



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA FRONTEIRA SUL – UFFS**  
**CAMPUS ERECHIM**  
**CURSO DE ENGENHARIA AMBIENTAL E SANITÁRIA**

**KARINE DA SILVA DE ANDRADE**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO  
DE COBALTO UTILIZANDO O ORGANISMO TESTE *Daphnia magna***

**ERECHIM - RS**

**2019**

**KARINE DA SILVA DE ANDRADE**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO  
DE COBALTO UTILIZANDO O ORGANISMO TESTE *Daphnia magna***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS –  
Campus de Erechim, como parte das exigências  
para obtenção do título de bacharel, na área de  
Engenharia Ambiental e Sanitária.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Cristiane Funghetto Fuzinatto

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Helen Treichel

ERECHIM - RS

2019

**KARINE DA SILVA DE ANDRADE**

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO  
DE COBALTO UTILIZANDO O ORGANISMO TESTE *Daphnia magna***

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Universidade Federal da  
Fronteira Sul - UFFS - Campus Erechim,  
como requisito para a obtenção do título de  
bacharel em Engenharia Ambiental e  
Sanitária.

Este trabalho de conclusão de curso foi defendido e aprovado em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca examinadora:

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Cristiane Funghetto Fuzinatto  
UFFS – Erechim/RS

---

Prof.<sup>a</sup> Dra. Helen Treichel  
UFFS-Erechim/RS

---

Prof. Dra. Marília Hartmann  
UFFS – Erechim/RS

---

Prof. Me. Marlon Luiz Neves da Silva  
UFFS – Chapecó/SC

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho não teria se tornado realidade sem a colaboração de inúmeras pessoas. Meus agradecimentos são direcionados:

A Deus por me proporcionar condições para seguir nesta caminhada.

A minha família e em especial aos meus pais, Antonio Roil e Emerenciana, que possibilitaram a realização deste sonho, que sempre estiveram ao meu lado me apoiando nos momentos de alegria e realizações, bem como nos momentos de lágrimas e tristezas, sei que não foi fácil suportar a saudade que a distância causou. A vocês dedico todas as minhas realizações. Não poderia deixar de citar o meu irmão Douglas e a minha cunhada Marieli, obrigada por todo o apoio.

Agradeço também à minha orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cristiane Funghetto Fuzinato e a minha coorientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Helen Treichel, pela orientação e por todos os conhecimentos que me repassaram, pela paciência inesgotável, ajuda e apoio, visando a melhor execução deste trabalho.

À equipe do Laboratório de Qualidade da Água da Universidade Federal da Fronteira Sul, Julia Schneider, Aline Goulart, Ana Flávia Mohr, Andressa Balem, Thais Wolf, Caroline Delazeri Bettio, Brenda Ellen de Sousa Reis, Jamile Marcon, pela amizade e ajuda ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

Agradeço ao Prof. Me. Marlon Neves da Silva pela ajuda e dedicação.

A família que me acolheu em Erechim, Maria, Alcemir e Jéssica Mulinari, a minha vó de coração, Nilda Zanatelli.

As amigas construídas ao longo da graduação, em especial a Júlia Schneider, Marina Sbardelotto, Jessica Zanivan, Natália Klanovicz, Fábio Stefanski, Helena Meireles e a todos os amigos, antigos e novos, que não puderam ser citados, mas que marcaram minha vida significativamente.

À Universidade Federal da Fronteira Sul pela infraestrutura e auxílio financeiro. Agradeço a todos os professores e funcionários da Universidade Federal da Fronteira Sul que de alguma forma vieram a contribuir para a realização deste trabalho.

## RESUMO

As nanopartículas (NPs) pode ser aplicadas em diversas áreas dentre elas na engenharia de computadores e catalisadores, neste sentido, a nanopartícula de Óxido de Cobalto (CoONP) é utilizada na catálise, em função das propriedades semicondutoras e eletrocatalíticas que a NP apresenta. Logo o presente estudo avaliou a toxicidade aguda e os efeitos sub agudos de nanopartículas de Óxido de Cobalto, utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna* como organismo teste. As NPs foram sintetizadas em suspensões e posteriormente caracterizadas para confirmar suas características, os métodos utilizados na caracterização foram o Microscopia Eletrônica de Transmissão e obteve-se o diâmetro médio de 3 nm, observou-se ainda a formação de aglomerados de nanopartículas, esse efeito de aglomeração foi comprovado pela Medida de Espalhamento da Luz Dinâmico que informou um diâmetro hidrodinâmico de 30 nm e índices de polidispersão superior a 0,2 o que confirma uma heterogeneidade de dispersão das partículas. O estado de aglomeração das NPs pode ser associado a grande área superficial, de 224,7 m<sup>2</sup>/g, as propriedades físicas do cobalto e também devido as forças eletrostáticas presentes nos meios diluídos, utilizados no processo de avaliação da toxicidade aguda e sub aguda das nanopartículas. O potencial zeta confirmou a instabilidade da NP nos três diferentes meios diluídos, a instabilidade da suspensão contribui para o efeito de aglomeração das nanoestruturas. Através dos testes de toxicidade aguda desenvolvidos, obteve-se uma CE<sub>50, 48h</sub> igual a 349 µg/L. Com o intuito de avaliar os efeitos sub agudos relacionados a CoONP, manteve-se uma cultura de *D. magna* em exposição a uma concentração de 50 µg/L da NP, os feitos ao longo do tempo sobre os organismos foram verificados como mortalidade precoce das matrizes e redução na geração de filhotes, em que a reprodução no controle foi 60% maior que a verificada no lote exposto a CoONP. Avaliou-se novamente a CE<sub>50,48h</sub>, neste momento, partir dos organismos mantidos em meio tóxico, a fim de comparar com a CE<sub>50</sub> obtida anteriormente, o valor alcançado foi de 302 µg/L, logo verificou-se que a exposição ao longo do tempo a CoONP induziu uma redução da toxicidade de 14%, tornando a substância mais tóxica, pois quanto mais próxima de zero mais tóxica é a substância.

**Palavras-chave:** Nanotoxicologia, Testes toxicológicos, Microcrustáceo, Sub-agudo.

## ABSTRACT

Nanoparticles (NPs) can be applied in several areas among them in the engineering of computers and catalysts. In this sense, the nanoparticle Cobalt (CoONP) is used in the catalysis, due to the semiconductive and electrocatalytic properties of NP. Therefore the present study evaluated the acute toxicity and the subacute effects of nanoparticles of Cobalt, using the microcrustacean *Daphnia magna* as a test organism. The NPs were synthesized in suppressions and later characterized to confirm their characteristics, the methods used in the characterization were the Transmission Electron Microscopy and the average diameter of 3 nm was obtained, the formation of agglomerates of nanoparticles was also observed, this effect of agglomeration was confirmed by the Dynamic Light Scattering Measurement which reported a hydrodynamic diameter of 30 nm and polydispersity indexes of more than 0.2 confirming a dispersion heterogeneity of the particles. The state of agglomeration of the NPs can be associated with a large surface area of 224.7 m<sup>2</sup> / g, the physical properties of cobalt and also due to the electrostatic forces present in the diluting media used in the process of evaluation of the acute and sub-acute toxicity of nanoparticles. The zeta potential confirmed NP instability in the three different diluting media, the instability of the suspension contributes to the agglomeration effect of the nanostructures. Through the tests of acute toxicity developed, an EC<sub>50, 48h</sub> equal to 349 µg / L was obtained. In order to evaluate the sub-acute effects related to CoONP, a culture of *D. magna* was maintained on exposure to a concentration of 50 µg / L of NP, those made over time on the organisms were verified as early mortality of matrices and reduction in pups generation, in which the reproduction in the control was 60% higher than that verified in the batch exposed to CoONP. The EC<sub>50,48h</sub> was again evaluated at this time from the organisms maintained in toxic medium in order to compare with the EC<sub>50</sub> obtained above, the value reached was 302 µg / L, it was then found that exposure over the time the CoONP induced a reduction of toxicity of 14%, making the substance more toxic, because the closer to zero the more toxic the substance.

Keywords: Nanotoxicology, Toxicological tests, Microcrustaceous, Sub-acute.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Imagem da CoONP obtida através do MET. ....	35
Figura 2 -Histograma representando o diâmetro médio da CoONP.....	36
Figura 3- Carta Controle do organismo teste utilizando Dicromato de Potássio como substância de referência.....	40

## **LISTA DE QUADROS**

Quadro 1- Aplicações industriais de variações do Cobalto.....	19
---------------------------------------------------------------	----



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Fontes de exposição ambiental ao Cobalto .....	20
Tabela 2- Padrões de referência para Cobalto total.....	22
Tabela 3 – Diâmetros hidrodinâmicos para três diferentes meios, e o índice de polidispersão para cada diâmetro. ....	37
Tabela 4-Potencial zeta da CoNP para três diferentes meios.....	39
Tabela 5- Valores de $CE_{50,48\text{ h}}$ ( $\mu\text{g/L}$ ) para suspensão de nanopartículas de Óxido de Cobalto .....	41
Tabela 6- Dados de mortalidade e reprodução para o lote 1, em um tempo de exposição de 25 dias.....	43

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
2.1	OBJETIVOS GERAIS .....	15
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	15
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>16</b>
3.1	NANOTECNOLOGIA.....	16
3.2	COBALTO .....	18
<b>3.2.1</b>	<b>Nanopartículas de Óxido de Cobalto.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Legislações.....</b>	<b>21</b>
3.3	TOXICOLOGIA AMBIENTAL.....	23
<b>3.3.1</b>	<b>Nanotoxicologia .....</b>	<b>23</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Testes toxicológicos .....</b>	<b>24</b>
3.4	ORGANISMOS TESTE: MICROCRUSTÁCEO <i>Daphnia magna</i> .....	26
<b>3.4.1</b>	<b>Toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>.....</b>	<b>27</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
4.1	SÍNTESES DAS AMOSTRAS DE NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE COBALTO .....	29
4.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE ÓXIDO DE COBALTO .....	29
<b>4.2.1</b>	<b>Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Medida de espalhamento de luz dinâmico (DLS).....</b>	<b>30</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Potencial Zeta .....</b>	<b>30</b>
4.3	CULTIVO DO MICROCRUSTÁCEO <i>Daphnia magna</i> .....	30
4.4	TESTE DE SENSIBILIDADE COM <i>Daphnia magna</i> .....	31
4.5	TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM <i>Daphnia magna</i> .....	32
<b>4.5.1</b>	<b>Testes de toxicidade aguda com <i>D. magna</i> nascidos em condições subaguda</b>	<b>33</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>35</b>
5.1	CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBALTO .....	35
<b>5.1.1</b>	<b>Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....</b>	<b>35</b>

<b>5.1.2</b>	<b>Medida de espalhamento de luz dinâmico (DLS)</b> .....	<b>37</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Potencial Zeta</b> .....	<b>38</b>
<b>5.2</b>	<b>TESTES DE SENSIBILIDADE COM <i>D. magna</i></b> .....	<b>40</b>
<b>5.3</b>	<b>TESTES DE TOXICIDADE AGUDA</b> .....	<b>41</b>
<b>5.3.1</b>	<b>Testes de toxicidade aguda com <i>D. magna</i> nascidos em condições subaguda</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>44</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>46</b>
	<b>ANEXO I</b> .....	<b>58</b>
	<b>ANEXO II</b> .....	<b>59</b>
	<b>ANEXO III</b> .....	<b>61</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O marco inicial da nanotecnologia foi abordado pelo físico norte americano Richard Feynman, na reunião Anual da Sociedade Americana de Física em 1959, onde proferiu as vantagens e transformações com a utilização de nanomateriais. A popularização da nanociência aconteceu aproximadamente no ano de 1980, quando Eric Drexler, do Instituto Foresight, citou a construção de aparelhos em escala molecular, que possuíam tamanho na escala manométrica, são exemplos desses instrumentos braços de robôs e computadores (SILVA, 2011).

Nanociência e nanotecnologia são os termos empregados quando se refere ao estudo, engenharia, manipulação e aplicação de estruturas em escala nanométrica (nm), um nanômetro é  $10^{-9}$  m, ou seja, um bilionésimo de metro (MISHRA; MILITKY, 2019). A nanotecnologia trabalha com a criação e uso de dispositivos e materiais com novas funções, buscando inovações e desenvolvimento na microeletrônica, biomedicina, entre outros (NERLICH; LEMANCZYK, 2015). De acordo com Chau et al. (2007) devido a redução da escala, estruturas nanométricas apresentam propriedades funcionais exclusivas não encontradas em estruturas em escalas superiores.

Atualmente as nanopartículas (NPs) têm recebido mais atenção devido a sua ampla margem de aplicação em diversos campos como na catálise, na biomedicina em biossensores, na engenharia genética, na engenharia de alimentos onde os nanomateriais atuam como sistemas para melhorar a disponibilidade de suplementos nutricionais e compostos bioativos (DA RÓZ et al., 2015; HE; HWANG, 2016; DONG et al., 2019).

As NPs são classificadas em duas categorias, considerando suas fontes, podem ser de origem natural ou sintética, exemplos de nanopartículas naturais são as cinzas vulcânicas e complexas minerais, em relação às nanopartículas sintetizadas pelo homem são classificadas em inorgânicas e orgânicas, têm-se como exemplos, NPs metálicos-óxidos e vírus, respectivamente (SANTOS, 2014; DONG et al., 2019).

O desenvolvimento de nanopartículas pode ocorrer a partir de uma ampla variedade de elementos químicos, os mais comumente empregados são os metais, compostos orgânicos, silicatos, óxidos metálicos, entre outros (DROBNE, 2007). A síntese de nanopartículas metálicas pode ser realizada por diferentes métodos, as técnicas de rota física são processos elaborados, porém não conseguem controlar características como o tamanho das partículas em

nanoescala. Quanto aos métodos químicos, estes possuem uma maior eficiência em relação ao controle do tamanho, composição e até mesmo da forma da nanopartículas em alguns casos (GUPTA, A.; GUPTA, M., 2005; YADAV et al., 2015; MURADOV et al., 2018). Dong et al. (2019) cita também o método de síntese biológica, que seria economicamente mais viável, em relação aos métodos citados anteriormente.

Diversos metais são utilizados em sínteses de nanopartículas, entre estes estão o ouro, a prata, o zinco, o cobre e o cobalto, este último é considerado um metal pesado, assim como um metal de transição, óxidos de metais de transição são importantes semicondutores e tem aplicações magnéticas. A aplicação de nanopartículas de óxidos metálicos está em crescimento devido às propriedades de condução e ópticas, propriedades que possibilitam seu uso em baterias e componentes eletrônicos e também na transformação de energia eletrônica e solar (ZHAO et al., 2017).

Embora as nanopartículas sejam de grande importância para o desenvolvimento tecnológico, tanto em processos de produção como em pesquisas na área da saúde, os estudos em relação aos possíveis efeitos tóxicos, causados ao homem e ao meio ambiente, ainda não são considerados na abordagem tradicional da toxicologia (ZHAO et al., 2007). Sendo assim a nanotoxicologia surge como a ciência que tem como objetivo estudar e avaliar a toxicidade de nanomateriais e nanocompostos em contato com o homem. Os principais meios de contaminação por nanopartículas são pelas vias: respiratória, dérmica e através de ingestão (PASCHOALINO et al., 2010).

Sendo assim, existe um potencial risco de contaminação ambiental devido às propriedades das nanopartículas, como tamanho minimizado, capacidade de aglomeração ou dispersão, e sua grande área superficial, essas características podem auxiliar na translocação destas partículas pelos compartimentos ambientais e a acumulação destas ocasionar, danos à cadeia trófica, os efeitos. Estas propriedades justificam a importância de investigar sobre a disponibilidade, degradabilidade, reatividade e toxicidade dos nanocompostos (PASCHOALINO et al., 2010).

Dentre as diversas nanopartículas metálicas disponíveis no mercado, as nanopartículas de Óxido de Cobalto (CoONPs) destacam-se pelo seu potencial de utilização em inúmeros campos tecnológicos, como biosensores, na área medicinal, ressonâncias magnéticas, revestimentos em geral, plásticos, fios e fibras (AZONANO, 2013). Recentemente CoONPs têm sido utilizadas devido as suas propriedades bactericidas (RAZA et al., 2016). Este

aumento na utilização de CoONPs potencializa também a sua ocorrência no ambiente, seja pela liberação acidental, presença em águas residuárias.

No panorama mundial, o Brasil ocupa um lugar de destaque no campo da nanociência, em comparação com os países que possuem maior número de produções científicas relacionada ao tema encontra-se na 20ª posição do ranking (AGENCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL, 2011). A Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (ABDI), ainda expõe que o governo brasileiro aplicou em pesquisas relacionadas à nanotecnologia um valor de 160 milhões de reais, que quando somados aos investimentos privados empregados extrapolam os 320 milhões de reais, esse grande número de investimentos se deve ao interesse que o país apresenta em desenvolver as áreas farmacêutica, química e agroindustrial.

Com o intuito de avaliar a toxicidade de inúmeros compostos, a aplicação de testes toxicológicos vem evoluindo de maneira crescente nas últimas décadas, especialmente devido à melhor compreensão a respeito dos efeitos tóxicos de diversos materiais sintetizados nos últimos anos (WOOD et al., 2016). Os estudos toxicológicos em relação aos efeitos das nanopartículas no meio ambiente estão em fase de crescimento, porém em relação aos efeitos tóxicos das CoONPs ocorre uma deficiência em dados disponíveis na literatura quando em comparação com demais nanopartículas de metais, e sendo o Cobalto usado em inúmeras áreas, como a biomedicina, optou-se por avaliar a toxicidade aguda da nanopartícula de Óxido de Cobalto, através de testes toxicológicos com o microcrustáceo *Daphnia magna* visando contribuir para o desenvolvimento de novos estudos.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os efeitos de toxicidade aguda e subaguda da suspensão de nanopartículas de Óxido de Cobalto através da exposição do microcrustáceo *Daphnia magna* como organismo-teste.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para atingir o objetivo geral desta de pesquisa a seguir são apresentados os objetivos específicos:

- Realizar a síntese das nanopartículas e a caracterização das suspensões de nanopartículas de Óxido de Cobalto para avaliação da morfologia, tamanho, estabilidade da suspensão e área superficial;
- Avaliar os efeitos de toxicidade aguda da suspensão de CoONP utilizando como organismo teste o microcrustáceo *D. magna*;
- Avaliar os efeitos de toxicidade nos organismos testes mantidos em condições subaguda utilizando o organismo teste *Daphnia magna*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 NANOTECNOLOGIA

Para Chau et al. (2007) a nanociência e a nanotecnologia são o entendimento e manipulação de materiais nas escalas atômica, molecular e macromolecular. Os primeiros conceitos em relação à nanotecnologia surgiram em 1959 na conferência Anual da Sociedade Americana de Física, no evento o físico Richard Feynman introduziu a ideia de materiais em nanoescala (SANTOS 2008). Segundo Ferreira e Rangel (2009) o termo nanotecnologia foi introduzido pelo engenheiro japonês Norio Taniguchi em 1974, para designar uma nova tecnologia que ia além do controle de materiais e da engenharia em microescala. Em 1990 Donald Eigler fez uso da nanotecnologia para reproduzir as letras IBM, logotipo da empresa qual é proprietário, foram usados 35 átomos de xenônio que se movimentavam sobre uma superfície de níquel (PICRAUX, 2012).

A nanociência estuda e manipula a matéria em escala atômica e molecular, dimensões de  $10^{-9}$  m, essas dimensões permitem novas aplicações e usos que anteriormente era impossível com materiais em escalas maiores, essas estruturas desenvolvidas medem aproximadamente 1 a 100 nanômetros e são chamadas de nanopartículas. (NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE, 2013; EUROPEAN COMMISSION, 2011). Chamadas de nanopartículas, devido ao seu tamanho reduzido, ponderando que a NP deve conter ao menos uma de suas dimensões de no máximo 100 nm (MODRZEJEWSKA-SIKORSKA et al., 2017).

Nos últimos tempos a nanotecnologia surgiu como a oferta de novas soluções tecnológicas para auxiliar na criação de novos materiais com propriedades únicas e assim produzir produtos aprimorados (CONTRERAS; RODRÍGUEZ, 2017). Para Quina (2004), Vijayanandan e Balakrishnan (2018) as nanopartículas, apresentam propriedades mecânicas, ópticas, elétricas, magnéticas, catalíticas distintas e superiores às das macroestruturas, esta superioridade deve-se a intensa relação entre a área superficial e o volume.

A nanotecnologia proporciona pesquisas e desenvolvimento, e tem como resultado a síntese e a caracterização de nanopartículas, nanocompósitos e nanomateriais. O desenvolvimento tecnológico possibilitou uma maior utilização da nanotecnologia no dia-a-



dia, como em processos químicos e microscópios de alta resolução. Entretanto considerando-se os processos químicos, físicos e biológicos que ocorrem na natureza, é possível identificar a presença da nanotecnologia em períodos remotos da história da humanidade (FERREIRA; RANGEL, 2009). Para Alves (2004) há aproximadamente 4000 anos a.c., os alquimistas egípcios utilizavam o “elixir de ouro” para estimular a mente e restaurar a juventude. Este era conhecido como o “elixir da longa vida” e era composto por partículas de ouro na ordem de 1-100 nm.

Em relação ao meio ambiente existem três áreas nas quais se espera que a nanotecnologia proporcione grandes benefícios, são elas (QUINA, 2004):

- A prevenção de poluição no meio ambiente- o uso de nanomateriais que aumentam a eficiência de processos industriais teria resultado positivo no aproveitamento de matéria prima, com menor consumo de energia e mitigação na produção de resíduos indesejáveis. A nanotecnologia permite o aprimoramento de sistemas eletrônicos, como os displays, que possuem melhor definição além de serem mais leves, estes não possuem em sua fabricação materiais tóxicos e minimiza o consumo de energia;
- Remediação e tratamento da poluição- as nanopartículas possuem uma grande área superficial que lhes confere propriedades de adsorção de matérias orgânicas e metais. As nanopartículas podem ser utilizadas no tratamento de efluentes de processos industriais e solos contaminados, devidos as suas propriedades semicondutoras e/ou redox;
- Detecção e monitoramento de poluição- a nanotecnologia possibilita o desenvolvimento de pequenos sensores, que são mais sensíveis e seletivos para detectar e monitorar poluentes orgânicos e inorgânicos na natureza. Esses sensores auxiliam na detecção precoce da existência de contaminação e no monitoramento, em tempo real, de procedimentos industriais.

A síntese e o aproveitamento de nanopartículas é um campo da nanociência que através dos anos vem ganhando maior área de abrangência em setores tecnológicos. Os nanomateriais são definidos como pequenas porções, com tamanho nanométrico, provenientes de um material em maior escala e com características diferenciadas das apresentadas pelo material original (LALAU, 2014). Alguns exemplos de produtos desenvolvidos a partir do conceito da nanotecnologia são superfícies de vidro, tecidos impermeabilizantes, blocos cerâmicos com características absorventes e pinturas de automóveis resistentes a riscos (BOSSARDI, 2007).

As inovações desenvolvidas através da nanociência se fazem presentes em diversas áreas da engenharia elétrica, por meio de pesquisas em tópicos como condutores de baixa resistividades, nanomateriais isolantes e nanofluidos que aperfeiçoam o desempenho de resfriamento de transformadores (SUMEREDER; MUHR, 2007; CONTRERAS; RODRÍGUEZ; TAHA-TIJERINA, 2017). Para Dong et al. (2019) “A pesquisa sobre tamanho de partícula, forma, propriedades da superfície do material é uma das principais áreas importantes das propriedades de NPs para aplicações direcionadas em vastas áreas da ciência.”

Segundo Delgado e Paumgartten (2013) os produtos nanotecnológicos geralmente são definidos pelo seu tamanho e não pela sua composição química. Os materiais em nanoescala diferem dos demais materiais pelo aumento da área de superfície, bem como, os efeitos quânticos. Sendo assim, podem possuir características como a reatividade, propriedades elétricas e comportamentos *in vivo* alterados (THASSU; DELEERS; PATHAK, 2007).

### 3.2 COBALTO (Co)

O cobalto é um metal duro, ferromagnético, de coloração branca azulada, encontrado na temperatura ambiente em estado sólido, junto com cobre, ferro, prata e níquel, em concentrações de aproximadamente 1%. O sueco Georg Brandt, no século XVIII foi quem isolou pela primeira vez o cobalto, apesar do metal já ter sido anteriormente detectado em joias e artefatos de cerâmica chinesa e persa, e ainda em peças de Leonardo Da Vinci, (BARCELOUX, 1999; SILVA, 2008).

Os metais são constituintes naturais que podem ser encontrados no ambiente, e em pequena abundância nos organismos. Alguns metais como o zinco, ferro, cobre e cobalto são de grande importância para animais e plantas, pois agem como nutrientes, entretanto em elevadas concentrações podem oferecer riscos aos organismos quanto à toxicidade. Ao mesmo tempo em que metais como cádmio, mercúrio e chumbo podem apresentar toxicidade mesmo em quantidades pequenas (KLINGELFUS, 2014). O cobalto é um elemento essencial em humanos e necessário para a formação da vitamina B12, no entanto a administração exagerada pode reduzir a atividade da tireoide, o que causa um aumento da glândula, também pode ser tóxico a animais terrestres e aquáticos (NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1989;

BARCELOUX, 1999; KUBRAK et al., 2011). Para Lison et al. (2001) o cobalto apresenta potencial genotóxico e cancerígeno.

Devido à elevada permeabilidade magnética apresentada, o cobalto pode ser usado na produção de superligas empregadas em turbinas de aviões e na indústria de cerâmica como matéria prima, entre outros (SILVA, 2008). O cobalto quando associado a outros materiais como ferro, níquel, platina e fósforo, exibem propriedades magnéticas que possibilitam aplicações na indústria fonográfica e são componentes importantes em computadores (BARCELOUX, 1999).

No Quadro 1 são apresentados alguns componentes que contem cobalto em sua estrutura e os usos associados.

**Quadro 1-** Aplicações industriais de variações do Cobalto

<b>Componente</b>	<b>Fórmula</b>	<b>Usos</b>
Carbonato	$\text{CoCO}_3$	Pigmento, suplementos alimentares, catalisador
Cloreto	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	banhos de revestimento, refinamento de metal, pigmento, catalisador
Tetraóxido de Níquel Dicobalto	$\text{NiCo}_2\text{O}_4$	Catalisador, ânodo
Óxido de Cobalto (II)	$\text{CoO}$	Produtos químicos, catalisadores, pigmentos
Óxido de Cobalto (III)	$\text{Co}_3\text{O}_4$	Esmaltes, semicondutores
Fosfato	$\text{Co}_3(\text{PO}_4) \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	Pigmentos, pré-tratamento de aço
Óxido de Lítio	$\text{LiCoO}_2$	Eletrodo de bateria
Iodeto	$\text{CoI}_2$	Indicador de umidade

**Fonte:** Adaptado de Barceloux, 1999.

A partir do processo evolutivo, novos materiais e produtos são elaborados utilizando os metais disponíveis na natureza, assim sendo introduz-se novos riscos a saúde humana também (ALVES; DELLA ROSA, 2003). Na Tabela 1 são ilustradas as principais fontes de exposição ao Co.

**Tabela 1-** Fontes de exposição ambiental ao Cobalto

<b>Fonte de exposição</b>	<b>Concentração</b>
<b>Solo</b>	1-40 mg/Kg
<b>Dieta alimentar</b>	1,7 a 100 µg/ dia
<b>Alimentos</b>	13 -36 µg/ dia
<b>Água potável</b>	0,1 - 5 µg/ L
<b>Água oceânica</b>	0,3 µg/ L
<b>Ar</b>	<10 ng/m <sup>3</sup>

**Fonte:** Adaptado de Barceloux, 1999; Alves; Della Rosa, 2003.

### 3.2.1 Nanopartículas de Óxido de Cobalto

Em virtude da crescente utilização de óxidos metálicos em nanoescala, a preocupação em relação ao seu comportamento nos sistemas aquáticos e a biodisponibilidade quanto a partículas maiores também cresce, sendo assim é necessário realizar a adequada caracterização e conhecer os efeitos durante todo o ciclo de vida do nanocomposto. A caracterização de uma nanoestrutura abrange diferentes aspectos, assim para as análises toxicológicas Bucher et al. (2004) recomendam que se leve em consideração a forma, o tamanho, o estado físico de dispersão, a química do material e a área superficial.

A utilização de nanopartículas semicondutoras cresce cada dia mais, sua aplicação é variada como na catálise e na foto catálise. Comparando-se metais e óxidos nota-se que os óxidos detêm menor reatividade e, portanto são mais estáveis. As nanopartículas semicondutoras são frequentemente utilizadas na catálise heterogênea possibilitando o seu uso em equipamentos como lasers e sensores (SERGEEV; KLABUNDE, 2013). Na classe dos semicondutores enquadram-se os óxidos de metais de transição, que despertam o interesse em relação as suas nanopartículas e sua eficiência em inúmeras aplicações é objeto de estudo (LANJE et al., 2010).

Diversas nanopartículas são desenvolvidas utilizando cobalto em sua composição, tem-se nanopartículas de Óxido de Cobalto (CHEN et al., (1995); SHARAN; NARA, 2019), Óxido de Cobalto (III)(WANG et al., 2010; MAURO, 2015), Ferrite de Cobalto (MARMORATO, 2011; ABUDAYYAK, ALTINÇEKIÇ GÜRKAYNAK E ÖZHAN, 2017).

Das nanopartículas citadas anteriormente as de Óxido de Cobalto detêm propriedades magnéticas, o que possibilita a aplicação deste como biosensor na biomedicina, em nanofios,

nanofibras, também é utilizado em materiais de absorção de micro-ondas (AZONANO, 2013). Nanopartículas de Óxido de Cobalto vem despertando interesse graças à sua dependência à cerca da sua forma, tamanho e no que se refere às suas propriedades (PAPIS et al., 2009; BHATT et al., 2011).

As nanopartículas proporcionam várias possibilidades de aplicação em biomedicina como é o caso das nanopartículas de Óxido de Cobalto, este elemento é conhecido por exibir estruturas cristalinas diferentes: hcp e hcc. É possível que as duas fases possam coexistir à temperatura ambiente, a composição estrutural hcc é termodinamicamente beneficiada acima de 450 °C e a fase hcp é favorecida quando em baixas temperaturas (SARGENTELLI; FERREIRA, 2010). Segundo Liang e Zhao (2012) “partículas magnéticas nanométricas são consideradas potenciais adsorventes para poluentes aquosos devido às suas altas áreas de superfície e a vantagem única de fácil separação sob campos magnéticos externos”.

Nanomateriais a base de Cobalto quando associados ao óxido de grafeno e a sílica são empregados em sensores para a detecção da *Salmonella spp.*, o nanocompósito apresenta atividade eletrocatalítica na redução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e também possui excelente desempenho na oxidação do fenol (APPATURI et al., 2019). A associação de grafeno e óxido de cobalto faz parte do desenvolvimento de baterias de lítio (FANG et al., 2019; MEI et al., 2019). Materiais de Cobalto nanoestruturados têm sido aplicados como eletrocatalisador em função de suas propriedades de potencial redox e o baixo custo do material (WANG, 2014; SHAHID et al., 2015, 2018). Segundo Cruz et al (2019) nanopartículas de Cobalto possuem potencial de aplicação na remoção de corantes têxteis de águas residuárias.

### 3.2.2 Legislações

Ainda que o uso de CoONP possa causar possíveis efeitos tóxicos ao meio ambiente e a saúde humana, ainda não existem legislações internacionais ou nacionais que abordam especificamente o lançamento de quaisquer nanopartículas no ambiente. Em consequência da falta de legislações específicas aplicáveis, ainda utiliza-se normativas que tratam dos valores referentes aos padrões de lançamento do íon (Co), quer dizer, utiliza-se os valores orientadores do íon cobalto para CoONP.

Dentre as legislações nacionais aplicáveis em relação ao íon de cobalto, a Resolução 357/2005 do Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) destaca-se por tratar do enquadramento e classificação dos corpos d'água, a resolução também estabelece os padrões e

as condições de lançamento de efluentes. A CONAMA 357/2005 é complementada pela Resolução CONAMA 430/2011, porém nesta última atualização não é citado os padrões de lançamento referente ao íon cobalto. Além destas duas resoluções, vale destacar também a Resolução CONAMA 396/2008, que trata da classificação das águas subterrâneas e seus enquadramentos e em seu Anexo I- apresenta uma lista de substâncias químicas com grande probabilidade de ocorrer em águas subterrâneas, ainda são estabelecidos os Valores Máximos Permitidos (VMP), para os usos considerados principais, e os Limites de Quantificação Praticáveis (LQP) que no caso do Cobalto é de 10 µg/L.

Algumas outras legislações podem ser destacadas, como a Resolução CONSEMA 128 de 2006 que dispõem dos padrões de emissão de efluentes líquidos para o estado do Rio Grande do Sul, mais tarde no ano de 2017 esta resolução foi complementada e alterada pela Resolução CONSEMA 355/2017 (RIO GRANDE DO SUL, 2017).

Na Tabela 2 a seguir são apresentados os limites máximos estabelecidos para o cobalto.

**Tabela 2-** Padrões de referência para Cobalto total.

<b>Legislação</b>	<b>Componentes</b>	<b>Limites máximos</b>
<b>CONAMA 357/2005</b>	Águas doces - classes 1e 2	0,05 mg Co/L
	Águas doces - classe 3	0,2 mg Co/L
<b>CONAMA 396/2008</b>	Dessedentação animal	1.000 µg/L
	Irrigação	50 µg/L
<b>CONSEMA 128/2006</b> <b>CONSEMA 355/2017</b>	Água superficial	0,5 mg Co/L

**Fonte:** Adaptado de Brasil, 2005. Brasil, 2008; Rio Grande do Sul, 2006; Rio Grande do Sul, 2017.

Através da análise dos dados citados na tabela acima, é observado que após a alteração da Resolução CONAMA 357/2005 pela CONAMA 430/2011, não há mais o estabelecimento de padrões de lançamento de efluentes para o íon cobalto.

### 3.3 TOXICOLOGIA AMBIENTAL

A toxicologia ambiental segundo Brilhante e Caldas (1999) e Sisinho e Oliveira-Filho (2013), estuda interações tóxicas de substâncias químicas no ecossistema e sua capacidade de afetar a fisiologia normal de organismos vivos. De acordo com Chasin e Lima (2010) a toxicologia é a ciência que estuda os efeitos nocivos decorrentes das interações entre as substâncias químicas com o organismo, com a finalidade de prevenir, diagnosticar e tratar a intoxicação.

A toxicologia engloba diversas áreas de estudo, de acordo com Filho e Magalhães (2008) surgiu como um mecanismo de monitoramento ambiental, fundamentada na resposta de organismos a agentes químicos. Sendo considerada a ciência que possibilita avaliar com exatidão os efeitos de elementos físicos e químicos sobre os organismos vivos, populações e comunidades em seus ecossistemas, abrangendo as suas interações com o ambiente juntamente com as formas de transporte das substâncias (ZAGATTO, 2015).

No sentido de estudar as interações da nanomateriais com o meio ambiente, surge o termo nanotoxicologia como uma subárea da toxicologia ambiental (ROSSETTO, 2012; SCHIRMER, 2013).

#### 3.3.1 Nanotoxicologia

Modificações nas propriedades dos materiais (redução de tamanho e aumento da área superficial) conferem novas características aos materiais, principalmente nas modificações dos efeitos de toxicidade para organismos e também para o ambiente (CURTIS et al., 2006; CHAU et al., 2007). Publicações científicas relacionadas à avaliação toxicológica de novos nanomateriais crescem exponencialmente, devido à preocupação da comunidade científica em tentar elucidar os efeitos destes contaminantes nos diferentes ambientes e organismos (MANIMEGALAI; KUMAR; SHARMA, 2011; SHARMA et al., 2014). O crescimento na produção e uso de nanomateriais proporcionou uma extensa discussão em relação aos potenciais riscos referentes à sua exposição (SEATON; DONALDSON, 2005).

Para Rossetto (2012) com o aumento da necessidade de compreender as ameaças dos nanomateriais e compostos nanoestruturados ligados ao meio ambiente e à saúde humana, apareceu o termo nanotoxicologia, que possui como propósito investigar o efeito nocivo

destes materiais em relação aos seres humanos e ao meio ambiente. Segundo Paschoalino, Marcone e Jardim (2010) as pesquisas iniciais a respeito da toxicidade de nanomateriais foram realizadas na última década do século XX, investigando-se materiais que em escala micrométrica não apresentavam toxicidade, e que em escala nanométrica, como nanoparticulados, apresentavam algum efeito tóxico.

Os estudos sobre nanotoxicologia estão voltados para caracterizar a segurança dos nanomateriais, com foco especial em definir seus mecanismos de ação bem como seus perfis toxicológicos (HOLSAPPLE et al., 2005). De acordo com Dogra (2019) e seus colaboradores é necessário investigar as nanopartículas, quanto à suas propriedades, aplicações e realizar estudos referentes às interações com o DNA, avaliando a citotoxicidade, genotoxicidade. Para Ates et al. (2016) os efeitos tóxicos de nanomateriais depende de propriedades como tamanho, área de superfície, comportamento químico como a estabilidade da suspensão.

Manickam et al. (2017), cita que as NPs possuem propriedades quânticas que podem causar efeitos de genotoxicidade e carcinogenicidade a organismos quando expostos. Outras características das NPs como tamanho pequeno, grande área superficial e potencial zeta, aumentam a captação, persistência, a citotoxicidade e a genotoxicidade das nanopartículas (KARAKOTI; HENCH; SEAL, 2006; PUGAZHENDHI et al., 2018).

### 3.3.2 Testes toxicológicos

Paschoalino, Marcone e Jardim (2010) afirmam que os testes de toxicidade podem ser realizados em culturas de células (*in vitro*) ou com organismos vivos (*in vivo*) como peixes, ratos e até seres humanos. Müller (2011) e Schmidt (20017) descrevem os testes de toxicidade como ensaios laboratoriais que têm como objetivo avaliar os efeitos nocivos das substâncias a serem analisadas, bem como o seu grau de toxicidade. De acordo com Ronco et al. (2004) e Corrêa et al. (2003) os ensaios de toxicidade realizados sob condições controladas e padronizadas vêm servindo como fonte de informações para avaliar os efeitos ecológicos de contaminantes tóxicos.

A avaliação da toxicidade de um material determina-se através da realização de testes toxicológicos, a qual permite saber se o produto possui características tóxicas ou nocivas, quando comprovado a presença destas características analisa-se a natureza deste efeito tóxico e o grau de toxicidade. Nesses testes os organismos vivos utilizados são expostos a



concentrações variadas da substância de interesse avaliando-se os efeitos causados nos organismos, exemplos desses é a imobilidade, morte, alterações morfológicas e fisiológicas (MATIAS, 2014 *apud* SCHMIDT, 2017).

Os ensaios toxicológicos são usados no estudo dos efeitos tóxicos de uma determinada substância para no organismo-teste, ao comprovar-se o efeito o nível de toxicidade do material é identificado. O conhecimento destas informações auxilia na tomada de decisões, como as medidas a serem seguidas para mitigar os impactos causados e como essa intervenção afeta o meio ambiente (OSCAR, 2015). Segundo Knie e Lopes (2004), os testes toxicológicos podem ser utilizados para diversos setores, entre eles licenciamento de produtos químicos, fiscalização de efluentes, monitoramento de qualidade de águas, entre outros.

Entre os testes toxicológicos normalmente realizados cita-se: testes de toxicidade aguda, toxicidade crônica, toxicidade sub-crônica, sensibilidade, mutagênese, carcinogênese, e reprodução, além de, analisar os efeitos sobre a pele e olhos (SPIELMANN, 2002; BARROS; DAVINO, 2003).

A toxicidade aguda pretende indicar a ocorrência de efeitos bruscos em um curto período de tempo relacionado ao ciclo de vida do organismo-teste, frente à exposição desses a uma dose ou concentração do elemento-teste em variadas diluições. Já a segunda estuda o efeito resultante de repetidas aplicações de certa substância durante um espaço médio de tempo, durante o ciclo de vida de definida espécie e a toxicidade crônica visa à caracterização do perfil toxicológico de um elemento em uma espécie, depois de uma exposição prolongada, neste caso ocupando o ciclo de vida de forma representativa (MATIAS, 2014 *apud* SCHMIDT, 2017).

Podem ocorrer casos em que uma substância química testada não produza efeitos tóxicos sobre organismos aquáticos nos ensaios de toxicidade aguda, este fato não aponta que esta não seja tóxica para os organismos. Os bioensaios de toxicidade crônica permitem analisar os efeitos tóxicos de substâncias químicas, os organismos são expostos por longo tempo a concentrações sub-letais, ou seja, concentrações em que permite-se a sobrevivência dos organismos, porém afetam suas características biológicas como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento, entre outras (COSTA et al., 2008).

Os testes de toxicidade aguda consistem em avaliar qual a concentração de determinada substância capaz de produzir efeitos tóxicos ao organismo utilizado no teste, a duração a exposição é de curto espaço de tempo e resulta em danos graves ou leva a morte do organismo (PANKRATZ, 2001).

Os testes de toxicidade aguda normalmente fundamentam-se na exposição de organismos teste a diversas concentrações da substância que se deseja testar, isto ocorre através de diluições da mesma amostra, sendo a morte do organismo o resultado mais comum. Os efeitos observados diferem de acordo com o organismo avaliado, sendo assim analisa-se a mortalidade, no caso de peixes; imobilidade, para invertebrados; e crescimento, no caso de algas (BRENTANO, 2006). Para Watanabe et al., (2017) a Agencia de Proteção Ambiental (EPA) recomenda que para teste de toxicidade aquática utilize-se invertebrados de água doce como *Daphnia magna* e *Ceriodaphnia dubia*

### 3.4 ORGANISMOS TESTE: MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna*

Na escolha dos organismos testes algumas características devem ser consideradas como a sua disponibilidade, sensibilidade, abundância, ser seletivo ao contaminante, de fácil cultivo em laboratório, entre outras (RAND, 1995). Dentre os organismos utilizados em testes toxicológicos destaca-se a *Daphnia magna*, que de acordo a NBR 12.713 de 2016 (ABNT, 2016) a *D. magna* STRAUS, 1820, pertence à classe *Cladocera* e à ordem *Crustacea*, é um microcrustáceo zooplancônico de água doce, vulgarmente conhecida como “pulga d’água”, possui um tamanho de 0,5 mm (fase jovem) e 5 - 6 mm (fase adulta). Age como um consumidor primário na cadeia alimentar aquática, a alimentação ocorre através da filtração de substâncias orgânicas particuladas que encontram-se em suspensão, principalmente algas unicelulares. Com condições ambientais adequadas reproduz-se assexuadamente por partenogênese, gerando apenas fêmeas (KNIE; LOPES, 2004; BARMENTLO et al., 2015). Entretanto em condições adversas, de temperatura, alimentação os organismos podem se reproduzir sexualmente, gerando efípios, a espécie é encontrada em águas doces e salobras, como rios e lagos, vivem em temperaturas entre 18 e 22 °C (ALEKSEEV; LAMPERT, 2001; ELBERT, 2005).

As *daphnias* tem uma carapaça transparente, que rodeia a maior parte do corpo, a cor pode variar de um amarelo pálido, salmão-rosado até tons avermelhados, entretanto a cor ainda pode variar conforme o alimento ingerido, por exemplo, após consumir algas verdes, a aparência altera-se para esverdeada (BAPTISTA, 2001). As *D. magna* geralmente estão presentes em sistemas aquáticos lênticos e possui uma carapaça que envolve praticamente todo o seu corpo, menos a cabeça e seus dois pares de antenas, o par secundário é responsável pela

locomoção (FINKLER, 2002; CLARE, 2011). A carapaça transparente que circunda o seu tronco, termina no membro posterior em um espinho apical. Na parte final do tronco, conhecida como abdômen posterior, existem pinças destinadas a limpeza da carapaça (FLOHR, 2007).

A reprodução acontece a partir do 7º dia de vida, primeiramente originam-se poucos neonatos por matriz, com cerca de 12 dias de existência cada matriz produz aproximadamente de 30 a 50 filhotes. A diferenciação entre machos e fêmeas é de fácil visualização, pois estes são menores e exibe um corpo mais delgado, outra diferença característica entre machos e fêmeas é a presença da bolsa incubadora nelas, onde são mantidos os ovos e embriões (KNIE; LOPES, 2004).

Conforme Costa et al. (2008) existem várias espécies de *Daphnias*, as mais utilizadas em testes de toxicidade são as *Daphnias magna*, por existir um grande número de informação sobre as técnicas de cultivo, os requisitos de temperatura, luz e nutrientes e sobre sua resposta a muitas substâncias tóxicas. Para Knie e Lopes (2004), as vantagens de esse organismo ser utilizado em bioensaios normatizados são: fácil cultivo em laboratório; ciclo de vida e reprodução curtos; produz descendentes geneticamente idênticos garantindo a uniformidade nos testes; reage sensivelmente a vários agentes nocivos. Os indivíduos utilizados nos testes devem ter no máximo 24 h para de vida.

### **3.4.1 Toxicidade aguda com *Daphnia magna***

Os ensaios de toxicidade aguda são realizados em laboratório em condições monitoradas e específicas com o intuito de avaliar a toxicidade de uma substância nociva em relação ao organismo-teste, quando exposto a um curto espaço de tempo. Os testes são efetuados seguindo a NBR 12.713/2016 (ABNT, 2016).

O principal objetivo dos ensaios de toxicidade aguda é apontar a Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) ou a Concentração Efetiva Mediana (CE<sub>50</sub>) (COSTA et al., 2008). A CL<sub>50</sub> diz respeito à concentração em que 50% da comunidade exposta à amostra sobrevive, já a CE<sub>50</sub> refere-se à concentração da amostra que gera, em 50% dos organismos durante a exposição um efeito agudo, sendo estes geralmente a imobilidade ou inibição da respiração (MATIAS, 2009).

Em estudos realizados por Rebello, Shaikh e Desa (2010) com CoO em nanoescala revelaram que a NP apresenta efeitos sobre as microalgas *Navicula spp.* e *Chaetoceros spp.* e

também em células bivalves *Meretrix meretri*. Ates et al. (2016) utilizou *Artemia salina* para desenvolver seus testes com CoONP. Já Griffitt et al. (2009) avaliou a concentração letal mediana (CL<sub>50</sub>) para *Danio rerio*, *Daphnia pulex* adulto, *Ceriodaphnia dubia* neonatos. Pesquisadores também avaliaram os efeitos citotóxicos de nanopartículas de Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (KHAN et al., 2015), e em duas culturas do protozoário *Leishmania axênica*, em macrófagos, em células RBC humano e em camarão salmoura (KHALIL et al., 2017). Em pesquisa desenvolvida por Di Guglielmo et al. (2010) avaliou-se a CL<sub>50</sub> de nanopartículas de Ferrite de Cobalto em células-troco embrionárias.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 SÍNTESES DAS NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE COBALTO

As nanopartículas de Óxido de Cobalto foram sintetizadas adaptando o método de microemulsão citado por Chen et al., (1995) que sintetizou-se nanopartículas magnéticas de Cobalto utilizando Cloreto de Cobalto Hexahidratado ( $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) como agente precursor metálico e o Borohidrato de Sódio ( $\text{NaBH}_4$ ) como agente redutor, adaptou-se o polímero Álcool Polivinílico (PVA) como o agente surfactante.

Na síntese das nanopartículas de Óxido de Cobalto em suspensão, para um volume de 100 mL, utilizou-se 1 g de PVA (1%) que foi solubilizada em 50 mL de água deionizada, mantida sob aquecimento a 100 ° C e agitação constante. Após a solubilização completa do polímero e a solução já em temperatura ambiente, adicionou-se 0,03 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  que foi a massa dissolvida em 30 mL de água deionizada gelada.

A última etapa a ser realizada foi a titulação lentamente de 0,015 g de  $\text{NaBH}_4$  diluídos em 20 mL de água ultrapura gelada, a diluição do reagente foi realizada o mais rápido possível devido as características de absorção da água do  $\text{NaBH}_4$  serem grandes. Manteve-se durante todo o processo de síntese a agitação e o banho de gelo, com intuito de minimizar a formação de espuma.

Depois de todos os processos realizados a suspensão de nanopartículas de Cobalto foi armazenada a 4 °C, com um período de validade para os testes toxicológicos de aproximadamente 30 dias, em caso de necessidade a outra síntese foi realizada antes da data de validade. Vale ressaltar que a suspensão de CoONP foi utilizada nos testes somente após decorrido um dia da síntese, devido ao fato que durante este período de tempo algumas reações residuais de formação da nanopartículas podem ocorrer.

### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTICULAS DE ÓXIDO DE COBALTO

As CoONPs foram caracterizadas em relação ao seu diâmetro médio, sua área superficial e sua estabilidade em suspensão, na caracterização das nanopartículas de Óxido de Cobalto foram utilizados os métodos citados a seguir: Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET); Medida de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta. As análises de

caracterização foram realizadas no Laboratório de Microscopia Central (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

#### **4.2.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)**

A Microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi o método empregado para avaliar o tamanho da nanopartícula, com o objetivo de analisar, por meio das imagens obtidas, se a amostra utilizada está em nanoescala, se ocorre ou não a formação de aglomerações e qual é a morfologia da nanoestrutura. Através do MET obteve-se o diâmetro médio da CoONP e assim tornou-se possível determinar a área superficial da NP.

#### **4.2.2 Medida de espalhamento de luz dinâmico (DLS)**

O DLS é um método em que um feixe de luz monocromática incide sobre a amostra e uma fotomultiplicadora é responsável por detectar a luz espalhada (MORO, 2010). O DLS é utilizado para avaliar as dimensões das nanopartículas em suspensão, através deste método determina-se o tamanho e a distribuição do tamanho da nanopartícula.

#### **4.2.3 Potencial Zeta**

O Potencial Zeta foi empregado como o parâmetro de avaliação da carga superficial da NP, esta análise torna-se importante, pois é necessário verificar se as nanopartículas possuem carga que possibilite a ligação com outras substâncias e a estabilidade em suspensão. Segundo Moro (2010) “[...] é a diferença de potencial entre o meio de dispersão e a dupla camada elétrica na superfície da partícula.”.

### **4.3 CULTIVO DO MICROCRUSTÁCEO *Daphnia magna***

O cultivo do microcrustáceo *D. magna* foi realizado no Laboratório de Qualidade da Água, da Universidade Federal da Fronteira Sul- *Campus* Erechim, conforme descrito na NBR 12.713 (ABNT, 2016).

Os organismos foram mantidos em béqueres de vidro, onde estes permanecem em uma incubadora, na qual a temperatura é controlada de  $20 \pm 2$  ° C e fotoperíodo de 16 horas de luz. Os béqueres em sua maioria possuem capacidade de 2L cada, sendo estes preenchido com um volume de aproximadamente 1.250 mL do meio de cultura M4, adaptado de, o modo de preparo o meio M4 é descrito no Anexo I, conforme estabelecido na NBR 12.713 (ABNT, 2016), o meio foi renovado três vezes por semana durante a manutenção dos lotes, onde os organismos são transferidos para um novo béquer com novo meio de cultura e em seguida foram alimentados, sendo cultivado cerca de 30 organismos por lote.

A alimentação foi realizada no dia da manutenção e troca do meio, o alimento usado é a alga *Desmodesmus subspicatus*, que é anteriormente inoculada em um meio nutriente preparado no laboratório seguindo a norma NBR 12.713(ABNT, 2016). A metodologia utilizada no preparo do alimento utilizado está descrita no Anexo II. No processo de troca do meio é contabilizado o número de filhotes por lote, juntamente com o número de indivíduos adultos vivos e mortos, as temperaturas da sala de manutenção e da incubadora além da quantidade de alimento fornecido, todos estes dados são anotados em uma tabela de controle. Os organismos adultos são transferidos para um novo recipiente, quanto aos filhotes estes foram descartados em recipiente de descarte com Hipoclorito de Sódio (NaClO), ou usados na abertura de novos lotes. Os filhotes com até 24 horas de vida foram os utilizados nos teste de toxicidade aguda e de sensibilidade.

#### 4.4 TESTE DE SENSIBILIDADE COM *Daphnia magna*

Os testes de toxicidade aguda com *D. magna* necessitam de uma validação, para isto foram realizados testes de sensibilidade com Dicromato de Potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ), como substância de referência. Os testes de sensibilidade consistiram em expor os organismos durante 24 horas em diluições de uma solução de  $K_2Cr_2O_7$  em um meio ISO, o meio foi preparado anteriormente, segundo a metodologia descrita no Anexo III, sendo mantido sob agitação constante por mínimo 12 horas.

Os testes foram realizados semanalmente durante o período de avaliação da toxicidade aguda da CoONP, seguindo a metodologia descrita na NBR 12.713/2016, que descreve a

realização de testes de toxicidade aguda. Os testes foram efetuados em duplicata com dois controles, para as concentrações padrão de  $K_2Cr_2O_7$  que já são preestabelecidas.

Inicialmente preparou-se um volume de 50 ml de cada concentração padrão estabelecidas para a substância de referência, diluída em meio ISO. Posteriormente o volume total de cada concentração foi dividido em duplicata, adicionando aproximadamente 25 mL em béqueres distintos. A última etapa realizada consistiu de adicionar 6 neonatos com idade de no máximo 24 horas, nos béqueres contendo as concentrações de Dicromato de Potássio diluídas. O controle foi realizado para todos os testes desenvolvidos, onde *D. magna* foi mantida nas mesmas condições experimentais, porém sem a adição da substância de referência.

A leitura do teste foi realizada após 24 horas, onde foram verificados quantos organismos estavam imóveis em cada recipiente, os valores obtidos foram anotados na ficha de controle respectiva a cada teste de sensibilidade desenvolvido. Os cálculos dos valores de  $CE_{50, 24h}$  com a substância de referência ocorreram através do *Graphpad Prism versão 6.0*.

A NBR 12.713/2016 (ABNT, 2016) aponta que durante a execução de testes de sensibilidade deve-se elaborar uma carta controle, onde é necessário considerar o Limite Central (LC), que corresponde a média dos valores considerando também os desvios padrão em uma faixa de  $\pm 2$ . A ISO 6341/2012 estabelece a faixa adequada de sensibilidade, com o Dicromato de Potássio, em testes com *Daphnia magna* deve ser entre 0,6 e 1,7 mg/L.

#### 4.5 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA COM *Daphnia magna*

Este teste consistiu em expor neonatos a uma série de doses do agente nocivo, no caso a suspensão de nanopartículas de Óxido de Cobalto, os neonatos utilizados deveriam possuir de 2 até 26 horas de vida. Os resultados foram analisados quanto à capacidade natatória ou a imobilidade do organismo teste. De acordo com Knie e Lopes (2004) são considerados imóveis, além dos organismos aparentemente mortos, aqueles incapazes de nadar na coluna d'água até 15 segundos após leve agitação do recipiente. Vale ressaltar que os testes foram realizados de acordo com NBR 12.713/2016.

Durante a realização dos testes de toxicidade aguda, o volume de solução mãe (CoONP) a ser utilizada foi determinada pela Equação 1 proposta por Atkins e Jones(2012), posteriormente ocorreu a diluição e homogeneização deste volume com o meio ISO. Da



mesma forma que os testes de sensibilidade os testes de toxicidade aguda também foram realizados em duplicata, com o mesmo número de organismos citados anteriormente e também possuiu o mesmo tipo de controle.

$$V_{inicial} = \frac{C_{inicial} * V_{inicial}}{C_{inicial}} \quad (\text{Equação 1})$$

Os testes foram realizados em duas etapas, a primeira foi à etapa de testes preliminares, que possibilitou conhecer a faixa de concentração adequada e assim realizar a segunda etapa, de testes definitivos. Na primeira etapa de testes utilizou-se concentrações de 1600µg/L até 200µg/L.

Através dos testes preliminares determinou-se que para os testes definitivos seria utilizada a seguinte faixa de concentrações: 1000 µg/L; 800 µg/L; 400 µg/L; 200 µg/L; 100 µg/L e 50 µg/L. Para a análise do ensaio, foi registrado o número de organismos imóveis em cada solução-teste, bem como no controle para assim ser possível avaliar os resultados. Os resultados obtidos são expressos em CE<sub>50,48h</sub> isto é, Concentração Efetiva que ocasiona a imobilidade de 50 % da população exposta em um período de 48 horas. Os resultados são calculados com o auxílio do software *Graphpad Prism versão 6.0*

#### **4.5.1 Testes de toxicidade aguda com *D. magna* nascidos em condições subaguda**

Após a realização dos testes de toxicidade aguda verificou-se que para a concentração de 50 µg/L não foi registrada a mortalidade dos organismos nos testes realizados. Desta forma a concentração de 50 µg/L foi definida como concentração teste para o desenvolvimento do cultivo dos organismos em condição subaguda.

O cultivo iniciou-se com em média 30 organismos por béquer, vale ressaltar que os organismos usados para a abertura dos lotes eram filhotes provenientes do cultivo realizado no laboratório. É importante destacar que diferentemente dos testes de toxicidade de aguda realizados anteriormente, neste caso foi necessário alimentar os organismos para que se mantivesse um cultivo.

Este novo teste foi realizado de maneira similar ao cultivo normal da cultura, sendo mantido sobre iluminação constante, em uma temperatura de 20 ± 2 ° C. A sua manutenção foi realizada três vezes por semana, nos demais dias acompanhou-se o desenvolvimento dos

lotes para retirada dos neonatos, utilizados para realizar os testes de toxicidade subaguda com as concentrações de 1000 µg/L; 800 µg/L; 400 µg/L; 200 µg/L e 100 µg/L .

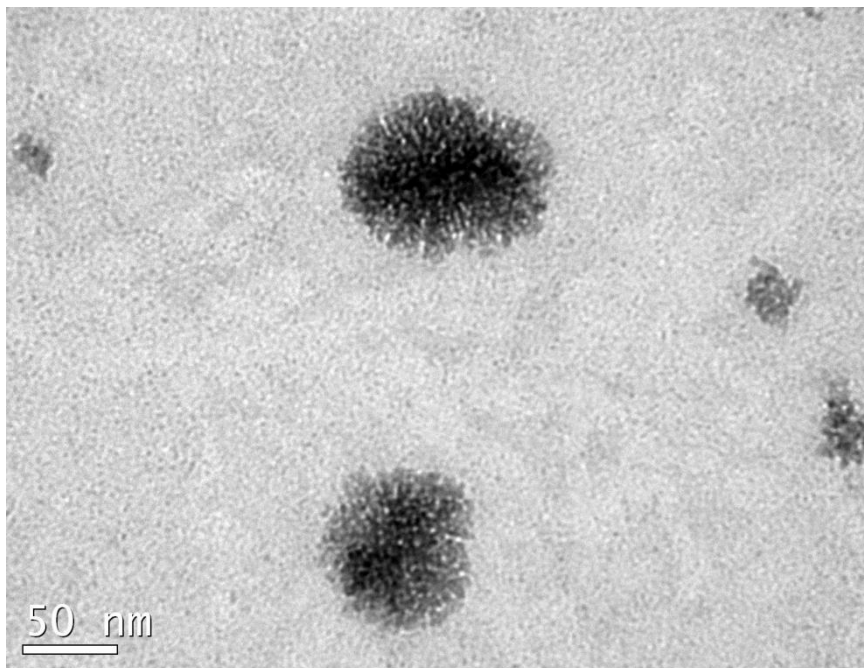
## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBALTO

#### 5.1.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Na Figura 1 apresenta-se uma imagem obtida através do MET, onde é possível visualizar uma aglomeração das CoONPs. Segundo Sharan e Nara (2019), o comportamento de agrupamento das nanopartículas de Cobalto, parcialmente solúveis, pode influenciar na sua ecotoxicidade. De acordo com Papis *et al.* (2009) as nanopartículas de  $\text{Co}_3\text{O}_4$  tendem a formam aglomerados de diversos tamanhos e formas em razão de suas propriedades magnéticas.

**Figura 1-** Imagem da CoONP obtida através do MET.



**Fonte:** Laboratório de Microscopia Central da UFSC

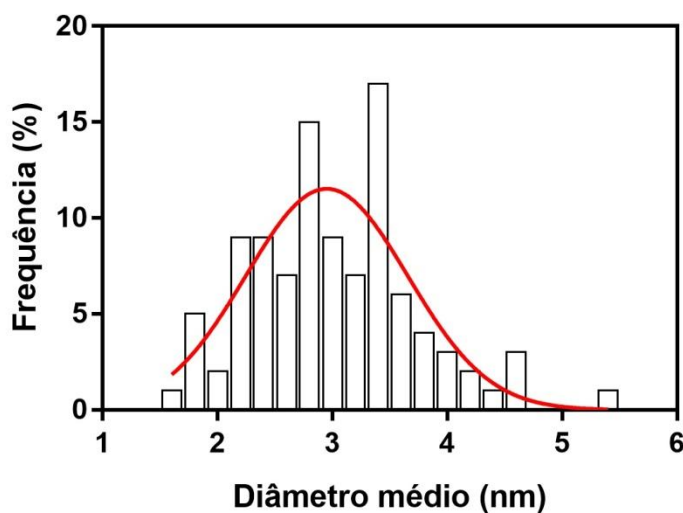
O tamanho da nanopartícula de Óxido de Cobalto foi determinado a partir da técnica de microscopia eletrônica de transmissão, que informa o diâmetro da NP. Na Figura 2

apresenta-se o histograma de distribuição de tamanhos da nanopartícula, o histograma ilustrado foi construído com aproximadamente 100 partículas selecionadas.

Percebe-se que o diâmetro médio da CoONP é de aproximadamente 3 nm, desvio padrão de 0,70 e Intervalo de Confiança (IC 95%) de 0,14, valor é idêntico ao observado por Wang et al. (2010) que determinaram que uma microesfera mesoporosa de Óxido de Cobalto ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ ) é constituída de nanopartículas aglomeradas de diâmetro médio igual a 3 nm. Shim (2011) sintetizou  $\text{Co}_3\text{O}_4$ NP através do método verde com a bactéria *Bacillus subtilis*, e obteve NPs com diâmetros entre 2 e 5 nm. Dogra *et al.* (2019) também relatou um tamanho médio de NPs de Óxido de Cobalto de 3,0 nm, obtidos a partir da curva de distribuição de tamanho fornecida pelo MET.

O diâmetro obtido para a NP é semelhante ao encontrado por Cruz (2019), de 3,64 nm, em estudo realizado com nanopartículas de Cobalto (CoNPs). Já Viali (2013), descreveu que nanopartículas do tipo caroço@casca utilizando metais como Cobalto, platina e paládio na síntese, forma NPs CoPt@Pd, e possui um valor de diâmetro médio de 3,5 nm  $\pm$ 0,9, e um desvio padrão de 0,78.

**Figura 2** -Histograma representando o diâmetro médio da CoONP



**Fonte:** Laboratório de Microscopia Central da UFSC.

A partir do diâmetro médio da nanopartícula, pôde-se calcular a área superficial da NP ( $A_{superficial}$ ), para tal utilizou-se a Equação 2 descrita por Hiemenz e Rajagopalan (1997).

$$A_{superficial} = \frac{6}{\rho * D} \quad (\text{Equação 2})$$

Dessa maneira, considerando o diâmetro (D) como 3 nm, e a densidade ( $\rho$ ) do Cobalto como  $8,900 \text{ g/cm}^3$ , a área superficial da CoONP é de  $224,7 \text{ m}^2/\text{g}$ .

### 5.1.2 Medida de espalhamento de luz dinâmico (DLS)

Na Tabela 3 podem ser visualizados os tamanhos das nanopartículas nos meio ISO e M4 e também em água ultrapura. As CoONPs possuem diâmetro médio de 3 nm, porem as NP se aglomeram tornando seu tamanho maior e assim passando para a escala micro, este comportamento pode ser explicado devido as características magnéticas do Cobalto. Para Hobson e Guy (2014) os nanomateriais tendem a formar aglomerados quando entram em contato com fluidos e soluções de cultura, resultando em exposições que podem alterar a toxicidade do produto original.

**Tabela 3** – Diâmetros hidrodinâmicos para três diferentes meios, e o índice de polidispersão para cada diâmetro.

Meio	Diâmetro (nm)	Média(nm)	Índice de polidispersão (IP)	Média do IP
CoONP (água ultra pura)	36,306	29,711	0,418	0,4205
	23,116		0,423	
CoONP(ISO)	31,570	30,185	0,480	0,535
	28,801		0,590	
CoONP (M4)	32,568	30,459	0,660	0,634
	28,350		0,609	

Fonte: A Autora, 2019.

Os valores médios de diâmetro obtido pelo DLS são de aproximadamente 30 nm devido a aglomeração das NPs, esse comportamento pode ser visualizado na Figura 1 que apresenta a aglomeração de CoONPs. Observa-se que o diâmetro hidrodinâmico obtido foi muito superior ao tamanho real da NP estimado pelo MET, este mesmo resultado foi alcançado por Ates et al. (2016).

Os valores médios apresentados na Tabela 3 são semelhantes aos observados por Muradov et al. (2018) para nanopartículas de Sulfeto de Cobalto, utilizando PVA como agente surfactante. Maleki, Hosseini e Taherizadeh (2018) obtiveram tamanho médio da  $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{NP}$  sintetizada, de aproximadamente 30 nm. O mesmo resultado foi obtido por Chen et al. (2018) para CoNPs.

Em estudos realizados com nanopartículas de Ferrite de Cobalto o valor médio de 52% das partículas foi inferior a 33,6 nm (ABUDAYYAK; ALTINÇEKİÇ GÜRKAYNAK; ÖZHAN, 2017). Para Marmorato et al. (2011) as medições a partir do método DLS, realizadas em diferentes meios, indica um aumento do diâmetro médio das nanopartículas de Ferrite de Cobalto em suspensão, agrupados de  $35,6 \pm 1,1$  nm.

Provavelmente a menor média de diâmetros encontrada para a NP em água ultra pura deve-se a ausência de sais neste meio, mesmo assim, ocorre um agrupamento das NPs que de acordo com Papis et al. (2010) pode ser associado as propriedades físicas do cobalto. O uso dos meios diluidores conferiu uma aglomeração superior a NP, a diluição de CoONP em meio ISO quando comparada com a nanopartícula diluída em M4 apresentou diâmetro médio inferior, este efeito pode ser devido a composição do meio conter menor quantidade de sais. Quando se compara os dados da Tabela 3 e da Figura 2 observa-se que existe uma heterogeneidade na dispersão das nanopartículas, visto que índice de dispersão superior a 0,2 confere um elevado grau de dispersão, essa heterogeneidade é observada na análise da Figura 2 em que os diâmetros variam em um faixa de 2 a 5 nm.

### 5.1.3 Potencial Zeta

O potencial zeta é o parâmetro utilizado para determinar a carga superficial da nanopartícula de Cobalto. Na análise do potencial zeta usou-se a CoONP em três diferentes meios: CoONP em água ultrapura, CoONP diluída em meio ISO e por último diluída em meio M4. Os resultados alcançados para o potencial zeta são apresentados na Tabela 4, e tem como unidade de medida para carga superficial milivolts (mV).

**Tabela 4-**Potencial zeta da CoONP para três diferentes meios.

Meio	Potencial zeta (mV)	Média(mV)	pH
CoONP (água ultra pura)	-2,93	-3,28	6,6
	-3,30		
	-3,62		
CoONP(ISO)	-14,79	-14,43	8,4
	-14,25		
	-14,24		
CoONP (M4)	-10,03	-11,18	7,8
	-11,67		
	-11,84		

Fonte: A autora, 2019.

De acordo com Vijayanandan e Balakrishnan (2018), geralmente partículas de Cobalto com potencial zeta maior que +25 mV e menor que -25 mV são consideradas com alto grau de estabilidade. Percebe-se que as partículas estudadas possuem valores de potencial zeta compreendido dentro da faixa de -25mV e +25mV, assim as nanopartículas apresentam um certo grau de instabilidade O potencial zeta mediano das nanopartículas determinado para os dois meios, e o valor obtido para a CoONP em água ultrapura é semelhante ao observado por Heinlaan et al. (2017) para nanopartículas de  $\text{Co}_3\text{O}_4$  com tempo de medição de 0h, no mesmo estudo observou-se o potencial para tempos de medição de 48 h com e sem adição da *Daphnia magna*, os valores encontrados foram respectivamente,  $-5,2 \pm 1,7$  e  $-7,2 \pm 1,2$  mV.

A instabilidade de NP de Cobalto também foi observada por Chen et al. (2018), onde o potencial zeta foi determinado para diluições de CoNPs em água Milli-Q e água do mar, os valores obtidos respectivamente são -23,2 mV e -13,8 mV, conferindo assim maior estabilidade para as NPs em água de Milli-Q.

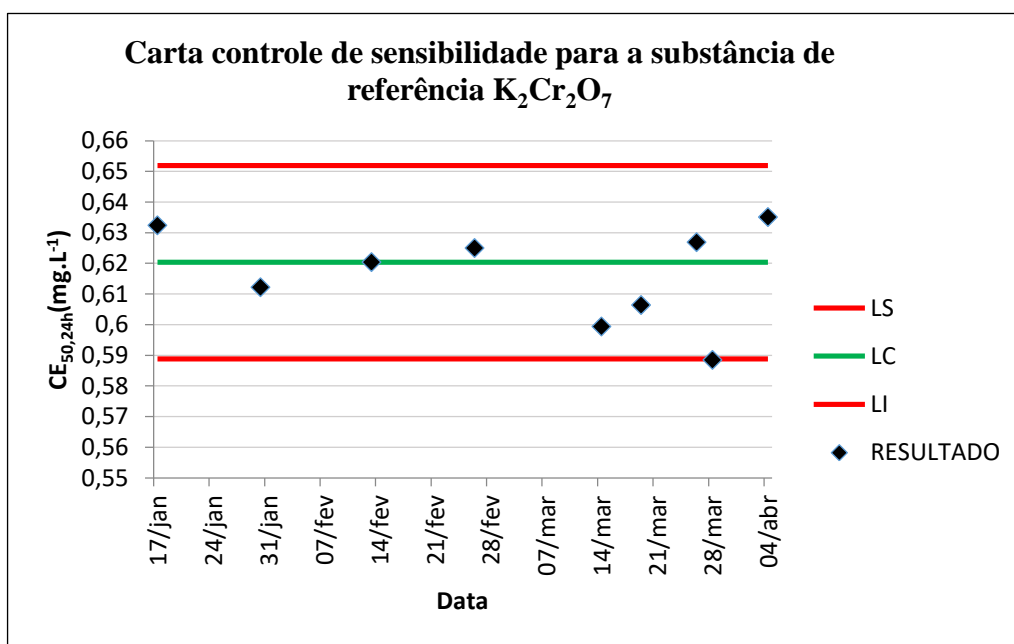
Mauro et al. (2015) caracterizou  $\text{Co}_3\text{O}_4$ NPs para o parâmetro potencial zeta, para dois diferentes meios, água e suor sintético, obteve para água uma Média:  $-19,8 \pm 1,15$  mV, já o suor sintético foi analisado para diferentes tempos de exposição, 0 horas e 24 horas, obtendo respectivamente Média:  $-18,5 \pm 3,5$  mV e Média:  $-15,9 \pm 4,2$  mV.

Embora na literatura estejam disponíveis alguns estudos referente à caracterização de nanopartículas de cobalto, em muitos casos os valores observados para o potencial zeta foram discrepantes em relação ao presente estudo, porem para Ates et al. (2016) em estudo realizado com CoONP o valor de potencial zeta obtido foi semelhante, os autores encontram -3,57 mV. As diferenças analisadas entre os estudos podem ser associadas a presença dos sais nos meios ISO e M4, existe entre os sais que compõem os meios forças eletrostáticas que podem ser responsáveis por reações, causando a instabilidade da suspensão.

## 5.2 TESTES DE SENSIBILIDADE COM *D. magna*

Os testes de sensibilidade foram realizados durante o período de testes de avaliação da toxicidade aguda, ao total realizou-se nove testes de sensibilidade com o *D. magna*, utilizando como substância de referência o Dicromato de Potássio -10 mg/L. Constatou-se que a sensibilidade da *D. magna* foi variável no decorrer do período de testes, na Figura 3 é apresentada a carta de controle elaborada.

**Figura 3-** Carta Controle do organismo teste utilizando Dicromato de Potássio como substância de referência.



**Fonte:** A autora, 2019.

Na Figura 3, é possível visualizar os pontos de dispersão em preto que representam os resultados de  $CE_{50,24h}$  para cada teste, uma linha de limite superior (LS) que considera a média mais dois desvios padrão, uma linha de limite central (LC) que representa a média dos resultados e um limite inferior (LI) calculado subtraindo-se da média dois desvios padrão.

O valor médio da  $CE_{50,24h}$  foi de 0,62 mg/L, com desvio padrão de 0,015 mg/L. Segundo a ISO 6341/2012 para a substância de referência Dicromato de Potássio a faixa de



sensibilidade é de 0,6 mg/L a 1,7 mg/L . Assim,  $CE_{50,24h}$  média para a sensibilidade estava compreendido na faixa adequada.

### 5.3 TESTES DE TOXICIDADE AGUDA

Na Tabela 5 são apresentados os resultados de  $CE_{50,48h}$ , juntamente com o Intervalo de Confiança (IC, 95%) do teste de toxicidade aguda.

**Tabela 5-** Valores de  $CE_{50,48h}$  ( $\mu\text{g/L}$ ) para suspensão de CoONP.

Nº do teste	$CE_{50,48h}$ ( $\mu\text{g/L}$ )	IC(95%)
1	348,6	2,497 a 2,587
2	327,6	2,445 a 2,586
3	349	2,499 a 2,587
4	395,3	2,566 a 2,628
5	404,3	2,567 a 2,646
<b><math>CE_{50,48h}</math> (<math>\mu\text{g/L}</math>) média</b>	349	-

Fonte: A autora, 2019.

Por meio da análise dos dados apresentados na Tabela 5 calculou-se a média da  $CE_{50,48h}$  e obteve-se o valor de 349  $\mu\text{g/L}$  (0,349  $\mu\text{g/mL}$ ; 0,349  $\text{mg/L}$ ).

Em estudo realizado por Griffitt et al. (2009) avaliou-se a concentração letal mediana ( $CL_{50}$ ) para diferentes organismos teste, a seguir são apresentadas as características das nanopartículas de Cobalto, diâmetro na faixa de 10-20 nm, área superficial de 36,39  $\text{m}^2/\text{g}$ , potencial zeta +17,8 mV, polidispersidade 0,238. Os autores utilizaram os organismos teste *Danio rerio*, *Daphnia pulex* adulto, *Ceriodaphnia dubia* neonatos, os valores obtidos de  $CL_{50}$ , são:  $CL_{50,48h} > 10 \text{ mg/L}$  para *Danio rerio* e *Daphnia pulex*; para *C. dubia*  $CL_{50} 1,67 \text{ mg/L}$ .

Demais estudos realizados avaliaram os efeitos citotóxicos e o potencial antibacteriano de  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NPs}$ , Khan et al. (2015) avaliaram estes efeitos em células humanas e também em nove espécies de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, os autores observaram que NPs de Óxido de Cobalto demonstraram atividade anticancerígena para duas células humanas colorretal distintas, os valores de índice de citotoxicidade (IC 50%) respectivamente é 2,26 e 394,5  $\mu\text{g/mL}$ . Em relação ao potencial antibacteriano, não foi observado nenhum efeito significativo.

Khalil et al. (2017) realizaram estudos de avaliação do potencial citotóxico de nanopartículas biogênicas de Óxido de Cobalto com culturas promastigota e amastigota do protozoário *Leishmania axênica* encontrando respectivamente uma  $CL_{50,72h}$  de 12,82  $\mu\text{g/ml}$  e 3,16  $\mu\text{g/ml}$ . Os autores também avaliaram o potencial citotóxico para macrófagos, obtendo  $CL_{50}$  igual 58,55  $\mu\text{g/ml}$ , e posteriormente testaram para RBC humano, observando  $CL_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$  e também para o camarão de salmoura com  $CL_{50}$  igual a 19,18  $\mu\text{g/ml}$ . Neste estudo, o método de síntese da NP foi à metodologia verde, usando extratos de folhas de *Sageretia thea* como agente quelante.

Em outro estudo, diferentes concentrações de nanopartículas de CoO são aplicadas as microalgas *Navicula* e *Chaetoceros spp.* e observou-se que a exposição a 0,2 mg/mL de nanopartículas de CoO por 5 dias resultou em densidades celulares diminuídas em ambas as microalgas (REBELLO; SHAIKH; DESA, 2010). Em estudo realizado por Di Guglielmo et al. (2010) com nanopartículas de Ferrite de Cobalto (CoFeNP), utilizando no teste duas linhas de células-tronco embrionárias, ES-D3 e 3T3, obteve-se respectivamente a  $CL_{50}$  243,91 e 20,05  $\mu\text{g/ml}$  em um tempo de exposição de 10 dias.

Heinlaan et al. (2017) expos *D. magna* à  $\text{Co}_3\text{O}_4\text{NP}$ , a nanopartícula possui tamanho primário de 30 nm, entretanto ao se introduzir em um meio o diâmetro aumentou até  $441 \pm 45$  nm, os resultados alcançados demonstram que a nanopartícula não induziu efeito agudo no organismos teste.

A discrepância entre os valores observados pode ser devido às propriedades físicas da NP, ou pode ser associada aos diferentes métodos de síntese das nanopartículas. Vale ressaltar que a escolha dos organismos teste também influencia nos resultados. A  $CE_{50}$  obtida neste trabalho não foi semelhante a nenhuma outra encontrada na literatura e percebe-se que os valores entre os demais autores também possuem uma diferença significativa.

As características da nanopartícula como o diâmetro médio de 3 nm, o tamanho da partícula de 30 nm, a instabilidade da suspensão, a heterogeneidade da dispersão das partículas e sua grande área superficial são fatores que contribuem para a diferença entre os valores alcançados, quando em comparação com os demais estudos de toxicidade de nanopartículas de Cobalto.

### **5.3.1 Testes de toxicidade aguda com *D. magna* nascidos em condições subaguda**

Os neonatos de *D. magna* foram expostos a uma concentração de 50 µg/L de CoONP, mantendo-se assim um cultivo dos organismos, os organismos foram expostos desde o início da sua vida, passando pelo seu crescimento, maturidade sexual e reprodução, ao todo foram acompanhados 14 lotes com seus respectivos controles.

A seguir é ilustrado na Tabela 6 as informações de reprodução e mortalidade do lote 1 e de seu respectivo controle, os dias de exposição são relativos aos dias em que realizou-se a manutenção da cultura e efetuou-se a alimentação dos organismos.

**Tabela 6-** Dados de mortalidade e reprodução para o lote 1, em um tempo de exposição de 25 dias.

Dias de Exposição	Número de Matrizes		Reprodução	
	Lote 1	Controle	Lote 1	Controle
2	30	30	0	0
4	28	29	0	0
7	27	29	0	0
9	26	29	0	3
11	24	29	0	7
14	23	29	0	4
16	22	28	1	0
18	19	27	5	16
21	16	26	10	6
23	14	26	6	18
25	12	25	4	10
<b>Total</b>	<b>18</b>	<b>5</b>	<b>26</b>	<b>64</b>

Fonte: A Autora, 2019.

Na análise da Tabela 6 verificou-se que os organismos expostos a condições subagudas tornam-se mais sensíveis ao longo do tempo e apresentam mortalidade superior a do controle. As condições subagudas, onde os organismos são expostos a um baixo nível da substância tóxica, apresentaram efeito na reprodução dos organismos, observou-se que os organismos mantidos em condições de laboratório adequadas reproduziram-se em um menor espaço de tempo e em maiores quantidades, enquanto que, os organismos expostos apresentaram um retardo na reprodução e geraram menores quantidades de filhotes.

Durante o acompanhamento do cultivo observou-se que os organismos mantidos em condições subagudas não consumiam todo o alimento adicionado ao meio, o mesmo não foi constatado no controle. A mitigação da assimilação do alimento pode ter causado falta de nutrientes nos organismos contribuindo para a debilitação das *D. magna*, causando a morte precoce dos microcrustáceos, visto que, os organismos expostos a CoONP sobreviveram por

no máximo 60 dias. Watanabe et al. (2017) realizou testes com culturas de *Ceriodaphnia dubia* e constatou que até mesmo uma baixa concentração de Co de 50 µg/L, pode causar efeitos toxicológicos nos organismos testes.

Os neonatos gerados pelos organismos expostos foram utilizados em testes de toxicidade subaguda, obteve-se uma  $CE_{50,48h}$  de 302 µg/L, quando compara-se ambas as concentrações efetivas medianas obtidas nestes trabalho, observa-se os testes realizados com organismos criados em condições sub agudas apresentam um efeito de toxicidade maior que em relação aos organismos gerados em condições ambientais adequadas.

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos durante a pesquisa possibilitam concluir que:

- A CoONP apresentou toxicidade aguda aos organismos teste *Daphnia magna*, em concentração de cobalto total superior aos padrões de lançamento de efluentes, estabelecidos na legislação CONAMA 357/2005 atualizada para a CONAMA 430/2011. A legislação estabelece os limites máximos para duas classes de água doce, Classe 1 e Classe 2, respectivamente os valores permitidos são 0,05 mg/L e 0,2 mg/L, sendo que a  $CE_{50,48h}$  obtida é igual a 0,349 mg/L;
- Em relação à legislação CONSEMA 128/2006 a nanopartícula de Óxido de Cobalto não apresentou toxicidade ao organismo teste, visto que a norma cita um limite de 0,5 mg/L de Cobalto total;
- Observou-se que a  $CE_{50,48h}$  obtida a partir dos neonatos provenientes do cultivo em meio tóxico foi maior que a  $CE_{50,48h}$  realizada anteriormente, os valores encontrados foram 0,302 mg/L e 0,349 mg/L respectivamente. Esta maior toxicidade pode ser associada aos efeitos subagudos que a exposição durante um período de tempo causou nos organismos;
- Observou-se nos lotes expostos a CoONP, uma baixa geração de filhotes quando comparada com os índices obtidos a partir do controle estabelecido, a reprodução do controle foi 60% maior que a reprodução dos organismos mantidos na concentração de 50 µg/L;
- O elevado grau de toxicidade da nanopartícula pode ser associado ao seu tamanho reduzido, diâmetro de 3 nm, dado que partículas muito pequenas podem adentrar em células de organismos com maior facilidade;
- Foi observada a aglomeração das nanopartículas obtendo tamanho médio das partículas de 30 nm, este efeito de aglomeração pode ser devido à propensão da NP em tentar reduzir a energia associada a sua grande área superficial, de 224,7 m<sup>2</sup>/g;
- A instabilidade da NP foi verificada através do parâmetro potencial zeta, e comprovou-se que a CoONP está dentro da faixa de instabilidade de nanopartículas, a instabilidade de nanopartículas está intimamente relacionada com a sua capacidade de aglomeração;
- A suspensão de nanopartículas apresentou diferentes valores de carga superficial para os três meios diluidores utilizados durante a pesquisa, e quando compara-se os resultados obtidos conclui-se que para os meios compostos por sais confere-se uma maior aglomeração das partículas;

- Verificou-se que não existem legislações específicas que estabelecem limites de lançamento para CoONP e também para demais metais em nanopartículas, sendo assim espera-se que os resultados obtidos neste estudo venham a contribuir cientificamente para o conhecimento dos efeitos das nanopartículas de cobalto, e que em um futuro próximo possa contribuir também para o desenvolvimento e a criação de legislações.

## REFERÊNCIAS

ABUDAYYAK, M.; ALTINÇEKİÇ GÜRKAYNAK, T.; ÖZHAN, G.. In Vitro Evaluation of the Toxicity of Cobalt Ferrite Nanoparticles in Kidney Cell. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 14, n. 2, 2017. Disponível em: <[http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article\\_16072/169-173.pdf](http://cms.galenos.com.tr/Uploads/Article_16072/169-173.pdf)>. Acesso em: 09 jun. 2019.

AGÊNCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL (ABDI).  
Nanotecnologias: subsídios para a problemática dos riscos e regulação. Brasília: **ABDI**, 2011.

ALEKSEEV, V.; LAMPERT, W. Maternal control of resting-egg production in *Daphnia*. **Nature**, v. 414, n. 6866, p. 899, 2001.

ALVES, A. N. L.; DELLA ROSA, H. V. Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 2, p. 129-139, 2003. Disponível em: < <http://www.periodicos.usp.br/rbcf/article/view/43871/47492>>. Acesso em: 20 abr. 2019.

ALVES, O. L. Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. **Parcerias Estratégicas**, v. 9, n. 18, 2004. Disponível em: < [http://seer.cgee.org.br/index.php/parcerias\\_estrategicas/article/viewFile/138/132](http://seer.cgee.org.br/index.php/parcerias_estrategicas/article/viewFile/138/132)>. Acesso em: 17 dez. 2018.

APPATURI, J. N. et al. Supported cobalt nanoparticles on graphene oxide/mesoporous silica for oxidation of phenol and electrochemical detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Salmonella spp. **Materials Chemistry and Physics**, v. 232, p. 493-505, 2019.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. ABNT NBR 12.713 de 31 de maio de 2016. **Ecotoxicidade aquática – Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Cladocera, Crustacea)**. Brasília, 2016.

ATES, M. et al. Toxicity of engineered nickel oxide and cobalt oxide nanoparticles to Artemia salina in seawater. **Water, Air, & Soil Pollution**, v. 227, n. 3, p. 70, 2016.

ATKINS, P; JONES, L. **Princípios de química**: Questionando a vida moderna e o meio ambiente. 5. ed. Porto Alegre: Bookman, 2012. 941 p.

AZONANO. **Cobalt (Co) Nanoparticles- Properties, Applications**. 2013. Disponível em: < <http://www.azonano.com/article.aspx?ArticleID=3274> >. Acesso em: 22 dez. 2018.

BAPTISTA, I. E. **Avaliação da toxicidade de efluentes gerados em uma indústria têxtil catarinense**. Dissertação de Mestrado - Departamento de Engenharia Sanitária, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, 2001. Disponível em: < <https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/82020/183009.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 14 dez. 2018.

BARCELOUX, D. G. Cobalt. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, Topanga, California, p. 201-206, 1999.

BARMENTLO, S. H. et al. Acute and chronic toxicity of short chained perfluoroalkyl substances to *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, v. 198, p. 47-53, 2015.

BARROS, S. B. M; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. **Fundamentos de toxicologia**, São Paulo, ed. 2, p. 57-68, 2003.

BHATT, A. S. et al.. Microwave-assisted synthesis and magnetic studies of cobalt oxide nanoparticles. **Materials Chemistry and Physics**, p. 347-350, 2011. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/229341588\\_Microwave-Assisted\\_Synthesis\\_and\\_Magnetic\\_Studies\\_of\\_Cobalt\\_Oxide\\_Nanoparticles](https://www.researchgate.net/publication/229341588_Microwave-Assisted_Synthesis_and_Magnetic_Studies_of_Cobalt_Oxide_Nanoparticles)>. Acesso em: 18 fev. 2019.

BOSSARDI, K. **Nanotecnologia aplicada a tratamentos superficiais para o aço carbono 1020 como alternativa ao fosfato de zinco**. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Minas, Metalúrgica e Materiais. Área de Concentração: Ciência dos Materiais) – Departamento de Materiais da Escola de Engenharia da UFRGS, Porto Alegre. 2007. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/10889>>. Acesso em: 21 dez. 2018.

BRASIL. Resolução nº 357 de 2005. **Classificação de Corpos D'água e Padrões de Lançamento de Efluentes**. Brasília, 18 mar. 2005.

\_\_\_\_\_. Resolução nº 396 de 2008. **Classificação e enquadramento das águas subterrâneas**. Brasília, 3 abr. 2008.

\_\_\_\_\_. Resolução nº 430 de 2011. **Padrões de Lançamento de Efluentes**. Brasília, 13 mai. 2011.

BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: Avaliação de efluentes tratados de um aterro sanitário**. Dissertação de Mestrado - Departamento de Engenharia Sanitária Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, Florianópolis, SC, 2006. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/88729/230242.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em 14 dez. 2018.

BRILHANTE, O. M.; CALDAS, L. Q. A. **Gestão e avaliação de risco em saúde ambiental**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1999. Disponível em: <<http://www.eadcopp.com.br/v01/pdf/Gestaoeavaliacaoderiscoemsaudeambiental.pdf>>. Acesso em: 20 fev. 2019.

BUCHER, J. et al.. Developing Experimental Approaches for the Evaluation of Toxicological Interactions of Nanoscale Materials. **Final Workshop Report 3–4 November**, University of Florida, Gainesville, p. 1–37, 2004.

CHAU, C. F.; WU, S. H.; YEN, G. C. The development of regulations for food nanotechnology. **Trends in Food Science & Technology**, Amsterdam, v. 18, n. 5, p. 269-280, 2007. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2007.01.007>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

CHASIN, A. A. M.; LIMA, I. V. **Toxicologia para químicos**. Minicursos CRQ-IV, 2010. Disponível em: <[http://www.crq4.org.br/sms/files/file/toxicologia\\_mini2010.pdf](http://www.crq4.org.br/sms/files/file/toxicologia_mini2010.pdf)>. Acesso em: 20 fev. 2019.

CHEN, J. P. et al.. Enhanced magnetization of nanoscale colloidal cobalt particles. **Physical Review B**, v. 51, n. 17, p. 11527-11532, 1995.



- CHEN, X. et al. Toxicity of Co nanoparticles on three species of marine microalgae. **Environmental Pollution**, v. 236, p. 454-461, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749117337946>>. Acesso em: 09 jan. 2019
- CLARE, J. **Daphnia: Na Aquarist's Guide**. Disponível em: <[www.caudata.org/daphnia/](http://www.caudata.org/daphnia/)> Acessado em: 16 jan. 2019.
- CONTRERAS, J. E.; RODRÍGUES, E. A. Nanostructured insulators – A review of nanotechnology concepts for outdoor ceramic insulators. **Ceramics International**, v. 43, ed. 12, p. 8545-8550, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884217307113>>. Acesso em: 30 jan. 2019.
- CONTRERAS, J. E.; RODRÍGUEZ, E. A.; TAHA-TIJERINA, J. Nanotechnology applications for electrical transformers—A review. **Electric Power Systems Research**, v. 143, p. 573-584, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378779616304655>>. Acesso em: 30 jan. 2019.
- CORRÊA, C. L.; ALONZO, H. G. A.; TREVISAN, R.M.S. Avaliação do risco. **In: OGA, S. Fundamentos de toxicologia**, São Paulo, ed. 2, p. 69-76, 2003.
- COSTA, C. R. et al.. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820-1830, 2008. Disponível em: <[http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol31No7\\_1820\\_37-RV07485.pdf](http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol31No7_1820_37-RV07485.pdf)>. Acesso em: 14 dez. 2018.
- CRUZ, J.C. Synthesis and characterization of cobalt nanoparticles for application in the removal of textile dye. **Journal of Environmental Management**, v. 242, p. 220-228, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479719305262>>. Acesso em: 09 jun. 2019.
- CURTIS, J. et al.. Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians. **Toxicological reviews**, v. 25, n. 4, p. 245–260, 2006.
- DA RÓZ, A. et al.. **Nanoestruturas: Princípios e aplicações**. Rio de Janeiro, 2015.
- DELGADO, I. F.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Desafios atuais da pesquisa em toxicologia: Avaliação da toxicidade de nanomateriais manufaturados para o desenvolvimento. **Revista Vigilância Sanitária em Debate, sociedade, ciência e tecnologia**, p. 11-24, 2013.
- DI GUGLIELMO, C. et al.. Embryotoxicity of cobalt ferrite and gold nanoparticles: A first in vitro approach. **Reproductive Toxicology**, v. 30, ed. 2, p. 271-276, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S089062381000095X#tbl3>>. Acesso em: 07 jun. 2019.
- DOGRA, V. et al.. Bactericidal effects of metallosurfactants based cobalt oxide/hydroxide nanoparticles against *Staphylococcus aureus*. **Science of The Total Environment**, v. 681, p. 350-364, 2019. Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004896971932090X>>. Acesso em: 07 jun. 2019.

DONG, P. et al. Innovative nano-carriers in anticancer drug delivery-a comprehensive review. **Bioorganic Chemistry**, v. 85, p. 325-336, 2019. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045206818308915>>. Acesso em: 20 maio 2019.

DROBNE, D. Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology. **Arh Hig Rada Toksikol**, Liubliana, Slovenia, p. 471-478, 2007. DOI: 10.2478/v10004-007-0040-4

ELBERT, D. Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in *Daphnia*. **National Center for Biotechnology Information** (US), 2005.

EUROPEAN COMMISSION – EC. Commission Recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial - 2011/696/EU. **Official Journal of the European Union**, p. 38-40, 2011.

FANG, D. et al. Cobalt oxide nanoparticles anchored on discharged-graphene film for lithium-ion battery. **Solid State Ionics**, v. 340, 2019.

FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: Aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, No. 7, 1860-1870, 2009. Disponível em: <<http://submission.quimicanova.s bq.org.br/qn/qnol/2009/vol32n7/32-RV08203.pdf>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

FILHO, A. S. F.; MAGALHAES, D. P. **A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos**. O ecologia Brasiliensis Rio de Janeiro v.12, n.3, p. 355-381, 2008.

FINKLER, R. **Avaliação do efeito tóxico de líquidos percolados sobre o sistema reprodutivo de *Daphnia magna***. 2002. 117 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2002.

FLOHR, L. **Ensaios toxicológicos com *Daphnia magna* como alternativa para classificação de resíduos sólidos industriais**. Dissertação de Mestrado. Florianópolis, 2007. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/90613/243670.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

GRIFFITT, R. J. et al. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. **Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal**, v. 27, n. 9, p. 1972-1978, 2009. Disponível em: <<https://setac.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1897/08-002.1>>. Acesso em: 03 jun. 2019

GUPTA, A. K.; GUPTA, M. Synthesis and surface engineering of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Biomaterials**, v. 26, n. 18, p. 3995-4021, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961204009317?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 dez. 2018.

HE, X.; HWANG H. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, ed. 4, p. 671-681, 2016. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1021949816300758>>. Acesso em: 20 mar. 2019

HEINLAAN, M. et al.. Exposure to sublethal concentrations of  $\text{Co}_3\text{O}_4$  and  $\text{Mn}_2\text{O}_3$  nanoparticles induced elevated metal body burden in *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 189, p. 123-133, 2017. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X1730156X>>. Acesso em: 15 maio 2019.

HIEMENZ, P; RAJAGOPALAN, R. **Principles of colloid and surface chemistry**. 3. ed. Flórida: Marcel Dekker, 1997. 671 p.

HOBSON, D. W.; GUY, R. C. Nanotoxicology. *Encyclopedia of Toxicology*, p. 434-436, 2014.

HOLSAPPLE, M. P. et al.. Research strategies for safety evolution of nanomaterials part II: toxicological and safety evolution of nanomaterials, current challenges and data needs. **Toxicological Sciences**, v. 88, nº 1, p. 12- 17, 2005. Disponível em: < <https://academic.oup.com/toxsci/article-lookup/doi/10.1093/toxsci/kfi293>>. Acesso em: 23 jan. 2019.

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

KARAKOTI, A. S.; HENCH, L. L.; SEAL, S. The potential toxicity of nanomaterials—The role of surfaces. **JOM**, v. 58, ed. 7, p. 77-82, 2006. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s11837-006-0147-0>>. Acesso em: 16 nov. 2019.

KHALIL, A. T. et al.. Physical properties, biological applications and biocompatibility studies on biosynthesized single phase cobalt oxide ( $\text{Co}_3\text{O}_4$ ) nanoparticles via *Sageretia thea* (Osbeck.). **Arabian Journal of Chemistry**, 2017. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S187853521730134X>>. Acesso em: 03 jun. 2019.

KHAN, S. et al.. In vitro evaluation of anticancer and antibacterial activities of cobalt oxide nanoparticles. **JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry**, v. 20, ed. 8, p. 1319–1326, 2015. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s00775-015-1310-2>>. Acesso em: 03 jun. 2019.

KLINGELFUS, T. **Efeitos tóxicos de nanopartículas de dióxido de titânio ( $\text{TiO}_2$ ) e chumbo inorgânico (PbII) em *Rhamdia quelen* (SILURIFORMES, HEPTAPTERIDAE)**. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013. Disponível em: < <http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/30519/R%20-%20D%20>>

%20TATIANE%20KLINGELFUS.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 14 dez. 2018.

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

KUBRAK, O.I. et al. Cobalt-induced oxidative stress in brain, liver and kidney of goldfish *Carassius auratus*. **Chemosphere**, v. 85, p. 983-989, 2011.

LALAU, C. M. **Avaliação da toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre através de macrófitas da espécie *Landoltia punctata***. Dissertação de mestrado. Florianópolis, SC, 2014. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/123238/327421.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 21 dez. 2018.

LANJE, A. S. et al.. Synthesis and optical characterization of copper oxide nanoparticles. **Advances in Applied Science Research**, v. 1, n. 2, p. 36-40, 2010. Disponível em: <<http://www.imedpub.com/articles/synthesis-and-optical-characterization-of-copper-oxide-nanoparticles.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2019.

LIANG, X.; ZHAO, L. Room-temperature synthesis of air-stable cobalt nanoparticles and their highly efficient adsorption ability for Congo red. **RSC Advances**, 2012. Disponível em: <<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2012/RA/c2ra20240a#!divAbstract>>. Acesso em: 20 jan. 2019.

LISON, D. et al.. Update on the genotoxicity and carcinogenicity of cobalt compounds. **Occup. Environ. Med.**, p. 619–625, 2001.

MALEKI, A.; HOSSEINI, N.; TAHERIZADEH, A.. Synthesis and characterization of cobalt ferrite nanoparticles prepared by the glycine-nitrate process. **Ceramics International**, v. 44, ed. 7, p. 8576-8581, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0272884218303626>>. Acesso em 9 jun. 2019.

MANICKAM, V. et al.. Applications and genotoxicity of nanomaterials in the food industry. **Environmental Chemistry Letters**, v. 15, ed. 3, p. 399–412, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10311-017-0633-3#citeas>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

MANIMEGALAI, G.; KUMAR, S. S.; SHARMA, C. Pesticide mineralization in water using silver nanoparticles. **Int. J. Chem**, p. 1463-1471, 2011.

MARMORATO, P. et al.. Cellular distribution and degradation of cobalt ferrite nanoparticles in Balb/3T3 mouse fibroblasts. **Toxicology Letters**, v. 207, ed. 2, p. 128-136, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037842741101513X>>. Acesso em: 09 jun. 2019.

MAURO, M. et al.. Cobalt oxide nanoparticles: behavior towards intact and impaired human skin and keratinocytes toxicity. **International journal of environmental research and**

**public health**, v. 12, n. 7, p. 8263-8280, 2015. Disponível em:< <https://www.mdpi.com/1660-4601/12/7/8263/htm>>. Acesso em: 10 maio 2019.

MISHRA, R.; MILITKY, J. Nature, nanoscience, and textile structures. **Nanotechnology in Textiles**, p. 1-34, 2019.

MEI, J. et al. Cobalt oxide-based nanoarchitectures for electrochemical energy applications. **Progress in Materials Science**, v. 103, p. 596- 677, 2019.

MODRZEJEWSKA-SIKORSKA, A. et al.. The effect of silver salts and liginosulfonates in the synthesis of liginosulfonate-stabilized silver nanoparticles. **Journal of Molecular Liquids**, v. 240, p. 80–86, 2017. Disponível em:< <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167732217311455>>. Acesso em: 7 fev. 2019.

MORO, C. F. **Comportamento do peptídeo entomotóxico Jaburetox-2Ec em solução e a sua interação com lipossomas miméticos de plaquetas humanas**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul- Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Porto Alegre, 2010. Disponível em:< <https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/28438/000768579.pdf>>. Acesso em: 15 jan. 2018.

MÜLLER, J. **Avaliação de toxicidade da fração solúvel em água do biodiesel, diesel e da mistura binária diesel/biodiesel de 5% (B5)**. 2011. 112 f. Monografia (Especialização) - Curso de Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.

MURADOV, M. B. et al.. Synthesis and characterization of cobalt sulfide nanoparticles by sonochemical method. **Infrared Physics & Technology**, v. 89, p. 255-262, 2018. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1350449517302037>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

NATIONAL NANOTECHNOLOGY INITIATIVE (NNI). **What is nanotechnoly?** United States National Nanotechnology Initiative, 2013. Disponível em: < <http://www.nano.gov/nanotech-101/nanotechnology-facts>> Acesso em: 19 dez. 2018.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Recommended dietary allowances. **National Academies Press**, 1989.

NERLICH, B.; LEMANCZYK, S. Nanotechnology: Social and Cultural Aspects. **International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences**, ed, 2, p. 188-193, 2015. Disponível em:< <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080970868850564>>. Acesso: em 19 maio 2019.

OSCAR, B. V. **Avaliação toxicológica de nanoestruturas de óxido de zinco aplicadas em argamassas**. Florianópolis, SC, 2015. Disponível em: < <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/bitstream/handle/123456789/160026/TCC%20FINAL%202015-1%20Bianca%20Vicente%20Oscar.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 23 nov. 2018.

PANKRATZ, T. M. Environmental engineering dictionary and directory. **Lewis Publishers**, Boca Raton; Florida. 2001.

PAPIS, E. *et al.*. Engineered cobalt oxide nanoparticles readily enter cells. **Toxicology Letters**, v. 189, ed. 3, p. 253-259, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378427409011667>>. Acesso em: 16 jan. 2019.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. Os Nanomateriais e a Questão Ambiental. **Química Nova**, Campinas, Brasil, p. 421-430, 2010. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422010000200033](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422010000200033)>. Acesso em: 20 dez. 2018.

PICRAUX, S. T. **Nanotechnology**. Disponível em: <<http://www.britannica.com/EBchecked/topic/962484/nanotechnology>>. Acesso em: 20 dez. 2018.

PUGAZHENDHI, A. *et al.*. Inorganic nanoparticles: A potential cancer therapy for human welfare. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 539, p. 104-111, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S037851731830053X>>. Acesso em 16 nov. 2018.

QUINA, F.H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, São Paulo, v.27, n.6, p.1028-1029, 2004. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422004000600031](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000600031)>. Acesso em: 20 dez. 2018.

RAND, G. M. **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate, and risk assessment**. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis. 1995.

RAZA, M. A. *et al.*. Synthesis, characterization and antibacterial properties of nano-sized cobalt particles. The 2016 World Congress on Advances in Civil, **Environmental and Materials Research (ACM 2016)**. Disponível em: [http://www.i-asem.org/publication\\_conf/acem16/6.ICAM16/T2H.2.MR373\\_1375F1.pdf](http://www.i-asem.org/publication_conf/acem16/6.ICAM16/T2H.2.MR373_1375F1.pdf) Acesso em: 19 abr. 2019

REBELLO, V., SHAIKH, S., DESA, P.V. Toxicity of cobalt oxide nanoparticles. **In: International Conference on Environmental Engineering and Applications (ICEEA 2010)**, p. 195-199, 2010

RIO GRANDE DO SUL. Resolução nº 128 de 2006. **Padrões de Lançamento de Efluentes para o Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, RS, 2006.

\_\_\_\_\_ Resolução nº 355 de 2017. **Padrões de Lançamento de Efluentes para o Estado do Rio Grande do Sul**. Porto Alegre, 2017.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. Em Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de Calidad de Aguas - Estandarización, Intercalibración, Resultados y Aplicaciones, **Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo**, Ottawa, 2004.

Disponível em: < <https://prd-idrc.azureedge.net/sites/default/files/openbooks/147-7/index.html>>. Acesso em: 14 dez. 2018.

ROSSETTO, A. L. O. F. **Estudo comparativo entre os efeitos tóxicos agudos e crônicos do óxido de cobre na forma de nanopartícula e micropartícula**. Dissertação de mestrado. Florianópolis, SC, 2012.

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

SANTOS, P. C. **Nanopartículas: toxicidade biológica**. João Pessoa-PB, 2015. Disponível em:< <https://repositorio.ufpb.br/jspui/bitstream/123456789/898/1/PCS24022015.pdf>>. Acesso em: 07 maio 2019.

SARGENTELLI, V.; FERREIRA, A. P. Nanopartículas magnéticas: o cobalto. **Eclética Química**, v. 35, n.4, Araraquara, São Paulo, 2010. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-46702010000400020](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-46702010000400020)>. Acesso em: 19 jan. 2019.

SCHIRMER, K. et al. Ecotoxicological aspects of nanomaterials in the aquatic environment. In: **Safety Aspects of Engineered Nanomaterials**. p. 978–981, 2013.

SCHMIDT, J. R. A. **Avaliação de risco envolvendo a manipulação de nanomateriais em um laboratório de pesquisa**. Dissertação de mestrado. Florianópolis, SC, 2017. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/176917/346686.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 15 nov. 2018.

SEATON, A.; DONALDSON, K. **Nanoscience, nanotoxicology, and the need to think small**. *The Lancet*, Edinburgh, v. 365, p. 923-924, 2005. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673605710618?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 dez. 2018.

SERGEEV, G. B.; KLABUNDE, K. J. Nanochemistry - Solvated Metal Atom Dispersion (SMAD) for Making Metal Nanoparticles. **Nanochemistry**, ed. 2, p. 55–73, 2013.

SHAHID, M. M. et al. An electrochemical sensing platform based on a reduced graphene oxide–cobalt oxide nanocube@ platinum nanocomposite for nitric oxide detection. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 3, n. 27, p. 14458-14468, 2015.

SHAHID, M. M. et al. An electrochemical sensing platform of cobalt oxide@ gold nanocubes interleaved reduced graphene oxide for the selective determination of hydrazine. **Electrochimica Acta**, v. 259, p. 606-616, 2018.

SHARAN, A.; NARA, S. **Phytotoxic Properties of Zinc and Cobalt Oxide Nanoparticles in Algae**. *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms: Concepts and Controversies*, v. 2, p. 1-22, 2019.

SHARMA, V. et al.. Organic-coated silver nanoparticles in biological and environmental conditions: Fate, stability and toxicity. **Advances in Colloid and Interface Science**, p. 15-34, 2014.

SHIM, H. et al.. Highly Reversible Lithium Storage in Bacillus subtilis-Directed Porous  $\text{Co}_3\text{O}_4$  Nanostructures. **ACS Nano**, v. 5, n. 1, p. 443-449, 2011.

SILVA, C. G. da. **O que é a nanotecnologia?**. 2011 Disponível em: <<http://www.comciencia.br/reportagens/nanotecnologia/nano10.htm>>. Acesso em: 17 dez. 2018.

SILVA, D. de O. **Nanopartículas de cobalto preparada em líquidos iônicos: síntese, caracterização e aplicação em processo Fischer-Tropsch**. Dissertação (Mestrado de Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2008. Disponível em: <<http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/14350>>. Acesso em: 14 jan. 2019.

SISINNO, C. L. S.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Princípios de toxicologia ambiental. **INTERCIENCIA**, ed. 1, 2013.

SPIELMANN, H. Animal Use in the Safety Evaluation of Chemicals: Harmonization and Emerging Needs. **ILAR Journal**, v. 43, p. 11- 17, 2002.

SUMEREDER, C.; MUHR, M.. The prospects of nanotechnology in electrical power engineering. **In: 19th International Conference on Electricity Distribution. Vienna**, p 21-24, 2007. Disponível em:<[https://www.researchgate.net/profile/C\\_Sumereder/publication/228886730\\_THE\\_PROSPECTS\\_OF\\_NANOTECHNOLOGY\\_IN\\_ELECTRICAL\\_POWER\\_ENGINEERING/links/5440ecde0cf251bcd6149c4.pdf](https://www.researchgate.net/profile/C_Sumereder/publication/228886730_THE_PROSPECTS_OF_NANOTECHNOLOGY_IN_ELECTRICAL_POWER_ENGINEERING/links/5440ecde0cf251bcd6149c4.pdf)>. Acesso em: 30 jan. 2019

THASSU, D.; DELEERS, M.; PATHAK, Y. **Nanoparticulate drug delivery systems**. New York: Informa Healthcare; 2007. 382p. Disponível em: <[http://ajprd.com/download ebooks\\_pdf/50.pdf](http://ajprd.com/download ebooks_pdf/50.pdf)>. Acesso em: 21 dez. 2018.

VIALI, W. R.. **Síntese e caracterização de nanopartículas magnéticas do tipo caroço@casca de 'CO'@'PD' com propriedades para aplicações tecnológicas**. 2013. Disponível em:<[https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/102568/viali\\_wr\\_dr\\_araiq.pdf;sequence=1](https://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/102568/viali_wr_dr_araiq.pdf;sequence=1)>. Acesso em 05 jun. 2019.

VIJAYANANDAN, A. S.; BALAKRISHNAN, R. M. Biosynthesis of cobalt oxide nanoparticles using endophytic fungus *Aspergillus nidulans*. **Journal of Environmental Management**, v. 218, p. 442-450, 2018. Disponível em:<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479718304146>>. Acesso em: 30 jan. 2019.

WANG, L. *et al.*. Preparation and electrochemical properties of mesoporous  $\text{Co}_3\text{O}_4$  crater-like microspheres as supercapacitor electrode materials. **Current Applied Physics**, v. 10, ed. 6, p. 1422-1426, 2010.



WANG, Z. et al. Oxygen electrocatalysts in metal–air batteries: from aqueous to nonaqueous electrolytes. **Chemical Society Reviews**, v. 43, n. 22, p. 7746-7786, 2014.

WATANABE, C. H. et al.. Toxicity assessment of arsenic and cobalt in the presence of aquatic humic substances of different molecular sizes. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 139, p. 1-8, 2017.

WOOD, C. S; WEIS, C; CARO, C; ROE, A. A practice analysis of toxicology. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 82, p. 140–146, 2016.

YADAV, A. et al.. Fungi as an efficient mycosystem for the synthesis of metal nanoparticles: progress and key aspects of research. **Biotechnology letters**, v. 37, n. 11, p. 2099-2120, 2015. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s10529-015-1901-6>>. Acesso em: 19 fev. 2019.

ZAGATTO, P.A. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações**. IV Seminário sobre Ecotoxicologia. 2015.

ZHAO, G. et al.. Metal/oxide interfacial effects on the selective oxidation of primary alcohols. **Nature communications**, v. 8, n. 14039, 2017. Disponível em: < <https://www.nature.com/articles/ncomms14039>>. Acesso em: 19 abr. 2019

ZHAO, Y et al.. Dependence of nanotoxicity on nanoscale characteristics and strategies for reducing and eliminating nanotoxicity. **Nanotoxicology**, p. 265– 280, 2007.

**ANEXO I****Preparo do Meio de Cultura (M4) - Cultivo de *Daphnia magna***

No quadro a seguir são apresentadas as soluções utilizadas no preparo do meio M4, para um volume de 5L de água de osmose. O meio deve ser mantido em aeração constante, por no mínimo 24 horas antes de seu uso.

<b>SOLUÇÃO</b>	<b>VOLUME (mL)</b>
Solução de Cloreto de Cálcio	16
Solução de Sulfato de Magnésio	4
Solução de Cloreto de Potássio	4
Solução de Bicarbonato de Sódio	4
Solução Catiônica	0,5
Solução Aniônica	2,5
Solução de Silicato	1
Solução de Ferro EDTA	25
Solução de Sulfato	0,5
Solução Vitamínica	0,5

**Fonte:** Adaptado de NBR 12.713(ABNT, 2016)

## ANEXO II

**Cultivo da alga *Desmodesmus subspicatus***

Para o cultivo da alga *Desmodesmus subspicatus*, mantém-se uma cultura-estoque (inoculo) em meio líquido, com validade de no máximo 2 meses, o inoculo dever ser mantido sobre refrigeração. O primeiro passo é preparar o meio de cultura algácea (CHU) utilizando as soluções descritas na Tabela abaixo, que foram preparadas anteriormente e mantidas refrigeradas, os volumes usados são 10 mL/L para as soluções de 1 a 6 e 1 mL/L das soluções de 7 a 10.

SOLUÇÃO	REAGENTE	QUANTIDADE (mg)	PREPARO
1	NaNO <sub>3</sub>	25 000	Dissolver em 1000mL de água destilada
2	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2 500	Dissolver em 1000mL de água destilada
3	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	7 500	Dissolver em 1000mL de água destilada
4	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7 500	Dissolver em 1000mL de água destilada
5	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17 500	Dissolver em 1000mL de água destilada
6	NaCl	2 500	Dissolver em 1000mL de água destilada
7	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> Na <sub>2</sub> O <sub>8</sub> .2H <sub>2</sub> O	50 000	Dissolver em 1000mL de água destilada
	KOH	31 000	Dissolver em 1000mL de água destilada
8	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	4 980	Dissolver em 500mL de água destilada
9	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11 420	Dissolver em 500mL de água destilada
10	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,82	Dissolver em 1000mL de água destilada
	MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	1,44	
	MoO <sub>3</sub>	0,71	
	CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1,57	
	Co(NO <sub>3</sub> ).6H <sub>2</sub> O	0,49	

Após o preparo do meio CHU, caso necessite este deve ter seu pH corrigido para a neutralidade (pH=7,00 ± 0,2), em seguida o meio é adicionado em um Kitassato e depois de vedado deve ser autolavado. Depois de esterilizado o meio é realizada a inoculação da alga, na uma capela de fluxo laminar com lâmpada UV. Com a cultura já inoculada esta deve permanecer sobre aeração e iluminação constante por aproximadamente de 7 a 10 dias. Após

este período a alga já atingiu o crescimento e a cultura já pode ser centrifugada. Depois da centrifugação, a alga depositada no frasco de alimento é ressuspensa com o meio M4 utilizado no cultivo de *Daphnia magna*.

**ANEXO III****Preparo do meio ISO**

No quadro abaixo é disposto o preparo do meio ISO, para um volume de 5L de água de osmose. O meio ISO deve ser mantido aerado, por 24 horas antes da realização da manutenção do cultivo.

<b>SOLUÇÃO</b>	<b>VOLUME (mL)</b>
Solução de Cloreto de Cálcio	16
Solução de Sulfato de Magnésio	4
Solução de Cloreto de Potássio	4
Solução de Bicarbonato de Sódio	4

**Fonte:** Adaptado de NBR 12.713(ABNT, 2016)