



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

**JULIA MARIA SCHNEIDER**

**NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBALTO: SÍNTESE,  
CARACTERIZAÇÃO E TOXICIDADE PARA A MICROALGA *Desmodesmus  
subspicatus***  
**UM ESTUDO PRELIMINAR**

**ERECHIM - RS**

**2021**

**JULIA MARIA SCHNEIDER**

**NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBALTO: SÍNTESE,  
CARACTERIZAÇÃO E TOXICIDADE PARA A MICROALGA *Desmodesmus  
subspicatus*  
UM ESTUDO PRELIMINAR**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à  
Universidade Federal da Fronteira Sul – UFFS –  
Campus 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

2021

## **Bibliotecas da Universidade Federal da Fronteira Sul - UFFS**

Schneider, Julia Maria

NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBALTO: SÍNTESE,  
CARACTERIZAÇÃO E TOXICIDADE PARA A MICROALGA *Desmodesmus*  
*subspicatus* UM ESTUDO PRELIMINAR / Julia Maria  
Schneider. -- 2021.

46 f.:il.

Orientadora: Profa. Dra. Cristiane Funghetto  
Fuzinato

Co-orientadora: Profa. Dra. Helen Treichel  
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) -  
Universidade Federal da Fronteira Sul, Curso de  
Bacharelado em Engenharia Ambiental e Sanitária,  
Erechim, RS, 2021.

1. Nanotoxicologia, Óxido de Cobalto, *Desmodesmus*  
*subspicatus*, Microalga.. I. Fuzinato, Cristiane  
Funghetto, orient. II. Treichel, Helen, co-orient. III.  
Universidade Federal da Fronteira Sul. IV. Título.

**JULIA MARIA SCHNEIDER**

**NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE COBALTO: SÍNTESE,  
CARACTERIZAÇÃO E TOXICIDADE PARA A MICROALGA *Desmodesmus  
subspicatus***

**UM ESTUDO PRELIMINAR**

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. Dr. Paulo Afonso Hartmann  
UFFS – Erechim/RS

---

Prof. Dr. Rodrigo Costa Puerari  
UFSC – Florianópolis/SC

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a meus pais Deomar e Carmelita, e também ao meu irmão Evandro por sempre me incentivarem a seguir o caminho do conhecimento, sem medir esforços para que este dia pudesse se tornar realidade, por estarem sempre ao meu lado, sem vocês nada disso seria possível, todas as minhas conquistas serão sempre dedicadas à vocês, serei eternamente grata, todo o meu amor por vocês!

Ao meu namorado Carlos Alexandre Rech por estar ao meu lado em todos esses anos, nos momentos de alegria e nos momentos mais difíceis, por ser sempre tão paciente, prestativo, compreensivo e amoroso.

Agradeço ao meu irmão, ao meu namorado e a minha cunhada Caroline pelas inúmeras caronas para à Universidade para que pudesse realizar esse trabalho.

Às minhas queridas amigas de infância Pâmela Chiarello e Renata Vechiatto por me darem forças e por estarem sempre ao meu lado, nos momentos bons e nos nem tão bons assim, aos amigos que fiz durante a graduação e à equipe de pesquisa do Laboratório de Qualidade da Água, em especial Caroline Delazeri Bettio e Karine da Silva de Andrade pela ajuda na realização deste trabalho e pela amizade.

À minha querida orientadora Professora Dra. Cristiane Funghetto Fuzinato, sempre muito atenciosa, pela paciência e pela amizade, por todo apoio e suporte, por ter confiado em mim, no meu trabalho, serei sempre muito grata.

À banca examinadora pela disposição em fazer parte deste momento tão importante da minha formação.

Aos docentes do curso de Engenharia Ambiental e Sanitária pelos conhecimentos transmitidos. Aos funcionários e técnicos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, em especial Suzana Bazoti pelo auxílio nas atividades de laboratório durante a realização dos testes.

À Universidade Federal da Fronteira Sul pela infraestrutura, por ter me recebido e me proporcionado tantas experiências.

## RESUMO

Nas últimas décadas o interesse relacionado ao desenvolvimento da nanotecnologia aumentou, em grande parte pelas vantagens que as nanopartículas (NPs) apresentam devido às suas propriedades exclusivas de tamanho reduzido e grande área superficial. Dentre as nanopartículas se destacam as de Óxido de Cobalto (CoO) que são utilizadas principalmente em biosensores na medicina, contrastes para ressonância magnética, revestimentos, plásticos, fios e fibras. As inúmeras aplicações cotidianas de NPs de CoO, acabam por possibilitar a liberação destes materiais no meio ambiente de forma inadequada. Para avaliação dos possíveis efeitos destes materiais no meio ambiente, faz-se uso de testes toxicológicos onde expõe-se um organismo teste a diversas concentrações da substância de interesse. Logo o presente estudo avaliou a toxicidade crônica de nanopartículas de Óxido de Cobalto, utilizando a microalga de água doce *Desmodesmus subspicatus* como organismo teste. As nanopartículas foram sintetizadas em suspensões e posteriormente caracterizadas, para confirmar suas características, os métodos utilizados na caracterização foram a Microscopia Eletrônica de Transmissão e obteve-se o diâmetro de 3 nm, com desvio padrão de 0,70 e IC95% de 0,14, a Medida de Espalhamento da Luz Dinâmico informou um diâmetro hidrodinâmico de 30 nm e o potencial zeta confirmou a instabilidade da nanopartícula, a partir do diâmetro obtido calculou-se a área superficial de 224,7 m<sup>2</sup>/g. Observou-se que as nanopartículas formam aglomerados, este estado da NP pode ser associado a grande área superficial e as suas propriedades físicas. Os testes de toxicidade crônica foram desenvolvidos com a suspensão de CoONP e obteve-se uma CE<sub>50, 72h</sub> de 0,7964 mg.L<sup>-1</sup>. Com os testes realizados obtiveram-se dados que auxiliaram na compreensão dos efeitos das nanopartículas de Óxido de Cobalto no organismo de ambiente aquático natural, a microalga *Desmodesmus subspicatus*, evidenciando a toxicidade e destacando a importância de estudos que investiguem os efeitos adversos de substâncias químicas nos ambientes naturais.

**Palavras-chave:** Nanotoxicologia, Óxido de Cobalto, *Desmodesmus subspicatus*, Microalga.

## ABSTRACT

In the last décadas the interest related to the development of nanotechnology has increased, largely due to the advantages that nanoparticles (NPs) present due to their exclusive properties of small size and large surface area. Among the nanoparticles, Cobalt Oxide (CoO) stands out, which are mainly used in biosensors in medicine, contrasts for magnetic resonance, coatings, plastics, yarns and fibers. The countless daily applications of CoO NPs end up making it possible to release these materials in the environment inappropriately. To assess the possible effects of these materials on the environment, toxicological tests are used where a test organism is exposed to different concentrations of the substance of interest. Therefore, the present study evaluated the chronic toxicity of Cobalt Oxide nanoparticles, using the freshwater microalgae *Desmodesmus subspicatus* as a test organism. The nanoparticles were synthesized in suspensions and later characterized, to confirm their characteristics, the methods used in the characterization were Transmission Electron Microscopy and the diameter of 3 nm was obtained, with a standard deviation of 0.70 and 95% CI of 0.14 , the Dynamic Light Scattering Measure reported a hydrodynamic diameter of 30 nm and the zeta potential confirmed the instability of the nanoparticle, the surface area of 224.7 m<sup>2</sup> / g was calculated from the obtained diameter. It was observed that the nanoparticles form clusters, this state of the NP can be associated with a large surface area and its physical properties. The chronic toxicity tests were developed with the suspension of CoONP and an EC<sub>50</sub>, 72h of 0.7964 mg.L<sup>-1</sup> was obtained. With the tests carried out, data were obtained that helped to understand the effects of the Cobalt Oxide nanoparticles in the organism of a natural aquatic environment, the microalgae *Desmodesmus subspicatus*, showing the toxicity and highlighting the importance of studies that investigate the adverse effects of chemical substances in the natural environments.

Keywords: Nanotoxicology, Cobalt Oxide, *Desmodesmus subspicatus*, Microalgae.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microalga verde <i>Desmodesmus Subspicatus</i> . .....	20
Figura 2: Cultivo da microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i> em ambiente com variáveis controladas de temperatura e luminosidade.....	21
Figura 3: Representação da câmara de Neubauer.....	22
Figura 4: Método de contagem de células na câmara de Neubauer. ....	22
Figura 5: Erlenmeyers distribuídos aleatoriamente na mesa de agitação durante a execução de teste de toxicidade crônica com <i>D. subspicatus</i> .. .....	27
Figura 6: Imagem das NPs de CoO obtida através do MET. ....	28
Figura 7: Imagem das NPs de CoO obtida através do MET. ....	29
Figura 8: Imagem das NPs de CoO obtida através do MET. ....	29
Figura 9: Imagem do aglomerado de NPs de Óxido de Cobalto obtida através do MET. ....	30
Figura 10: Histograma apresentando o diâmetro médio das nanopartículas de Óxido de Cobalto. ....	31
Figura 11: Correlação entre o número de células da microalga <i>D. subspicatus</i> e a absorvância a 682 nm a partir de diluições em meio CHU da solução estoque do organismo teste .....	34

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Volumes necessários de soluções (dicromato de potássio, microalga e solução nutriente) para gerar 100 mL das concentrações utilizadas no teste de sensibilidade....	23
Tabela 2: Concentrações utilizadas para preparar as soluções teste.....	26
Tabela 3: Diâmetros hidrodinâmicos para três diferentes meios, e o índice de polidispersão para cada diâmetro. ....	32
Tabela 4: Potencial zeta da CoONP para três diferentes meios. ....	33
Tabela 5: Valores de absorvância a 682 nm e número de células contadas em microscópio ótico. ....	34
Tabela 6: Valores de $CE_{50, 72h}$ para sensibilidade da microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i> exposta a dicromato de potássio. ....	35
Tabela 7: Reagentes utilizados para o preparo das soluções constituintes do meio CHU. ....	44
Tabela 8: Volume necessário de cada solução para o preparo de 1 litro de meio CHU.	45
Tabela 9: Reagentes constituintes das soluções I, II e III que compõem a solução nutriente. ....	46
Tabela 10: Volume necessário de cada solução-estoque para o preparo de 1 litro de solução nutriente.....	46

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Objetivos gerais.....	13
2.2 Objetivos específicos.....	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 Nanotecnologia.....	14
3.2 Óxido de Cobalto.....	15
3.3 Testes toxicológicos.....	17
3.4 Nanotoxicologia.....	18
3.5 Microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	20
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Cultivo da microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	21
4.2 Teste de sensibilidade com a microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	23
4.4 Síntese das nanopartículas de Óxido de Cobalto.....	24
4.5 Caracterização das nanopartículas de Óxido de Cobalto.....	24
4.5.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	25
4.5.2 Medida de espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	25
4.5.3 Potencial Zeta.....	25
4.6 Teste de toxicidade crônica com a microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	28
5.1 Caracterização das nanopartículas de Óxido de Cobalto.....	28
5.1.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	28
5.1.2 Medida de espalhamento de luz dinâmico (DLS).....	31
5.1.3 Potencial Zeta.....	32
5.2 Contagem de células algáceas e leitura de absorbância.....	33
5.3 Teste de sensibilidade com a microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	35

5.4 Teste de toxicidade crônica com a microalga <i>Desmodesmus subspicatus</i> .....	35
6 CONCLUSÕES .....	37
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	39
ANEXO I.....	44
ANEXO II .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é um campo que avança em rápida expansão e atravessa as tradicionais fronteiras das ciências e engenharias e vem sendo considerada uma área promissora de pesquisas, dedicando-se ao estudo e desenvolvimento de materiais em escala nanométrica ( $10^{-9}$  m) (FARIAS, 2011).

Embora o interesse do homem pelo estudo e aplicação tecnológica de nanopartículas seja bastante recente, pode-se afirmar que a nanotecnologia está presente na natureza à bilhões de anos, desde quando átomos e moléculas começaram a formar estruturas mais complexas dando origem a vida (MELO & PIMENTA, 2004).

Os primeiros relatos do homem trabalhando com a nanotecnologia foram dos egípcios, que inventaram a tinta nanquim, uma mistura do negro do fumo (fuligem), com dimensões nanométricas, com goma arábica e água (MCTI, 2019).

No entanto, a primeira utilização do termo nanotecnologia surge apenas numa conferência de engenharia em 1974, onde Norio Taniguchi, professor da Tokyo University of Science, descreveu o seu trabalho de investigação em semicondutores pelo uso de técnicas de deposição de filme e feixes de energia de elevada precisão, com controle nanométrico das dimensões (MARQUES, 2014).

Os principais tipos de nanopartículas atualmente utilizadas são os nanotubos de carbono e os óxidos de metais. Existem no mercado inúmeras nanopartículas metálicas, dentre elas as nanopartículas de Óxido de Cobalto que são utilizadas principalmente em biosensores na medicina, contrastes para ressonância magnética, revestimentos, plásticos, fios e fibras. A sua constante utilização pode acabar potencializando sua presença no meio ambiente (FRANCISCO, 2006).

Uma preocupação com relação às nanopartículas reside principalmente no fato delas estarem sendo produzidas e utilizadas em produtos comerciais em larga escala. Logo, o risco de alcançarem os diferentes compartimentos ambientais e se tornarem disponíveis é muito grande. Além disso, muitos sistemas nanoparticulados que estão atualmente em uso são produzidos com metais de transição, silício, carbono e óxidos metálicos, podendo ser altamente tóxicos (DREHER, 2004).

A partir da preocupação sobre os prováveis danos que as nanopartículas podem causar no meio ambiente, surge a nanotoxicologia, que avalia a gravidade dos efeitos causados pelos nanomateriais em organismos vivos (NEL, A. *et al*, 2006).

A nanotoxicologia avalia através de análises de caráter toxicológico que têm a finalidade de saber se, e em qual grandeza, as substâncias químicas, tanto isoladamente quanto na forma de misturas, são nocivas, e a causa e o local onde se manifestam seus efeitos (KNIE & LOPES, 2004).

Um organismo muito utilizado na realização dos testes ecotoxicológicos são as algas por serem elementos fundamentais que compõem a cadeia trófica dos ecossistemas aquáticos. Por esse motivo, são consideradas adequadas para avaliar a qualidade hídrica e de efluentes, assim como a periculosidade de substâncias químicas, baseando-se na observação dos efeitos desses meios sobre o desenvolvimento da biomassa algal (KNIE & LOPES, 2004).

Não há dúvida de que a nanotecnologia oferece a perspectiva de grandes avanços que permitam melhorar a qualidade de vida e ajudar a preservar o meio ambiente. Entretanto, como qualquer área da tecnologia que faz uso intensivo de novos materiais e substâncias químicas, ela traz consigo alguns riscos ao meio ambiente e à saúde humana (QUINA, 2004)

Tendo em vista estes riscos verifica-se a importância de investigar sobre a disponibilidade, degradabilidade, reatividade e toxicidade dos nanocompostos. Os efeitos nocivos que podem resultar da produção, transporte e utilização desses materiais nanoestruturados constituem a justificativa da preocupação e dos estudos voltados à área da nanotecnologia (PASCHOALINO, MARONE E JARDIM, 2010).

Esta pesquisa surge como uma maneira de preencher lacunas a respeito de informações científicas relacionadas a toxicidade de suspensões de nanopartículas de Óxido de Cobalto a organismos aquáticos, neste caso em especial a microalga *Desmodesmus subspicatus*.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivos gerais**

Avaliar a toxicidade de suspensões de nanopartículas de Óxido de Cobalto para a microalga *Desmodesmus subspicatus*.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Realizar a síntese de nanopartículas de Óxido de Cobalto;
- Caracterizar as suspensões de nanopartículas de óxido de cobalto para confirmação de morfologia (cristalinidade e área superficial), tamanho, dispersão;
- Determinar os efeitos de toxicidade crônica para a microalga *D.subspicatus* após exposição às nanopartículas metálicas de Óxido de Cobalto;

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Nanotecnologia

O termo “nanotecnologia” foi criado e definido pela Universidade Científica de Tóquio no ano de 1974 e é a ciência que estuda e manipula a construção de materiais, substâncias, dispositivos ou objetos em escala nanométrica (1 nanômetro =  $10^{-9}$  do metro). A nanotecnologia está presente desde componentes eletrônicos até aparelhos utilizados na medicina e cosméticos como por exemplo os protetores solar (ABDI, 2011).

Ainda segundo a Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial (2011), desde o ano de 2000 o governo brasileiro vem empregando esforços no desenvolvimento de nanotecnologias, entre 2000 e 2007 investiu por meio de suas universidades e centros de pesquisa R\$ 160 milhões na pesquisa da nanotecnologia, somando os investimentos do setor privado, estima-se um total de R\$ 320 milhões no período.

No meio ambiente, a nanotecnologia pode oferecer várias aplicações, mas as principais são relacionadas à medidas mitigadoras. As três principais áreas das quais podemos esperar grandes benefícios são: na prevenção da poluição ou dos danos indiretos ao meio ambiente, no tratamento ou remediação da poluição e na detecção e monitoramento da poluição (QUINA, 2004).

Quanto as questões ambientais, a nanotecnologia é apresentada como uma ferramenta capaz de fornecer novas soluções tecnológicas para diversos problemas ambientais incluindo as alterações no clima, na qualidade do ar e da água (AZOULAY *et al*, 2009).

Contudo, além de uma enorme expectativa em relação à tudo que poderá ser desenvolvido através da nanotecnologia, a questão que se coloca é: qual o impacto destes novos materiais sobre a saúde humana e o meio ambiente? Alguns estudiosos do assunto e pesquisadores acreditam que “essa nova indústria somente poderá se desenvolver de forma dinâmica se tais preocupações forem satisfatoriamente mitigadas” (ABDI, 2011).

Segundo Quina (2004), as mesmas características que tornam as nanopartículas interessantes do ponto de vista tecnológico, podem ser indesejáveis quando essas são liberadas ao meio ambiente. O pequeno tamanho das nanopartículas facilita sua difusão e transporte na atmosfera, em águas e em solos, ao passo que dificulta sua remoção por técnicas usuais de filtração. De modo geral, sabe-se muito pouco ou nada sobre a biodisponibilidade, biodegradabilidade e toxicidade dos nanomateriais. A contaminação do meio ambiente por nanomateriais com grande área superficial, boa resistência

mecânica e atividade catalítica pode resultar na concentração de compostos tóxicos na superfície das nanopartículas, com posterior transporte no meio ambiente ou acúmulo ao longo da cadeia alimentar.

Com o grande número de pesquisas e trabalhos que vem sendo realizados na área da nanotecnologia e nanomateriais, faz-se necessário um levantamento sobre a segurança e toxicidade destes produtos e procedimentos (JAIN, 2005), visto que à medida que a nanotecnologia avança, toda a sociedade passa a se envolver com este assunto, seja direta ou indiretamente, especialmente na medida em que novos produtos contendo materiais nanoestruturados chegam ao mercado consumidor. Portanto, a possibilidade de ganho econômico jamais pode servir de argumento para justificar a degradação do meio ambiente e o comprometimento da qualidade de vida das gerações presentes e futuras (SILVA, 2008).

### **3.2 Óxido de Cobalto**

O cobalto é um metal de cor cinza brilhante, dúctil, um tanto maleável, estável ao ar e a água em temperatura ambiente. Apresenta propriedades semelhantes às do níquel. Ele é um metal de transição e pertence ao grupo 9 da tabela periódica. Ocorre em minerais como a cobaltita e, mais frequentemente, está associado a minérios de níquel, prata, chumbo, cobre e ferro, dos quais é obtido como subproduto. Sua presença também é detectada em meteoritos (UNESP, 2010).

O cobalto é um elemento químico que além de ser essencial, está presente na vitamina B12 e tem sua principal utilização na indústria metalúrgica para produção de aços com características especiais de dureza e resistência. Na forma de óxidos é utilizado como catalisador na indústria química e de óleos. Na forma de sais, uma das utilizações é na indústria de cerâmica, como pigmento (RBCF, 2003).

Segundo Francisco (2006) o cobalto é utilizado também em superligas usadas em turbinas de gás de aviões, ligas resistentes a corrosão, aços rápidos, ferramentas de diamante, ímãs e em cintas magnéticas, catálise do petróleo e indústria química, revestimentos metálicos por eletrodeposição devido ao seu aspecto, dureza e resistência a corrosão, secante para pinturas: tintas e vernizes, revestimento base de esmaltes vitrificados, pigmentos: cobalto azul e cobalto verde, eletrodos de baterias elétricas, cabos de aço de pneumáticos, fontes de radiação gama em radioterapia, esterilização de alimentos (pasteurização fria) e radiografia industrial para o controle de qualidade de metais (detecção de fendas).

Os óxidos metálicos constituem uma diversificada classe de materiais, cujas propriedades variam de metais semicondutores e isolantes. As superfícies da maioria dos óxidos metálicos desempenham papéis fundamentais em uma enorme variedade de fenômenos. A degradação das superfícies de supercondutores de “alta temperatura” devido a interação com o meio ambiente, a passivação de superfícies metálicas para reduzir a corrosão, o bom desempenho de catalisadores na oxidação parcial de hidrocarbonetos e a fabricação de sensores de gases para o controle de poluição são alguns exemplos de processos que são extremamente dependentes das propriedades das superfícies de óxidos metálicos ou das interfaces entre os óxidos metálicos e outros materiais (SOARES, 2002).

Nas últimas décadas muitas pesquisas realizadas na área da nanotecnologia foram voltadas para os óxidos de ferro. Entretanto, mais recentemente, algumas pesquisas têm colocado ênfase sobre as nanoestruturas compostas por outros metais de transição, como o cobalto (HYEON, 2002).

Ainda segundo Hyeon (2002), metais de transição possuem várias propriedades que são mais ideais do que àquelas observadas para os óxidos de ferro. Metais de transição magnéticos nanoestruturados exibem comportamento ferromagnético, enquanto que àqueles de ferro exibem comportamento superparamagnético. As estruturas ferromagnéticas produzem um momento magnético maior do que as estruturas superparamagnéticas. Também, os metais de transição retêm suas propriedades magnéticas na ausência de um campo magnético, enquanto que as nanoestruturas de óxido de ferro não retêm. Nanoestruturas de óxido de ferro apresentam uma definição magnética pobre e de difícil controle das propriedades magnéticas. Muitas complicações são encontradas em seus procedimentos de síntese, entre elas: uma mistura de muitas fases de óxidos de ferro, baixa cristalinidade e grande dispersão no tamanho das partículas.

O óxido de cobalto (CoO), bem como outras nanopartículas que possuam cobalto em sua composição, têm despertado interesse devido à sua notável dependência entre forma e tamanho no que remete às suas propriedades (BHATT, 2001). O cobalto é muito conhecido por apresentar duas estruturas cristalinas: hcp e hcc. Embora estas duas fases possam coexistir à temperatura ambiente, a estrutura hcc é termodinamicamente privilegiada acima de 450°C e a fase hcp é favorecida a baixas temperaturas, com o desenvolvimento da nanotecnologia, alguns autores reportaram que o cobalto apresenta uma terceira forma cristalina, a forma E, cuja obtenção está diretamente associada a metodologias de sínteses de nanoestruturas (HYEON, 2002).

### 3.3 Testes toxicológicos

Dentro das análises biológicas destacam-se a microbiologia, a limnologia, a ecotoxicologia e a toxicologia ambiental, que revela, através dos bioensaios, efeitos agudos ou crônicos produzidos por substâncias químicas (MENDONÇA, 2005).

Os ensaios toxicológicos desenvolvidos atualmente são destinados a pesquisar se um produto manifesta ou não efeitos tóxicos ou nocivos e qual é a natureza destes efeitos e seu grau de toxicidade (MATIAS, 2005). Para Knie & Lopes (2004), os testes ecotoxicológicos podem ser utilizados para diversas áreas, entre elas licenciamento de produtos químicos, inspeção de efluentes, monitoramento de qualidade de águas, entre outros abrangendo o estudo quantitativo e qualitativo dos efeitos tóxicos.

Apesar de ser errôneo é bastante comum os termos toxicologia e ecotoxicologia serem utilizados como sinônimos, visto que a ecotoxicologia é uma extensão da toxicologia ambiental. Segundo Matias (2009), é possível um fator ambiental exercer efeitos graves sobre organismos individuais e não representar impactos sobre populações e ecossistemas.

Nos ensaios de ecotoxicidade uma quantidade conhecida de organismos é submetida ao agente estressante por períodos conhecidos de tempo e então, tem seus efeitos avaliados quanto à sobrevivência ou mortalidade dos organismos, bem como efeitos comportamentais, morfológicos e fisiológicos. Tais testes permitem a determinação do tempo e das concentrações necessárias para que o agente tóxico possa causar efeitos adversos perceptíveis (BRENTANO, 2006).

KNIE & LOPES (2004), apresenta alguns critérios para a escolha adequada dos organismos para os testes ecotoxicológicos:

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

De modo geral, os testes toxicológicos ou ecotoxicológicos normalmente são aplicados em organismos aquáticos, pois os ecossistemas aquáticos representam os receptáculos finais de qualquer poluição causada, sendo ela aquática, atmosférica ou nos solos (MATIAS, 2009).

Nos testes toxicológicos são normalmente realizados em laboratórios, expondo estes organismos aquáticos a várias concentrações de determinado agente químico ou a várias diferentes diluições do agente teste, durante períodos de tempo pré-determinados (MENDONÇA, 2005).

No Brasil os testes de toxicidade foram padronizados pela Associação de Normas Técnicas (ABNT), em nível internacional os testes de toxicidade foram padronizados pela American Society for Testing and Materials - ASTM (Estados Unidos); Association Française de Normalisation - AFNOR (França); American Water Work Association - AWWA (Estados Unidos); International Organization for Standardization - ISO (Estados Unidos); Organization for Economic Co-Operation and Development - OECD (Estados Unidos); Deutsches Institut für Normung - DIN (Alemanha) (KNIE & LOPES, 2004).

No Brasil o CONAMA, Conselho Nacional do Meio Ambiente, é o órgão responsável pela definição de normas e padrões para controle da qualidade do ambiente. Em 2011, o CONAMA nº 430 veio para substituir e alterar os artigos das resoluções CONAMA nº357/2005 e 396/2008, no âmbito de lançamentos de efluentes em corpos hídricos, além de estabelecer critérios de ecotoxicidade (CONAMA, 2011).

### **3.4 Nanotoxicologia**

A nanotoxicologia emerge como uma nova divisão dentro das ciências toxicológicas, tendo como objeto de estudo os nanomateriais (OBERDORSTER, 2005). A preocupação com a nanotoxicidade surge na medida em que diversificados nanomateriais são sintetizados, manipulados e descartados em diferentes ambientes, sejam naturais, urbanos ou industriais, sem o devido controle e regulamentação (NEL, A. *et al*, 2006).

Os primeiros estudos sobre a toxicidade de nanopartículas aconteceram na última década do século XX, observando-se que materiais em escala micrométrica não apresentavam toxicidade, enquanto os que possuíam escala nanométrica apresentavam algum efeito tóxico (PASCHOALINO, MARONE E JARDIM, 2010).

Esse ramo de estudo da toxicologia busca compreender como os nanomateriais artificiais interagem com sistemas vivos, para que seja possível o desenvolvimento de modelos para quantificar a exposição do ser humano aos nanomateriais e avaliar os seus impactos na saúde e ao meio ambiente (SBTOX, 2017).

O centro desse problema reside na natureza físico-química dos agentes estudados, pois, a toxicologia clássica está envolvida com o estudo de tóxicos que

são moleculares enquanto que em nanotoxicologia são estudados toxicantes que são partículas. Esta dualidade na natureza dos toxicantes estudados (moléculas versus partículas) impõe sérias implicações durante a avaliação da toxicidade (BARROS E DAVINO, 2008). Além das propriedades físico-químicas do nanomaterial avaliado, deve-se considerar também: a magnitude, duração e frequência da exposição, a suscetibilidade dos organismos e as vias de introdução e contato com os biosistemas, sendo esta última diretamente ligada com a manifestação da nanotoxicidade (SHARIFI, S. *et al*, 2012).

Contudo, hoje não existe no Brasil legislação específica, aprovada e em vigor, que oriente o uso da nanotecnologia pelas empresas. O que existe de mais concreto são três projetos de lei que abordam a regulação estatal, estando dois deles arquivados junto à Câmara dos Deputados e um deles em tramitação junto ao Senado. Um dos projetos arquivados é o Projeto de Lei nº 5.133/2013, que define o conceito de nanotecnologia e tem como uma de suas metas instituir a obrigatoriedade de inserir no rótulo de todos os produtos à base de nanotecnologias informações ao consumidor sobre a tecnologia usada (BRASIL, 2016).

O Projeto de Lei nº 6.741/2013, que também se encontra arquivado, "dispõe sobre a Política Nacional de Nanotecnologia, o incentivo à pesquisa, o desenvolvimento tecnológico e o controle pelo Poder Público dos riscos e impactos decorrentes das atividades de nanotecnologia". Ambos os projetos são de autoria do Deputado Sarney Filho. Ambos os Projetos de Lei provocaram resistência de diversos setores envolvidos, principalmente pelas empresas produtoras, que seriam obrigadas a disponibilizar informações (BRASIL, 2016).

E por fim o projeto que está tramitando no Senado é o Projeto de Lei nº 880/2019 que tem como objetivo instituir o Marco Legal da Nanotecnologia e Materiais avançados no Brasil e trata de estímulos ao desenvolvimento científico, à pesquisa, à capacitação científica e tecnológica e à inovação nanotecnológica. O texto sugere que insumos manufaturados brasileiros que utilizam nanotecnologia ou novos materiais tenham preferência em concorrências públicas e também assegura que haja uma política nacional à Iniciativa Brasileira de Nanotecnologia, cujo intuito é integrar e fortalecer ações governamentais que promovam o desenvolvimento científico e tecnológico da nanotecnologia (NANOEACH,2020).

Enquanto estas leis não entram em vigor uma solução encontrada no Brasil foi a instituição do Comitê Interno de Nanotecnologia na Anvisa em 21 de agosto de 2014, que representou um importante passo na gestão dos riscos. A Anvisa quer que os produtos

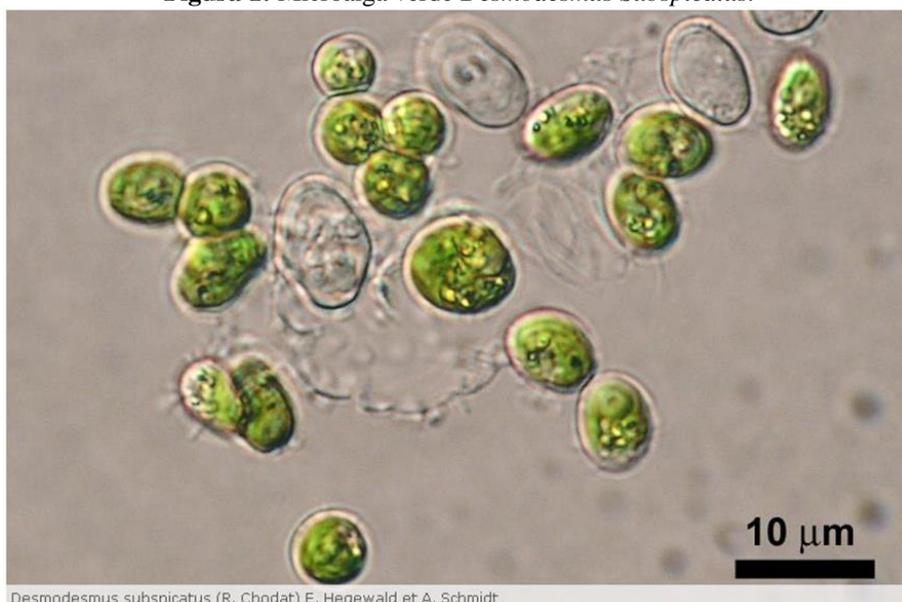
que possuem nanotecnologia passem a informar de forma clara, no momento do registro, se utilizam esta tecnologia. Este pode ser o primeiro passo para que a Anvisa avalie o cenário da nova tecnologia no país e discuta como este produto deve ser acompanhado (ANVISA, 2014).

### 3.5 Microalga *Desmodesmus subspicatus*

A alga verde planctônica *Desmodesmus subspicatus* (Figura 1) é a representante dos produtores primários nos ecossistemas de água doce. As algas são a base do ciclo de vida na água e servem de alimento para outros organismos. Participam dos ciclos biogeoquímicos, especialmente do carbono, do oxigênio, nitrogênio, fósforo e silício, por esse motivo destacam-se na manutenção do equilíbrio do ambiente aquático. No cultivo em laboratório as microalgas apresentam-se normalmente de forma unicelular, enquanto na natureza formam agregados de até 5 ou 6 células (KNIE & LOPES, 2004).

Pesquisas com algas já acontecem há muito tempo devido a sua importância trófica nos ecossistemas aquáticos, como indicador da poluição aquática são utilizadas a aproximadamente 100 anos. Geralmente as análises com algas para avaliação da qualidade hídrica e de efluentes e da periculosidade de substâncias químicas se baseiam na observação dos efeitos desses meios sobre o desenvolvimento da biomassa algal (KNIE & LOPES, 2004).

**Figura 1:** Microalga verde *Desmodesmus Subspicatus*.



Fonte: CCALA, 2017.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos foram realizados no Laboratório de Qualidade da Água e em demais laboratórios que envolvem o Curso de Engenharia Ambiental e Sanitária da Universidade Federal da Fronteira Sul (UFFS) – *Campus Erechim/RS* e no Laboratório de Microscopia Central da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

### 4.1 Cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus*

O cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus* foi mantido no laboratório de Qualidade da Água de acordo com a NBR 12648:2018 (ABNT). O cultivo foi mantido em meio de cultura CHU (ANEXO I) em ambiente com temperatura controlada de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$  como especificado na norma e com aeração e iluminação constante, como pode ser observado na Figura 2.

**Figura 2:** Cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus* em ambiente com variáveis controladas de temperatura e luminosidade.



**Fonte:** A autora, 2021.

O meio de cultura CHU foi preparado e autoclavado à  $121^{\circ}\text{C}$  por 20 minutos em erlenmeyer de 1000 mL. A manipulação do CHU e a inoculação das algas foram feitas em câmara de fluxo laminar para evitar contaminação.

A contagem de células foi realizada à partir da metodologia descrita pelo Laboratório de Virologia (Labvir) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, 2021).

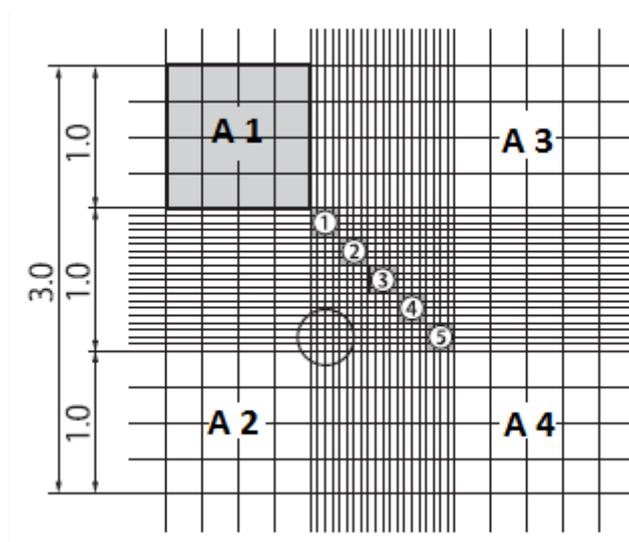
Foi preparada uma sequência de diluições para se obter uma concentração adequada de células (se a concentração for muito alta as células se sobrepõem e dificultam a contagem), e então foi pipetado uma alíquota de 0,1 mL de cada diluição e adicionado

cuidadosamente entre a câmara de Neubauer e a lâmina, preenchendo-a completamente por capilaridade, para assim realizar a contagem das células presentes em cada diluição. A Figura 3 representa a câmara de Neubauer.

A contagem é realizada apenas nos quadrantes A1, A2, A3 e A4, essa contagem segue em sentido ziguezague da esquerda para a direita, de cima para baixo, as células que se encontram sobre as linhas não são contadas, para evitar que sejam contadas mais de uma vez, a Figura 4 apresenta o método de contagem das células.

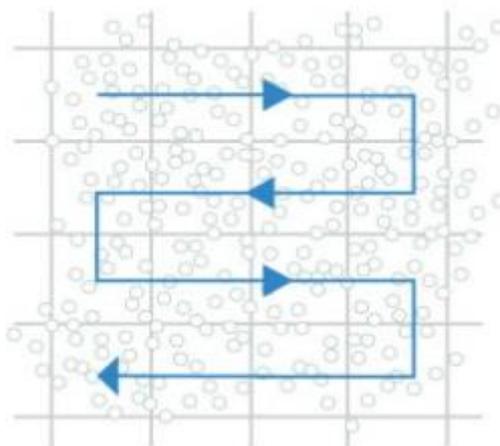
Após a contagem na câmara de Neubauer as diluições foram submetidas a leitura de absorvância no espectrofotômetro (Marca: Nova instruments NI 1600UV, UV – VIS 190-1100nm), em um comprimento de onda de 682nm.

**Figura 3:** Representação da câmara de Neubauer.



Fonte: KASVI, 2017.

**Figura 4:** Método de contagem de células na câmara de Neubauer.



Fonte: KASVI, 2017.

#### 4.2 Teste de sensibilidade com a microalga *Desmodesmus subspicatus*

O teste de sensibilidade demonstra a estabilidade e a saúde dos lotes, bem como a viabilidade na utilização da alga em testes ecotoxicológicos.

Os testes de sensibilidade foram feitos, também, de acordo com a ABNT NBR 12.648:2018, expondo a microalga, *D. subspicatus*, a uma substância de referência: o Dicromato de potássio ( $K_2Cr_2O_7$ ). Para a realização do teste foram preparadas 3 soluções, conforme o Anexo II, que resultaram em 1 litro de solução nutriente.

Todos os ensaios foram feitos em duplicata, nas concentrações e volumes dispostos na Tabela 1, medindo-se o pH inicial do controle e a biomassa por espectrofotometria antes do início do teste.

**Tabela 1:** Volumes necessários de soluções (dicromato de potássio, microalga e solução nutriente) para gerar 100 mL das concentrações utilizadas no teste de sensibilidade.

Concentração (mg de $K_2Cr_2O_7/L$ )	Volume dicromato de potássio (mL)	Volume de microalga (mL)	Volume de solução nutriente (mL)	Volume total (mL)*
Controle	-	10	10	100
0,1	1	10	10	100
0,3	3	10	10	100
0,5	5	10	10	100
0,7	7	10	10	100
0,9	9	10	10	100

**Fonte:** A autora, 2021.

\*O volume total deu-se pela adição de meio CHU na quantidade necessária para atingir os 100 mL.

Os erlenmeyers foram distribuídos aleatoriamente na mesa agitadora e trocados de lugar diariamente até o término do teste de sensibilidade, de forma a minimizar possíveis diferenças de iluminação. O teste ocorreu em temperatura controlada (23°C), agitação de 150 rpm e iluminação contínua por um tempo de 72 horas.

Ao fim das 72 horas, determinou-se a biomassa algácea por espectrofotometria para definir qual foi o aumento na densidade celular durante o período, bem como o pH do controle negativo.

A partir da curva de correlação, os valores de absorbância foram transformados em número de células e inseridos no *software* GraphPad Prism® 6.0, resultando em um valor de sensibilidade.

As concentrações escolhidas para realizar o teste de sensibilidade foram escolhidas a partir do valor de  $CE_{50,72h}$  (concentração capaz de causar 50% de inibição do crescimento algal) encontrado na literatura: 0,53 mg L<sup>-1</sup> (KNIE & LOPES, 2014).

#### 4.4 Síntese das nanopartículas de Óxido de Cobalto

As nanopartículas de Óxido de Cobalto foram sintetizadas adaptando o método de microemulsão onde 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 (Chen et al., 1995).

Para um volume de 100 mL foi pesado 1,0 g de PVA que foi solubilizado em 50 mL de água ultra pura com aquecimento de  $100^\circ\text{C}$  e agitação até completa solubilização.

Após solubilizado o polímero deve atingir a temperatura ambiente, para então ser adicionado a 30 mL de água ultra pura gelada contendo 0,03 g de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (mantido sob agitação).

O Cloreto de Cobalto utilizado foi da marca LANFAN 98 > MM 273,93 g/mol.

Foram pesados então 0,015 g de  $\text{NaBH}_4$  e essa massa foi diluída em 20 mL de água ultra pura gelada.

A água utilizada para solubilizar os reagentes foi FLUKA pureza > 99% S. Aldrich MM37,83 g/mol e deve estar abaixo de  $4^\circ\text{C}$ .

Esta solução de Borohidreto de Sódio foi colocada em uma bureta de 25 mL com gotejamento lento na solução anterior (PVA +  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), sob forte agitação formando então uma solução de cor preta. 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 Óxido de Cobalto ficou armazenada sob refrigeração a  $4^\circ\text{C}$ , com um período de validade de aproximadamente 30 dias. A suspensão de nanopartículas 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.

#### 4.5 Caracterização das nanopartículas de Óxido de Cobalto

As nanopartículas de Óxido de Cobalto foram caracterizadas em relação a sua área superficial, ao seu diâmetro médio e sua estabilidade em suspensão. Na caracterização das nanopartículas foram utilizados os métodos: 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).

#### **4.5.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)**

Para avaliar o tamanho da nanopartícula, a fim de analisar se a amostra utilizada está em nanoescala, foi empregado o método de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). Através das imagens obtidas pode-se observar a morfologia da nanoestrutura e se ocorre ou não a formação de aglomerados. Através do MET obteve-se o diâmetro médio da CoONP e assim tornou-se possível determinar a área superficial da NP.

Os diâmetros médios das NPs foram determinados a partir das imagens de um Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEM-1011 MET – 100kV), localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Para tal análise, as suspensões-teste foram gotejadas sobre uma grade de carbono-Cu (300 meshes) e contidas em um dessecador à vácuo por 24h para a secagem. O programa ImageJ® foi utilizado para determinar o diâmetro das NPs a partir da curva gaussiana gerada com a análise das imagens MET.

#### **4.5.2 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 (com a camada elétrica dipolar ao redor da partícula) e a distribuição do tamanho da nanopartícula.

O Potencial Zeta das CoONP foram determinados em água de osmose reversa (H<sub>2</sub>O OR), e também para os meios de teste (ISO) e cultivo (M4 e CHU) pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), em triplicata a 25 °C, com utilização do equipamento NanoBrook 90Plus Zeta, do Laboratório de Toxicologia Ambiental – LABTOX da UFSC. O pH também foi medido nos diferentes meios (Alfakit, AT-355). Nestas aferições, as soluções foram diluídas em proporção 1/10 (v/v).

#### **4.5.3 Potencial Zeta**

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

#### 4.6 Teste de toxicidade crônica com a microalga *Desmodesmus subspicatus*

O efeito avaliado no teste de toxicidade crônica para a microalga *Desmodesmus subspicatus* foi o crescimento algáceo, com um tempo de ensaio de 72 horas. O teste foi realizado com iluminação contínua e mantido sobre agitação constante a  $150 \pm 3$  rpm em mesa agitadora orbital “shaker”, em ambiente com temperatura controlada entre  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ .

A solução nutriente (ANEXO II) foi preparada a partir da solução estoque, utilizando 100 mL da solução 1, 10 mL da solução 2 e 10 mL da solução 3, para preparar 1 litro de solução teste. O pH do meio foi ajustado em  $8,0 \pm 0,5$ , o meio foi autoclavado em  $121^\circ\text{C}$  por 20 minutos e depois de frio, foram adicionados 3 g de bicarbonato de sódio por litro de solução. A cultura durante o teste deve alcançar a densidade de  $10^4$  células. $\text{mL}^{-1}$ .

O teste foi realizado apenas uma vez e foram utilizadas diferentes concentrações: [0,3; 0,5; 1; 2; 4; 5,5; 6; 6,5; 8; 10; 12]  $\text{mg.L}^{-1}$ . Essas concentrações foram escolhidas, baseadas nas concentrações utilizadas em ensaios de toxicidade de nanopartículas de Óxido de Cobalto com *Daphnia magna* em outros trabalhos realizados no laboratório de Qualidade da Água da Universidade Federal da Fronteira Sul, campus Erechim/RS.

A Tabela 2 apresenta a preparação das soluções teste com volume final de 50 mL, adaptada de KNIE & LOPES (2014).

**Tabela 2:** Concentrações utilizadas para preparar as soluções teste.

NPs (mL)	Água de diluição (mL)	Solução nutriente (mL)	Algas – $10^5$ cel/mL (mL)	Volume da solução teste (mL)
<b>CONTROLE</b>	30	10	10	50
<b>0,30</b>	29,7	10	10	50
<b>0,50</b>	29,5	10	10	50
<b>1,00</b>	29	10	10	50
<b>2,00</b>	28	10	10	50
<b>4,00</b>	26	10	10	50
<b>5,50</b>	24,5	10	10	50
<b>6,00</b>	24	10	10	50
<b>6,50</b>	23,5	10	10	50
<b>8,00</b>	22	10	10	50
<b>10,0</b>	20	10	10	50
<b>12,0</b>	18	10	10	50

**Fonte:** A autora, 2021.

\*A água de diluição utilizada foi água ultra pura.

Os erlenmeyers com as soluções foram bem vedados com parafilm e distribuídos de forma aleatória no shaker (Figura 5) para minimizar eventuais diferenças espaciais de luminosidade e temperatura e foram trocados de lugar ao menos 1 vez a cada 24 horas.

**Figura 5:** Erlenmeyers distribuídos aleatoriamente na mesa de agitação durante a execução de teste de toxicidade crônica com *D. subspicatus*.



**Fonte:** A autora, 2021.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 5.1 Caracterização das nanopartículas de Óxido de Cobalto

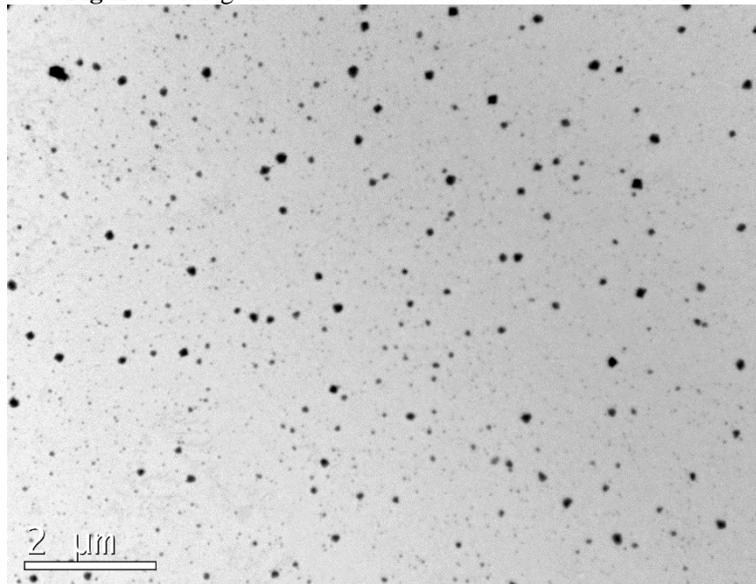
#### 5.1.1 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As Figuras 6, 7 e 8 apresentam imagens obtidas através do MET, onde é possível visualizar as nanopartículas de Óxido de Cobalto.

A Figura 9 apresenta imagens obtidas através do MET, onde é possível visualizar uma aglomeração das nanopartículas de Óxido de Cobalto. De acordo com Papis *et al.* (2009) as nanopartículas de CoO tendem a formar aglomerados de diversos tamanhos e formas em razão de suas propriedades magnéticas.

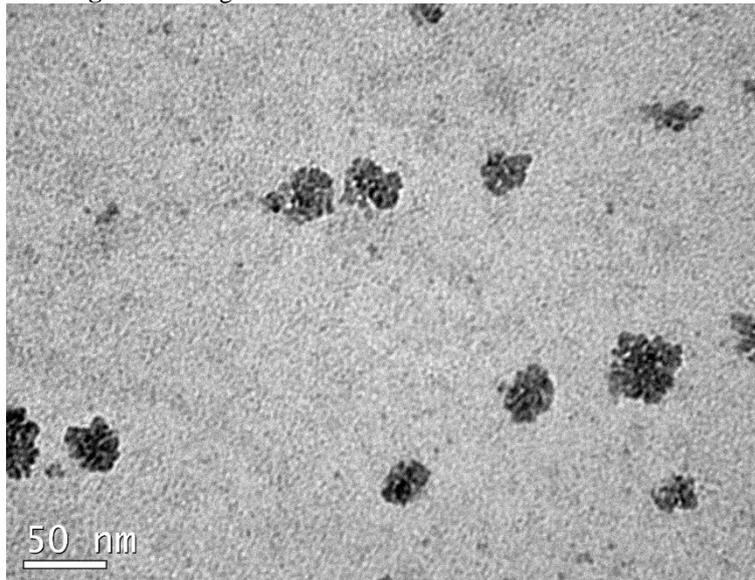
Segundo Sharan e Nara (2019), o comportamento de agrupamento das nanopartículas de Cobalto, parcialmente solúveis, pode influenciar na sua ecotoxicidade.

**Figura 6:** Imagem das NPs de CoO obtida através do MET.



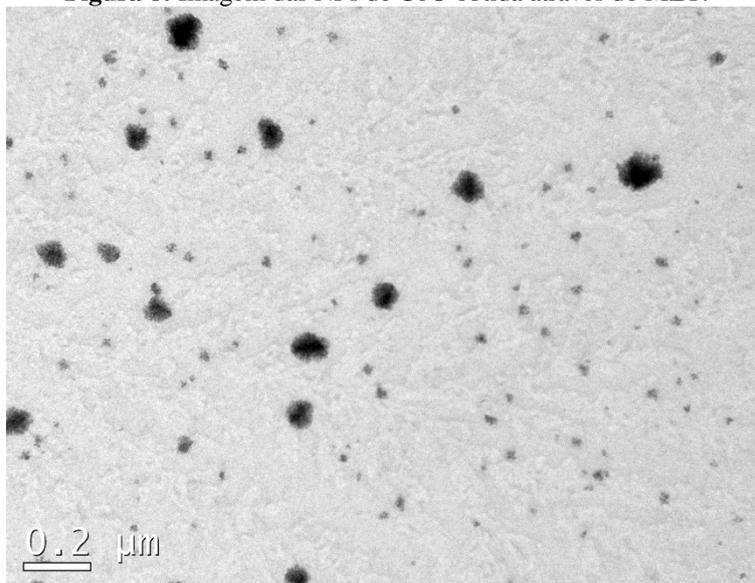
**Fonte:** Laboratório de Microscopia Central da UFSC.

**Figura 7:** Imagem das NPs de CoO obtida através do MET.



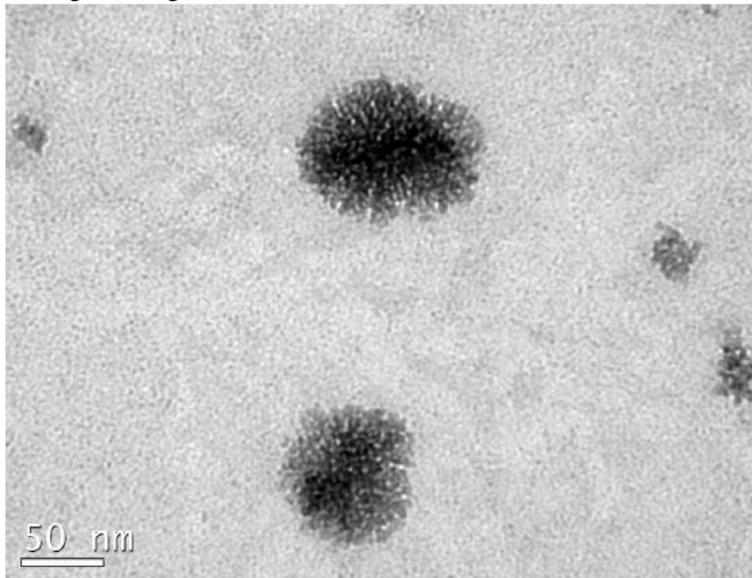
**Fonte:** Laboratório de Microscopia Central da UFSC.

**Figura 8:** Imagem das NPs de CoO obtida através do MET.



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

**Figura 9:** Imagem do aglomerado de NPs de Óxido de Cobalto obtida através do MET.

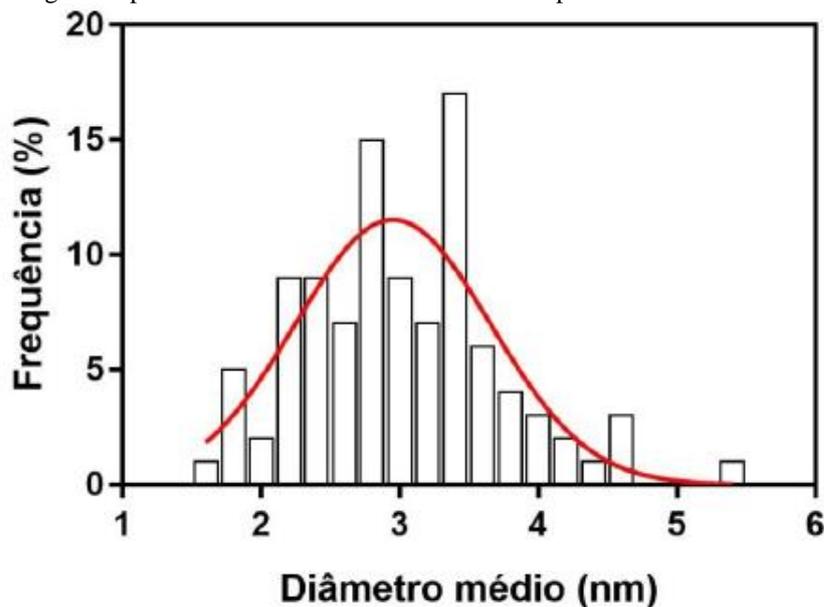


**Fonte:** Laboratório de Microscopia Central da UFSC.

A Figura 10 apresenta 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 nanopartícula de Óxido de Cobalto é de aproximadamente 3 nm, desvio padrão de 0,70 e Intervalo de Confiança (IC 95%) de 0,14, valor 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 nanopartículas de Óxido de Cobalto 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 também é semelhante ao encontrado por Cruz (2019), de 3,64 nm, em estudo realizado com nanopartículas de Cobalto.

**Figura 10:** Histograma apresentando o diâmetro médio das nanopartículas de Óxido de Cobalto.



**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).

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

Considerando o diâmetro (D) como 3 nm, e a densidade ( $\rho$ ) do Cobalto como 8,900 g/cm<sup>3</sup>, a área superficial da nanopartícula de Óxido de Cobalto é de 224,7 m<sup>2</sup>/g.

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

As nanopartículas de Óxido de Cobalto possuem diâmetro médio de 3 nm, porém 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. A Tabela 3 apresenta os diferentes valores de diâmetros das nanopartículas de cobalto na água ultra pura e nos meios ISO e M4.

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

Meio	Diâmetro (nm)	Média(nm)	Índice de polidispersão (IP)	Média do IP
<b>CoONP (água ultra pura)</b>	36,306	29,711	0,418	0,4205
	23,116		0,423	
<b>CoONP(ISO)</b>	31,570	30,185	0,480	0,535
	28,801		0,590	
<b>CoONP (M4)</b>	32,568	30,459	0,660	0,634
	28,350		0,609	
<b>CoONP (CHU)</b>	49,887	41,2275	0,451	0,524
	32,568		0,597	

Fonte: A Autora, 2021.

Os valores médios de diâmetro obtido pelo DLS são de aproximadamente 30 nm devido a aglomeração das NPs. 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 de diâmetro obtido pelo DLS são semelhantes aos observados por Muradov et al. (2018) para nanopartículas de Sulfeto de Cobalto, utilizando PVA como agente surfactante. 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.

Maleki, Hosseini e Taherizadeh (2018) obtiveram tamanho médio da nanopartícula de Ferrite de Cobalto sintetizada, de aproximadamente 30 nm. O mesmo resultado foi obtido por Chen et al. (2018) para CoNPs.

### 5.1.3 Potencial Zeta

O potencial Zeta é o parâmetro utilizado para determinar a carga superficial da nanopartícula de Óxido de Cobalto. 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. 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.

Os resultados alcançados para o potencial zeta em água ultra pura e nos meios ISO e CHU são apresentados na Tabela 4, e tem como unidade de medida para carga superficial milivolts (mV).

**Tabela 4:** Potencial zeta da CoONP para quatro diferentes meios.

<b>Meio</b>	<b>Potencial zeta (mV)</b>	<b>Média(mV)</b>	<b>pH</b>
<b>CoONP (água ultra pura)</b>	-2,93	-3,28	6,6
	-3,30		
	-3,62		
<b>CoONP(ISO)</b>	-14,79	-14,43	8,4
	-14,25		
	-14,24		
<b>CoONP (M4)</b>	-10,03	-11,18	7,8
	-11,67		
	-11,84		
<b>CoONP (CHU)</b>	-12,42	-12,34	7,2
	-12,03		
	-12,57		

**Fonte:** A Autora, 2021.

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.

Para Ates et al. (2016) em estudo realizado com CoONP o valor do 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.

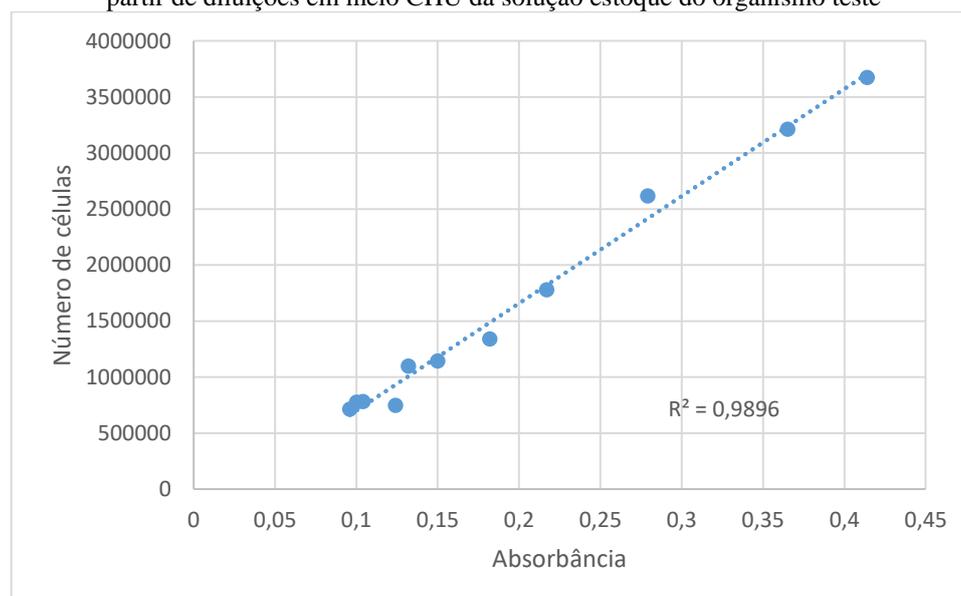
## **5.2 Contagem de células algáceas e leitura de absorbância**

Através das leituras de absorbância no espectrofotômetro e da contagem do número de células presentes nas suspensões algáceas pelo microscópio ótico (Tabela 5), gerou-se a curva de equivalência entre as variáveis (Figura 11).

**Tabela 5:** Valores de absorbância a 682 nm e número de células contadas em microscópio ótico.

ABSORBÂNCIA (682nm)	NÚMERO DE CÉLULAS (/mL)
0,414	3675000
0,365	3212500
0,279	2617500
0,217	1780000
0,182	1340000
0,150	1142500
0,132	1097500
0,124	747500
0,104	780000
0,100	775000
0,096	712500

**Fonte:** A autora, 2021.

**Figura 11:** Correlação entre o número de células da microalga *D. subspicatus* e a absorbância a 682 nm a partir de diluições em meio CHU da solução estoque do organismo teste

**Fonte:** A autora, 2021.

Observando a Figura 8, percebe-se um comportamento linear, sendo que o aumento do número de células significa também o aumento da absorbância. Com isso, obteve-se a equação da reta, bem como um coeficiente de correlação ( $R^2$ ) satisfatório.

### 5.3 Teste de sensibilidade com a microalga *Desmodesmus subspicatus*

A sensibilidade indica a estabilidade nos procedimentos de cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus*, garantindo a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados dos testes toxicológicos.

Os resultados obtidos indicaram que a concentração de efeito de dicromato de potássio capaz de causar 50% de inibição do crescimento algal ( $CE_{50, 72h}$ ) obtida foi de  $0,6465 \pm 0,6 \text{ mg.L}^{-1}$ , indicando que o dicromato de potássio mostrou-se tóxico para a microalga *Desmodesmus subspicatus*.

Comparando o valor encontrado durante os ensaios e o valor encontrado na literatura da  $CE_{50, 72h}$  para *Desmodesmus subspicatus* de  $0,53 \text{ mg.L}^{-1}$  (KNIE & LOPES, 2014), pode-se considerar os valores próximos, com um desvio padrão de  $0,077 \text{ mg.L}^{-1}$  e um coeficiente de variância menor de 15% indicando que os dados são homogêneos e isso demonstra a reprodutibilidade do ensaio.

Na Tabela 6 são apresentados os valores de  $CE_{50, 72h}$  e o Intervalo de Confiança (IC 95%) dos testes de sensibilidade realizados.

**Tabela 6:** Valores de  $CE_{50, 72h}$  para sensibilidade da microalga *Desmodesmus subspicatus* exposta a dicromato de potássio.

Número do teste	$CE_{50} \text{ (mg/L)}$	IC (95%)
1	0,8892	0,4764 - 1,660
2	0,5844	0,3479 - 0,9817
3	0,4658	0,2597 - 0,8355
<b><math>CE_{50, 72h}</math> média</b>	0,6465	-

Fonte: A autora, 2021.

### 5.4 Teste de toxicidade crônica com a microalga *Desmodesmus subspicatus*

Para os estudos avaliando a exposição crônica das nanopartículas de Óxido de Cobalto frente à microalga *Desmodesmus subspicatus*, utilizando os resultados obtidos nos ensaios, com o auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 6.0® e Microsoft Excel®, foi possível obter o valor de  $CE_{50, 72h}$  de  $0,7964 \text{ mg.L}^{-1}$ . O ensaio indicou que as nanopartículas de Óxido de Cobalto mostraram-se tóxicas para a microalga, porém não foram encontrados valores de  $CE_{50, 72h}$  para a microalga *Desmodesmus subspicatus* na literatura à fim de comparação.

Em trabalho realizado no grupo de pesquisa do Laboratório de Qualidade da Água da Universidade Federal da Fronteira Sul – Campus Erechim com a exposição aguda de

nanopartículas de Óxido de Cobalto para *Daphnia magna* a  $CE_{50, 48h}$  encontrada foi de 0,349 mg.L<sup>-1</sup>.

Sharan & Nara (2020) realizaram estudos de toxicidade das NPs de Óxidos de Cobalto com diâmetro hidrodinâmico médio de 400nm para a alga *Chlorella minutíssima* e obtiveram um  $CE_{50}$  de 38,16 mg.L<sup>-1</sup>.

Chen *et al* (2018) testou nanopartículas de Cobalto com tamanho médio de 30nm, potencial Zeta de -23,2mV em água mili-Q sobre as microalgas marinhas *Platymonas subcordiforus*, *Chaetoceros curvisetus* e *Skeletonema costatum* e obteve respectivamente os valores de  $EC_{50}$ : 67,2; 38,6 e 21,5 mg.L<sup>-1</sup>.

Rebello *et al* (2010) estudou diferentes concentrações de nanopartículas de Cobalto para as microalgas *Navicula* e *Chaetoceros spp.* e observou que 0,2 mg/mL das nanopartículas expostas por 5 dias diminuiu a densidade celular de ambas microalgas.

Kim *et al* (2006) estudou a toxicidade do Cobalto para a microalga verde de água doce *Chlorella vulgaris* e encontrou uma  $CE_{50}$  de 0,6 mg.L<sup>-1</sup>.

A classificação de NPs e seus sais solúveis para categorias de perigo segue a Diretiva da UE 93/67 / EEC (CEC 1996) e é baseada no mais baixo valor médio  $EC_{50}$  dos três principais organismos ambientais: algas, crustáceos e peixes: valores abaixo de 1 mg L<sup>-1</sup> = muito tóxico para organismos aquáticos; 1–10 mg L<sup>-1</sup> = tóxico para organismos aquáticos; 10–100 mg L<sup>-1</sup> = prejudicial aos organismos aquáticos; valores acima de 100 mg L<sup>-1</sup> = não classificado. Logo o valor obtido de  $CE_{50, 72h}$  (0,7964 mg.L<sup>-1</sup>) pode ser considerado muito tóxico (BONDARENKO *et al*, 2013).

O valor obtido de  $CE_{50, 72h}$  (0,7964 mg.L<sup>-1</sup>) não pode ser comparado com segurança, visto que não foi encontrado outro trabalho que utiliza-se o mesmo organismo teste e a mesma NP, com as mesmas propriedades físicas e com o mesmo método de síntese. A  $CE_{50, 72h}$  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.

## 6 CONCLUSÕES

Através deste trabalho, pode-se concluir que a microalga *Desmodesmus subspicatus* apresenta sensibilidade na exposição crônica à nanopartículas de Óxido de Cobalto em concentrações na ordem de miligramas por litro do contaminante, tornando possível o cálculo da  $CE_{50}$  e apresentou uma  $CE_{50, 72h}$  de  $0,7964 \text{ mg.L}^{-1}$ . Não foram encontrados para a *Desmodesmus subspicatus* valores de  $CE_{50}$ , destacando assim o pioneirismo do ensaio.

Com os ensaios realizados obtiveram-se dados que auxiliaram na compreensão dos efeitos das nanopartículas de Óxido de Cobalto nos organismos de ambientes aquáticos naturais, evidenciando a toxicidade significativa frente ao organismo-teste empregado e destacando a importância de estudos que investiguem os efeitos adversos de substâncias químicas nos ambientes naturais.

A Resolução CONAMA 357/2005 estabelece os padrões de qualidade da água para concentração total de Cobalto os limites máximos para água doce Classe I e Classe II como  $0,05 \text{ mg.L}^{-1}$  e  $0,2 \text{ mg.L}^{-1}$ , logo as nanopartículas de Óxido de Cobalto apresentam concentração maior do que a permitida, porém não podem ser consideradas não tóxicas ( $CE_{50, 72h} = 0,7964 \text{ mg.L}^{-1}$ ).

A Resolução CONSEMA 128/2006 estabelece os Padrões de Emissão de Efluentes Líquidos para fontes de emissão que lancem seus efluentes em águas superficiais no Estado do Rio Grande do Sul e coloca como limite máximo de Cobalto total  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  e as NPs de Óxido de Cobalto também ultrapassam o limite máximo estabelecido, porém não podem ser consideradas não tóxicas, pois em  $0,5 \text{ mg.L}^{-1}$  foram verificadas inatividades no crescimento algal e se exposto a essa concentração por um longo período de tempo a NP pode se tornar tóxica.

A toxicidade das nanopartículas de Óxido de Cobalto pode estar relacionada ao seu tamanho reduzido, visto que partículas na escala nano possuem facilidade para adentrar células de outros organismos.

Não existem, no Brasil, legislações específicas que estabeleçam limites de lançamento para nanopartículas de Óxido de Cobalto e nem para as demais nanopartículas.

Os resultados apresentados aqui podem ser considerados preliminares. O projeto

se encontrava em fase de adaptação de metodologias às condições e aos equipamentos de laboratório da UFFS e com a paralisação das atividades presenciais nos Campi da UFFS em 16/03/2020, devido a pandemia do Novo Coronavírus (COVID-19), o projeto de pesquisa precisou ser paralisado, principalmente pela falta de transporte à Universidade e, por isso, o projeto precisou ser retomado, o que levou algum tempo, logo foram realizadas poucas repetições dos testes de sensibilidade e apenas uma repetição do teste de toxicidade frente as nanopartículas de Óxido de Cobalto. Contudo esses resultados podem servir como norteadores para projetos futuros.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABNT. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648:2018 - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica: Método de ensaio com algas.** Rio de Janeiro, 2018.

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

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Agência avalia nanotecnologias para a saúde. 2014.** Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/>>. Acesso em: 24 abr. 2021.

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.

AZOULAY, D. et al. **Nanotechnology and the Environment: A Mismatch Between Claims and Reality.** Ipen International Pops Elimination Network's nanotechnology Working Group, Europa: p. 1-8, 20 jul. 2009.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S.C. **Avaliação da toxicidade.** In: Oga, S.;M.M.A. Carmago and J.A.O. Batistuzzo, Fundamentos de toxicologia. 2008, São Paulo, SP: Atheneu Editora.

BHATT, A.S; Bhat, D.K; Tai, C; Santosh, M.S. **Microwave-assisted synthesis and magnetic studies of cobalt oxide nanoparticles.** Materials Chemistry and Physics.2011, 125, 347-350.

BONDARENKO, O., JUGANSON, K., IVASK, A. *et al.* **Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review.** *Arch Toxicol* 87, 1181-1200 (2013). Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s00204-013-1079-4>>. Acesso em:26 mai 2021.

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

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

BRASIL. CÂMERA DOS DEPUTADOS. **PL 5133/2013: Projeto de Lei. 2013.** Disponível em: <<http://www.camara.gov.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=567257>> . Acesso em: 23 mar. 2021.

BRASIL. CÂMERA DOS DEPUTADOS. **PL 6741/2013: Projeto de Lei. 2013.** Disponível em: <<https://www.camara.leg.br/proposicoesWeb/fichadetramitacao?idProposicao=600333>>. Acesso em: 23 mar. 2021.

BRENTANO, D. M. **Desenvolvimento e Aplicação do teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*: Avaliação de Efluentes Tratados de um Aterro Sanitário.** 2006. 145 f. Dissertação (Pós-graduação) - Curso de Engenharia Ambiental, UFSC, Florianópolis - SC, 2006.

CCALA, Culture Collection of Autotrophic Organism, **R. Chodat E. Hegewald et A. Schmidt**, 2017. Disponível em: < <http://ccala.butbn.cas.cz/en/desmodesmus-subspicatus-r-chodat-e-hegewald-et-a-schmidt-0>>. Acesso em: 26 mar. 2021.

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 abr. 2021.

CONAMA - CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. **Dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes, complementa e altera a resolução nº 357, de 17 de março de 2005, do Conselho Nacional do Meio Ambiente – CONAMA**. Brasil, p. 9 mai. 2011.

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 abr. 2021.

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 abr. 2021.

DREHER, K. L.. **Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles**. Toxicological Sciences, 2004, 3:3-5.

FARIAS, E. M. **Nanotecnologia e meio ambiente: um levantamento sobre os riscos e benefícios dessa nova tecnologia em um contexto atual**. 30 f. TCC (graduação) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Estadual da Paraíba, João Pessoa, 2011.

FRANCISCO, B. B. A. **Fontes Alternativas para a Obtenção de Níquel, Cobalto e Cobre**. In: XIV JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – CETEM, 2006, Rio de Janeiro.

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

HYEON, Taeghwan. **Chemical synthesis of magnetic nanoparticles**. Chemical Communications, [s.l.], n. 8, p.927-934, 3 dez. 2002. Royal Society of Chemistry (RSC).

JAIN, K. K. **The Role of Nanobiotechnology in Drug Discovery**. DDT, v. 10, n. 21, november 2005.

KASVI. **Como é realizada a contagem de células?** 21 dez. 2017. Disponível em: < <https://kasvi.com.br/como-e-realizada-contagem-de-celulas/>>. Acesso em: 29 abr. 2021.

KIM, James H.; GIBB, Herman J.; HOWE, Paul D. **Cobalt and inorganic cobalt compounds**. Concise international chemical assessment document ; 69, 2006.

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

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 abr. 2021.

MARQUES, E.F. **Da nanociência à nanotecnologia**, *Rev. Ciência Elementar*, V2(3):058, 2014. Disponível em: <<https://rce.casadasciencias.org/rceapp/art/2014/058/>>. Acesso em: 05 abr. 2021.

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 abr. 2021.

MATIAS, W. G. **Apostila de toxicologia Ambiental**. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, UFSC, Florianópolis. 2009.

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

MCTI - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações. **Nanotecnologia: a engenharia da vida que promove avanços científicos sem precedentes**. 2019. Disponível em: <[https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/salaImprensa/noticias/arquivos/2017/11/Nanotecnologia\\_a\\_engenharia\\_da\\_vida\\_que\\_promove\\_avancos\\_cientificos\\_sem\\_precedentes.html?searchRef=nanotecnologia&tipoBusca=expressaoExata](https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/salaImprensa/noticias/arquivos/2017/11/Nanotecnologia_a_engenharia_da_vida_que_promove_avancos_cientificos_sem_precedentes.html?searchRef=nanotecnologia&tipoBusca=expressaoExata)>. Acesso em: 07 abr. 2021.

MELO, C. P.; PIMENTA, M. **Nanociências e nanotecnologia**. 18: 9-22. Disponível em: <[http://seer.cgee.org.br/index.php/parcerias\\_estrategicas/article/viewFile/130/124](http://seer.cgee.org.br/index.php/parcerias_estrategicas/article/viewFile/130/124)>. Acesso em: 02 abr. 2021.

MENDONÇA, V. S. **Aplicabilidade de Testes de Toxicidade Aguda com *Daphnia magna* e *Vibrio Fisheri*, no Monitoramento da Qualidade das Águas de Bacias Hidrográficas: O Caso do Rio Ipojuca em Pernambuco**. 2005. 84 f. Tese (Mestrado) - Curso de Mestrado em Gestão e Política Ambiental, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2005.

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 abr. 2021.

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 abr. 2021.

NANOEACH. **Escola de Artes, Ciências e Humanidades da USP**. Disponível em <http://www.each.usp.br/nanoeach/?p=2115>. Acesso em 23 mar. 2021.

NEL, A. *et al.* "Toxic potential of materials at the nanolevel". *Science*, 2006. 311(5761): p. 622-7.

OBERDORSTER, G.; E. Oberdorster and J. Oberdorster. "Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles". *Environ Health Perspect*, 2005. 113(7): p. 823-39.

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: 11 abr. 2021.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. **Os Nanomateriais e a Questão Ambiental**. *Química Nova*, Campinas – SP, Brasil, p. 421-430, 2010.

QUINA, F. H. **Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos**. *Química Nova*, [s.l.], v. 27, n. 6, p.1028-1029, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO).

RBCF, REVISTA BRASILEIRA DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS: **Exposição ocupacional ao cobalto: aspectos toxicológicos**. São Paulo: v. 39, n. 2, 2003.

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.

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.

SBTOX. **Sociedade Brasileira de Toxicologia** - Disponível em: <<http://www.sbtox.org>>. Acesso em: 24 abr. 2021.

SHARAN, A.; NARA, S. **Exposure of synthesized Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles to *Chlorella minutissima*: an ecotoxic evaluation in freshwater microalgae**. *Aquatic Toxicology*, v. 224, p.1-8, 2020.

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.

SHARIFI, S. *et al.* **Toxicity of nanomaterials**. *Chem Soc Rev*, 2012. 41(6): p. 2323-43.

SHIM, H. *et al.* **Highly Reversible Lithium Storage in Bacillus subtilis-Directed Porous Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanostructures**. *ACS Nano*, v. 5, n. 1, p. 443-449, 2011.

SILVA, E. M. P. **A tecnologia, suas estratégias, suas trajetórias.** Ciência e Cultura, São Paulo: p. 13-21, 01 jul. 2008. Semestral.

SOARES, E. A. **Óxidos metálicos, 2002.** Disponível em: <<http://www.fisica.ufmg.br/~edmar/fisica/posdoc/profix/node3.html>>. Acesso em: 24 abr. 2021.

UFRGS - UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL – Laboratório de Virologia. **BMM 5777 – Culturas celulares e suas aplicações em Microbiologia.** Disponível em: <[https://www.ufrgs.br/labvir/material/contagem\\_celulas.pdf](https://www.ufrgs.br/labvir/material/contagem_celulas.pdf)>. Acesso em: 12 abr. 2021.

UNESP. Universidade Estadual de São Paulo. **O Cobalto.** 2010. Disponível em: <<http://editoraunesp.com.br/blog>>. Acesso em: 24 abr. 2021.

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 abr. 2021.

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.

**ANEXO I**  
**Cultivo da microalga *Desmodesmus subspicatus***

Para o cultivo da microalga *D. subspicatus* utilizou-se o meio CHU, preparado conforme o Anexo C da ABNT NBR 12648:2018, descrito na Tabela 7. As soluções foram preparadas com antecedência, armazenadas e mantidas refrigeradas por um período de até 6 meses.

**Tabela 7:** Reagentes utilizados para o preparo das soluções constituintes do meio CHU.

Solução	Reagente	Concentração por litro
1	Nitrato de sódio	25 g
2	Cloreto de cálcio di-hidratado	2,5 g
3	Sulfato de magnésio hepta-hidratado	7,5 g
4	Fosfato de potássio dibásico	7,5 g
5	Fosfato de potássio monobásico	17,5 g
6	Cloreto de sódio	2,5 g
7	Titriplex III	50 g
	Hidróxido de potássio	31 g
8	Sulfato ferroso hepta-hidratado	4,98 g
9	Ácido bórico	11,42 g
	Sulfato de zinco hepta-hidratado	8,82 mg
	Cloreto de manganês tetra-hidratado	1,44 mg
10	Óxido de molibdênio	0,71 mg
	Sulfato de cobre penta-hidratado	1,57 mg
	Nitrato de cobalto hexa-hidratado	0,49 mg

**Fonte:** Anexo C da ABNT NBR 12648:2018.

Para cada litro de CHU, foram misturadas as soluções nas quantidades descritas na Tabela 8 e adicionando-se água ultrapura até atingir o volume final de 1 litro.

**Tabela 8:** Volume necessário de cada solução para o preparo de 1 litro de meio CHU.

Solução	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Volume (mL)	10	10	10	10	10	10	1	1	1	1

**Fonte:** Anexo C da ABNT NBR 12648:2018.

**ANEXO II**  
**Preparo da solução nutriente**

**Tabela 9:** Reagentes constituintes das soluções I, II e III que compõem a solução nutriente.

<b>Regente</b>	<b>Quantidade/L</b>
<b>Solução I</b>	
Cloreto de amônia	1,5 g
Cloreto de magnésio hexa-hidratado	1,2 g
Cloreto de cálcio di-hidratado	1,8 g
Sulfato de magnésio hepta-hidratado	1,5 g
Fosfato de potássio monobásico	0,16 g
<b>Solução II</b>	
Cloreto férrico hexa-hidratado	80 mg
Titriplex III	100 mg
<b>Solução III</b>	
Ácido bórico	185 mg
Cloreto de manganês tetra-hidratado	415 mg
Cloreto de zinco	3 mg
Cloreto de cobalto hexa-hidratado	1,5 mg
Cloreto de cobre di-hidratado	0,01 mg
Molibdato de sódio di-hidratado	7 mg

**Fonte:** KNIE & LOPES (2004).

**Tabela 10:** Volume necessário de cada solução-estoque para o preparo de 1 litro de solução nutriente.

<b>Solução estoque</b>	<b>Volume por litro</b>
I	10 mL
II	1 mL
III	1 mL
Bicarbonato de sódio	300 mg

**Fonte:** KNIE & LOPES (2004).