson Mathias

Alfenas – MG

2014

Tavares, Karla Palmieri.

Avaliação da toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre e de óxido de cromo para *Daphnia similis* e *Brachionus calyciflorus* / Karla Palmieri Tavares. - 2014.

50 f. -

Orientador: Fábio Kummrow

Dissertação (Mestrado em Ecologia e Tecnologia Ambiental) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Ecotoxicologia. 2. Organismos aquáticos. 3. Nanopartículas metálicas. I. Kummrow, Fábio. II. Título.

CDD: 615.9



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
Universidade Federal de Alfenas / UNIFAL-MG
Programa de Pós-graduação – Ecologia e Tecnologia Ambiental

Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas - MG CEP 37130-000
Fone: (35) 3299-1419 (Coordenação) / (35) 3299-1392 (Secretaria)
www.unifal-mg.edu.br/ppgecoambiental/



KARLA PALMIERI TAVARES

**“AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE
E DE ÓXIDO DE CROMO PARA *DAPHNIA SIMILIS* E *BRACHIIONUS
CALYCIFLORUS*”**

A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Mestre em
Ecologia e Tecnologia Ambiental pela
Universidade Federal de Alfenas. Área de
Pesquisa: Tecnologia Ambiental.

Aprovado em: 26/02/2014

Prof. Dr. Fábio Kummrow

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Fábio Kummrow

Prof. Dr. Paulo Augusto Zaitune Pamplin

Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: Paulo Augusto Zaitune Pamplin

Prof.^a Dr.^a Simone Valente Campos

Instituição: USP

Assinatura: Simone V. Campos

Dedico aos meus pais, ao Patrick e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por me conceder o milagre diário da vida, discernimento e guia para conclusão deste trabalho.

Aos meus pais Ilmar e Selmara, por estarem sempre ao meu lado me dando força, incentivo e amor incondicional.

À minha família, por serem sempre pacientes e estarem do meu lado nos momentos mais difíceis.

Ao Patrick, pelo amor, companheirismo e incentivo constante nesta etapa da minha vida.

Ao Professor Fábio Kummrow, meu orientador, por estar presente sempre nos momentos de dúvidas e pela confiança depositada em mim para a realização deste trabalho.

Aos Professores Sandro Barbosa, Gisela Umbuzeiro e William Gerson Mathias pela co-orientação e colaborações importantes.

Aos amigos do LEAL, especialmente Anjaína, Josiane, Ádria e Francine, pela amizade e pela ajuda fundamental para que pudesse desenvolver esse trabalho.

Às minhas amigas Bianca e Francieli, pela amizade e pelos momentos bons e difíceis compartilhados durante essa etapa da minha vida.

Aos amigos do BIOGEN pelo aprendizado.

À minha amiga Juliana pelo apoio e pelos conselhos e momentos de incentivo.

À Universidade Federal de Alfenas e ao PPG-ETA pela oportunidade e à CAPES pela bolsa de apoio ao estudante.

Aos membros da banca, Prof. Dr. Paulo Augusto Zaitune Pamplin, Profa. Dra. Simone Valente Campos, Prof. Dr. Thiago Correa de Souza e Profa. Dra. Nelma de Mello Silva Oliveira, pela disponibilidade e contribuições para a melhoria deste trabalho.

E a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram com essa etapa da minha vida profissional. Muito obrigada!

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)

RESUMO

O uso de nanopartículas (NP) metálicas tem crescido exponencialmente, gerando preocupações sobre o seu risco ambiental para a biota aquática. As NP de óxido de cobre (NP de CuO) são frequentemente empregadas em tintas anti-incrustantes, e as NP de óxido de cromo (NP de Cr₂O₃) vêm sendo utilizadas como pigmento verde. A extensa utilização dessas NP pode contaminar os ecossistemas aquáticos, e os seus efeitos toxicológicos no ambiente são pouco conhecidos. Neste estudo, foi avaliada a toxicidade aguda induzida pelas NP de CuO e Cr₂O₃, comparando-se com CuSO₄ como fonte de íons Cu²⁺ e Cr(NO₃)₃ como fonte de íons Cr³⁺, utilizando o microcrustáceo *Daphnia similis* e o rotífero *Brachionus calyciflorus* como organismos-teste. Para *D. similis*, a CE50 média para NP de CuO foi de 0,064 mg/L e para CuSO₄ foi de 0,015 mg/L, valores estes mais baixos do que os valores encontrados na literatura para *D. magna*. Para *B. calyciflorus*, a CE50 para NP de CuO foi de 0,0145 mg/L e para CuSO₄ foi de 0,0029 mg/L. A diminuição da toxicidade da NP em relação ao sal pode ser devido ao fato de que as NP de CuO tendem a se aglomerar, o que pode ter reduzido a liberação dos íons Cu²⁺ no meio do teste. A CE50 média para NP de Cr₂O₃ foi de 6,74 mg/L e para Cr(NO₃)₃ foi de 11,98 mg/L para *D. similis*, enquanto que para *B. calyciflorus* foi de 89,97 mg/L (NP de Cr₂O₃) e 14,72 mg/L (Cr(NO₃)₃). O tamanho reduzido das NP de Cr₂O₃ (15-30 nm) e o maior potencial zeta podem ter contribuído para maior estabilidade em suspensão e menor potencial de aglomeração, explicando uma maior toxicidade das NP em relação ao sal Cr(NO₃)₃, o que não foi observado para *B. calyciflorus*. As NP de CuO foram consideradas muito tóxicas e as NP de Cr₂O₃ perigosas para os organismos testados. Entretanto, *B. calyciflorus* se mostrou mais sensível às NP de CuO e ao CuSO₄ do que *D. similis*, que apresentou maior sensibilidade às NP de Cr₂O₃ e ao Cr(NO₃)₃ em comparação ao rotífero.

Palavras-chave: Nanotoxicologia, nanopartículas de óxidos metálicos, microcrustáceos, rotíferos, testes de toxicidade aguda.

ABSTRACT

The use of metal nanoparticles has grown exponentially, but there are also concerns about the environmental risk to aquatic biota. Copper oxide nanoparticles (CuO NPs) are frequently employed in antifouling paints, and nanoparticles of chromium oxide (Cr₂O₃ NPs) have been used as a green pigment. Their extensive use can contaminate aquatic ecosystems, and the toxicological effects of these NPs to the biota are poorly known. In this study, we evaluated the acute toxicity induced by CuO NPs and Cr₂O₃ NPs, comparing with CuSO₄ as Cu²⁺ ion source and Cr(NO₃)₃ as Cr³⁺ ion source, using *Daphnia similis* and *Brachionus calyciflorus*. For *D. similis*, the mean EC50 for CuO NPs was 0.064 mg/L and for CuSO₄ was 0.015 mg/L, lower values of EC50 than those available in the literature for *D. magna*. For *B. calyciflorus*, the EC50 for CuO NPs was 0.0145 mg/L and for CuSO₄ was 0.0029 mg/L. The decrease in toxicity of NPs compared to salt may be due to the fact that CuO NPs tend to agglomerate, which may have reduced the release of Cu²⁺ in the test medium. The mean EC50 for Cr₂O₃ NPs was 6.74 mg/L and for Cr(NO₃)₃ was 11.98 mg/L for *D. similis*, whereas for *B. calyciflorus* was 89.97 mg/L (Cr₂O₃ NPs) and 14.72 mg/L (Cr(NO₃)₃). The reduced size of the Cr₂O₃ NPs (15-30 nm) and the higher Zeta Potential may have contributed to the higher stability in suspension and less potential for agglomeration, partially explaining the higher toxicity of NPs in relation to Cr(NO₃)₃ salt, which was not observed for *B. calyciflorus*. CuO NPs were considered very toxic and Cr₂O₃ NPs were considered dangerous for organisms tested. However, *B. calyciflorus* was more sensitive to NP of CuO and CuSO₄ than *D. similis*, which showed greater sensitivity to NP Cr₂O₃ and Cr (NO₃)₃ in comparison to the rotifer.

Keywords: Nanotoxicology, metal oxide nanoparticles, microcrustaceans, rotifers, acute toxicity tests.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 DESENVOLVIMENTO	11
2.1 NANOMATERIAIS E O MEIO AMBIENTE	11
2.2 ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS DE NANOMATERIAIS	12
2.3 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE (CuO) e ÓXIDO DE CROMO (Cr ₂ O ₃)	17
2.4 CARACTERIZAÇÃO DE NP PARA ESTUDOS TOXICOLÓGICOS	19
3 JUSTIFICATIVA	21
4 OBJETIVOS	23
4.1 OBJETIVO GERAL	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5 MATERIAIS E MÉTODOS	24
5.1. ORIGEM E CARACTERIZAÇÃO DAS NP	24
5.2 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE NP E DAS SOLUÇÕES DOS SAIS DE PARTIDA	24
5.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>Daphnia similis</i>	25
5.3.1 Cultivo de <i>Daphnia similis</i>	25
5.3.2 Água de diluição	27
5.3.3 Alimentação dos organismos	28
5.3.4 Testes de sensibilidade	29
5.3.5 Teste de toxicidade aguda com <i>Daphnia similis</i>	30
5.4 TESTES AGUDOS COM <i>Brachionus calyciflorus</i>	32
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6.1 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>B. calyciflorus</i>	34
7 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS	42
SEGUNDA PARTE - ARTIGO: Acute toxicity of copper oxide and chromium oxide nanoparticles to <i>Daphnia similis</i>	50

1 INTRODUÇÃO

A Nanotecnologia é uma área da ciência que envolve processos, materiais e produtos na escala nanométrica (10^{-9} m), e tem despertado interesse crescente nas últimas décadas por utilizar materiais e sistemas cujos componentes apresentam propriedades físicas, químicas e/ou biológicas significativamente novas. Esses materiais têm beneficiado distintos segmentos, tais como, alimentício, eletrônico, farmacêutico, biotecnológico, médico-hospitalar, cosmético, agrícola e de segurança nacional (MOORE, 2006).

Como qualquer área da tecnologia que faz uso intensivo de novos materiais e substâncias químicas, a nanotecnologia traz consigo alguns riscos ao meio ambiente e à saúde humana. O pequeno tamanho das nanopartículas (NP) facilita sua difusão e transporte na atmosfera, em águas e em solos, e pode facilitar também a sua entrada e acúmulo em células vivas (QUINA, 2004).

Em vista do grande número de produtos no mercado, o uso da nanotecnologia vem sendo amplamente discutido quanto aos seus potenciais impactos, como a contaminação do meio ambiente e o lançamento de efluentes resultantes deste processo, que pode apresentar toxicidade desconhecida ou elevada. Devido ao rápido crescimento da produção e comercialização desses produtos, os ecossistemas aquáticos podem ser contaminados por poluentes nanométricos, e dentre eles pode-se destacar as NP de óxidos metálicos, que vem sendo sintetizadas em grande escala e utilizadas em inúmeras aplicações industriais (BRAR et al., 2010).

Para Wang et al., (2011), entre as NP de óxidos metálicos de transição, o óxido de cobre (CuO) tem atraído especial atenção, pois vêm sendo utilizados na composição de tintas anti-incrustantes de embarcações (ICOMIA, 2006; MELEGARI et al., 2013), representando assim uma importante fonte de contaminação aos ecossistemas aquáticos. As nanopartículas de óxido de cromo (Cr_2O_3) também tem despertado interesse para várias aplicações, como na composição de materiais de revestimento de proteção térmica, como catalisadores e como pigmentos verdes utilizados na composição de tintas e vidros (MAKHLOUF et al., 2013).

A fim de estudar os efeitos deletérios que os nanomateriais exercem sobre os seres humanos e o meio ambiente, surgiu a ciência denominada Nanotoxicologia, que é uma subárea da toxicologia dedicada à essa questão (STONE et al., 2010). Porém ainda são escassos os estudos sobre a toxicidade de NP em organismos aquáticos. Estudos utilizando diferentes organismos-teste são necessários para determinar seus efeitos, e estabelecer

critérios de liberação dessas NP no meio ambiente. Nesse contexto, as espécies do gênero *Daphnia* e os rotíferos têm se apresentado como potenciais organismos-teste em estudos ecotoxicológicos, por serem sensíveis e de fácil cultivo e manipulação em laboratório.

Particularmente os dafinídeos são considerados bons organismos para a toxicologia aquática, pois são filtradores e capazes de ingerir nanopartículas (ARTAL et al., 2013). A espécie *Daphnia magna* é um dos mais antigos e mais utilizados organismos-teste em Ecotoxicologia, e é um organismo padrão reconhecido nos protocolos da USEPA (Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos). Entretanto, no Brasil, a espécie *Daphnia similis* vem sendo também uma das espécies mais utilizadas para ensaios de avaliação de toxicidade aguda (ZAGATTO, 1988), pois ocorre em ambientes tropicais e dessa forma proporciona resultados ecologicamente mais relevantes (RODGHER et al., 2010).

Juntamente com as espécies de *Daphnia* vêm se destacando no campo da ecotoxicologia os rotíferos, pois além de possuir um importante papel na cadeia trófica como condutores do fluxo de energia (WALLACE, 2002), eles também possuem grande sucesso ecológico por terem curto tempo de geração e reprodução partenogenética (SNELL e JANSSEN, 1995). Além disso, são cosmopolitas e em grande parte detritívoros, desempenham um importante papel nos processos de purificação da água e são encontrados em grande abundância em lagoas de tratamento de esgoto (PAGGI, 1995). Rotíferos do gênero *Brachionus* podem ser um bom organismo-teste para avaliar a toxicidade das NP por causa de sua rápida reprodução, tempos de geração curtos e sensibilidade às mudanças ambientais, além da disponibilidade comercial de ovos dormentes (cistos) (SNELL e JANSSEN, 1995).

A literatura relata efeitos tóxicos de NP de CuO e NP de Cr₂O₃ em organismos aquáticos (HEINLAAN et al., 2008; BUFFET et al., 2011; LIN et al., 2012, MANUSADZIANAS et al., 2012), gerando uma preocupação a respeito do comportamento dessas NP em ambientes aquáticos e indicando uma necessária caracterização dos seus efeitos sobre a biota.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 NANOMATERIAIS E O MEIO AMBIENTE

O aumento da produção e a crescente aplicação dos nanomateriais têm provocado uma ampla discussão sobre os riscos potenciais destes materiais ao meio ambiente. A produção anual de bens de consumo que contêm nanopartículas teve um aumento significativo nos últimos anos. Em 2004, sua produção anual foi de 1.000 toneladas, e atualmente, a produção é de 5.000 toneladas, e a estimativa é de um aumento para 100.000 mil toneladas na próxima década (PASCHOALINO et al., 2010). Estes números indicam uma inevitável exposição humana e ambiental às NP.

Existem diversos tipos de nanopartículas, e para Christian et al. (2008), dois tipos de classificação das NP possuem grande relevância ambiental: as nanopartículas inorgânicas e orgânicas. Podem-se citar como exemplo, para NP inorgânicas, as de nano-ouro, nano-cobre, nano-prata; os óxidos metálicos, tais como, nano óxido de cobre, dióxido de titânio e os *quantum dots* (materiais semicondutores). Já as NP orgânicas, são exemplos clássicos os nanotubos de carbono e o fulerenos (C50 e C70). As NP podem ter origens naturais, provindas de rochas vulcânicas, fumaça, poeiras de minerais, entre outros. Entretanto, levando em consideração a gama de produtos com NP engenheiradas disponíveis no mercado (cerca de 900), estes podem ser considerados, na atualidade, a principal fonte destes materiais ao ambiente (CHATTERJEE, 2008).

Os ambientes naturais vêm sendo contaminados por produtos e resíduos nanotecnológicos, seja durante os processos de produção, transporte e utilização, tanto de maneira direta quanto indiretamente por descarte dos produtos consumidos (THE ROYAL SOCIETY AND ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING, 2004; MUELLER e NOWACK, 2008). Além disso, houve também o desenvolvimento de técnicas de remediação de água com base na utilização de nanomateriais, como por exemplo, nanopartículas de ferro, o que indica uma fonte direta de contaminação dos ambientes aquáticos (VASEASHTA et al., 2007).

Os nanomateriais possuem características que podem facilitar a sua translocação pelos compartimentos ambientais (atmosfera, águas e solo), tais como tamanho reduzido, grande área superficial e capacidade de aglomeração e dispersão (QUINA, 2004), de forma que podem se tornar disponíveis aos diferentes organismos e ocasionar danos à cadeia alimentar

(LOVERN et al., 2007), causando perturbação no equilíbrio de todo o ecossistema aquático (PASCHOALINO et al., 2010).

Ainda se sabe pouco a respeito dos efeitos dos nanomateriais sobre os organismos e seus impactos sobre os ecossistemas. A literatura atual indica que muitos tipos de NP têm o potencial de causar efeitos adversos em uma ampla variedade de organismos aquáticos, desde bactérias, passando por invertebrados, peixes e outros vertebrados (OBERDÖRSTER et al., 2006; ARUOJA et al., 2009; SCOWN et al., 2010).

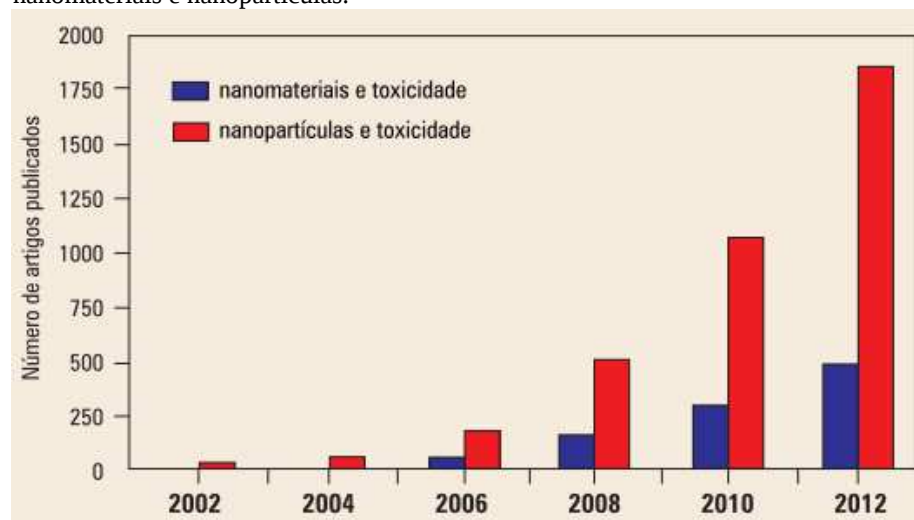
Devido às suas características, as NP podem penetrar em tecidos vivos e afetar os seus processos metabólicos (MEDINTZ et al., 2005). Por possuírem uma pequena dimensão, podem ter maior permeabilidade através de mucosas e membranas celulares, e, além disso, por ter uma área superficial aumentada, os efeitos tóxicos podem ser potencializados (SERVICE, 2004). Recentemente foi demonstrado que a reatividade de superfície e a desestabilização química de NP de óxidos metálicos estavam envolvidas no seu potencial de toxicidade por levar à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (AUFFAN et al., 2012).

Estudos ecotoxicológicos são necessários para determinar métodos seguros para utilização e eliminação de NP (HANDY et al., 2008). Entretanto, a falta de abordagens padronizadas para caracterizar os efeitos deletérios das NP e a incerteza a respeito de como esses efeitos podem ser incorporados na avaliação de risco ecológico indicam a necessidade de testar cada tipo de nanomaterial produzido e comercializado (KLAINÉ et al., 2012).

2.2 ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS DE NANOMATERIAIS

Nos últimos dez anos, houve uma evolução no número de trabalhos indexados no banco de dados do “ISI Web of Knowledge” que reportam estudos toxicológicos de nanomateriais (Figura 1). Embora seja expressivo e crescente o número de artigos publicados nesta área, ainda não há um consenso sobre os riscos desses materiais para a saúde humana e meio ambiente (JOHNSTON et al., 2013).

Figura 1: Evolução do número de publicações científicas envolvendo toxicidade de nanomateriais e nanopartículas.



Fonte: MARTINEZ e ALVES, 2013.

Diversos ensaios toxicológicos padronizados estão disponíveis para se avaliar a resposta biológica de uma substância química em um organismo. No entanto, não há padronização para a avaliação da toxicidade de NP, o que dificulta a comparação de resultados e o consenso sobre a toxicidade desses materiais. Os estudos realizados até o momento são adaptações dos procedimentos padrões utilizados para outras substâncias (PASCHOALINO et al., 2010).

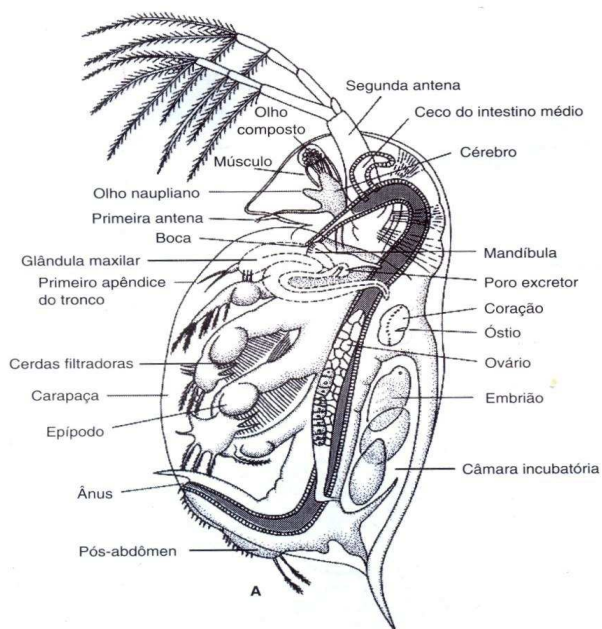
A maioria dos testes de toxicidade de nanomateriais é realizada *in vitro*, com o objetivo de avaliar os riscos para a saúde humana, utilizando-se culturas de células de mamíferos, as quais foram extraídas das mais variadas partes do corpo como cérebro, pulmões, coração, pele e fígado (SAYES et al. 2007). Em relação aos testes *in vivo*, observa-se que grande parte destes utilizam organismos aquáticos, os quais traduziriam o impacto destes nanomateriais no ambiente, já que as águas continentais e marinhas seriam o principal compartimento receptor de nanomateriais. Nestes testes normalmente são utilizados bactérias (*Aliivibrio fischeri*, anteriormente denominado *Vibrio fischeri*), peixes (*Danio rerio*), crustáceos (*Daphnia sp.*) e algas (*Pseudokirshneriella subcapitata*) (OBERDÖRSTER et al., 2006; ARUOJA et al., 2009). Variando-se a concentração do nanomaterial em contato com os organismos, o teste permite calcular estatisticamente os indicadores que irão possibilitar a comparação de toxicidade entre diferentes nanomateriais e/ou entre nanomateriais e substâncias químicas em outras escalas de tamanho.

Os principais testes *in vivo* que estão sendo utilizados para avaliação ecotoxicológica de nanopartículas são os testes de toxicidade aguda, sendo que os parâmetros de avaliação mais utilizados são a mortalidade e a imobilidade dos organismos-teste. Esses testes têm por

objetivo determinar a Concentração Letal Media (CL50) ou a Concentração Efetiva Media (CE50), isto é, a concentração do agente tóxico que causa mortalidade ou imobilidade, respectivamente, a 50% dos organismos-teste depois de um determinado período de exposição (MAGALHÃES e FERRÃO-FILHO, 2008).

Estes ensaios, cujo objetivo é avaliar a toxicidade dos nanomateriais no meio aquático, estão sendo realizados principalmente com organismos do gênero *Daphnia* (Figura 2), como a *Daphnia magna*, em função de serem elos importantes na cadeia alimentar entre as algas, consumidas por estes, e os peixes, que são seus predadores (OBERDÖRSTER et al., 2006).

Figura 2: Representação gráfica de *Daphnia sp.*



Fonte: RUPPERT e BARNES, 1996.

Os dafinídeos são considerados bons organismos-teste em nanotoxicologia aquática, pois são filtradores, são capazes de ingerir nanopartículas e têm sido propostos como um organismo modelo para o ensaio ecotoxicológico de nanomateriais (ARTAL et al., 2013). Além disso, em função de sua relativa simplicidade com relação a outros testes que utilizam animais maiores, e em função de ser um organismo representativo já que sua extinção poderia causar grave desequilíbrio pela drástica diminuição de peixes, o teste com *Daphnia* provavelmente é o teste mais indicado no momento para avaliação da toxicidade aguda de nanomateriais, conforme mostra a tendência observada nos trabalhos publicados (ARTAL et al., 2013).

No Brasil, *Daphnia similis*, embora não seja uma espécie nativa, vem sendo juntamente com *D. magna*, uma das espécies mais estudadas e utilizada para ensaios de avaliação de toxicidade aguda (ZAGATTO, 1988). A utilização de *D. similis* se baseia na alta sensibilidade que estes microcrustáceos apresentam a vários toxicantes (WREN e STEPHENSON, 1991; FOSSI et al., 1998). Existe um grande número de informações sobre suas técnicas de cultivo e sobre as respostas à exposição a diversas substâncias tóxicas. RODGHER et al. (2010) avaliaram os efeitos dos metais cádmio e cromo sobre *D. similis*, e observaram que essa espécie é tão sensível quanto *D. magna* e *Daphnia pulex* a esses metais.

Estudos têm demonstrado alta toxicidade de diversos tipos de nanomateriais para espécies do gênero *Daphnia*. Gaiser et al. (2012) avaliaram a toxicidade aguda de NP de prata para *D. magna*, e obtiveram uma CL50 de 0,1 mg/L, consideravelmente mais tóxica que a micro prata, que apresentou CE50 de 1 mg/L. Nanomateriais de prata também foram avaliadas utilizando *D. similis* (ARTAL et al., 2013) e *D. pulex* (GRIFFITT et al., 2008) como organismos-teste, sendo encontrados valores de CE50 de 1.1 µg/L e 0.04 mg/L, respectivamente.

Nanopartículas de ZnO, TiO₂ e Al₂O₃ foram avaliadas por Zhu et al. (2009) utilizando *D. magna* como organismo teste, e grandes quantidades de material escuro foram encontradas no trato digestivo das *Daphnia* após a exposição, mas não no grupo de controle, mostrando que esses organismos são capazes de ingerir tais nanomateriais. Dessa forma, o potencial para a subsequente transferência de NP para outros níveis tróficos deve receber atenção adicional.

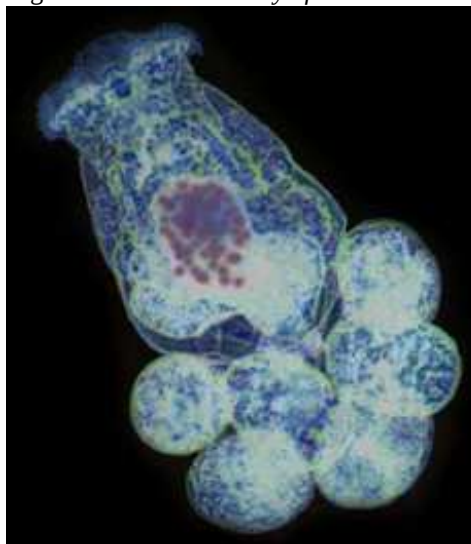
Lovern et al. (2008) estudaram a absorção e liberação de NP de ouro no trato digestivo de *D. magna*, e encontraram as nanopartículas na cavidade oral, ao longo do trato digestivo e na cauda, indicando que houve a acumulação das nanopartículas. NP de CuO foram avaliadas juntamente com micropartículas de CuO, utilizando *D. magna* (HEINLAAN et al., 2008), e as NP foram muito mais tóxicas (CE50 = 3,2 mg/L) do que as micropartículas (CE50 = 164,8 mg/L).

Zhu et al. (2010) avaliaram a transferência trófica de nanopartículas de TiO₂ na cadeia alimentar, incluindo *D. magna* e seu predador, *D. rerio*. As *Daphnia* foram expostas às NP e utilizadas como alimento para os peixes, e apesar de não ter ocorrido biomagnificação, concluiu-se que a dieta é uma das principais vias de exposição a NP para organismos aquáticos maiores.

Juntamente com as *Daphnia*, os rotíferos, principalmente do gênero *Brachionus*, têm sido utilizados para avaliação de efeitos agudos de diversos compostos (DAHMS et al., 2011), pois apresentam pequeno tamanho, tempo de geração curto e disponibilidade de cistos

comerciáveis (SNELL e PERSOONE, 1989). Particularmente a espécie *Brachionus calyciflorus* (Figura 3) é amplamente utilizada para estudos toxicológicos, pois desempenha um papel importante em diversos processos ecológicos em comunidades de água doce e possui uma distribuição cosmopolita (CHAROY et al., 1995).

Figura 3: *Brachionus calyciflorus*.



Fonte: <http://www.microbiotests.be/toxkits/rotoxkitf.pdf>

Testes de toxicidade aguda e crônica para *B. calyciflorus* e *Brachionus plicatilis* já foram descritos e padronizados (SNELL, 1991; SNELL, 1998). Entretanto, estudos de toxicidade de NP empregando rotíferos ainda são escassos. Um estudo utilizando o rotífero *Brachionus manjavacas* demonstrou que as taxas de crescimento populacional foram reduzidas a 50% quando expostos a *quantum dots* (materiais semicondutores) de 37 nm a uma concentração de 0,3 mg/L. Foi observada a absorção desses nanomateriais no intestino e nos ovos das mães expostas, e a prole afetada sofreu redução de vitalidade mesmo após serem colocadas em um ambiente livre de *quantum dots* (SNELL e HICKS, 2011).

Manusadzianas et al. (2012) avaliaram os efeitos tóxicos de NP de óxido de cobre para *B. calyciflorus*, obtendo CE50 de 0,39 mg/L, valor que indica alta toxicidade desse nanomaterial para essa espécie. Em um estudo que avaliou a toxicidade de NP de TiO₂ de diversos tamanhos para o rotífero *B. plicatilis* observou-se que quanto menor a nanopartícula maior a toxicidade, o que pode indicar que devido ao menor tamanho elas são mais facilmente ingeridas. NP de TiO₂ de 15 nm apresentaram CE50 de 5,37 mg/L, NP de 25 nm, CE50 de 10,43 mg/L e NP de 32 nm, CE50 de 267,3 mg/L (CLEMENT et al., 2013). Dessa forma, os

rotíferos também podem ser organismos teste úteis, fornecendo informações relevantes sobre os efeitos das NP.

2.3 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBRE (CuO) e ÓXIDO DE CROMO (Cr₂O₃)

Entre os óxidos metálicos de transição, o óxido de cobre tem atraído atenção por suas diversas aplicações (WANG et al., 2011), pois são utilizados como fotocondutores (ZHOU et al., 2006) e possuem uma excelente condutividade térmica podendo ser utilizado como fluído de transferência de calor em máquinas e fototérmicas (CHANG et al., 2005). Além dessas aplicações, as NP de CuO têm sido utilizadas como biocidas na composição de tintas anti-incrustantes de embarcações (ICOMIA, 2006; MELEGARI et al., 2013), o que representa uma importante fonte de contaminação dos ecossistemas aquáticos por esse tipo de NP (PERREAULT et al., 2010).

Nos últimos dez anos surgiram preocupações quanto aos efeitos do cobre sobre o ambiente marinho, pois altos níveis deste metal foram detectados em áreas de intensa operação naval (MARTINS e VARGAS, 2013). O potencial tóxico das tintas anti-incrustantes à biota marinha já foi estudado e constatado. Reichelt-Brushett e Harrison (2000) demonstraram que concentrações relativamente baixas de cobre prejudicaram e inibiram a colonização de larvas de coral (*Acropora tenuis*) em um ambiente marinho na Austrália. Johnson et al. (2007) avaliaram o efeito do cobre em embriões de *D. rerio*, e verificaram que os indivíduos expostos tiveram os batimentos cardíacos mais rápidos, sugerindo respostas ao estresse nos embriões durante a exposição.

Vários trabalhos têm demonstrado toxicidade de NP de CuO para organismos aquáticos. Buffet et al. (2011) avaliaram seus efeitos em *Scrobicularia plana* (molusco bivalve) e *Hediste diversicolor* (invertebrado marinho) e observaram alterações comportamentais (hábitos de alimentação e de escavação), além de um aumento da proteína metalotioneína, cuja produção é induzida pelo aumento da entrada de metais na célula. Heinlaan et al. (2008), utilizando os crustáceos *D. magna* e *Thamnocephalus platyurus* em testes de toxicidade aguda, verificaram que as NP de CuO foram muito mais tóxicas em comparação com a micropartícula para esses organismos.

Perreault et al. (2010) avaliaram o efeitos das NP de CuO na macrófita *Lemna gibba*, e verificaram elevada inibição dos processos fotossintéticos e diminuição do crescimento dos

organismos expostos por 48 horas a uma faixa de concentração de 100 a 400 mg/L. A alga *P. subcapitata* teve seu crescimento completamente inibido por NP de CuO quando exposta a uma concentração de 6,4 mg/L, a qual foi muito mais tóxica que a micropartícula, cuja inibição ocorreu a 25,6 mg/L (ARUOJA et al., 2009).

Todos esses resultados geram preocupação acerca do comportamento das NP de CuO em sistemas aquáticos e de sua elevada biodisponibilidade em relação a partículas maiores (ALMEIDA et al., 2007). Dados obtidos na literatura sugerem que a toxicidade de nanopartículas metálicas está relacionada principalmente à liberação de íons metálicos no meio (HEINLAAN et al., 2008; PERREAULT et al., 2014). Da mesma forma a biodisponibilidade do cobre é o principal determinante de toxicidade, e ela é afetada por diferentes componentes abióticos e bióticos dentro do ambiente aquático (ARUOJA et al., 2009). No estudo de Aruoja et al. (2009), verificou-se que a toxicidade das NP de CuO para *P. subcapitata* foi semelhante à do sulfato de cobre (CuSO_4), indicando que os efeitos tóxicos são devidos aos íons cobre disponíveis. Dessa forma, faz-se necessária a correta caracterização de seus efeitos nos organismos aquáticos, considerando a elevada toxicidade já constatada do cobre para os organismos aquáticos (KAHRU e DUBOURGUIER, 2010).

Nanopartículas de óxido de cromo (Cr_2O_3) tem atraído uma considerável atenção nos últimos anos. Além de possuírem elevada área superficial, essas NP são bastante resistentes ao desgaste, sendo utilizadas para várias aplicações, como por exemplo, na composição de materiais de revestimento de proteção térmica e como catalisadores (MAKHLOUF et al., 2013). Essas NP são consideradas um importante material refratário devido ao seu elevado ponto de fusão (2435°C) e resistência à oxidação (GIBOT e VIDAL, 2010).

Além dessas aplicações, nanopartículas de Cr_2O_3 têm sido utilizadas como pigmento verde, como por exemplo, o *Viridian* ($\text{Cr}_2\text{O}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), que foi descoberto como pigmento em 1838 e o processo de sua manufatura foi patenteado por Guinet em 1859 (HORIE et al., 2013). Devido à sua alta estabilidade, esse pigmento, também chamado de verde de cromo, é amplamente utilizado na composição de tintas e vidros (NANUM NANOTECHNOLOGY, 2013).

São limitados os dados disponíveis na literatura sobre toxicidade de NP de óxido de cromo. Annarao et al. (2008), em um estudo de toxicocinética, avaliaram a distribuição de NP de Cr_2O_3 em ratos, e verificaram sua que absorção foi eficiente através da pele e houve uma distribuição uniforme nos tecidos e nos músculos. Vajpayee et al. (2011) avaliaram os efeitos fitotóxicos de NP de Cr_2O_3 em trigo (*Triticum aestivum*), e observaram que houve inibição da germinação de sementes e no crescimento das plântulas de forma concentração dependente.

No entanto, estudos publicados na literatura sobre a toxicidade desses tipos de NP para os organismos aquáticos são raros. Lin et al. (2012) avaliaram seus efeitos em *D. rerio* e demonstraram que essas NP interferiram na eclosão do embrião desse organismo. Da mesma forma que a toxicidade de várias NP metálicas está relacionada à liberação dos íons no meio, Lin et al. (2012) demonstraram que provavelmente essa liberação se aplica também às NP de Cr_2O_3 . Ao comparar o seu efeito com o do sal de cromo solúvel, verificou-se que ambos inibiram a atividade da enzima ZHE1, que é responsável pela eclosão do embrião de *D. rerio*. Dessa forma é necessário avaliar os efeitos das NP de Cr_2O_3 para organismos de outros níveis tróficos, além de *D. rerio*.

2.4 CARACTERIZAÇÃO DE NP PARA ESTUDOS TOXICOLÓGICOS

Ao se iniciar um estudo de toxicidade com NP em organismos vivos, é necessário caracterizar as suspensões-teste para compreender os possíveis fatores responsáveis pelos efeitos deletérios observados. Existem diferentes tipos de caracterização que podem ser realizadas para uma determinada NP.

Segundo Krug e Wick (2011), um conjunto mínimo de informações sobre as propriedades de nanomateriais para cada estudo deve ser estabelecido, e esse conjunto deve ser composto de:

- a) Composição química, pureza, impurezas;
- b) Tamanho e distribuição do tamanho da partícula;
- c) Superfície específica;
- d) Morfologia (cristalina/amorfa);
- e) Química de superfície, revestimento, funcionalização;
- f) Grau de aglomeração/agregação e distribuição da partícula em condições experimentais;
- g) Solubilidade em água;
- h) Reatividade da superfície e/ou a de carga superficial (Potencial Zeta).

Para a determinação do tamanho e da estrutura de nanopartículas, a microscopia eletrônica de transmissão (TEM) tem se mostrado a mais adequada dentre as técnicas de microscopia disponíveis para a obtenção de imagens diretas das NP. A TEM projeta elétrons através de uma camada muito fina do material a ser analisado, produzindo uma imagem

bidimensional em uma chapa fotográfica ou em uma tela fluorescente. Em geral, o experimento utilizando o TEM resulta em uma imagem que é transferida para um computador onde é tratada estatisticamente com ajuda de um software específico (DURAN et al., 2006). A difração de raios X (DRX) também pode ser utilizada na determinação do tamanho das partículas, através da equação de Debye-Scherrer, todavia a aproximação feita é insuficiente para dar a distribuição de tamanho real das NP (KOGA e SUGAWARA, 2003).

Outra forma de caracterização das suspensões é através da determinação do potencial zeta das partículas. Segundo Schaffazick et al., (2003), a medida é realizada através da técnica de Mobilidade Eletroforética, ou seja, através da medida das cargas superficiais da amostra. O potencial zeta é o potencial elétrico no plano hidrodinâmico de cisalhamento, e depende não somente da superfície da partícula, mas também do dispersante. Pode ser afetado pelo pH ou força iônica do meio. Dessa forma, pode-se prever a estabilidade de suspensões coloidais. Esta técnica, contudo não leva em conta a heterogeneidade das cargas de cada molécula, fornecendo sempre um valor médio.

3 JUSTIFICATIVA

O recente aumento na produção, tipos e utilização de nanomateriais tem levantado preocupações sobre o que a liberação desses materiais no ambiente pode acarretar. Pouco se sabe sobre o efeito de NP em organismos aquáticos, mas já existem evidências de que estes compostos podem entrar na cadeia alimentar e se acumular em diferentes níveis tróficos (HOLBROOK et al., 2008). Além disso, experimentos com organismos aquáticos têm demonstrado que a presença de nanopartículas leva à diminuição da fertilidade, mudanças fisiológicas, alterações de comportamento e um aumento na taxa de mortalidade (TEMPLETON et al., 2006). Em vista disto, e do fato que ainda faltam muitos dados sobre a ecotoxicologia de NP, é de suma importância o desenvolvimento de estudos que possam avaliar os efeitos tóxicos destes materiais a organismos relevantes dos ambientes aquáticos.

Nanopartículas de óxidos metálicos têm recebido especial atenção devido às suas diversas aplicações industriais. A sua crescente produção e comercialização leva a uma preocupação sobre o seu descarte no meio ambiente e seus possíveis efeitos tóxicos aos organismos aquáticos. Nanopartículas de óxido de cobre são utilizadas para diversos fins, merecendo destaque a sua utilização na composição de tintas anti-incrustantes de embarcações, estando assim em contato direto com o meio aquático. Estudos têm demonstrado elevada toxicidade dessas NP para organismos aquáticos de diferentes níveis tróficos, demonstrando dessa forma a importância de avaliar os efeitos agudos e crônicos desse material (HEINLAAN et al., 2008; ARUOJA et al., 2009; KAHRU e DUBOURGUIER, 2010; BUFFET et al., 2011; ISANI et al., 2013). As nanopartículas de óxido de cromo vêm sendo utilizadas na composição de tintas e vidros (pigmento verde de cromo), porém, estudos sobre a toxicidade dessas NP para organismos aquáticos são escassos, de modo que só foi encontrado um estudo na literatura abordando toxicidade dessas NP para *D. rerio* (LIN et al., 2012).

Além da forma que essas NP vêm sendo utilizadas, possibilitando que sejam liberadas em grande quantidade em ambientes aquáticos, a facilidade que elas possuem em penetrar em sistemas vivos devido ao seu tamanho nanométrico e ao desconhecimento de seu potencial toxicológico, as NP de CuO e de Cr₂O₃ estão incluídas na *Rede cooperativa de pesquisas em nanotoxicologia aplicada a nanopartículas de interesse da indústria petrolífera e de tintas* nº 552112/2011-9.

Para a avaliação da toxicidade de NP de CuO e NP de Cr₂O₃, os organismos *D. similis* e *B. calyciflorus* são considerados como bons organismos-teste, pois apresentam reprodução predominantemente partenogenética, ciclo de vida e tempo de geração curto, além de serem altamente sensíveis à várias substâncias tóxicas. *D. similis*, além de apresentar alta sensibilidade e serem representantes dos ecossistemas tropicais, são fáceis de serem manipuladas e cultivadas em laboratório. *B. calyciflorus* são muito utilizados em avaliações de toxicidade aguda e crônica, devido à comercialização dos seus cistos para a realização dos testes. Além disso, uma recente revisão da Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 2006) sobre o uso de invertebrados em ensaios de toxicidade de produtos químicos identificou os rotíferos como um dos táxons mais promissores.

Nesse contexto a obtenção de dados sobre a toxicidade desses dois tipos de nanopartículas para organismos considerados importantes, tendo do ponto de vista ambiental quanto do seu uso em testes ecotoxicológicos padronizados, pode contribuir para o entendimento dos impactos ao meio ambiente decorrentes da presença dessas NP em ambientes aquáticos.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre (CuO) e de óxido de cromo (Cr₂O₃), em comparação ao sulfato de cobre (CuSO₄) como fonte de íons Cu²⁺ e ao nitrato de cromo Cr(NO₃)₃ como fonte de íons Cr³⁺, através da exposição do microcrustáceo de água doce *D. similis* e do rotífero *B. calyciflorus* para avaliação de toxicidade aguda dessas NP. Esta comparação entre as NP e os sais de partida se deve ao fato de que a toxicidade de nanopartículas metálicas está relacionada principalmente à liberação de íons metálicos no meio (HEINLAAN et al., 2008; ARUOJA et al., 2009; PERREAULT et al., 2014).

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Realizar ensaios de toxicidade aguda utilizando *D. similis* para suspensões das nanopartículas de CuO e de Cr₂O₃ e para soluções de CuSO₄ e de Cr(NO₃)₃;
- b) Realizar ensaios de toxicidade aguda utilizando *B. calyciflorus* para suspensões das nanopartículas de CuO e de Cr₂O₃ e para soluções de CuSO₄ e de Cr(NO₃)₃.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. ORIGEM E CARACTERIZAÇÃO DAS NP

As NP de CuO e de Cr₂O₃ foram sintetizadas e caracterizadas pelo Laboratório de Toxicologia Ambiental ENS (LABTOX) da Universidade Federal de Santa Catarina. A NP de CuO foi obtida via método de decomposição térmica direta a partir do sal precursor CuSO₄.5H₂O (sulfato de cobre pentahidratado), e a NP de Cr₂O₃ foi obtida pelo mesmo método com o Cr(NO₃)₃.9H₂O (nitrato de cromo III nonohidratado) como sal precursor. Ambas as NP foram caracterizadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM), Difração de raios-X (DRX) e pela determinação do Potencial Zeta (ζ).

5.2 PREPARO DAS SUSPENSÕES DE NP E DAS SOLUÇÕES DOS SAIS DE PARTIDA

As NP de CuO e Cr₂O₃ são pouco solúveis, portanto foram preparadas suspensões com as mesmas. Para a realização dos testes com *D. similis*, a suspensão da NP de CuO foi preparada a uma concentração de 100 mg/L, pesando 0,01 g das NP e diluindo em 100 mL de água mineral, e a suspensão de NP de Cr₂O₃ foi preparada a uma concentração de 1g/L, pesando 0,1 g da amostra e diluindo em 100 mL de água mineral. A água mineral utilizada foi a mesma utilizada no cultivo das *D. similis*.

Já para a realização dos testes com *B. calyciflorus*, as suspensões da NP de CuO e de NP de Cr₂O₃ foram preparadas a uma concentração de 1g/L, pesando 0,01 g das NP e diluindo em 10 mL do meio de diluição do Kit ROTOXKIT FTM, da Microbiotests.

Todas as suspensões foram colocadas em frasco 'Schott' de 200 mL em banho de gelo e sonicadas por 30 minutos. O desruptor de células ultrassônico (Cole Parmer – 100 W) trabalhou na potência máxima de 99%. Os testes foram realizados imediatamente após a sonicação das suspensões, e antes e durante o procedimento tomou-se o cuidado de homogeneizá-las.

Foram preparadas soluções de CuSO₄ e Cr(NO₃)₃, à uma concentração de 100 mg/L e 1 g/L, respectivamente, para os testes com *D. similis*. Para os testes com *B. calyciflorus*, as

soluções foram preparadas às concentrações de 10 g/L para CuSO_4 e 1g/L para $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$. Esses sais inorgânicos foram utilizados na síntese das respectivas NP, ou seja, são os sais de partida ou precursores das NP. Ambos os sais são solúveis em água, e as soluções foram preparadas com a mesma água mineral que é utilizada no cultivo de *D. similis* e com o meio de diluição do Kit ROTOXKIT FTM para os rotíferos.

5.3 TESTE DE TOXICIDADE AGUDA COM *D. similis*

Todos os procedimentos necessários para a realização dos testes de toxicidade aguda com *D. similis*, incluindo cultivo dos organismos, carta-controle e o próprio teste, foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental Prof. Dr. Abílio Lopes (LEAL), da Faculdade de Tecnologia da UNICAMP, *câmpus* Limeira.

5.3.1 Cultivo das *D. similis*

O cultivo das *D. similis* (Figura 4) foi realizado de acordo com a norma NBR 12713 (ABNT, 2009). As culturas foram mantidas em água de diluição, em local limpo, isento de substâncias ou vapores tóxicos.

Figura 4: *Daphnia similis* adulta



Fonte: Da autora.

Os organismos foram mantidos em cristalizadores de vidro com capacidade para 2 L (100 organismos por cristalizador), em estufa incubadora tipo B.O.D. da marca Marconi, modelo MAC 403, com controle de temperatura e luz (Figura 5). A incubadora foi regulada para um fotoperíodo de 16 horas de luz e 8 horas de escuro, intensidade luminosa de aproximadamente 1000 lux e temperatura de 22 +/- 2 °C. A sala de cultivo para manipulação das culturas foi aclimatada com temperatura de 20 +/- 2 °C.

Figura 5: Cristalizadores e estufa incubadora tipo B.O.D. utilizados no cultivo de *D. similis*.



Fonte: Da autora.

A renovação da água de cultivo nos cristalizadores foi realizada 3 vezes por semana evitando-se diferença de temperatura maior que 2 °C. No manuseio das *D. similis* foram utilizadas pipetas do tipo *Pasteur*, e lotes com organismos com idade superior a 28 dias foram descartados (ABNT, 2009).

Os organismos jovens ou neonatas (Figura 6), obtidos por partenogênese a partir da segunda postura e cultivados nas condições estabelecidas, foram os organismos utilizados nos ensaios, atendendo aos requisitos da norma NBR 12713 (ABNT, 2009). Segundo esta norma deverão ser utilizados organismos jovens entre 6 e 24 horas de idade, obtidos a partir de fêmea com idade entre 7 dias e 28 dias.

Figura 6: Neonata (organismo jovem) da espécie *D. similis*.



Fonte: Da autora.

5.3.2 Água de Diluição

A água de diluição foi preparada com água mineral de boa qualidade, de uso comercial com procedência conhecida (Jacutinga), cujas características estão listadas na Tabela 1. Essa água foi utilizada tanto para a manutenção das culturas quanto para a realização de testes de toxicidade.

Tabela 1: Características químicas e físico-químicas da água mineral Jacutinga.

Água mineral - Jacutinga	
Composição química (mg/L)	
Bicarbonato	52,05
Cálcio	6,816
Sódio	6,497
Magnésio	3,477
Nitrato	2,53
Cloreto	1,57
Potássio	1,415
Sulfato	0,25
Fluoreto	0,08
Características Físico-Químicas	
pH a 25 °C – 6,41	
Temperatura da água da fonte – 21,8 °C	
Condutividade elétrica a 25 °C – 101,2 uS/cm	

Foram adicionados sais na água de diluição para correção de alguns parâmetros, tais como: pH de 7.2 a 7.6, dureza total de 40 a 48 mg/L em CaCO_3 e condutividade de aproximadamente 160 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Para isso foram utilizadas 2 soluções: SOLUÇÃO 1, contendo sulfato de cálcio e SOLUÇÃO 2, contendo cloreto de potássio, bicarbonato de sódio e sulfato de magnésio (ABNT, 2009). A água de diluição foi mantida com aeração constante e filtrada antes de ser utilizada (Figura 7).

Figura 7: Recipiente com a água mineral utilizada no cultivo



Fonte: Da autora.

Para manter o controle da qualidade de cada lote de água de diluição preparado realizou-se o teste de viabilidade. Este teste foi conduzido uma vez por mês através da exposição de 10 organismos-teste distribuídos em 5 réplicas. Esses recipientes foram mantidos nas mesmas condições de manutenção das culturas e sem alimentação, por um período de 48 horas. Após esse período, foram efetuadas as leituras dos testes, sendo observado o número de organismos móveis. O lote de água de diluição foi considerado aceitável para uso quando a porcentagem de imobilidade dos organismos não excedeu a 10% do valor total de organismos (ABNT, 2009).

5.3.3 Alimentação dos organismos

As culturas de *D. similis* foram alimentadas com cultura de *P. subcapitata* em fase exponencial de crescimento e concentração final de 3×10^6 células por organismo por dia

(Figura 8) e alimento composto (ração para truta e levedura, marca Tetramin) cuja a quantidade final foi 0,05 mL por organismo por dia.

Figura 8: Alimento composto de algas.



Fonte: Da autora.

5.3.4 Testes de sensibilidade

Os testes de sensibilidade foram realizados mensalmente para avaliação das condições fisiológicas dos organismos-teste, utilizando como substância de referência o cloreto de sódio (NaCl). Os resultados obtidos e a análise estatística indicam se o organismo está dentro da faixa de sensibilidade estabelecida (carta-controle) e apto a ser usado nos testes.

Para o teste de sensibilidade com *D. similis* preparou-se, a partir de uma solução estoque de NaCl, as concentrações 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5 e 4,0 mg/L. Na montagem do ensaio cada concentração foi preparada em triplicata, com 10 mL das diferentes concentrações em cada recipiente. Preparou-se o controle negativo com água de diluição também em triplicata contendo 10 mL em cada recipiente e colocou-se cinco neonatas por recipiente. A leitura final da sensibilidade foi realizada após 48 horas de exposição. Para estar de acordo com os padrões da CETESB (1994), os valores da CE50 dos testes de sensibilidade para o NaCl devem estar entre 1,6 e 3,6 g/L.

5.3.5 Teste de toxicidade aguda com *D. similis*

Os testes de toxicidade aguda com *D. similis* foram realizados de acordo com as condições padronizadas pela norma brasileira NBR 12713 (ABNT, 2009). Os testes foram realizados com a exposição de organismos jovens (entre 6 a 24 horas de idade) a diferentes concentrações das NP e dos respectivos sais de partida, preparadas com água de cultivo.

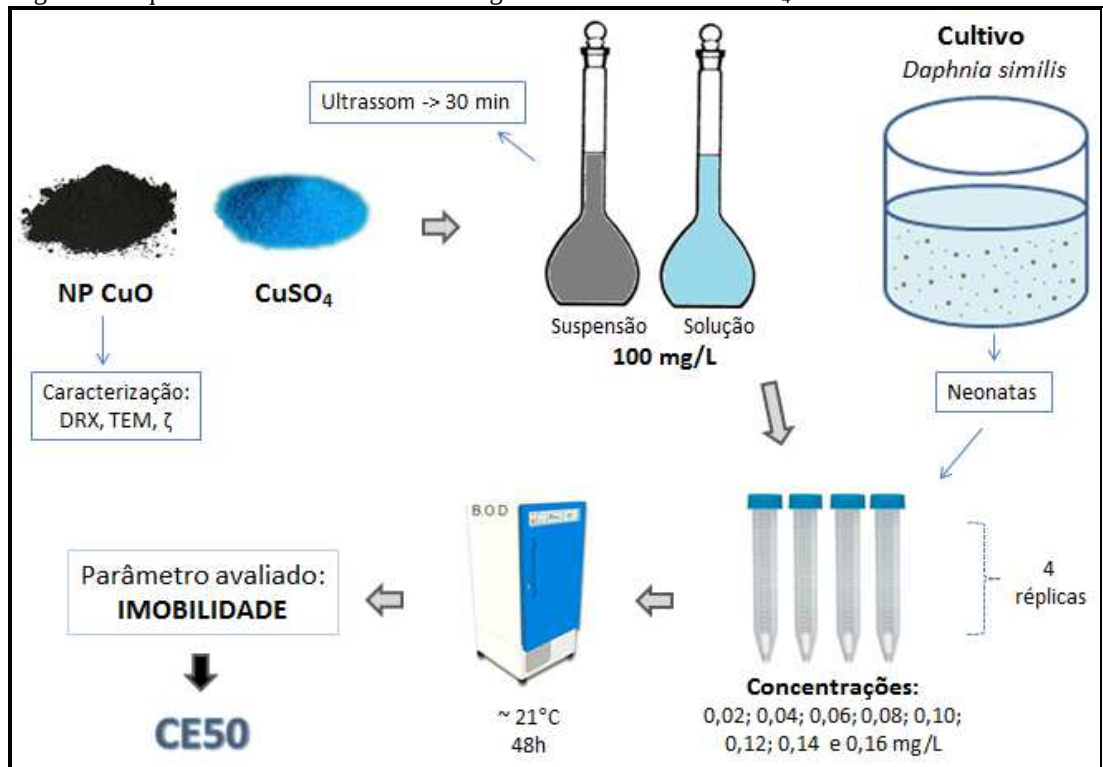
Para a amostra de NP CuO e CuSO₄ foram utilizadas as concentrações 0,02; 0,04; 0,06; 0,08; 0,10; 0,12; 0,14 e 0,16 mg/L. Para NP Cr₂O₃ foram utilizadas as concentrações 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 mg/L e para Cr(NO₃)₃ foram utilizadas as concentrações 30, 60, 90, 120, 150 e 180 mg/L.

Para cada diluição, inclusive no controle negativo, foram adicionados 20 organismos, escolhidos e distribuídos aleatoriamente em quatro réplicas com volumes iguais a 10 mL. O ensaio foi mantido com temperatura controlada de 20 a 22 °C por 48 horas em ambiente escuro, com os recipientes cobertos e sem alimentação dos organismos.

Ao final do ensaio foi registrada a quantidade de organismos imóveis em cada concentração testada, a fim de realizar o cálculo da porcentagem de imobilidade para cada concentração em relação ao controle. Para a validação dos resultados no término do ensaio a porcentagem de organismos imóveis no controle negativo não pode ultrapassar os 10%.

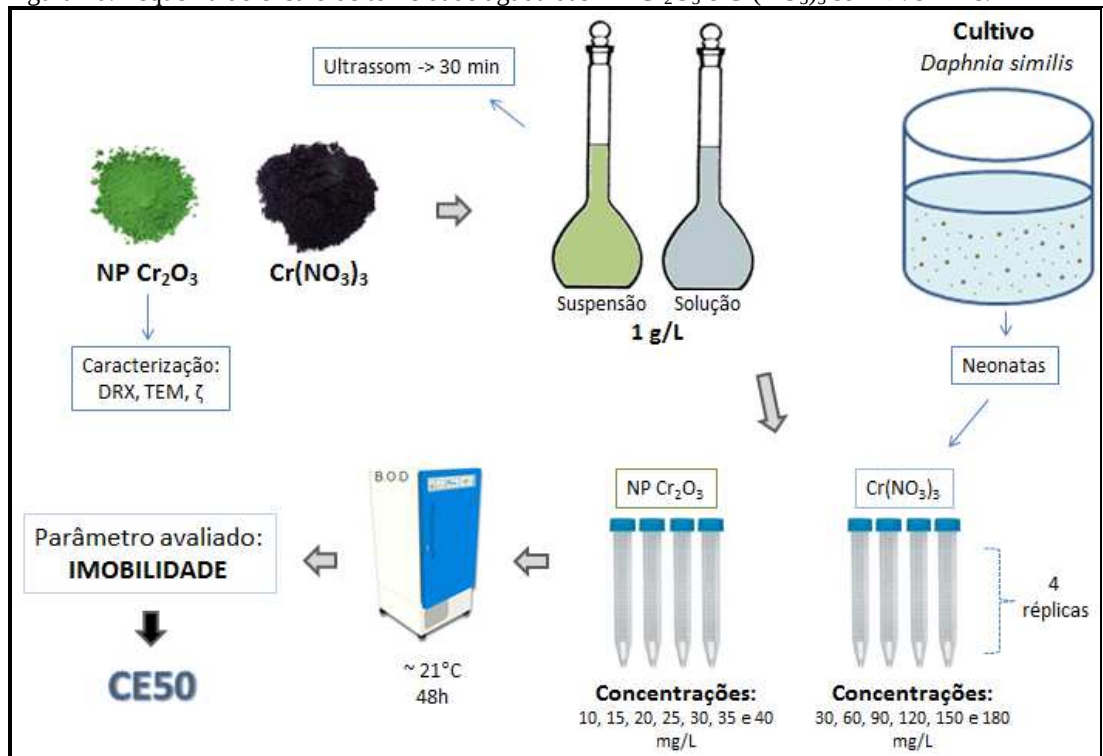
Dessa forma, o número de organismos imóveis em cada concentração testada foi utilizado para calcular a concentração que causou efeito em 50% dos organismos (CE50), utilizando o método estatístico “Trimmed Spearman-Kärber Method for Estimating Median Lethal Concentrations in Toxicity Bioassays” (HAMILTON et al., 1977). Nas Figuras 9 e 10 estão demonstrados os procedimentos do ensaio de toxicidade com os materiais avaliados.

Figura 9: Esquema do ensaio de toxicidade aguda com NP CuO e CuSO₄ com *D. similis*.



Fonte: Da autora.

Figura 10: Esquema do ensaio de toxicidade aguda das NP Cr₂O₃ e Cr(NO₃)₃ com *D. similis*.



Fonte: Da autora.

5.4 TESTES AGUDOS COM *Brachionus calyciflorus*

Os testes agudos com o rotífero *B. calyciflorus* foram realizados utilizando o Kit ROTOXKIT FTM, da Microbiotests (Figura 11). O kit é composto por cistos (ovos dormentes), sais para o preparo do meio de diluição (NaHCO_3 , 96 mg/L; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 60 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 123 mg/L e KCl, 4 mg/L) e material para a montagem do teste (placas escavadas e pipetas).

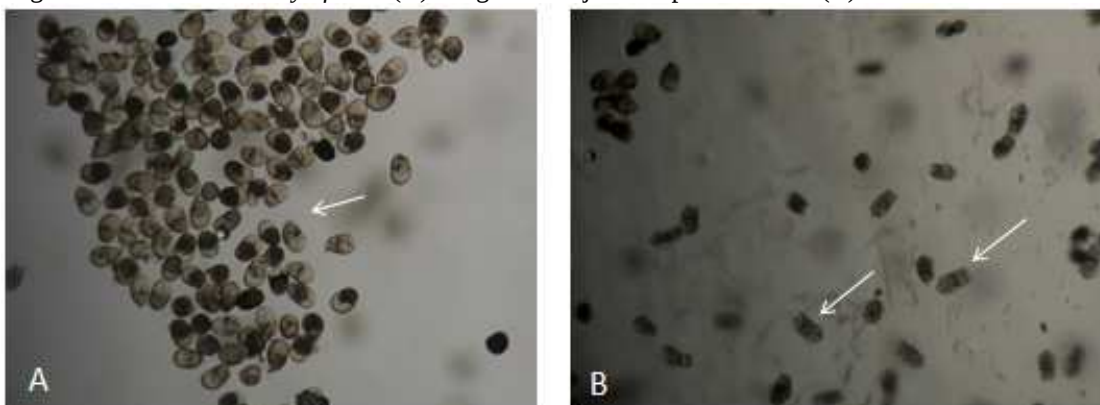
Figura 11: Kit ROTOXKIT FTM da Microbiotests.



Fonte: Da autora.

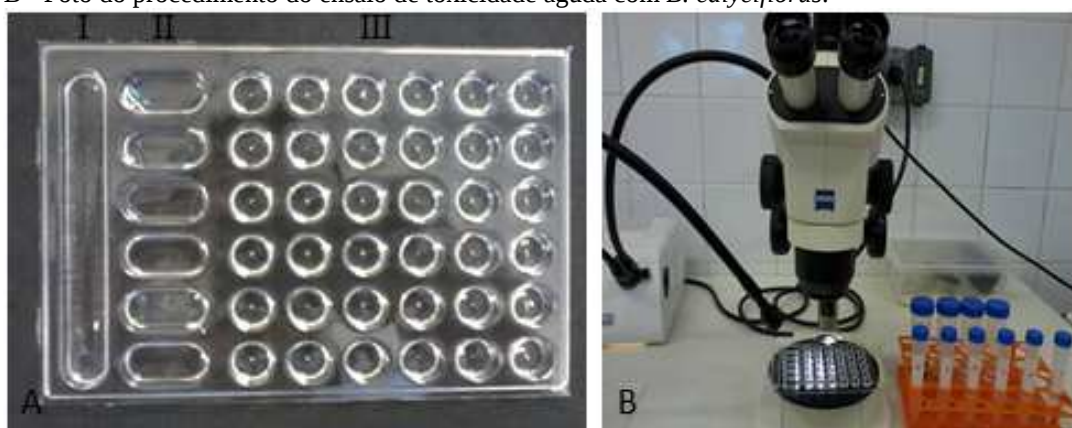
Os cistos disponíveis no kit foram incubados por 16 horas, à 25°C e com iluminação de 4.000 lux. Após verificar a eclosão dos cistos (Figura 12), o ensaio de toxicidade aguda foi realizado utilizando-se uma placa escavada disponível no kit (Figura 13). Na placa existem 6 cavidades para lavagem dos organismos (uma para o controle negativo e 5 para as concentrações do toxicante) a fim de diminuir a diluição do toxicante. Após a lavagem, são colocados 30 organismos jovens (0 a 2 horas de idade) para cada diluição, inclusive no controle negativo, escolhidos e distribuídos aleatoriamente em seis réplicas.

Figura 12: Cistos de *B. calyciflorus* (A) e organismos jovens após a eclosão (B).



Fonte: Da autora.

Figura 13: A - Placa utilizada para a realização do ensaio (I – cavidade de incubação dos cistos; 2 – cavidade de lavagem; III – cavidades para as diluições das NP e dos sais).
B - Foto do procedimento do ensaio de toxicidade aguda com *B. calyciflorus*.



Fonte: Da autora.

O meio de diluição do teste foi o mesmo utilizado na incubação dos cistos, e foi preparado de acordo com o protocolo do kit, utilizando água destilada e os sais NaHCO_3 , 96 mg/L; $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 60 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 123 mg/L e KCl, 4 mg/L.

Para a amostra de NP de CuO foram utilizadas as concentrações 0,001; 0,003; 0,01; 0,03 e 0,1 mg/L e para CuSO_4 foram utilizadas as concentrações 0,001; 0,005; 0,01; 0,05 e 0,1 mg/L. Para NP de Cr_2O_3 e para $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ foram utilizadas as concentrações 50, 100, 150, 300 e 500 mg/L.

Os organismos foram mantidos em incubadora do tipo B.O.D. por 24 horas, à 25°C, no escuro e sem alimentação. Ao final do teste, o parâmetro avaliado foi a imobilidade dos organismos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados e discussão sobre a caracterização das amostras e sobre os testes de toxicidade aguda com *D. similis* estão apresentados na segunda parte dessa dissertação sob a forma de artigo. Esse artigo foi submetido à revista oficial da Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (ECOTOX-BRASIL) que se chama Ecotoxicology and Environmental Contamination (EEC) e que possui Qualis CAPES B2 na área de avaliação Ciências Ambientais. Dessa forma, nessa seção de resultados serão apresentados os resultados dos testes de toxicidade aguda com *B. calyciflorus*.

6.1 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM *Brachionus calyciflorus*

Os valores de CE50 das NP de CuO, do CuSO₄, das NP de Cr₂O₃ e do Cr(NO₃)₃ com *B. calyciflorus* foram determinados pela média dos resultados obtidos de 3 testes independentes e corrigidos pelas concentrações de cobre e cromo presente na NP e no sal, já que a literatura sugere que a toxicidade desse tipo de NP está principalmente relacionada a liberação dos íons metálicos no meio dos testes (HEINLAAN et al., 2008; ARUOJA et al., 2009; PERREAULT et al., 2014). Essa correção foi realizada através de um cálculo que determina a porcentagem da massa do cobre na molécula de CuO e de CuSO₄ e do cromo na molécula de Cr₂O₃ e de Cr(NO₃)₃, então é feita uma conversão das concentrações das substâncias para as concentrações dos íons metálicos.

O valor médio de CE50 para a NP de CuO para *B. calyciflorus* foi 0,011 mg/L, com intervalo de confiança de 95% entre 0,008 e 0,018 mg/L. Os valores das CE50 para os 3 testes independentes são apresentados na Tabela 2, já corrigidos para íons cobre, e as curvas dose-resposta estão representadas na Figura 14.

Tabela 2: Valores de CE50 encontrados para os 3 testes independentes com NP de CuO para *B. calyciflorus*.

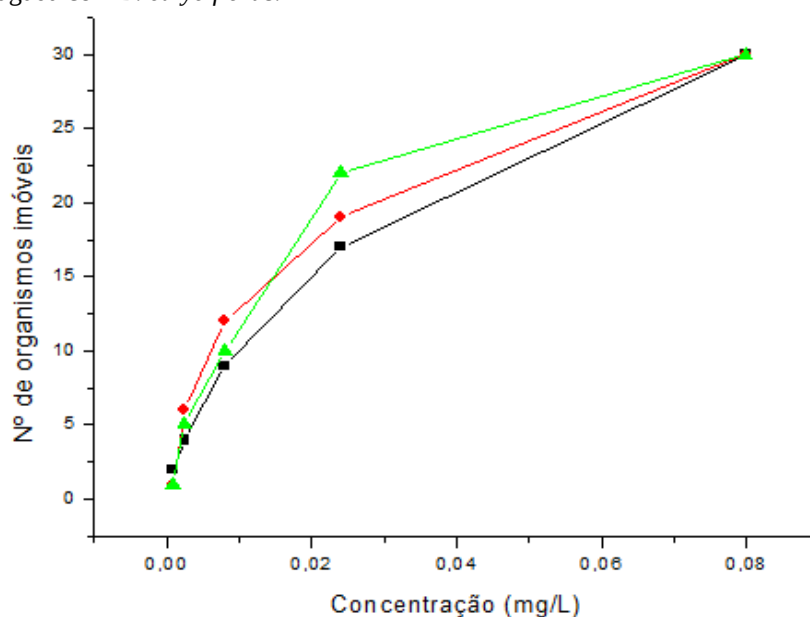
	CE50* (mg/L)	IC 95%**
Teste 1	0,014	0,008 – 0,024
Teste 2	0,010	0,008 – 0,016
Teste 3	0,010	0,008 – 0,016
Média	0,011	0,08 – 0,018
Desvio padrão	0,0023	
CV (%)***	23,09	

*CE50 – Concentração efetiva 50%

**IC95% - Intervalo de confiança de 95%

***Coeficiente de variação

Figura 14: Curva dose-resposta da NP de CuO referente ao teste de toxicidade aguda com *B. calyciflorus*.



Nota: As concentrações estão em valores corrigidos para cobre, e os pontos nas curvas indicam os valores médios de organismos imóveis para cada concentração.

O valor de CE50 médio para o sulfato de cobre (CuSO_4) para *B. calyciflorus* foi igual a 0,0025 mg/L, com intervalo de confiança de 95% entre 0,0025 e 0,004 mg/L. Os valores das CE50 para os 3 testes independentes são apresentados na Tabela 3, já corrigidos para íons cobre, e a figura 15 representa a curva dose-resposta referente ao teste com CuSO_4 para *B. calyciflorus*.

Tabela 3: Valores de CE50 encontrados para os 3 testes independentes com CuSO_4 para *B. calyciflorus*.

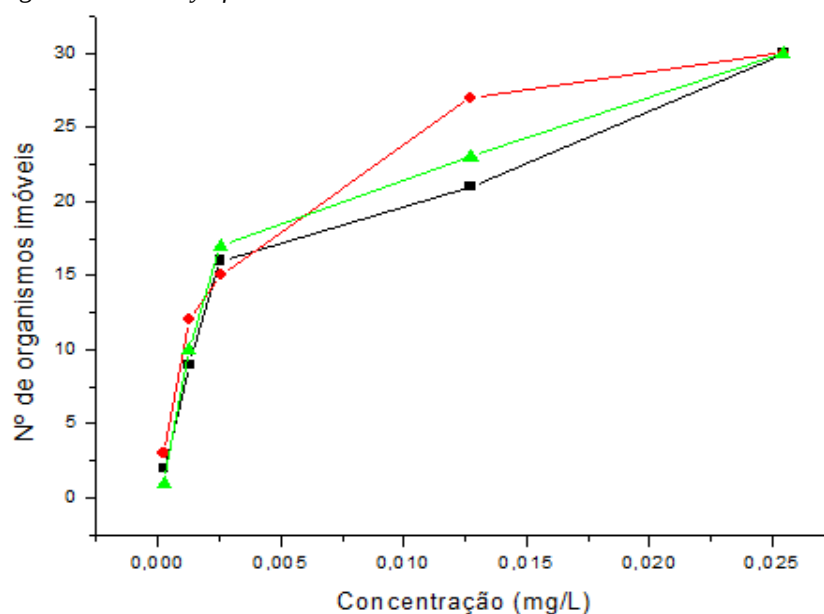
	CE50* (mg/L)	IC 95%**
Teste 1	0,003	0,0025 - 0,005
Teste 2	0,002	0,0025 – 0,005
Teste 3	0,0025	0,0025 – 0,0025
Média	0,0025	0,0025 – 0,004
Desvio padrão	0,0005	
CV (%)***	20	

*CE50 – Concentração efetiva 50%

**IC95% - Intervalo de confiança de 95%

***Coeficiente de variação

Figura 15: Curva dose-resposta do CuSO_4 referente ao teste de toxicidade aguda com *B. calyciflorus*.



Nota: As concentrações estão em valores corrigidos para cobre, e os pontos nas curvas indicam os valores médios de organismos imóveis para cada concentração.

A NP de CuO apresentou toxicidade aproximadamente 4 vezes menor que a solução de CuSO_4 nos testes com *B. calyciflorus*. Esse resultado pode estar relacionado com a tendência à aglomeração e coagulação das NP de CuO , que foi observada durante o preparo da suspensão, mesmo após o processo de sonicação. Dessa forma pode ter ocorrido uma menor liberação dos íons Cu^{2+} no meio do teste, reduzindo sua disponibilidade aos organismos e o aumento no tamanho dos agregados pode também ter dificultado a sua ingestão pelos rotíferos.

O potencial zeta da suspensão de NP de CuO apresentou-se baixo (-11,73 mV), outro fator que indica a aglomeração das NP. O potencial zeta caracteriza a estabilidade coloidal, e dá boa informação sobre a mobilidade dos nanomateriais, suas taxas de agregação e interações com as superfícies. Quando seu valor se aproxima de 0 mV, ocorre uma agregação maior, e o seu valor parece estar relacionado com o potencial de toxicidade (CATTANEO et al., 2009).

Apesar de ter apresentado toxicidade menor que o sal CuSO₄, a NP de CuO deste estudo apresentou toxicidade bem maior (aproximadamente 27 vezes) que a encontrada na literatura (0,39 mg/L) para *B. calyciflorus* (MANUSADZIANAS et al., 2012). Essa diferença pode ser devida à aglomeração das NP, já que no trabalho de Manusadzianas et al. (2012) as NP se aglomeraram mais rápido do que neste estudo, o que pode ter reduzido a biodisponibilidade dos íons cobre aos organismos. O tamanho dos agregados de NP também pode ter influenciado a toxicidade, já que de acordo com Pauluhn (2009), o tamanho dos agregados parece ser mais informativo do que o próprio tamanho da NP.

Entretanto, neste estudo e no estudo de Manusadzianas et al. (2012), a toxicidade da NP de CuO e do CuSO₄ de modo geral se assemelham para os organismos já testados, reforçando a hipótese de que a toxicidade das NP está relacionada predominantemente à liberação dos íons no meio (HEINLAAN et al., 2008; PERREAULT et al., 2014). Esse mesmo comportamento foi verificado nos testes de toxicidade aguda com *D. similis*, na qual a NP de CuO apresentou uma CE50 (0,064 mg/L) 4 vezes menor que a CE50 (0,015 mg/L) para CuSO₄, ou seja, a NP de CuO foi menos tóxica pelos mesmo motivos.

Dos trabalhos encontrados sobre a toxicidade de NP de CuO para organismos aquáticos (HEINLAAN et al., 2008; ARUOJA et al., 2009; PERREAULT et al., 2010; MANUSADZIANAS et al., 2012), o rotífero *B. calyciflorus* se apresentou o mais sensível à esse tipo de NP, indicando a importância de se avaliar a toxicidade de NP de CuO para organismos de diferentes níveis tróficos.

Embora a toxicidade da NP tenha sido menor que a do sal, os valores da CE50 apresentaram-se muito baixo, indicando alta toxicidade. De acordo com a Diretiva 67/548/EEC, principal legislação da União Europeia sobre segurança química, substâncias que apresentam CE50 menores que 1 mg/L são classificadas como muito tóxicas, indicando que a NP de CuO e o CuSO₄ podem oferecer riscos potenciais à biota aquática (KAHRU e IVASK, 2012).

A NP de Cr₂O₃ apresentou uma CE50 média igual a 78,27 mg/L, com intervalo de confiança de 95% entre 63,55 e 96,4 mg/L. Os valores das CE50 para os 3 testes

independentes são apresentados na Tabela 4, já corrigidos para íons cobre, e as curvas dose-resposta estão representadas na Figura 16.

Tabela 4: Valores de CE50 encontrados para os 3 testes independentes com NP de Cr_2O_3 para *B. calyciflorus*.

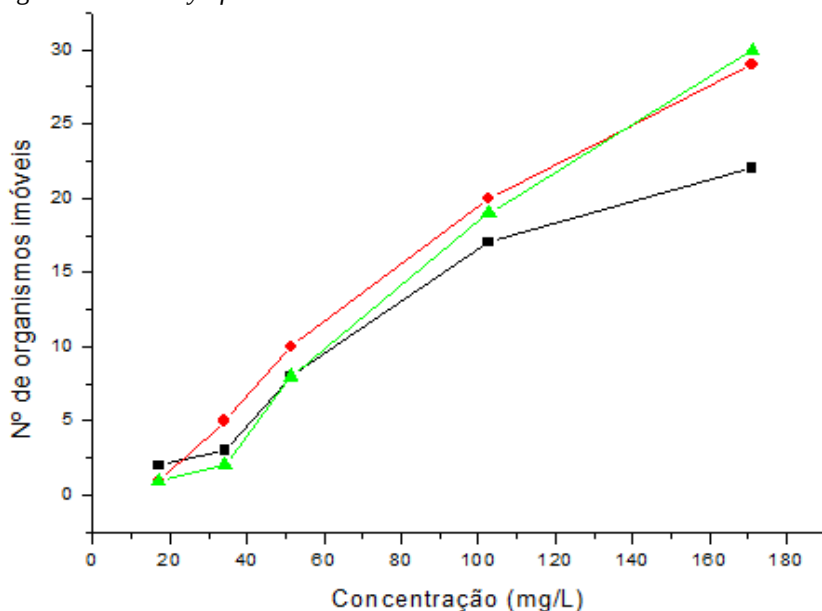
	CE50* (mg/L)	IC 95%**
Teste 1	89,97	68,21 – 118,68
Teste 2	68,24	57,4 – 81,12
Teste 3	76,61	65,05 – 89,42
Média	78,27	63,55 – 96,4
Desvio padrão	10,96	
CV (%)***	14,3	

*CE50 – Concentração efetiva 50%

**IC95% - Intervalo de confiança de 95%

***Coeficiente de variação

Figura 16: Curva dose-resposta das NP de Cr_2O_3 referente ao teste de toxicidade aguda com *B. calyciflorus*.



Nota: As concentrações estão em valores corrigidos para cromo, e os pontos nas curvas indicam os valores médios de organismos imóveis para cada concentração.

O nitrato de cromo ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$) apresentou CE50 média igual 15,32 mg/L, com intervalo de confiança de 95% entre 13,52 e 17,91 mg/L. Os valores das CE50 para os 3 testes independentes são apresentados na Tabela 5, já corrigidos para íons cromo, e a figura 17 representa a curva dose-resposta referente ao teste com $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$.

Tabela 5: Valores de CE50 encontrados para os 3 testes independentes com NP de Cr_2O_3 para *B. calyciflorus*.

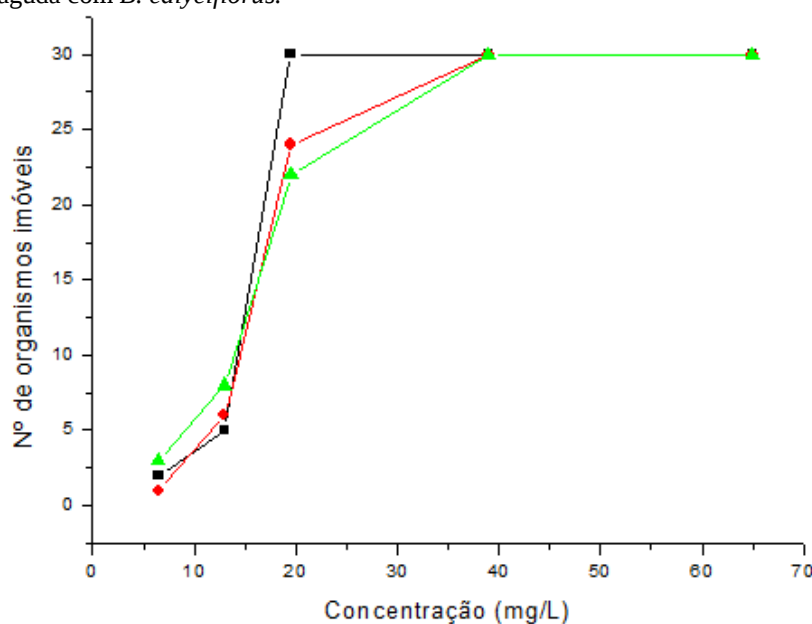
	CE50* (mg/L)	IC 95%**
Teste 1	14,72	13,41 – 17,81
Teste 2	15,75	13,92 – 17,81
Teste 3	15,48	13,23 – 18,12
Média	15,32	13,52 – 17,91
Desvio padrão	0,535	
CV (%)***	3,45	

*CE50 – Concentração efetiva 50%

**IC95% - Intervalo de confiança de 95%

***Coeficiente de variação

Figura 17: Curva dose-resposta do $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ referente ao teste de toxicidade aguda com *B. calyciflorus*.



Nota: As concentrações estão em valores corrigidos para cromo, e os pontos nas curvas indicam os valores médios de organismos imóveis para cada concentração.

A NP de Cr_2O_3 apresentou toxicidade aproximadamente 5 vezes menor que a solução de $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ nos testes com *B. calyciflorus*. Esse resultado pode estar relacionado à tendência à sedimentação das nanopartículas observada durante a realização do teste. Embora a suspensão com as NP de Cr_2O_3 apresentou-se relativamente mais estável e com poucos aglomerados, foi observada uma deposição do material no fundo das escavações das placas de teste, cujo volume é de 300 μL . Dessa forma, possivelmente houve uma menor liberação dos

íons Cr^{3+} no meio do teste, reduzindo sua disponibilidade aos organismos, e também a formação dos aglomerados parece ter dificultado a sua ingestão.

Esse comportamento não foi observado nos testes com *D. similis*, no qual a NP de Cr_2O_3 apresentou toxicidade aproximadamente 2 vezes maior que a solução de $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$. Entretanto, nos testes com *D. similis*, as nanopartículas apresentaram menor tendência à sedimentação, se mantendo mais estáveis em suspensão e menos aglomeradas, e consequentemente mais disponíveis às *Daphnia*. Além do cromo liberado no meio do teste, as NP presentes no interior do trato digestivo das *D. similis* podem ter agido como uma fonte direta de liberação dos íons Cr para os tecidos dos organismos-teste. Outro fator que pode ter influenciado na toxicidade dessas NP é o meio utilizado na realização do teste, água mineral para *D. similis* e meio padrão de diluição do Kit ROTOXKIT FTM para *B. calyciflorus*, já que fatores como pH, concentrações iônicas, interações entre NP e outros sais podem influenciar na tendência à aglomeração e sedimentação das NP (SCOWN et al., 2010).

Substâncias que apresentam um valor de CE50 entre 10 a 100 mg/L são consideradas perigosas de acordo com a Diretiva 67/548/EEC (KAHRU e IVASK, 2012). Dessa forma as NP de Cr_2O_3 e o nitrato de cromo podem ser classificados como perigosos à biota aquática.

7 CONCLUSÃO

As NP de CuO e Cr₂O₃ testadas apresentaram toxicidade aguda tanto para *D. similis* quanto para *B. calyciflorus*, bem como dos seus sais de partida. Entretanto, *B. calyciflorus* se mostrou mais sensível às NP de CuO e ao CuSO₄ do que *D. similis*, que apresentou maior sensibilidade às NP de Cr₂O₃ e ao Cr(NO₃)₃ em comparação ao rotífero. A toxicidade dessas NP parece estar associada principalmente à liberação dos íons cobre e cromo no meio, e a diminuição da toxicidade em relação aos sais inorgânicos pode estar relacionada à tendência à aglomeração e sedimentação dessas NP.

Tendo em vista a ampla utilização destas NP e sua consequente liberação no meio ambiente, são necessários mais estudos ecotoxicológicos desses materiais, principalmente de nanopartículas de cromo, cujos dados ecotoxicológicos são escassos.

Esse estudo reforça essa necessidade, já que as NP de CuO podem ser consideradas muito tóxicas e as NP de Cr₂O₃ perigosas à biota aquática.

REFERÊNCIAS

- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp. (Cladocera, Crustacea). Associação Brasileira de Normas Técnicas, Rio de Janeiro, 2. ed. , 2009, 21p.
- ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T. C.; SOUSA, O. Marine paints: The particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings**, v. 59, n. 1, p. 2-20, 2007.
- ANNARAO, S. et al. Chromium oxide nanoparticle distribution: an MRI study in rats. **International Society for Magnetic Resonance in Medicine**, v. 16, p. 2583, 2008.
- ARTAL, M. C. et al. The role of silver and vanadium release in the toxicity of silver vanadate nanowires toward *Daphnia similis*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 32, n. 4, p. 1-5, 2013.
- ARUOJA, V. et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Science of the Total Environment**, v. 407, n.4, p. 1461-1468, 2009.
- AUFFAN, M. et al. Ecotoxicity of inorganic nanoparticles: From unicellular organisms to invertebrates. **Encyclopedia of Nanotechnology**, pp. 623-636. Springer Netherlands, 2012.
- BRAR, S. K. et al. Engineered nanoparticles in wastewater and wastewater sludge – Evidence and impacts. **Waste Management**, v. 30, n. 3, p.504-520, 2010.
- BUFFET, P. E. et al. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. **Chemosphere**, v. 84, n. 1, p.166-174, 2011.
- CATTANEO, A. G. et al. Ecotoxicology of nanomaterials: the role of invertebrate testing. **ISJ-Invertebrate Survival Journal**, v. 6, n. 1, p. 78-97, 2009.
- COMPANHIA DE TECNOLOGIA DE SANEAMENTO AMBIENTAL DO ESTADO DE SÃO PAULO - CETESB. **Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustácea). Método de Ensaio**. L5.018, 1994.
- CHANG, H. et al. Rheology of CuO nanoparticle suspension prepared by ASNSS. **Advanced Materials**, v. 10, n. 2, p.128-132, 2005.

CHAROY, C. P. et al. The swimming behaviour of *Brachionus calyciflorus* (rotifer) under toxic stress. I. The use of automated trajectometry for determining sublethal effects of chemicals. **Aquatic Toxicology**, v. 32, n. 4, p. 271-282, 1995.

CHATTERJEE, R. The challenge of regulating nanomaterials. **Environmental science & technology**, v. 42, n. 2, p. 339-343, 2008.

CHRISTIAN, P. et al. Nanoparticles: Structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. **Ecotoxicology**, v.17, n. 5, p. 326-343, 2008.

CLEMENT, L.; HUREL, C.; MARMIER, N. Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants – Effects of size and crystalline structure. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, p. 1083-1090, 2013.

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES. **Commission Directive 93/67/EEC of 20 July 1993, laying down the principles for assessment of risks to man and the environment of substances notified in accordance with Council Directive 67/548/EEC.** Official Journal of the European Communities L227/9, 1993.

DAHMS, H.U.; HAGIWARA, A.; LEE, J.S. Ecotoxicology, ecophysiology, and mechanistic studies with rotifers. **Aquatic Toxicology**, v. 101, n. 1, p. 1-12, 2011.

DURAN, N.; MATTOSO, L.H.C.; MORAIS, P.C. Nanotecnologia, introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. **Artliber**, 2006, 208p.

FOSSI, M.C.; SAVELLI, C.; CASINI, S. Mixed function oxidase induction in *Carcinus aestuarii*. Field and experimental studies for the evaluation of toxicological risk due the mediterranean contaminants. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 121, n. 1, p. 321-331, 1998.

GAISER, B. K. et al. Interspecies comparisons on the uptake and toxicity of silver and cerium dioxide nanoparticles. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 144-154, 2012.

GIBOT, P.; VIDAL, L. Original synthesis of chromium (III) oxide nanoparticles. **Journal of the European Ceramic Society**, v. 30, n. 4, p. 911-915, 2010.

GRIFFITT, R. J. et al. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 9, p. 1972-1978, 2008.

HAMILTON, M.A.; RUSSO, R.C.; THURTON, R.V. Trimed Spearman-Kärber method for estimating median lethal concentrations in toxicity bioassays. **Environmental Science & Technology**, v. 11, n. 7, p. 714-719, 1977.

HANDY, R.D.; OWEN, R.; VALSAMI-JONES, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: Current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. **Ecotoxicology**, v. 17, n. 5, p. 315–325, 2008.

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, 2008.

HOLBROOK, R.D. et al. Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food chain. **Nature Nanotechnology**, v.3, n. 6, p. 352-355, 2008.

HORIE, M. et al. Chromium (III) oxide nanoparticles induced remarkable oxidative stress and apoptosis on culture cells. **Environmental toxicology**, v. 28, n. 2, p. 61-75, 2013.

INTERNATIONAL COUNCIL OF MARINE INDUSTRY ASSOCIATIONS - ICOMIA. **Factsheet on copper-based antifouling**. 2006.

ISANI, G. et al. Comparative toxicity of CuO nanoparticles and CuSO₄ in rainbow trout. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 97, p. 40–46, 2013.

JOHNSON, A.; CAREW, E.; SLOMAN, K. A. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. **Aquatic Toxicology**, v. 84, n. 4, p. 431-438, 2007.

JOHNSTON, H. et al. Engineered nanomaterial risk. Lessons learnt from completed nanotoxicology studies: potential solutions to current and future challenges. **Critical reviews in toxicology**, v. 43, n.1, p. 1-20, 2013.

KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H. C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, v. 269, n. 2, p. 105-119, 2010.

KAHRU, A.; IVASK, A. Mapping the dawn of nanoecotoxicological research. **Accounts of chemical research**, v. 46, n.3, p. 823-833, 2012.

KLAINÉ, S. J. et al. Paradigms to assess the environmental impact of manufactured nanomaterials. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 1, p. 3-14, 2012.

KOGA, K.; SUGAWARA, K. I. Population statistics of gold nanoparticle morphologies: direct determination by HREM observations. **Surface science**, v. 529, n.1, p. 23-35, 2003.

KRUG, H. F.; WICK, P. Nanotoxicology: an interdisciplinary challenge. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 50, n.6, p. 1260-1278, 2011.

LIN, S. et al. Zebrafish high-throughput screening to study the impact of dissolvable metal oxide nanoparticles on the hatching enzyme, ZHE1. **Small**, v. 9, n. 9-10, p. 1776–1785, 2012.

LOVERN, S.B.; STRICKLER, J.R.; KLAPER, R.D. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nano-particle suspensions (titanium dioxide, nano-C₆₀ and C₆₀HxC₇₀Hx). **Environmental science & technology**, v. 41, n. 12, p. 4465–4470, 2007.

LOVERN, S. B.; OWEN, H. A.; KLAPER, R. Electron microscopy of gold nanoparticle intake in the gut of *Daphnia magna*. **Nanotoxicology**, v.2, n. 1, p.43-48, 2008.

MAGALHÃES, D. P.; FERRÃO-FILHO, A. S. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia Brasiliensis**, v. 12, n.3, p. 355-381, 2008.

MAKHLOUF, S.A. et al. Structural, morphological and electrical properties of Cr₂O₃ nanoparticles. **Materials Science and Engineering**, v. 178, n. 6, p. 337-343, 2013.

MANUSADZIANAS, L. et al. Toxicity of copper oxide nanoparticle suspensions to aquatic biota. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n.1, p. 108-114, 2012.

MARTINEZ, D. S. T.; ALVES, O. L. Interação de nanomateriais com biosistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação. **Ciência e Cultura**, v. 65, n. 3, p. 32-36, 2013.

MARTINS, T. L.; VARGAS, M.F. Riscos à biota aquática pelo uso de tintas anti-incrustantes nos cascos de embarcações. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n.1, p. 1-11, 2013.

MEDINTZ, I. L. et al. Quantum dot bioconjugates for imaging, labeling and sensing. **Nature Materials**, v. 4, n.6, p. 435–446, 2005.

MELEGARI, S.P. et al. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 142-143, p. 431-440, 2013.

MOORE, M.N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? **Environment International**, v. 32, n.8, p. 967–976, 2006.

MUELLER, N.C.; NOWACK, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. **Environmental Science Technology**, v. 42, n.12, p. 4447–4453, 2008.

NANUM NANOTECNOLOGIA. Disponível em:
<www.nanum.com.br/interna.php?area=produto&escolha=45&idIdioma=>, Acessado em agosto de 2013.

OBERDÖRSTER, E. et al. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: Effects of fullerene (C₆₀) on aquatic organisms. **Carbon**, v. 44, n. 6, p. 1112-1120, 2006.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT - OECD. **Detailed review paper on aquatic arthropods in life-cycle toxicity tests with an emphasis on developmental, reproductive and endocrine disruptive effects**. OECD series on testing and assessment, number 55, ENV/JM/MONO. Paris, p. 125, 2006.

PAGGI, S.J. Rotifera. In: Lopretto, E.C. & Tell, G. **Ecosistemas de águas continentales. Metodologías para su estudio II**. Ediciones Sur, La Plata, p. 643-667, 1995.

PASCHOALINO, M.P.; MARCONE, G.P.S.; JARDIM, W.F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n.2, p. 421-30, 2010.

PAULUHN, J. Pulmonary toxicity and fate of agglomerated 10 and 40 nm aluminum oxyhydroxides following 4-week inhalation exposure of rats: toxic effects are determined by agglomerated, not primary particle size. **Toxicological sciences**, v. 109, n. 1, p. 152-167, 2009.

PERREAULT, F. et al. Evaluation of Copper Oxide Nanoparticles Toxicity Using Chlorophyll *a* Fluorescence Imaging in *Lemna gibba*. **Journal of Botany**, v. 2010, 9p., 2010.

PERREAULT, F., POPOVIC, R.; DEWEZ, D. Different toxicity mechanisms between bare and polymer-coated copper oxide nanoparticles in *Lemna gibba*. **Environmental Pollution**, v. 185, p. 219-227, 2014.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o Meio Ambiente: Perspectivas e Riscos. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 1028-1029, 2004.

REICHEL-T-BRUSHETT A.J.; HARRISON P.L. The effect of copper on the settlement success of larvae from the scleractinian coral *Acropora tenuis*. **Marine Pollution Bulletin**, v. 41, n. 7, p. 385-391, 2000.

RODGHER, S.; ESPÍNDOLA, E. L. G.; LOMBARDI, A. T. Suitability of *Daphnia similis* as an alternative organism in ecotoxicological tests: implications for metal toxicity. **Ecotoxicology**, v. 19, n.6, p. 1027-1033, 2010.

ROYAL SOCIETY AND THE ROYAL ACADEMY OF ENGINEERING. **Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties**. London, 2004.

RUPPERT, E.; BARNES, R. D. **Zoologia dos Invertebrados**. 6. ed. Livraria Rocca Ltda. São Paulo, 1996, 1029p.

SAYES, C. M.; REED, K. L.; WARHEIT, D. B. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. **Toxicological Sciences**, v. 97, n.1, p. 163-180, 2007.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCOWN, T. M. et al. Effects of aqueous exposure to silver nanoparticles of different sizes in rainbow trout. **Toxicological Sciences**, v. 115, n. 2, p. 521-534, 2010.

SERVICE, R.F. Nanotechnology grows up. **Science**, v. 304, n. 5678, p. 1732-1734, 2004.

SNELL, T. W.; PERSONE, G. Acute toxicity bioassays using rotifers. I. A test for brackish and marine environments with *Brachionus plicatilis*. **Aquatic toxicology**, v. 14, n.1, p. 65-80, 1989.

SNELL, T.W. A standard practice for performing acute toxicity tests using rotifers in the genus *Brachionus*. **American Society Testing Materials**, v. 11, p. 1210–1216, 1991.

SNELL, T.; JANSSEN, C. Rotifers in ecotoxicology: a review. **Hydrobiologia**, v. 313, n. 1, p. 231–247, 1995.

SNELL, T.W. Estimating chronic toxicity using rotifers. Standard methods for the examination of water and wastewater. **American Water Works Association**, Baltimore, v. 20, p. 8–65, 1998.

SNELL, T. W.; HICKS, D. G. Assessing toxicity of nanoparticles using *Brachionus manjavacas* (Rotifera). **Environmental Toxicology**, v. 26, n.2, p. 146-152, 2011.

STONE, V. et al. Nanomaterials for environmental studies: classification, reference material issues, and strategies for physico-chemical characterisation. **Science of the Total Environment**, v. 408, n. 7, p. 1745–1754, 2010.

TEMPLETON, R.C.; FERGUSON, P.L.; WASHBURN, K.M. Life Cycle Effects of Single Walled Carbon Nanotubes (SWNTs) on an Estuarine Meiobenthic Copepod. **Environment Science & Technology**, v. 40, n. 23, p. 7387–7393, 2006.

VAJPAYEE, P. et al. Adverse effects of chromium oxide nano-particles on seed germination and growth in *Triticum aestivum*. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 205-206, 2011.

VASEASHTA, A. et al. Nanostructures in environmental pollution detection, monitoring, and remediation. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 8, n. 1, p. 47-59, 2007.

WALLACE, R.L. Rotifers: exquisite metazoans. **Integrative and Comparative Biology**, v. 42, n. 3, p. 660–667, 2002.

WANG, Z.; LI, J.; ZHAO J.; XING, B. Toxicity and Internalization of CuO Nanoparticles to Prokaryotic Alga *Microcystis aeruginosa* as Affected by Dissolved Organic Matter. **Environment Science Technology**, v. 45, n. 14, p. 6032-6040, 2011.

WREN, CD.; STEPHENSON, G.L. The effects of acidification on the accumulation and toxicity of metals to freshwater invertebrates. **Environment Pollution**, v. 71, p. 205-241, 1991.

ZAGATTO, P. A. Sensibilidade de *Daphnia similis*: controle de qualidade de culturas. **Ambiente: revista CETESB de tecnologia**, v. 2, n. 2, p. 79-83, 1988.

ZHOU, K. et al. Synthesis, characterization and catalytic properties of CuO nanocrystals with various shapes. **Nanotechnology**, v. 17, n. 15, p. 3939–3943, 2006.

ZHU, X. et al. Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensions to *Daphnia magna*. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n.1, p. 67-75, 2009.

ZHU, X. et al. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from *Daphnia* to zebrafish in a simplified freshwater food chain. **Chemosphere**, v. 79, n. 9, p. 928–933, 2010.

SEGUNDA PARTE

ARTIGO: Acute toxicity of copper oxide and chromium oxide nanoparticles to *Daphnia similis*

Autores: Karla Palmieri Tavares; Ádria Caloto de Oliveira; Denice Schulz Vicentini; Silvia Pedroso Melegari; William Gerson Matias; Sandro Barbosa; Fábio Kummrow.

Artigo redigido conforme as normas da revista da Sociedade Brasileira de Ecotoxicologia (ECOTOX-BRASIL), Ecotoxicology and Environmental Contamination (EEC).

1 **Acute toxicity of copper oxide and chromium oxide nanoparticles to *Daphnia similis***

2 K.P. Tavares¹; A.Caloto-Oliveira²; D.S. Vicentini³; S.P. Melegari³; W.G. Matias³; S.
3 Barbosa¹; F. Kummrow⁴

4
5 1 Institute of Nature Sciences, Federal University of Alfenas, Alfenas - MG, Brazil.

6
7 2 Laboratory of Ecotoxicology and Environmental Microbiology, LEAL, Faculty of
8 Technology, State University of Campinas, Limeira - SP, Brazil.

9
10 3 Laboratory of Environmental Toxicology, LABTOX, Department of Sanitary and
11 Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis - SC, Brazil.

12
13 4 Institute of Environmental, Chemical and Pharmaceutical Sciences, Federal University of
14 São Paulo, Diadema - SP, Brazil.

15
16
17 *Corresponding author: Fábio Kummrow; e-mail: fkummrow@unifesp.br

18 Universidade Federal de São Paulo – *campus* Diadema; Rua São Nicolau, 210 - Centro –
19 Diadema; CEP: 09913-030 - Tel: (11) 3319-3574, Fax: (11) 4043-6428.

Abstract

Copper oxide nanoparticles (CuO NPs) are employed in antifouling paints, and nanoparticles of chromium oxide (Cr₂O₃ NPs) have been used as a green pigment. Their extensive use can contaminate aquatic ecosystems, and the toxicological effects of these NPs to the biota are poorly known. In this study, we evaluated the acute toxicity induced by CuO NPs and Cr₂O₃ NPs, comparing with CuSO₄ as Cu²⁺ ion source and Cr(NO₃)₃ as Cr³⁺ ion source, using *Daphnia similis*. The mean EC50 for CuO NPs was 0.064 mg L⁻¹ and for CuSO₄ was 0.015 mg L⁻¹, lower values of EC50 than those available in the literature for *D. magna*. CuO NPs tend to agglomerate, which may have reduced the release of Cu²⁺ in the test medium in relation to CuSO₄. The mean EC50 for Cr₂O₃ NPs was 6.74 mg L⁻¹ and for Cr(NO₃)₃ was 11.98 mg L⁻¹. The reduced size of the Cr₂O₃ NPs (15-30 nm) and the higher zeta potential may have contributed to the higher stability in suspension and less potential for agglomeration, partially explaining the higher toxicity of NPs in relation to Cr(NO₃)₃. After the tests, we observed morphological damages in organisms exposed to all tested substances, nanoparticles or the salts.

Keywords: Acute toxicity, Chromium oxide nanoparticles, Copper oxide nanoparticles, *Daphnia similis*, Nanotoxicology.

INTRODUCTION

Metal oxide nanoparticles (NPs) are already manufactured in large scale for both industrial and household use, and are incorporated into a wide range of products such as sunscreens, paints, construction materials, coatings, catalysts and cosmetics (Aruoja *et al.*, 2009; Keller *et al.*, 2010; Hanna *et al.*, 2013). Copper oxide (CuO) NPs have potential to replace noble metal catalysts for carbon monoxide oxidation and CuO NPs suspension (nanofluid) has excellent thermal conductivity for it to be used as a heat transfer fluid in machine tools (Buffet *et al.*, 2011). Furthermore, CuO NPs has been used for antimicrobial textiles (Gabbay *et al.*, 2006), gas sensors, photovoltaic cells, air and liquid filtration (Sousa & Teixeira, 2013), and as antifouling paints of boats, thus representing an important source of aquatic ecosystems contamination (Melegari *et al.*, 2013). Chromium oxide (Cr₂O₃) NPs has also attracted considerable attention in recent years. A wide range of applications such as coating materials for thermal protection, wear resistance, humidity sensing and refractory characteristics have been reported (Makhlouf *et al.*, 2013). In addition, this type of NP has been used in green pigment composition (Gibot & Vidal, 2010). As result of the increased use and production of NPs over the last years has led to their release in aquatic environments (Kahru *et al.*, 2008; Hanna *et al.*, 2013).

However, while the novel properties of NPs are increasingly studied, little information is available about their interactions with aquatic organisms (Kahru *et al.*, 2008). Additionally, transformations of NPs, such as dissolution, agglomeration, sedimentation, or change of surface moieties, could greatly affect the pathway and extent of NPs environmental fate (Maurer-Jones *et al.*, 2013). When added to water, metal NPs can aggregate, sediment out of the water column, adsorb to nutrients, and disassociate to release soluble metal ions (Griffitt *et al.*, 2009). Moreover, the knowledge of biological effects, target sites, and especially the

modes of action of the engineered particles seems to be inappropriate yet (Manusadžianas *et al.*, 2012).

Nanoparticles of CuO were identified as being important in ecotoxicological assays due to their relatively low dissolution rate but their potentially high toxicity towards organisms (Buffet *et al.*, 2011). Several studies have demonstrated toxicity of CuO NPs to aquatic organisms (Heinlaan *et al.*, 2008; Kahru & Dubourguier, 2010; Buffet *et al.*, 2011; Aruoja *et al.*, 2009; Isani *et al.*, 2013). Thus, it is necessary to characterize correctly their effects on aquatic organisms, considering the high toxicity before demonstrated by copper ions to aquatic organisms (Kahru & Dubourguier, 2010). On the other hand limited data are available in the literature on chromium oxide NP toxicity. Annarao *et al.* (2008) examined the distribution of Cr₂O₃ NPs in rats and found that its absorption through the skin was efficient and NPs were evenly distributed in the tissues and muscles. Vajpayee *et al.* (2011) evaluated the phytotoxic effects of Cr₂O₃ NPs to wheat (*Triticum aestivum*), and observed that there was inhibition of seed germination and seedling growth in concentration-dependent manner. However, studies published in the international literature on the toxicity of these types of NPs to aquatic organisms are limited. Lin *et al.* (2013) used zebrafish (*Danio rerio*) embryos and demonstrated that Cr₂O₃ NPs interfered in embryo hatching.

The aim of this work was to evaluate the acute toxicity of CuO and Cr₂O₃ NPs, comparing with CuSO₄ as Cu²⁺ ion source and Cr(NO₃)₃ as Cr³⁺ ion source, using *Daphnia similis*. Daphnids are considered a keystone species in aquatic toxicology because they are filter-feeders and are able to ingest NPs. They have also been proposed as a model organism for the ecotoxicological testing of nanomaterials (Artal *et al.*, 2013).

MATERIAL AND METHODS

Materials

The following materials were used to synthesized the evaluated NPs: copper sulfate hydrate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), sodium carbonate (Na_2CO_3), chromium nitrate hydrate ($\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) and sodium hydroxide (NaOH) purchased from Vetec[®] (Duque de Caxias, RJ, Brazil) and distilled water. All chemicals were analytical grade and were used as received.

CuO NPs synthesis

CuO NP was prepared via direct thermal decomposition method (Das et al., 2013) with a few modifications. The precursor was synthesized by adding 100 mL of a 60 mmol Na_2CO_3 solution to 100 mL of a 50 mmol $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ solution, and the mixture was ultrasonicated in a ultrasonic cell disruptor (Unique – 100 W, 99% of the maximum power) for 60 min at 60 °C. The precipitate produced was separated by centrifugation and washed several times with warm distilled water to remove any possible remaining ions in the final product. Then, the precipitate was transferred to a silica crucible and placed in an oven at 70 °C for 12 h. Finally, it was placed in a preheated muffle furnace at 600 °C for decomposition. After 2 h, the silica crucible was removed from the furnace and allowed to cool to room temperature, and the resulting dark brown powder was ground and sieved.

Cr₂O₃ NPs synthesis

The Cr_2O_3 NPs were synthesized using the thermal degradation methodology of $\text{Cr}(\text{OH})_3$ proposed by Bañobre-López *et al.* (2003) with few modifications. 21 mmol $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ and 50 mmol NaOH were added to 100 mL of distilled water and stirred for 30 min. The product was separated by centrifugation and washed several times with distilled

water. The $\text{Cr}(\text{OH})_3$ was dried in an oven for 24 h at 90 °C. Finally the product was calcined at 400 °C for 3 h for obtain Cr_2O_3 NPs.

Characterizations of NPs

All synthesized NPs were characterized by X-ray diffractograms (XRD), which were measured over the angular range of $2\theta = 20^\circ - 80^\circ$ using a Philips X'Pert diffractometer equipped with a copper tube ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1.54056 \text{ \AA}$). Images revealing the morphologies and sizes of the NPs were obtained using a transmission electron microscope (TEM; JEM-1011 TEM microscope). The zeta potential (ζ) of the NPs was measured using a Malvern Zetasizer Nano ZS (ZEN 3600 model). The samples for zeta potential and transmission electron microscope were prepared in ultrapure water (UW) (1 g L^{-1}).

Ecotoxicity testing

Suspensions of CuO NPs (100 mg L^{-1}) and Cr_2O_3 NPs (1000 mg L^{-1}) were prepared in mineral water and sonicated for 30 minutes in an ultrasonic bath (Colle Palmer 8891). CuO NPs were tested at concentrations 0.02; 0.04; 0.06; 0.08; 0.10; 0.12 and 0.14 mg L^{-1} . Cr_2O_3 NPs were tested at concentrations 10, 15, 20, 25, 30, 35 and 40 mg L^{-1} .

For comparison, solutions of the salts (CuSO_4 and $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$) used in the NPs synthesis were tested as a source of Cu^{2+} and Cr^{3+} , respectively. CuSO_4 was tested using the nominal concentrations of 0.02; 0.04; 0.06; 0.08; 0.10; 0.12 and 0.14 mg L^{-1} , while $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ was tested using nominal concentrations of 30, 60, 90, 120, 150 and 180 mg L^{-1} . The tests were performed immediately after the preparation of the suspensions and solutions.

D. similis stock cultures were kept according to procedure NBR 12713 (ABNT, 2009). The sensitivity of the *D. similis* culture was monitored monthly with sodium chloride (NaCl), Sigma Aldrich, $\geq 99\%$ purity, as a reference substance, and the culture was used if the results

were within the range expected toxicity whose EC50 should be between 1.6 and 3.6 g L⁻¹ (CETESB, 1994). Acute toxicity tests were performed according to the NBR 12713 (ABNT, 2009). For each of four replicates, five organisms 6- to 24-h-old were exposed during 48 h in 10 mL of each test concentrations under static conditions at 20 ± 2 °C in the dark. After exposure, immobilized organisms were counted and the EC50 (48 h) estimated by the Trimmed-Spearman Karber method (Hamilton *et al.*, 1977). Tests were considered acceptable if *D. similis* immobility in negative controls did not exceed 10%.

RESULTS AND DISCUSSION

Characterizations of NPs

Factors such as nanoparticle aggregation, size and surface properties play a crucial role in nanoparticle toxicity because they affect the bioavailability of such materials (Sousa & Teixeira, 2013), and so the characterization of NPs that will be submitted to ecotoxicological evaluation is a fundamental step.

TEM images of the synthesized CuO and Cr₂O₃ NPs are shown in Figure 1 (a and b). The TEM image in Figure 1a shows that the NPs are nearly spherical, with diameters ranging from 50 to 100 nm. Figure 1b shows an irregular morphology, with rare scattered clusters and NPs with sizes ranging between 15 and 30 nm.

Figure 1

The crystalline structures of NPs were examined by XRD (Figure 2 (a) and (b)). For CuO NPs the diffraction peaks from are consistent with the standard structure and can be indexed to the monoclinic phase of CuO (JCPDS No. 89-5898) (Massarotti *et al.*, 1998). The results indicated that the products are consisted of pure phase. Different peaks were observed

at $2\theta = 32.50^\circ$ (110), 35.42° (002), 38.70° (111), 48.72° (202), 53.49° (020), 58.27° (202), 61.52° (113), 66.22° (311) and 68.12° (220) corresponds to several planes of CuO NP. This confirms the formation of CuO NPs. For Cr₂O₃ NPs the diffraction peaks from are consistent with the crystal structure rhombohedral (space group 167, R-3c) and hexagonal lattice parameters (JCPDS No. 082-1484). Different peaks were observed at $2\theta = 24.65^\circ$ (012), 33.70° (104), 36.32° (110), 39.86° (006), 41.46° (113), 44.28° (202), 50.28° (024), 54.86° (116), 63.32° (214) and 65.27° (300) corresponds to several planes of Cr₂O₃ NPs. The crystallite size based on X-ray peak broadening was estimated using Debye-Scherrer's equation (Equation 1) (El-Trass *et al.*, 2012):

$$d(\text{\AA}) = \frac{k\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (1)$$

where k is an empirical constant equal to 0.9, λ is the wavelength of the X-ray source (1.5405 Å), β is the full width at half maximum of the diffraction peak, and θ is the angular position of the peak. The average value calculated for the crystallite size for CuO NPs is 25.2 nm and for Cr₂O₃ NPs is 28.40 nm.

Figure 2

Zeta potential value for CuO NPs suspension in ultrapure water was -11.73 mV, and the pH of the suspension was 6.07. The measure of Zeta Potential of Cr₂O₃ NPs was -19.65 mV and pH = 6.87. Zeta Potential is a common indicator of surface charge, which is the electrical potential at the surface of a sphere that includes the particle and adjacent water molecules that travel with the particle during its motion. A common rule of thumb is that the zeta potential must be > 30 mV or < -30 mV for repulsion to be sufficiently strong to avoid agglomeration (Oberdörster *et al.*, 2013).

The zeta potential indicates the stability of NPs in solution. The higher the value of the zeta potential greater will be the stability of NPs. These results indicate that Cr₂O₃ is more

stable in solution than CuO and both NPs exhibit pH within the pH range suitable to perform toxicological testing.

Ecotoxicity testing

The EC50 were determined from the means of results from three independent tests. Since the literature suggests that the toxicity of metal NPs is mainly related to the release of the metallic ions (Heinlaan *et al.*, 2008; Aruoja *et al.*, 2009; Perreault *et al.*, 2014), the EC50 were corrected for mass of copper present in the NPs as well as in the CuSO₄ and for mass of chromium present in Cr₂O₃ NPs and Cr(NO₃)₃.

The EC50 mean for CuO NPs was 0.064 mg L⁻¹ and for CuSO₄ was 0.015 mg L⁻¹ (Table 1). CuO NPs were four times less toxic than the copper sulfate salt (values corrected by mass of copper). The CuSO₄ EC50 obtained for *D. similis* is in agreement to the results of Bertolleti *et al.* (1992), 0.023 mg L⁻¹. Besides different species of *Daphnia* present differences in the sensibility to metals, Arauco *et al.* (2005) compare the toxicity of CuSO₄ using three different species of *Daphnia*. The author obtained similar values of CuSO₄ EC50 for *D. similis* and *D. magna* (0.0447 and 0.0426 mg L⁻¹ respectively, values of EC50 without correction for Cu mass). Rodgher *et al.* (2010) evaluated the response of *D. similis* to cadmium and chromium and concluded that this specie is as sensitive to metals as other standardized *Daphnia* species and behaves as an ideal test organism for ecotoxicological assessments. Based on this data and in the lack of toxicity data for CuO NPs to *D. similis* we compare our results with data from *D. magna* available in the literature.

Table 1

The EC50 values for CuO NPs and CuSO₄ obtained in this work were lower than values available in the literature for *D. magna*. Heinlaan *et al.* (2008) compare the toxicity of CuO NPs with particle size ~30 nm and CuSO₄ obtaining EC50 of 2.6 mg L⁻¹ for CuO NPs

and 0.07 mg L⁻¹ for CuSO₄. Blinova *et al.* (2010) also compare the toxicity of CuO NPs with CuSO₄ in natural river waters samples collected in six different sampling sites. The authors obtained EC50 ranging from 92.7 to >200 mg L⁻¹ for CuO NPs and 0.24 to 0.92 mg L⁻¹ to CuSO₄. The lower toxicity observed in river water samples in comparison to the test media was attributed to the presence of organic matter that can strongly complex to Cu and reduce the bioavailability of copper ions (Blinova *et al.*, 2010).

Copper sulfate salt was more toxic than the CuO NPs for both *D. similis* and *D. magna* (Heinlaan *et al.*, 2008; Blinova *et al.*, 2010). The same behavior was observed to *Oncorhynchus mykiss* (Isani *et al.*, 2013) and *Lemna gibba* (Perreault *et al.*, 2014). The higher toxicity of the CuSO₄ is associated to the greater bioavailability of Cu ions in de test media in comparison to the release of Cu ions from the CuO NPs. Other important factor is the aggregation of the NPs that can decrease the release of Cu ions (Perreault *et al.*, 2014). In this work the lower toxicity of the CuO NPs in relation of CuSO₄ may be related also by CuO NPs tendency to agglomerate, which may have reduced the release of Cu²⁺ in the test medium and also a lower intake of the agglomerates by *D. similis*. This tendency to agglomeration and coagulation was observed during the preparation of the suspension and by the low zeta potential (-11.73 mV).

During the evaluation of the tests organisms, it was observed an increase in the size of fat droplets as a response to exposure to nanoparticle (Figure 3b) compared to control (Figure 3a). Artal *et al.* (2013) also reported small bubbles under the carapace of *D. similis* exposed the silver nanowires that were similar to those observed in this work. The organisms exposed to CuSO₄ suffered great damage with exposure of internal organs (Figure 3b).

Figure 3.

Although the toxicity of CuO NPs was lower than that of the CuSO₄ salt, the values of EC50 had become very low, indicating high toxicity. According to Directive 67/548/EEC, the

main EU legislation on chemical safety, substances that exhibit EC50 less than 1 mg L⁻¹ are classified as very toxic (Kahru & Ivask, 2012), indicating that the CuO NPs and CuSO₄ may offer potential risks to aquatic biota.

Until the finishing of this manuscript, few studies investigated the chromium NPs toxicity. Lin *et al.* (2012) investigated the toxicity of chromium NPs to aquatic organisms using *Danio rerio*. This study has indicated that Cr₂O₃ NPs could interfere with embryo hatching by a chelator-sensitive mechanism that involves ligation of critical histidines in the ZHE1 (metalloprotease, responsible for degradation of the chorionic membrane) center by the shed metal ions. Moreover Horie *et al.* (2011) demonstrated that Cr₂O₃ NPs have a high cytotoxic potential to human keratinocyte HaCaT cells.

The mean EC50 for Cr₂O₃ NPs was 6.74 mg L⁻¹ and for Cr(NO₃)₃ was 11.98 mg L⁻¹ (Table 2). Cr₂O₃ NPs were approximately two times more toxic than the solution of Cr(NO₃)₃. For the Cr₂O₃ NPs the toxicity cannot completely be explained by the Cr³⁺ ions release. The reduced size of the Cr₂O₃ NPs (15-30 nm) and the higher zeta potential may have contributed to the observed toxicity. The tested Cr₂O₃ NPs were more stable in suspension and have less agglomeration potential. Thus, in addition to chromium released in the test medium, the NP present in the *D. similis* gut may have acted as a direct source of release of Cr ions to the test organism tissues. Hund-Rinke & Simon (2006) found that particles with smaller diameters are more easily ingested by *D. magna*, without any selective mechanism. However, larger particles are more difficult to be processed by the *Daphnia* (Baudo, 1987), thereby avoiding that the NPs reach the filter chamber.

Table 2

Organisms exposed to NP Cr₂O₃ were observed after the end of the test, and we could observe that the *Daphnia* were partially disintegrated and presented a dark material inside the bodies (Figure 4a), suggesting the intake of the tested NPs. We also observed blue spots in the

organisms exposed to $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$, probably due to deposition of chromium nitrate on the carapace of *D. similis* (Figure 4b).

Figure 4

Some EC50 values for trivalent chromium have been reported for invertebrate species. Caloto-Oliveira (2007) evaluated the toxicity of potassium dichromate to *D. similis* and the EC50 obtained was 0.081 mg L^{-1} (value corrected by chromium mass). To *D. magna*, the range of EC50 obtained to chromic nitrate ranging from 2 and $58.7 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ (USEPA, 1980), varying according to the hardness of the water.

Substances with EC50 value ranging $1\text{-}10 \text{ mg L}^{-1}$ are considered toxic in accordance with Directive 67/548/EEC and dangerous when EC50 value ranging $10\text{-}100 \text{ mg L}^{-1}$ (Kahru & Ivask, 2012). Thus the NP Cr_2O_3 and chromium nitrate can be considered as toxic and dangerous, respectively.

CONCLUSIONS

Both NPs tested showed toxicity to *D. similis*, but with distinct behaviors. While the toxicity of CuO NPs appears is primarily associated with the release of Cu ions in the test medium, this mechanism does not appear to be the main cause of the toxicity of Cr_2O_3 NPs. The Cr_2O_3 NPs were approximately two times more toxic than chromium salt indicating the characteristics of NPs, such as its reduced size, has an important influence on the toxicity observed. In view of the wide use of these NPs and their release into the environment, further ecotoxicological studies of these materials are required, mainly of chromium nanoparticles, whose ecotoxicological data are scarce.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq - Proj. nº 552112/2011-9) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível (CAPES - Proj. nº 017/2009) for financial support and LCME/UFSC for support on TEM analysis. We also thank to Dr G.A. Umbuzeiro for the use of the Laboratory of Ecotoxicology and Environmental Microbiology for performing tests. K.P. Tavares thanks CAPES for the scholarship granted.

REFERENCES

- ANNARAO, S., GURBANI, D., JAYALAKSHMI, K., SINHA, N., PARMAR, D., DHAWAN, A. & KHETRAPAL, C. L. 2008. Chromium oxide nanoparticle distribution: an MRI study in rats. *International Society for Magnetic Resonance in Medicine*, 16: 2583.
- ARAUCO, L.R.R., CRUZ, C. & MACHADO-NETO, J.G. 2005. Efeito da presença de sedimento na toxicidade aguda do sulfato de cobre e do triclorfon para três espécies de *Daphnia*. *Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente*, 5: 55-64.
- ARTAL, M.C., HOLTZ, R.D., KUMMROW, F., ALVES, O.L. & UMBUZEIRO, G.D.A. 2013. The role of silver and vanadium release in the toxicity of silver vanadate nanowires toward *Daphnia similis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32(4): 1-5.
<http://dx.doi.org/10.1002/etc.2128>

322 ARUOJA, V., DUBOURGUIER, H.C., KASEMETS, K. & KAHRU, A. 2009. Toxicity of
 323 nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. Science
 324 of the Total Environment, 407: 1461-1468. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.053>
 325
 326 ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. 2009. NBR 12.713 - Ecotoxicologia
 327 aquática - Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea).
 328
 329 BAÑOBRE-LÓPEZ, M., VÁSQUEZ-VÁSQUEZ, C., RIVAS, J. & LÓPEZ-QUINTELA, M.
 330 A. 2003. Magnetic properties of Chromium (III) oxide nanoparticles. Nanotechnology, 14:
 331 318-322. <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/14/2/342>
 332
 333 BAUDO, R. 1987. Ecotoxicological testing with *Daphnia*. Instituto Italiana di idrobiologia,
 334 45: 461-482.
 335
 336 BERTOLETTI, E., NIPPER, M.G. & MAGALHÃES, N.P. 1992. A precisão de testes de
 337 toxicidade com *Daphnia*. AMBIENTE, 6: 55-59.
 338
 339 BLINOVA, I., IVASK, A., HEINLAAN, M., MORTIMER, M. & KAHRU, A. 2010.
 340 Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. Environmental Pollution,
 341 158(1): 41-47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.08.017>
 342
 343 BUFFET, P.E., TANKOUA, O.F., BERHANU, D., HERRENKNECHT, C., POIRIER, L.,
 344 AMIARD-TRIQUET, C., AMIARD, J.C., BÉARD, J.B., RISSO, C., GUIBBOLINI, M.,
 345 ROMÉO M., REIP, P., VALSAMI-JONES, E. & MOUNEYRAC, C. 2011. Behavioural and

346 biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste*
 347 *diversicolor* to copper oxide nanoparticles. Chemosphere, 84 (1): 166-174.
 348 <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.02.003>
 349
 350 CALOTO-OLIVEIRA, A. 2007. Toxicidade de elementos-traço para consumidores primários
 351 na presença de exopolissacarídeos produzidos por organismos fitoplanctônicos
 352 (Chlorophyceae e Cyanophyceae). Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental - Escola
 353 de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, São Paulo, 183p.
 354
 355 CETESB (Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental do Estado de São Paulo).
 356 1994. Teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustácea).
 357 Método de Ensaio.
 358
 359 DAS, D., NATH, B.C., PHUKON, P. & DOLUI, S.K. 2013. Synthesis and evaluation of
 360 antioxidant and antibacterial behavior of CuO nanoparticles. Colloids and Surfaces B:
 361 Biointerfaces 101: 430-433. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2012.07.002>
 362
 363 DU, X.S., XIAO, M. & MENG, Y.Z. 2004. Facile synthesis of highly conductive
 364 polyaniline/graphite nanocomposites. European Polymer Journal 40: 1489-1493.
 365 <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2004.02.009>
 366
 367 EL-TRASS, A., EL-SHAMY, H., EL-MEHASSEB, I. & EL-KEMARY, M. 2012. CuO
 368 nanoparticles: Synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids.
 369 Applied Surface Science, 258: 2997-3001. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.11.025>
 370

371 GABBAY, J., BORKOW, G., MISHAL, J., MAGEN, E., ZATCOFF, R. & SHEMER-AVNI,
 372 Y. 2006. Copper oxide impregnated textiles with potent biocidal activities. Journal of
 373 Industrial Textiles, 35(4): 323-335. <http://dx.doi.org/10.1177/1528083706060785>
 374
 375 GIBOT, P. & VIDAL, L. 2010. Original synthesis of chromium (III) oxide nanoparticles.
 376 Journal of the European Ceramic Society, 30(4): 911-915.
 377 <http://dx.doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2009.09.019>
 378
 379 GRIFFITT, R.J., HYNDMAN, K., DENSLOW, N.D. & BARBER, D.S. 2009. Comparison of
 380 molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles.
 381 Toxicological Sciences, 107(2): 404-415. <http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfn256>
 382
 383 HAMILTON, M.A., RUSSO, R.C. & THURSTON, R.V. 1977. Trimmed Spearman–Karber
 384 method for estimating median lethal concentration in toxicity bioassays. Environmental
 385 Science & Technology, 11(7): 714–719. Correction: 1978, 12: 417.
 386
 387 HANNA, S. K., MILLER, R.J., ZHOU, D., KELLER, A.A. & LENIHAN, H. S. 2013.
 388 Accumulation and toxicity of metal oxide nanoparticles in a soft-sediment estuarine
 389 amphipod. Aquatic Toxicology, 142-143: 441-446.
 390 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.019>
 391
 392 HEINLAAN, M., IVASK, A., BLINOVA, I., DUBOURGUIER, H.C. & KAHRU, A. 2008.
 393 Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and
 394 crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. Chemosphere, 71(7): 1308-
 395 1316. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.047>

396

397 HORIE, M., NISHIO, K., ENDOH, S., KATO, H., FUJITA K., MIYAUCHI, A.,
 398 NAKAMURA, A., KINUGASA, S., YAMAMOTO, K., NIKI, E., YOSHIDA, Y.,
 399 IWAHASHI, H. 2011. Chromium (III) oxide nanoparticles induced remarkable oxidative
 400 stress and apoptosis on culture cells. *Environmental Toxicology*, 28(2): 61-75.
 401 <http://dx.doi.org/10.1002/tox.20695>

402

403 HUND-RINKE, K. & SIMON, M. 2006. Ecotoxic effect of photocatalytic active
 404 nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids (8 pp). *Environmental Science and Pollution*
 405 *Research*, 13(4): 225-232. <http://dx.doi.org/10.1065/espr2006.06.311>

406

407 ISANI, G., FALCIONI, M.L., BARUCCA, G., SEKAR, D., ANDREANI, G., CARPENÈ, E.
 408 & FALCIONI, G. 2013. Comparative toxicity of CuO nanoparticles and CuSO₄ in rainbow
 409 trout. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 97: 40–46.
 410 <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2013.07.001>

411

412 KAHRU A., DUBOURGUIER, H.C., BLINOVA, I., IVASK, A. & KASEMETS, K. 2008.
 413 Biotests and Biosensors for ecotoxicology of metal oxide nanoparticles: A minireview.
 414 *Sensors*, 8(8): 5153–5170. <http://dx.doi.org/10.3390/s8085153>

415

416 KAHRU, A. & DUBOURGUIER, H.C. 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology.
 417 *Toxicology*, 269(2-3): 105-119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2009.08.016>

418

419 KAHRU, A. & IVASK, A. 2012. Mapping the dawn of nanoecotoxicological research.
 420 *Accounts of chemical research*, 46(3): 823-833. <http://dx.doi.org/10.1021/ar3000212>

421

422 KELLER, A.A., WANG, H., ZHOU, D., LENIHAN, H.S., CHERR, G., CARDINALE, B.J.,

423 MILLER, R. & JI, Z. 2010. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural

424 aqueous matrices. *Environmental science & technology*, 44(6): 1962-1967.

425 <http://dx.doi.org/10.1021/es902987d>

426

427 LIN, S., ZHAO, Y., JI, Z., EAR, J., CHANG, C.H., ZHANG, H., LOW-KAM, C.,

428 YAMADA, K., MENG, H., WANG, X., LIU, R., POKHREL, S., MÄDLER, L.,

429 DAMOISEAUX, R., XIA, T., GODWIN, H.A., LIN, S. & NEL, A. E. 2012. Zebrafish high-

430 throughput screening to study the impact of dissolvable metal oxide nanoparticles on the

431 hatching enzyme, ZHE1. *Small*, 9 (9-10): 1776–1785.

432 <http://dx.doi.org/10.1002/smll.201202128>

433

434 MAKHLOUF, S.A., BAKRA, Z.H., AL-ATTARA, H. & MOUSTAFAA, M.S. 2013.

435 Structural, morphological and electrical properties of Cr₂O₃ nanoparticles. *Materials Science*

436 *and Engineering*, 178: 337-343. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mseb.2013.01.012>

437

438 MANUSADŽIANAS, L., CAILLET, C., FACHETTI, L., GYLYTĖ, B., GRIGUTYTĖ, R.,

439 JURKONIENĖ, S. & FÉRARD, J.F. 2012. Toxicity of copper oxide nanoparticle suspensions

440 to aquatic biota. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(1): 108-114. .

441 <http://dx.doi.org/10.1002/etc.715>

442

443 MASSAROTTI, V., CAPSONI, D., BINI, M., ALTOMARE, A. & MOLITERNI, A.G.G.

444 1998. X-ray powder diffraction ab initio structure solution of materials from solid state

445 synthesis: the copper oxide case. Zeitschrift für Kristallographie 213: 259–265.
 446 <http://dx.doi.org/10.1524/zkri.1998.213.5.259>
 447
 448 MAURER-JONES, M.A., GUNSOLUS, I.L., MURPHY, C.J. & HAYNES, C.L. 2013.
 449 Toxicity of engineered nanoparticles in the environment. Analytical Chemistry, 85(6): 3036-
 450 3049. <http://dx.doi.org/10.1021/ac303636s>
 451
 452 MELEGARI, S.P., PERREAULT, F., COSTA, R.H.R., POPOVIC, R. & MATIAS, W.G.
 453 2013. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the
 454 green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquatic Toxicology, 142: 431-440.
 455 <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.09.015>
 456
 457 OBERDÖRSTER, G., KANE, A.B., KLAPER, R.D. & HURT, R.H. 2013. Nanotoxicology.
 458 In: Klaassen, C.D. (ed), Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons. New
 459 York: McGraw-Hill, pp. 1189-1229.
 460
 461 PERREAULT, F., POPOVIC, R. & DEWEZ, D. 2014. Different toxicity mechanisms
 462 between bare and polymer-coated copper oxide nanoparticles in *Lemna gibba*. Environmental
 463 Pollution, 185: 219-227. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2013.10.027>
 464
 465 RODGHER, S., ESPÍNDOLA, E.L.G. & LOMBARDI, A.T. 2010. Suitability of *Daphnia*
 466 *similis* as an alternative organism in ecotoxicological tests: implications for metal toxicity.
 467 Ecotoxicology, 19: 1027-1033. DOI 10.1007/s10646-010-0484-1
 468

469 SOUSA, V.S. & TEIXEIRA, M.R. 2013. Aggregation kinetics and surface charge of CuO
470 nanoparticles: the influence of pH, ionic strength and humic acids. *Environmental Chemistry*,
471 10(4): 313-322. <http://dx.doi.org/10.1071/EN13001>
472
473 USEPA (Environmental Protection Agency). 1980. Ambient water quality criteria for
474 chromium. EPA 440/5-80-035. EPA, Office of Water Regulations and Standards,
475 Washington, D. C.
476
477 VAJPAYEE, P., KHATOON, I., PATEL, C.B., SINGH, G., GUPTA, K.C. & SHANKER, R.
478 2011. Adverse effects of chromium oxide nano-particles on seed germination and growth in
479 *Triticum aestivum*. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 7(1): 205-206.
480 <http://dx.doi.org/10.1166/jbn.2011.1270>
481
482

Tables

Table 1 - EC50 values obtained for the three independent tests performed with CuO NPs and CuSO₄ using *D. similis*.

Test	CuO NPs		CuSO ₄	
	EC50* (mg L ⁻¹)	IC 95%**	EC50* (mg L ⁻¹)	IC 95%**
1	0.051	0.05 – 0.06	0.010	0.01 – 0.01
2	0.065	0.06 – 0.07	0.012	0.01 – 0.01
3	0.077	0.07 – 0.08	0.010	0.01 – 0.01
Mean	0.064		0.010	
Standard deviation	0.013		0.001	
CV (%)***	20.350		11.540	

* EC50 – Effective concentration 50%

** IC95% - Confidence interval of 95%

*** Coefficient of variation

Table 2 - EC50 values obtained for the three independent tests performed with Cr₂O₃ NPs and Cr(NO₃)₃ using *D. similis*.

Test	Cr ₂ O ₃ NPs		Cr(NO ₃) ₃	
	EC50* (mg L ⁻¹)	IC 95%**	EC50* (mg L ⁻¹)	IC 95%**
1	6.53	5.95 – 7.17	12.26	11.17 – 13.47
2	6.73	5.76 – 7.88	11.03	9.12 – 13.33
3	6.96	6.51 – 7.22	12.67	11.19 – 14.34
Mean	6.74		11.98	
Standard deviation	0.21		0.85	
CV(%)***	3.20		6.96	

* EC50 – Effective concentration 50%

** IC95% - Confidence interval of 95%

*** Coefficient of variation

Figures

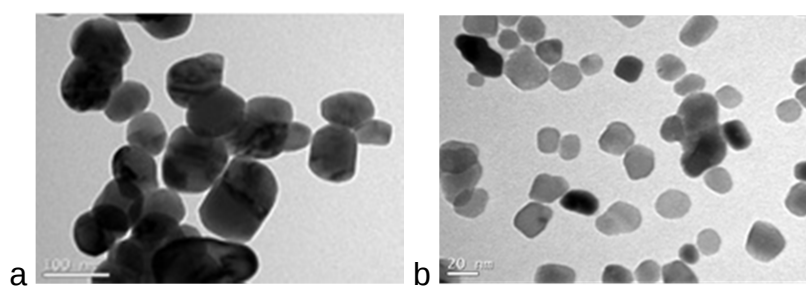
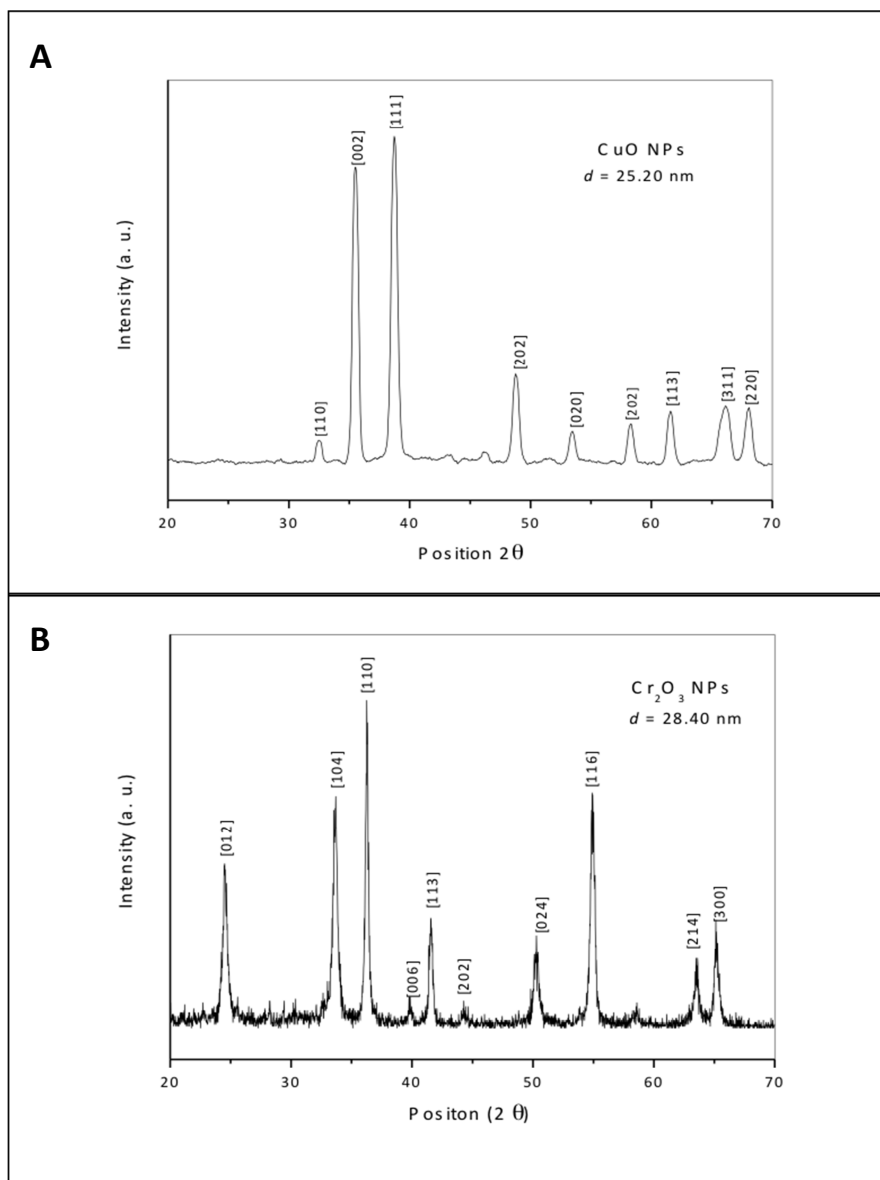


Figure 1. TEM image of CuO NPs (a) and Cr₂O₃ NPs (b)

518



519

520

521

Figure 2. XRD of CuO NPs (a) and XRD of Cr₂O₃ NPs (b)

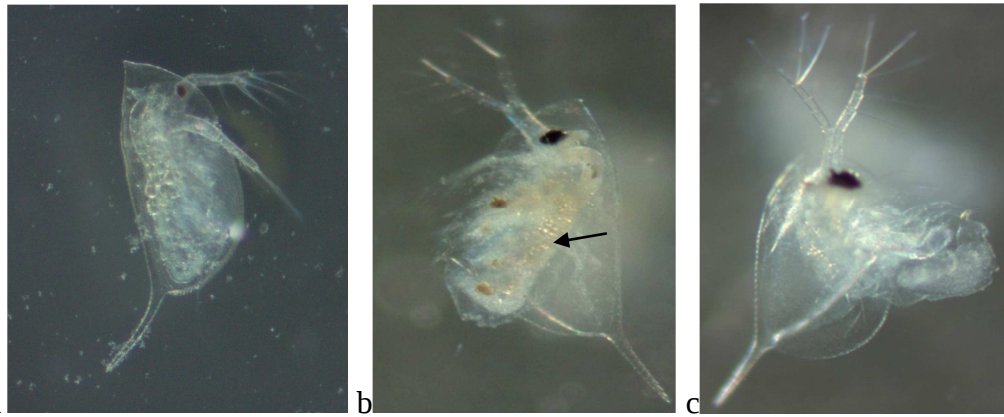


Figure 3. *D. similis* at control (a), *D. similis* after exposure to CuO NPs (b), indicating size increases of lipid droplets and after exposure to CuSO₄ (c).

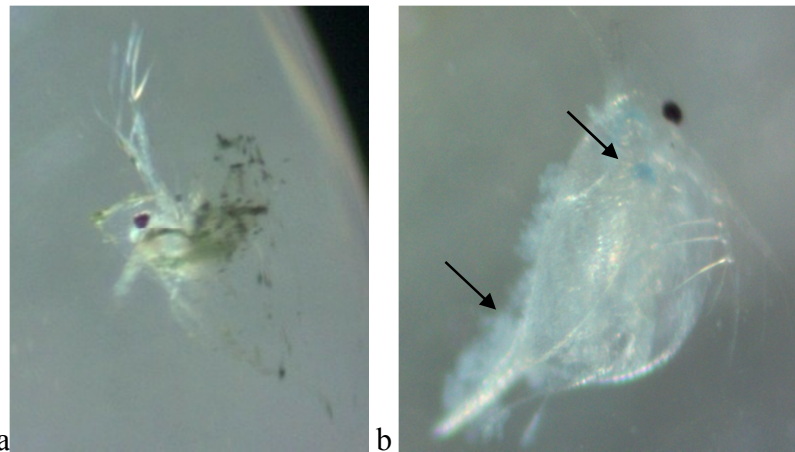


Figure 4. *D. similis* after exposure to Cr₂O₃ NPs (a) and Cr(NO₃)₃ (b).