



Jorge Abel dos Santos Toxicidade de nanomateriais de ácidos poliacrílicos
Silva Tavares hidrofobicamente modificados

**Toxicity of hydrophobically modified polyacrylic
acid nanomaterials**



Jorge Abel dos Santos Silva Tavares **Toxicidade de nanomateriais de ácidos poliacrílicos hidrofobicamente modificados**

Toxicity of hydrophobically modified polyacrylic acid nanomaterials

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Aplicada - Ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica da Professora Doutora Isabel Maria Cunha Antunes Lopes, Investigadora Principal do Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro.

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.

O autor

“By definition, you have to live until you die. Better to make that life as complete and enjoyable an experience as possible, in case death is boring, which I suspect it will be.”

— Irvine Welsh, *Trainspotting*

O júri

Prof. Doutora Isabel Maria Cunha Antunes Lopes
Investigadora principal da Universidade de Aveiro e CESAM

Prof. Doutora Susana Patrícia Mendes Loureiro
Investigadora principal da Universidade de Aveiro e CESAM

Prof. Doutora Maria Adelaide de Pinho Almeida
Professora auxiliar da Universidade de Aveiro

Agradecimentos

Gostaria de agradecer à Professora Isabel por me ter orientado ao longo deste ano e meio, sempre com disponibilidade, paciência e excelentes conselhos!

Gostaria de agradecer à minha família, em especial há minha Mamã, Irmã, Avó, Tité e Pai e a todos os meus amigos de sempre por terem feito de mim tudo o que sou hoje.

Queria também agradecer à minha Jess por todo o apoio não só durante a realização deste trabalho, mas sempre e ininterruptamente nestes últimos seis anos.

Por fim gostava de agradecer à Cátia V., por toda a paciência, disponibilidade e conhecimento! Sem ti ainda estaria hoje a tentar descortinar como contar rotíferos numa placa.

Índice

Resumo.....	VII
Abstract.....	VIII
Lista de Figuras.....	IX
Lista de Tabelas.....	X
1 – Introdução	1
I - Nanotecnologia e nanomateriais	1
II – Tipos de nanomateriais.....	3
III - Nanomateriais, suas características e interação com o meio ambiente.....	4
IV - Ecotoxicologia aplicada ao estudo de nanomateriais.....	6
V – Objectivos	11
2 – Materiais e Métodos.....	12
I - Caracterização dos nanomateriais HMPAA.....	12
II - Ensaio ecotoxicológicos com HMPAAs	14
III - Ensaio de inibição de crescimento com <i>Raphidocelis subcapitata</i> e <i>Chlorella vulgaris</i>	15
IV - Ensaio de inibição de bioluminescência com <i>Vibrio fischeri</i>	17
V – Ensaio de mortalidade com <i>Brachyonus calyciflorus</i>	18
VI - Ensaio de inibição de crescimento com <i>Daphnia magna</i>	19
VII - Efeitos no tamanho corporal de larvas de <i>Pelophylax perezii</i>	20
VIII – Análise de dados.....	21
3 – Resultados	
I - Caracterização física dos NMs HMPAA.....	22

II - Ensaio ecotoxicológico com HMPAAs.....	26
II.a) - <i>Raphidocelis subcapitata</i>	26
II.b) - <i>Chlorella vulgaris</i>	28
II.c) - <i>Vibrio fischeri</i>	30
II.d) - <i>Brachyonus calyciflorus</i>	32
II.e) - <i>Daphnia magna</i>	33
II.f) - <i>Pelophylax perezii</i>	35
4 – Discussão.....	38
5 – Conclusões	44
6 – Bibliografia	45

Palavras-chave: NM, HMPAA, EC, LC, Toxicidade

Resumo: A crescente demanda por novos e melhores produtos levou a um desenvolvimento exponencial de novos nanomateriais (NM) manufacturados desde a década de 90. A corrente massificação de NM em produtos de uso quotidiano promove o contacto entre NM e o ambiente com possíveis efeitos adversos para os ecossistemas. O trabalho apresentado pretende sugerir qual o NM de ácido poliacrílico hidrofobicamente modificado (HMPAA) menos prejudicial para o ambiente de entre seis HMPAA NM, dos quais um (HMPAA5) é atualmente comercializado, com o intuito de contribuir para a agenda da União Europeia em Nanosegurança: Inovações em nanotecnologia e nanomateriais sustentáveis e seguros. As seis variações de NMs HMPAA foram obtidos através da modificação de conformações reticuladas e inserção de grupos hidrofóbicos em diferentes posições do NM. Cada variação de suspensões HMPAA foi caracterizada através da utilização de técnicas de espalhamento dinâmico de luz e medidos os valores de condutividade e pH. A caracterização ecotoxicológica dos seis NMs foi feita recorrendo a uma bateria de ensaios padrão, letais e sub-letais, com espécies de diferentes grupos taxonómicos e funcionais, com o objetivo de aferir diversos graus de sensibilidade: (i) *Vibrio fischeri*, (ii) *Raphidocelis subcapitata* e *Chlorella vulgaris*, (iii) *Brachyonus calyficlorus*, (iv) *Daphnia magna*, (v) *Pelophylax perezii*. As concentrações que causaram 50% e 20% de efeitos foram computorizadas para cada ensaio (LC₅₀ para mortalidade e EC₅₀/EC₂₀ para efeitos sub-letais). Os valores de LC e EC variaram entre 0.75 mgL⁻¹ e 2000 mgL⁻¹ para todas as espécies e NMs. No geral, a espécie mais sensível testada foi a bactéria *Vibrio fischeri*, enquanto *Pelophylax perezii*, foi a mais tolerante. HMPAA1 e HMPAA2 foram, de todos os testados os NM mais tóxicos. Pelo contrário, HMPAA5 e HMPAA6 foram, no geral, os menos tóxicos para os organismos testados. Para as duas espécies de algas, HMPAA5 foi o NM menos tóxico e HMPAA6 o menos tóxico para *Vibrio fischeri*, *Brachyonus calyficlorus* e *Raphidocelis subcapitata*. Sugerimos que as indústrias desenvolvam NM HMPAA com grupos hidrofóbicos (curtos e longos) na sua superfície, uma vez que esta conformação parece induzir menos efeitos negativos nos ecossistemas, mantendo a funcionalização do NM e assim contribuindo para o desenvolvimento de uma nanotecnologia mais “verde”.

Keywords: NM, HMPAA, EC, LC, Toxicity

Abstract: The growing demand for new and better products led to an exponential development of manufactured nanomaterials (NM) since the 90's decade. The current widespread use of NM in consumer products is promoting the contact between nanomaterials and the environment, which may lead to adverse effects in the latter. The present work aimed at suggesting the most environmental-friendly hydrophobically modified polyacrylic acid (HMPAA) NM over six tested HMPAA NM, where one of them (HMPAA5) it's currently commercialized, in order to contribute for the European Union agenda on Nanosafety: safe and sustainable nanomaterials and nanotechnology innovations. Six variations of HMPAA MNMs were obtained by modifying the crosslinked conformation, the insertion position and the length of hydrophobic groups. Each variation of HMPAA suspensions were characterised by using light scattering techniques. Conductivity and pH were also measured. To characterise the ecotoxicity of the six NMs a battery of lethal and sublethal standardised assays were conducted with species from different taxonomic and functional levels to assess different ranges of sensitivity: (i) *Vibrio fischeri* (ii) *Raphidocelis subcapitata* and *Chlorella vulgaris*, (iii) *Brachyonus calyciflorus* (iv) *Daphia magna* (iv) *Pelophylax perezii*. The concentrations causing 50% and 20% of effects (LC50 for mortality and EC50/EC20 for sublethal endpoints) were computed for each monitored endpoint. Computed LC and EC values ranged from 0.75 mgL⁻¹ up to 2000 mgL⁻¹ for all tested NMs and species. In general, the most sensitive specie to the tested NMs was the bacteria *Vibrio fischeri*, while *Pelophylax perezii*, showed to be most tolerant. The HMPAA1 and HMPAA2 proved to be amongst the most toxic tested NMs. In contrast, HMPAA5 and HMPAA6 where, in general, the least toxic to freshwater biota. For the two tested algae species, HMPAA5 was the less harmful NM, and HMPAA 6 was the less toxic NM to *Vibrio fischeri*, *Brachyounus calicyflorus* and *Raphidocelis subcapitata*. It is suggested that industries should develop HMPAA with hydrophobic groups (short and long) at the surface of the NM as it seems to reduce their adverse effects to biota while maintaining its functionalization, thus contributing to a more sustainable development and greener nanotechnology.

Lista de figuras

Figura 1 – Número de artigos encontrados na base de dados Thomson Reuters ISI WoS, com as palavras-chave “toxicology and nano” (toxicologia e nano) e “size-dependent toxicity and nano” (toxicidade dependente de tamanho e nano) até 2014 Adaptado de <i>Ivask et al.</i> 2014	7
Figura 2 – Distribuição da quantidade de dados ecotoxicológicos para diferentes grupos de organismos. Adaptado de Kahru & Dubourguie, 2009.	8
Figura 3 – Representação esquemática das seis variações de nanomateriais de ácidos poliacrílicos hidrofobicamente modificados (HMPAA) estudados.	13
Figura 4 – Distribuição de tamanho dos seis HMPAAs quando suspensos em meio MBL, água destilada-H ₂ O _d , ASPM, ASTM, e FETAX.....	25
Figura 5 – Valores das concentrações dos seis HMPAAs que provocaram 20% (barras laranja) e 50% (barras azuis) de inibição no crescimento de <i>Raphidocelis subcapitata</i>	26
Figura 6 – Valores das concentrações dos seis HMPAAs que provocaram 20% (barras laranja) e 50% (barras azuis) de inibição no crescimento de <i>Chlorella vulgaris</i>	28
Figura 7 – Valores das concentrações dos seis HMPAAs que provocaram 20% (barras laranja) e 50% (barras azuis) de inibição da bioluminescência na bactéria <i>Vibrio fischeri</i>	30
Figura 8 – Valores das concentrações dos seis HMPAAs que provocaram 50% (barras azuis) de mortalidade em <i>Brachyonus calyciflorus</i>	32
Figura 9 – Valores das concentrações dos seis HMPAAs que provocaram 20% (barras laranja) e 50% (barras azuis) de inibição de crescimento em <i>Daphnia magna</i>	33

Figura 10 – Valores das concentrações dos seis HMPAAs que provocaram 10% (barras laranja) e 20% (barras azuis) de inibição de crescimento corporal em *Pelophylax perezii*. 35

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Informação relativa às espécies utilizadas na realização dos ensaios ecotoxicológicos.	14
Tabela 2 – Parâmetros físicos medidos na concentração de 2000mg/L de cada HMPAA nos diferentes meios de diluição (MBL, H ₂ O d-água destilada, ASPM, ASTM, FETAX). Pdi – Índice de polidispersão.	23
Tabela 3 – Quociente entre os valores das concentrações que provocam 50% e 20% (EC _{50,72h} e EC _{20,72h} , respetivamente) de inibição no crescimento de <i>Raphidocelis subcapitata</i> , após serem expostas durante 72h às seis variações de HMPAAs.	27
Tabela 4 – Quociente entre os valores das concentrações que provocam 50% e 20% (EC _{50,72h} e EC _{20,72h} , respetivamente) de inibição no crescimento de <i>Chlorella vulgaris</i> , após serem expostas durante 72h às seis variações de HMPAAs.	29
Tabela 5 – Quociente entre os valores das concentrações que provocam 50% e 20% (EC _{50,30min} e EC _{20,30min} , respetivamente) de inibição de bioluminescência na bactéria <i>Vibrio fischeri</i>	31
Tabela 6 - Quociente entre os valores das concentrações que provocam 50% e 20% (EC _{50,72h} e EC _{20,72h} , respetivamente) de inibição de crescimento em <i>Daphnia magna</i>	34
Tabela 7 - Quociente entre os valores das concentrações que provocam 50% e 20% (EC _{50,72h} e EC _{20,72h} , respetivamente) de inibição de crescimento corporal em <i>Pelophylax perezii</i>	36
Tabela 8 - Ordem de toxicidades relativas das seis variações de HMPAA para as seis espécies estudadas.	37

1. Introdução

I) Nanotecnologia e nanomateriais

No dia-a-dia vemo-nos rodeados por uma grande variedade de materiais, orgânicos ou inorgânicos, naturais ou sintéticos, desde o algodão ao plástico, entre muitos outros. Desde os primórdios da sua existência, o Homem, tem tirado grande proveito desta vasta diversidade de materiais de modo a tornar a sua vivência mais confortável. De fato, até à atualidade, têm sido desenvolvidos diversos materiais e utilizados em diferentes atividades do quotidiano do Homem, e, sem os quais a sociedade moderna, nos padrões vigentes, provavelmente não existiria (Meikle, 1997). Esta demanda incansável por novos materiais que apresentem novas propriedades e aplicações nos diversos sectores da sociedade promoveu a recentemente aparição de uma nova tecnologia, a nanotecnologia.

Atribui-se ao físico Richard Feynman, em 1959, o lançamento das bases para a nanotecnologia, quando este, numa palestra denominada “There's plenty of room at the bottom”, anunciou ser possível condensar, num espaço tão pequeno como a cabeça de um alfinete, todos os volumes da Enciclopédia Britânica (Fernades & Takeda, 2010). No entanto, o termo nanotecnologia *per se* surge no ano de 1974 por Taniguchi (1974) com a publicação do artigo “On the Basic Concept of Nanotechnology”. Neste trabalho, Taniguchi descreve, pela primeira vez, a criação de materiais com dimensões nanométricas, ou seja com dimensões inferiores a 100 nm (Fernades & Takeda, 2010). Na atualidade, referimo-nos à nanotecnologia como a ciência que se dedica ao estudo (manipulação, caracterização e desenvolvimento) de nanomateriais (NMs) (ASTM, 2006). A palavra “*nano*” tem origem na palavra grega “*nanos*” que significa anão. A Comissão Europeia, em 2011, definiu o termo nanomaterial como sendo “um material natural ou fabricado, que contém partículas num estado desagregado ou na forma de um agregado ou de um aglomerado, e em cuja distribuição número-tamanho 50% ou mais das partículas têm uma ou mais dimensões externas na gama de tamanhos compreendidos entre 1 e 100 nm.” Esta recomendação da Comissão Europeia também refere que “Em casos específicos e sempre que tal se justifique devido a preocupações ambientais e ligadas à saúde,

segurança e competitividade, o limiar da distribuição número-tamanho de 50% pode ser substituído por um limiar compreendido entre 1 e 50%”.

Apesar de desde sempre os NMs terem existido na natureza, por exemplo em cinzas vulcânicas, produtos de combustão aquando de fogos florestais ou no solo e sedimentos resultantes de processos geológicos e biológicos (Valsami-Jones *et al.*, 2008), é na década de 90 que a produção de NMs manufacturados cresce exponencialmente (Nel *et al.*, 2009). Presentemente esta é já uma indústria que gera milhões de dólares. Segundo o “Project on Emerging Nanotechnologies” (2013) atualmente existem mais de 1600 produtos diferentes, de uso corrente, contendo NMs, sendo este um número que se espera que continue a crescer rapidamente. Estimativas já existentes pontam para que a venda de produtos que utilizam nanotecnologia possa atingir 1 trilião de dólares em 2015 (Nel *et al.*, 2009) e que 15% de todos os produtos produzidos globalmente tenham alguma forma de nanotecnologia incorporada ou acoplada ao seu processo de produção (Bystrzejewska-Piotrowska, 2009). Os países que se encontram na vanguarda da investigação, criação e aplicação de NMs são os Estados Unidos, Alemanha e Japão. O governo norte-americano, por si só, investiu em 2007, um valor estimado em 1,5 biliões de dólares em nanotecnologia, com especial incidência no seu uso militar (Paschoalino *et al.*, 2010).

Os NMs, devido às suas dimensões e propriedades particulares, têm aplicações em distintos campos como a indústria farmacêutica e medicina (principalmente em sistemas de administração de fármacos), a cosmética, indústria têxtil, telecomunicações e informática, produção de combustíveis, processos de remediação ambiental, equipamento militar, entre muitos outros (Kahru & Dubourguier, 2009; Bystrzejewska-Piotrowska, 2009; Nel *et al.*, 2009). Podemos, assim, encontrar NMs em produtos do quotidiano como protetores solares, tintas, detergentes, tecidos anti-nódoas, e muitos mais (Kahru & Dubourguier, 2009). Todas estas aplicações tornam inevitável a exposição humana e ambiental a NMs, quer por contacto direto com os produtos que os incluem quer por libertação dos NMs, a partir desses produtos, para os diferentes compartimentos ambientais (Paschoalino *et al.*, 2010).

II) Tipos de nanomateriais

Os NMs podem ter origem natural ou antropogénica, sendo que os produzidos pelo Homem podem-no ser não intencionalmente (por exemplo, através de processos de combustão) ou intencionalmente (por exemplo, através da manipulação de átomos por metodologias químicas, físicas ou biológicas) (Nowack & Bucheli, 2007). Os NMs naturais existem nos ecossistemas desde sempre, e os organismos puderam evoluir na presença deles e, provavelmente, desenvolver mecanismos de defesa e tolerância a estes NMs. No que diz respeito aos NMs produzidos pelo Homem, só recentemente é que os ecossistemas começaram a ser expostos a estes tipo de compostos, pelo que não é expectável que o biota tenha desenvolvido mecanismos específicos para lidar com este tipo de contaminantes (Kahru & Dubourguier, 2009).

Atualmente existe uma enorme gama de NMs com diferentes composições químicas, tamanhos, formas, entre outras características. Segundo a organização “Working Party on Manufactured Nanomaterials” (WPMN), podemos dividir os NMs produzidos intencionalmente pelo Homem em dois grupos gerais, os inorgânicos, dos quais os mais comuns no mercado são os óxidos de metais, especialmente: NMs de Prata (Ag), Zinco (ZnO), Titânio (TiO₂); e os orgânicos, cuja produção de fulerenos C₆₀, nanotubos de carbono (CNT) e dendrímeros se destacam (Kahru & Dubourguier, 2009; Simón-Vázquez *et al.*, 2012). No entanto, o grupo de trabalhos da Comissão Europeia reporta, no Apêndice 2 do documento *Types and uses of nanomaterials, including safety aspects lists*, uma visão geral, e mais diversificada, das categorias de NMs que estão, nos dias de hoje, a ser produzidas e comercializadas, principalmente na Europa (European Commission, 2012). Estas categorias compreendem: (i) NM inorgânicos não-metálicos, que incluem por exemplo sílica amorfa sintética e outros NMs semelhantes a sílica amorfa (e.g. sais de ácido de silício), carbonato de cálcio, entre outros; (ii) NMs de metais e ligas metálicas, como ouro, prata, cobre, ferro, e vários outros NMs metálicos; (iii) NMs com base em carbono, incluindo, por exemplo, nanotubos e nanofibras de carbono, flocos de grafeno; (iv) nanopolímeros e dendrímeros, tais como nanotubos de poliméricos, nanofios, fibras de poliglicidilmetacrilatos, nanocelulose, nanoestruturas de poliacrilonitrilo; (v) pontos quânticos, que são usualmente constituídos por selenito de cádmio, sulfito de cádmio, arseniato e fosforeto de

inidium; (vi) nanoargilas, que são compostas por camadas de silicatos; (vii) nanocompósitos que constituem materiais sólidos multifásicos; e (viii) nanomicelas que constituem nanoemulsões multifásicas (European Commission, 2012).

III) Nanomateriais, suas características e interação com o meio ambiente

Embora o rápido desenvolvimento e produção de NMs tenha provocado um impacto positivo na economia mundial e tenha promovido vários aspetos benéficos para os consumidores, o conhecimento e compreensão acerca do impacto ambiental que a grande maioria dos NMs podem provocar é ainda considerado limitado (Nel *et al.*, 2009). Nos últimos anos, foram disponibilizadas verbas avultadas para o estudo de novos NMs. No entanto, a percentagem destinada à avaliação do seu impacto e toxicidade é pequena. Por exemplo, dos 1,5 biliões de dólares gastos pelos EUA, em 2007, na investigação de NMs apenas 3% foram aplicados a estudos de impacto ambiental (Paschoalino *et al.*, 2010). Este diferencial de investimento económico, juntamente com o rápido crescimento da nanotecnologia e a exponencial produção de novos NMs, dificulta um desenvolvimento paralelo do conhecimento relativo ao impacto destes compostos no meio ambiente (Nel *et al.*, 2009; Valsami-Jones *et al.*, 2008, Kahru & Dubourguier, 2009). No seguimento deste facto, vários NMs são atualmente lançados no mercado sem qualquer estudo prévio acerca dos seus efeitos nos ecossistemas.

Na literatura científica existem estudos que concluem que inclusivamente NMs naturais, resultantes de derivados de combustão (partículas ultrafinas), são prejudiciais e podem causar diversos problemas pulmonares em mamíferos e humanos (Nel *et al.*, 2009). Existem também vários trabalhos científicos que apontam para que alguns NMs manufacturados pelo Homem possam ser prejudiciais para diferentes *taxa* mesmo a baixas concentrações, como o caso de fulerenos (C₆₀) que causam mortalidade no organismo *Daphnia magna* a concentrações de 0,8 ppm (e.g. Zhu *et al.*, 2004). Deste modo, tornou-se urgente delinear estratégias e padronizar métodos que permitissem uma avaliação adequada da toxicidade de NMs e dos seus impactos na biosfera (e.g. Oberdorster *et al.*, 2005).

Os NMs possuem características que os tornam únicos e lhes conferem propriedades que permitem o seu uso eficaz em vários sectores industriais. No entanto, são também estas características que lhes podem conferir um maior potencial de produzir efeitos adversos no ambiente (Colvin, 2003).

A composição química das NMs está geralmente relacionada com a composição da matéria-prima da qual são constituídas, assim por vezes é possível prever a toxicidade de um NM tendo em conta a toxicidade do produto a partir do qual foi criado (Bystrzejewska-Piotrowska, 2009). No entanto, há várias características dos NMs que podem influenciar a sua toxicidade.

Ao nível físico-químico a principal propriedade diferenciadora dos NMs é o seu tamanho muito reduzido. Estas dimensões reduzidas dos NMs podem promover uma maior permeabilidade através da pele, mucosas e membranas celulares. Mais ainda, associado a este tamanho reduzido ocorre um aumento da área superficial, que pode provocar uma maior reatividade por parte destes compostos, fazendo prever um aumento da sua possível toxicidade comparativamente aos compostos correspondentes de tamanho não nano (Paschoalino *et al.*, 2010). O ouro é um exemplo deste tipo de interações, sendo um metal praticamente inerte, é utilizado para a produção de NMs reativos (Paschoalino *et al.*, 2010).

Vários trabalhos científicos têm reportado a influência das características físico-químicas de NMs na sua toxicidade. Por exemplo, Arouja *et al.*, (2009) observou que NMs de dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de cobre (CuO) revelaram ser mais tóxicas para a microalga *Raphidocelis subcapitata* do que partículas não-nano dos mesmos compostos (EC₅₀=35,9 mg Ti/l vs EC₅₀=5,83 mg Ti/l e EC₅₀=11,6 mg Cu/l vs EC₅₀=0,71 mg Cu/l). Afrooz *et al.*, (2012) sugere que NMs de ouro com forma de bastonete podem ser mais prejudiciais para os ecossistemas do que NMs de ouro com forma esférica, no entanto ressalva a necessidade de mais estudos para corroborar as suas conclusões.

Os NMs têm também tendência para se agregar quando em suspensões aquosas, formando massas de maiores dimensões. A agregação de NMs pode ser explicada pela “Teoria da estabilidade coloidal”. De uma forma simplificada esta teoria mostra que o aproximar de NMs gera interações energéticas (na sua maioria forças van der Waals e

interações eletrostáticas de dupla camada) entre a superfície dos mesmos que os podem levar a aproximar-se, agregando. Pode também acontecer que uma superfície coletora (suponhamos os componentes do fundo de um lago) exerça interações energéticas mais fortes com os NMs levando-os a depositarem-se (Petosa *et al.*, 2010). A agregação é uma das características que torna imprevisível o comportamento de NMs no meio ambiente. Estes podem também agregar-se com outros compostos como por exemplo matéria orgânica, alterando assim as suas propriedades físico-químicas e apresentando diferentes comportamentos quando comparados com a sua forma simples (Petosa *et al.*, 2010 Kahru & Dubourguier, 2009). Estudos de Heinlaan *et al.* (2008) com a espécie do cladóceros *Daphnia magna* demonstram que NMs de zinco, cobre e titânio ao agregarem estão menos disponíveis para o organismo, tornando-se menos tóxicas.

A solubilidade é também uma característica importante para a toxicidade de NMs especialmente no que respeita a ambientes aquáticos (Bystrzejewska-Piotrowska, 2009). Nanomateriais com baixas taxas de solubilidade tendem a não se degradar e a permanecerem nos ecossistemas durante um período longo de tempo, enquanto NMs com elevadas taxas de degradação geralmente produzem efeitos a curto prazo nos sistemas biológicos, uma vez que são mais rapidamente deteriorados e absorvidos por organismos (SCENIHR, 2006).

IV) Ecotoxicologia aplicada ao estudo de nanomateriais

A ecotoxicologia é uma disciplina abrangente que se dedica à avaliação dos contaminantes na biosfera e aos seus efeitos nos constituintes da mesma (Walter *et al.*, 2012). No seio desta disciplina, e como consequência do crescimento da nanotecnologia e da necessidade de se perceber o comportamento dos NMs e a sua toxicidade no meio ambiente, nasce a nanoecotoxicologia, que tem como principal objetivo gerar informação sobre o comportamento, destino e toxicidade de NMs nos vários compartimentos ambientais (Valsami-Jones *et al.*, 2008, Kahru & Dubourguier, 2009).

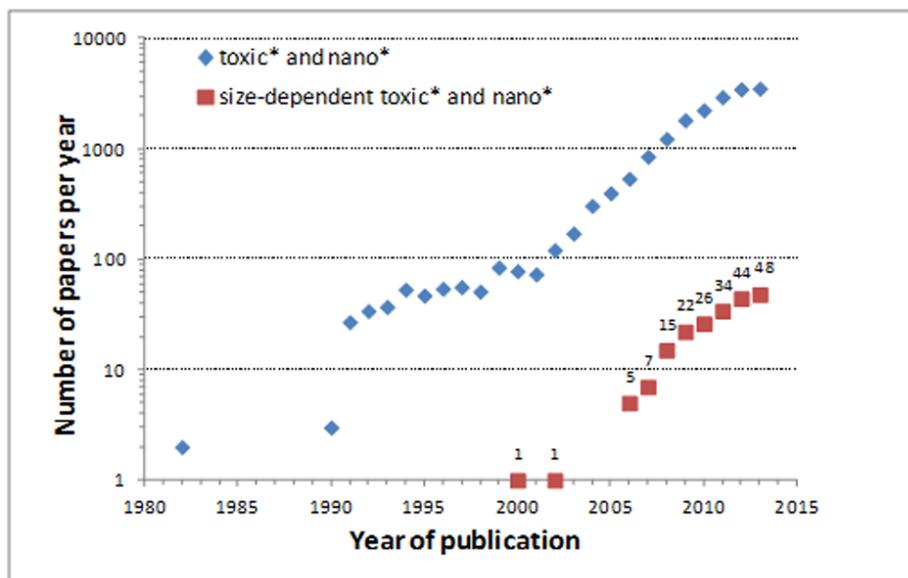


Figura 1 – Número de artigos encontrados na base de dados Thomson Reuters ISI WoS, com as palavras-chave “toxicology and nano” (toxicologia e nano) e “size-dependent toxicity and nano” (toxicidade dependente de tamanho e nano) até 2014. Adaptado de Ivask *et al.*, 2014

Em 2009 pouco mais de 10 publicações podiam ser encontradas na base de dados “ISI Web of Science” com as palavras-chave “nanoparticles + ecotoxicology” (Kahru & Dubourguier, 2009) ilustrando, assim o quanto recente é o tema “nano + ecotoxicologia”. No entanto, e num curto espaço de tempo, a nanoecotoxicologia cresceu largamente, sendo que em 2014 o número de artigos publicados anualmente sobre os temas “toxicidade de NMs” atingiu um valor de aproximadamente 3500 por ano (Ivask *et al.*, 2014). Desde 2009 os NMs mais estudados, em termos toxicológicos vão de encontro aos mais produzidos (ver página 5) e são os flurenos C_{60} – (moléculas compostas inteiramente por carbono), nanotubos de carbono (CNT), nano partículas de prata (Ag) e nanopartículas de titânio (TiO_2) (NIOSH, 2013; Kahru, & Dubourguie, 2009), surgindo recentemente um interesse crescente na produção industrial e consequentemente estudos toxicológicos de NMs de sílica (NIOSH, 2013).

A figura 2 resume os grupos de organismos mais estudados em 2009. Até à data da conclusão deste trabalho estudos mais recentes compilando dados sobre os grupos de organismos mais usados em ensaios nanoecotoxicologicos não foram encontrados. Os crustáceos são os organismos que aparecem em maior número de estudos, *Daphnia* (várias sub-espécies) o organismo em que se incide maior foco, visto ser um organismo modelo para estudos ecotoxicológicos, bastante fácil de manter sob cultura laboratorial. Seguidamente as bactérias são o grupo com mais informação disponível,

seguidas pelo grupo das algas e dos peixes. Existem ainda alguns trabalhos feitos com ciliados, leveduras e nemátodes, sendo que trabalhos com outros grupos de organismos existem em pequeno número (Kahru & Dubourguie, 2009). De ressaltar a crescente utilização de *Drosophila melanogaster* como organismo modelo para estudos de nanotoxicidade (Ong *et al.*, 2014).

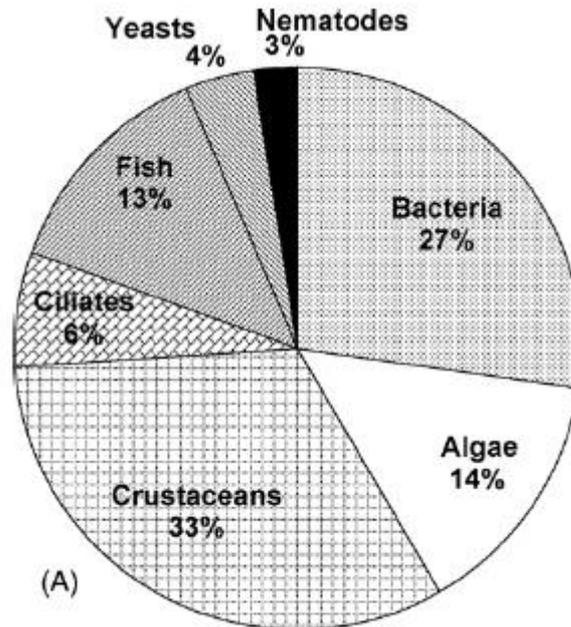


Figura 2- Distribuição da quantidade de dados ecotoxicológicos para diferentes grupos de organismos. Adaptado de Kahru & Dubourguie, 2009.

Segundo os dados disponíveis na literatura e de uma forma muito geral as algas e os crustáceos parecem ser os organismos mais sensíveis à NMs (Kahru & Dubourguie, 2009, Chakraborty, 2009).

Após a ingestão de NMs pelo organismo, que devido às suas pequenas dimensões facilmente atravessam barreiras biológicas, como a pele, trato intestinal, etc., estes rapidamente chegam à corrente sanguínea e depositam-se em diferentes órgãos (Ostiguy *et al.*, 2008). Entre eles o cérebro, intestino, pulmões, guelras (em meio aquático é um dos órgãos que mais facilmente acumula NMs), fígado, mostrando que os NMs podem causar diferentes efeitos negativos nos organismos dependendo da sua composição físico-química e meio e via de exposição (Ostiguy *et al.*, 2008).

Oberdorster *et al.* (2005) salientou dois fatores que devem funcionar como “normas” gerais de estudos nanoecotoxicológicos, a caracterização físico-química do NM (tamanho, capacidade de aglomeração, etc.), e a realização de testes *in vivo* e *in vitro*, como forma de esclarecer a interação organismo-NM e averiguar a toxicidade/sensibilidade desta interação.

Atualmente e baseada em recentes modelos Europeus como os presentes no relatório “Nanosafety in Europe 2015-2025: Towards Safe and Sustainable Nanomaterials and Nanotechnology Innovations” surge a linha de investigação em “Nanosegurança” que engloba equipas multidisciplinares e entre outros pretende analisar e catalogar a toxicidade de NMs, os cenários de exposição, transformações que os NMs possam sofrer no ambiente, estabelecer planos de avaliação e gestão de risco, que por fim levarão à criação de bases de dados completas. Prevê-se que este projeto a nível Europeu, em 2025, atinja patamares como a previsão de risco de novos NMs através da utilização de modelos computadorizados.

Enquadrados na gestão de risco, surgem trabalhos resultantes da colaboração de ecotoxicólogos e empresas produtoras de NMs no sentido de se desenvolverem e produzirem de NMs de elevada eficiência e ao mesmo tempo “amigos do ambiente”, assim como na modificação e adaptação de características específicas de NMs já existentes por forma a obter NMs mais “verdes” mas desempenhando as mesmas funções. No âmbito desta perspetiva, no presente trabalho foram estudados 6 variações de um NM de ácidos poliacrílicos hidrofobicamente modificado (HMPAA), que já é comercializado. Este composto, pertence a um grupo de polímeros com ligações reticuladas que têm vindo a atrair a atenção de diversos investigadores e indústrias devido às suas propriedades de espessamento que lhes conferem a capacidade de passar de um estado líquido a um estado semelhante a gel (Saunders & Vicent, 2002; Antunes *et al*, 2011). As variações deste NM estudadas neste trabalho possuem dois tipos de arquitetura, linear (HMPAA2) em que cada monómero é ligado apenas a outros dois e reticulados (HMPAA1, 3, 4, 5 e 6) neste tipo de polímeros existem ligações químicas entre as cadeias dos polímeros (Duarte, 2011). Os polímeros HMPAA foram alterados funcionalmente através da adição de grupos hidrofóbicos com o objetivo de aumentar as suas propriedades anfipáticas. Este tipo de alterações

produzem características reológicas únicas que conferem maior estabilidade a soluções quando comparando com polímeros não modificados (Duarte, 2011). Os grupos hidrofóbicos de polímeros modificados quando expostos a soluções aquosas tendem a associar-se através de interações intermoleculares (diminuindo o contacto entre grupos hidrofóbicos e a água) levando a um aumento da viscosidade das soluções. Ao aumento da viscosidade de um sistema por influência de polímeros dá-se o nome de espessamento (Duarte, 2011). O espessamento pode ser descrito como um efeito osmótico e pode ser essencialmente influenciado por modificações de pH, temperatura e força iónica do meio envolvente (Antunes *et al.*, 2011). Esta característica particular torna os NMs HMPAA úteis em áreas como a cosmética (para espessamento de soluções como champôs, cremes, etc.), a indústria farmacêutica em sistemas de administração de fármacos, produção de tintas ou em técnicas de separação e purificação de compostos (Antunes *et al.*, 2011).

V) Objetivo

O presente trabalho tem como objetivo avaliar influência de alterações na conformação estrutural de seis NMs de ácidos poliacrílicos – HMPAA (Hydrophobically modified polyacrylic acid) - na sua ecotoxicidade. Ao atingir este objetivo, pretende-se dar um contributo seguindo a atual linha de investigação da União Europeia em “Nanosegurança”, que procura nanomateriais mais sustentáveis, esta abordagem pretende sugerir se alguma das variações de NMs HMPAA poderia ser usado como alternativa de produção mais “verde” ao presentemente comercializado HMPAA5.

2. Material e Métodos

I. *Caracterização dos nanomateriais HMPAA*

No presente trabalho foram estudadas 6 variações de NM de ácidos poliacrílicos hidrofobicamente modificados (HMPAA). A variação HMPAA5 (por favor, ver abaixo informação sobre este NM e Fig. 3) foi fornecida pela empresa Cognis GmbH numa solução aquosa a 30% e modificada pelo Departamento de Química da Universidade de Coimbra de modo a obter as restantes 5 variações (HMPAA1 a HMPAA4 e HMPAA6; Fig. 4):

- HMPAA1 é composto por uma estrutura principal de ácidos poliacrílicos reticulados ligados entre si formando uma estrutura semi-densa e modificados pela adição de cadeias alifáticas hidrofóbicas longas e curtas.
- HMPAA2 é composto por uma estrutura linear sem ligações reticuladas com grupos hidrofóbicos de cadeias alifáticas curtas ao longo da sua estrutura.
- HMPAA3 é composto por uma estrutura de ácidos poliacrílicos reticulados ligados entre si formando uma matriz pouco densa com modificações hidrofóbicas na superfície da estrutura do NM através da adição de cadeias alifáticas longas.
- HMPAA4 é formado pela ligação de ácidos poliacrílicos reticulados formando uma estrutura densa, com modificações hidrofóbicas através da adição de cadeias alifáticas longas e curtas.
- A estrutura principal de HMPAA5 é formada pela ligação de ácidos poliacrílicos reticulados numa conformação pouco densa com modificações hidrofóbicas através da adição de cadeias alifáticas longas e curtas.
- HMPAA6 é formado pela ligação de ácidos poliacrílicos reticulados formando uma matriz pouco densa com modificações hidrofóbicas pela adição de cadeias alifáticas longas e curtas na superfície da estrutura do composto.

As suspensões de HMPAA, utilizadas para realizar os ensaios ecotoxicológicos, foram preparadas através da diluição de cada solução stock, fornecida pela Universidade de Coimbra, nos diferentes meios de teste (água destilada, meio MBL, meio ASTM, meio ASPM, e meio FETAX) (Stein, 1993; ASTM, 1990; ASTM 1998; Dawson & Bantle, 1987). Cada uma das soluções stock foi diluída para uma concentração de 2000mg/L de NM e o pH de cada dissolução foi ajustado para o valor 7,0 ($\pm 0,2$) através da adição de pequenas quantidades de NaOH. A partir desta concentração foram realizadas todas as concentrações testadas nos ensaios ecotoxicológicos.

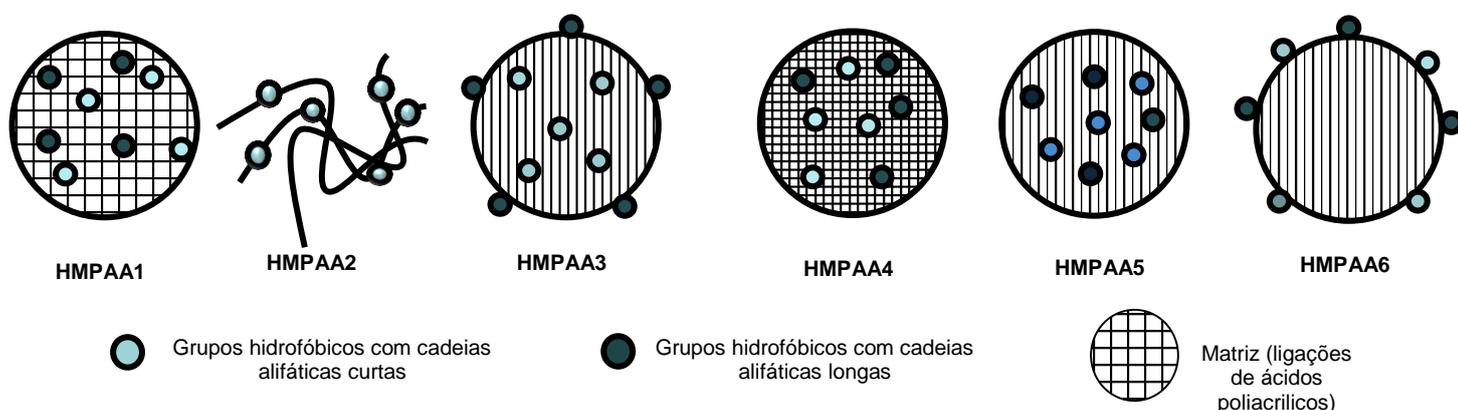


Figura 3- Representação esquemática das seis variações de nanomateriais de ácidos poliacrílicos hidrofobicamente modificados (HMPAA) estudados.

A caracterização das propriedades físicas de suspensões de NM é fundamental em estudos ecotoxicológicos. Deste modo, para cada suspensão das seis variações de HMPAA foram caracterizados os seguintes parâmetros, utilizando um aparelho Malvern Instrument Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, UK): o diâmetro hidrodinâmico (como medida do tamanho dos NM em suspensão) e o índice de polidispersão (refere-se à medida da amplitude da distribuição de tamanhos das partículas em suspensão; ISO 13321, 1996) foram medidos através do método de espalhamento dinâmico de luz; o potencial zeta (medida de estabilidade da suspensão) através da técnica de espalhamento electroforético de luz. Foi ainda medida a condutividade e pH utilizando os aparelhos conductivímetro (Wissenschaftlich

Technische Werkstätten-WTW conductivity 440i) e medidor de pH (HI 422x-02, PCE Instruments). As medições foram efetuadas a 20°C em retroespalhamento (173º; uma vez que reduz a probabilidade de que fotões dispersos encontrem mais do que uma partícula, reduzindo assim as interferências de partículas estranhas ou possíveis contaminações presentes nas amostras).

Os parâmetros mencionados acima foram determinados na concentração de 2000mg/L, de cada HMPAA, efetuada nos diferentes meios de cultura utilizados para realizar os ensaios ecotoxicológicos (por favor, ver secção *Ensaio Ecotoxicológicos*).

II. *Ensaio ecotoxicológicos com HMPAAs*

A toxicidade letal e subletal das seis variações de HMPAA foi avaliada através da realização de ensaios ecotoxicológicos com seis espécies de água doce pertencentes a diferentes grupos taxonómicos e que ocupam posições diferentes na cadeia trófica (desde os produtores até aos decompositores; Tabela 1), de modo a considerar diferentes sensibilidades aos NMs.

Tabela 1 – Informação relativa às espécies utilizadas na realização dos ensaios ecotoxicológicos.

Posição na cadeia trófica	Espécie	Grupo taxonómico Phylum
Produtor	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Chlorophyta
Produtor	<i>Chlorella vulgaris</i>	Chlorophyta
Decompositor	<i>Vibrio fisheri</i>	Proteobacteria
Consumidor primário	<i>Brachyonus calyciflorus</i>	Rotifera
Consumidor primário	<i>Daphnia magna</i>	Arthropoda
Consumidor secundário	<i>Pelophylax perezi</i>	Chordata

III. **Ensaio de inibição de crescimento com *Raphidocelis subcapitata* e *Chlorella vulgaris***

Os ensaios de inibição de crescimento permitem avaliar a influência do tóxico de interesse (neste caso NMs de HMPAA) no aumento da densidade celular (referido como crescimento) da microalga durante o período de exposição. O crescimento/inibição de crescimento é quantificado a partir de medições da densidade celular em função do tempo. Para este ensaio foi seguida a metodologia definida pela OECD (OECD, 2006).

Foram selecionadas duas espécies de microalgas verdes, *Raphidocelis subcapitata* e *Chlorella vulgaris*, como representativas de produtores primários, uma vez que são espécies padronizadas, facilmente cultiváveis em laboratório, são recomendadas por normas internacionais para estudos de ecotoxicologia e apresentam elevada sensibilidade a uma vasta gama de contaminantes (OECD, 2006; USEPA, 1994; EC, 1992).

Os ensaios foram realizados em placas estéreis de 24 poços. A sensibilidade e adequabilidade do teste de inibição e crescimento em placas de 24 poços foi já comprovada por vários trabalhos publicados (Blaise *et al*, 1998). Esta metodologia oferece diversas vantagens sobre outros testes convencionais, sendo uma das principais o facto de envolver pouco volume de solução, o que permite reduzir o volume de resíduos tóxicos gerados aquando da realização dos ensaios ecotoxicológicos (Rocha *et al*, 2011).

As duas espécies de microalgas, *R. subcapitata* e *C. vulgaris*, foram expostas a oito concentrações – 160; 320; 416; 540,8; 703; 914; 1188; 1544,4 mg/L - de cada HMPAA durante um período de 72h a $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e sob luz contínua (4000 lx). Para obtenção das concentrações testadas recorreu-se à diluição da concentração de 2000mg/L de cada um dos NMs de HMPAA em meio MBL “Woods Hole MBL Medium”, que é um meio padronizado utilizado para manutenção de culturas de microalgas (Stein, 1993).

Os poços centrais das placas foram preenchidos com 900 μL de solução a testar (MBL ou de uma das concentrações das 6 variações de HMPAA) e 100 μL de uma

suspensão de inóculo de alga (10^5 células/mL), de modo a iniciar o ensaio com uma densidade celular de 1×10^4 células/mL. Os poços periféricos foram preenchidos com 500 μ L de água destilada para evitar a evaporação de meio dos poços centrais. Para cada concentração de HMPAA foram realizadas três réplicas e para cada controlo foram efetuadas sete réplicas (MBL + solução de inóculo de alga).

A cada 24h procedeu-se à ressuspensão manual das algas em cada poço do ensaio de modo a não haver limitações no crescimento das microalgas.

Após terminado o período de 72h de exposição foi medida a absorvância final, a 440 nm, em cada réplica de HMPAAs e controlo, com recurso a espectrofotometria (espectrofotómetro Jenway, UV-VIS 6505).

O número de células de algas por mL foi calculado a partir dos valores de absorvância medidos, com recurso à fórmula:

$$c/mL = -17107,57 + Abs * 7925350 \quad (r^2 = 0.98), \text{ em que}$$

c/mL representa o número de algas por mililitro, e **Abs** representa a média aritmética dos valores de absorvância medida em cada concentração/controlo.

A taxa de crescimento diário das microalgas foi calculada, para cada concentração e controlo, com base na seguinte equação:

$$TCD = ((\ln(CF) - \ln(CI)) / 3), \text{ em que}$$

TCD representa a taxa de crescimento diário, **CI** representa o número de algas por mililitro no início do ensaio e **CF** representa o número de algas por mililitro no final do ensaio (i.e. após 72h de exposição).

Para calcular a percentagem de inibição do crescimento das microalgas relativamente ao respectivo controlo, foi utilizada a equação:

$$IC (\%) = ((\mu C - \mu S) / \mu C) * 100, \text{ em que}$$

IC representa a percentagem de inibição do crescimento, **μ C** representa a taxa média de crescimento no controlo, **μ S** a taxa média de crescimento em cada um dos tratamentos.

IV. Ensaio de inibição de bioluminescência com *Vibrio fischeri*

Vibrio fischeri é uma bactéria não patogénica e bioluminescente, sensível a uma vasta gama de compostos químicos e muito utilizada para avaliações preliminares da toxicidade de compostos químicos e amostras ambientais, pois necessita de volumes pequenos de amostras, é reproduzível, padronizado e de execução simples e rápida (Parvez *et al*, 2006).

Os ensaios de inibição de bioluminescência baseiam-se na quantidade de luminescência produzida por esta bactéria gram negativa, quantidade essa que se encontra diretamente associada à sua atividade metabólica. Assim, quando a atividade enzimática responsável pela produção de bioluminescência é afetada por um determinado composto químico, existe um decréscimo na produção de bioluminescência (Parvez *et al*, 2006).

O ensaio de inibição de bioluminescência com a bactéria *Vibrio fischeri*, foi realizado com base no kit comercial Microtox test® (AZUR Environmental, 1998), seguindo o protocolo “Microbics Corporation detailed protocol for Basic Test” (AZUR Environmental, 1998). Os reagentes e as soluções necessários para a realização do ensaio foram adquiridos à empresa Quincomer Inc. (Lisboa, Portugal) e todas as exposições e medições foram realizadas no aparelho “Microtox Model 500 Analyser” (Microbics Corporation, 1992).

A bioluminescência da população de *Vibrio fischeri* foi medida no início do ensaio e após 5, 15 e 30 minutos de exposição a nove concentrações de cada uma das variações HMPAA (1789 mg/L, 891 mg/L, 445,5 mg/L, 222,75 mg/L, 111,38 mg/L, 55,69 mg/L, 27,84 mg/L, 13,92 mg/L, 6,96 mg/L) e a um controlo (meio diluente fornecido pela Azur).

V. **Ensaio de mortalidade com *Brachyonus calyciflorus***

Os rotíferos são consumidores primários muito abundantes no zooplâncton de água doce, sendo por isso importantes membros de cadeias tróficas aquáticas e de elevada relevância ecológica para os ecossistemas (Shayestehfar, 2008). Este tipo de teste pretende avaliar a taxa de mortalidade provocada pelo composto químico, ou amostra ambiental, numa amostra de rotíferos após 24h de exposição. Este tipo de ensaio apresenta várias vantagens: para realizar o ensaio são utilizados indivíduos que eclodem de ovos de resistência, ovos estes que permanecem vários meses armazenados sob condições ideais (4°C sem luz), até à altura da sua utilização em ensaios ecotoxicológicos. Assim, não são necessárias culturas laboratoriais de organismos. Este ensaio requer pouco material, é prático, rápido e simples de realizar e bastante sensível (Muna *et al* 1995).

Os ensaios realizados foram feitos com recurso ao kit comercial Rotokit F acute™ e a procedimentos padronizados estabelecidos pelo protocolo “Rotokit 24h Acute” (MicroBioTests Inc., Nazareth, Belgium).

Vinte e quatro horas antes do início do ensaio, os ovos de resistência de *Brachyonus calyciflorus*, provenientes do kit Rotokit F acute™ (armazenados a 4°C no escuro), foram incubados em meio ASPM (Rotokit F™) numa câmara climática a 25°C ± 1, sob luz contínua (3000-4000 lx).

Após eclosão dos ovos de resistência os rotíferos foram transferidos para placas de 24 poços e expostos a um controlo (constituído por meio ASPM) e às seguintes gamas de concentrações de cada HMPAA: 57mg/L; 85,4 mg/L; 128,2mg/L; 192,2 mg/L ou 288,4 mg/L; 432,4 mg/L; 648,6 mg/L e 973 mg/L, através da diluição da solução de 2000mg/L com meio ASPM (Rotokit F™). Foram introduzidos 5 organismos em cada réplica/poço (volume de 3 mL) e foram realizadas 6 réplicas por cada concentração de HMPAA. Para cada HMPAA foram definidos 6 poços controlo contendo apenas os organismos e meio ASPM (Rotokit F™). Posteriormente os rotíferos foram expostos durante 24h, a 25°C ±1 no escuro. Durante o período de exposição não ocorreu renovação do meio ou alimentação. Após 24h foram contados os rotíferos mortos em cada poço e calculada a percentagem de mortalidade.

VI. *Ensaio de inibição de crescimento com Daphnia magna*

Daphnia magna é um organismo modelo para testes toxicológicos sensível a uma vasta gama de tóxicos, é facilmente mantido em laboratório, possui reprodução por partenogénese cíclica, um ciclo de vida curto e descendência abundante e idêntica geneticamente (Preuss *et al*, 2009).

Neste trabalho foram realizados ensaios de crescimento somático com o cladóceros de água doce *Daphnia magna*. Este tipo de teste pretende comparar o crescimento diário dos organismos expostos a um controlo versus organismos expostos a concentrações diferentes de contaminantes, neste caso HMPAAs, por um período de exposição de 72h.

As culturas de dáfnia, que originaram os neonatos utilizados nos ensaios ecotoxicológicos, foram mantidas em laboratório, sob condições de luz e temperatura controladas, a 20 ± 1 °C, com fotoperíodo de 16h luz e 8h escuro (OECD, 2008). Os indivíduos foram mantidos em meio artificial ASTM (ASTM 1990) a pH $7,3 \pm 0,3$, renovado a cada dois dias, assim como alimentadas de dois em dois dias com a alga verde *Raphidocelis subcapitata* (3×10^5 cell/mL/daphnia).

Para realizar os ensaios de inibição de crescimento somático foram utilizados neonatos com mais de 6h e menos de 24h de idade e pertencendo à terceira ninhada libertada pelos adultos de *D. magna* (OECD, 2008).

Foi medido o comprimento corporal (topo da cabeça até à base do espinho caudal) de dez neonatos, recolhidos da mesma população utilizada para realizar os ensaios, com recurso a uma lupa Leica MS 5, no início de cada ensaio de forma a obter o comprimento médio inicial dos organismos. Posteriormente, os neonatos foram colocados em tubos de ensaio, um indivíduo por tubo, com 15mL de meio e alimentados com *Raphidocelis subcapitata* (3×10^5 cell/mL/daphnia). O meio foi re-suspendido a cada 24h e não existiu renovação do mesmo durante as 72h de duração do ensaio, que decorreu no escuro. Foram realizadas 10 réplicas para o controlo e 7 réplicas por cada concentração de cada HMPAA. Para cada HMPAA foram testadas as seguintes concentrações: 132,6; 172,4; 224; 291; 368,4; 492; 640 mg/L. As

concentrações foram obtidas através da diluição de solução de 2000mg/L de HMPAA em meio ASTM (ASTM 1990).

No final das 72h de exposição o comprimento do corpo de todos os indivíduos expostos ao controlo e às concentrações dos HMPAAs foram medidos (na mesma lupa, lupa Leica MS 5) e, subsequentemente foi calculada a taxa de crescimento somático diário para cada indivíduo.

A taxa de crescimento somático diária (**TCD**) foi calculada com base na seguinte fórmula:

$$\text{TCD} = (\text{TMFi} - \text{TMI})/3$$

Onde, **TMFi** representa o tamanho médio final dos organismos, em mm, na concentração **i** e **TMI** representa o tamanho médio inicial dos neonatos.

VII. Efeitos no tamanho corporal de larvas de *Pelophylax perezi*

No estudo apresentado foram realizados ensaios de crescimento com a espécie de anfíbio *Pelophylax perezi*. Para realizar os ensaios foram recolhidas massas ovos de *P. perezi* numa lagoa de referência, localizada na Quinta da Boavista em Ílhavo, Aveiro. Após a captura, os ovos foram rapidamente transportados para o laboratório, num recipiente de plástico e mantidos no meio artificial Fetax (Dawson & Bantle, 1987). No laboratório os ovos foram limpos da vegetação associada a eles e separados individualmente.

Para o teste de redução do tamanho corporal foram utilizadas placas estéreis de 6 poços, nas quais foram colocados 10 ovos por poço com 15 ml de meio. Para cada HMPAA testada foram utilizados 4 poços para o controlo (meio FETAX), com um total de 40 organismos e 4 poços para cada concentração dos compostos. As concentrações testadas para cada HMPAA foram as seguintes: 368,4; 492; 640; 824,4; 1072; 1393,4; 1811,4; 2000 mg/L. Os tratamentos utilizados foram obtidos através da diluição das suspensões de 2000mg/L em meio Fetax (Dawson & Bantle, 1987).

Após a colocação dos ovos de *Pelophylax perezii* nos poços teste, as placas foram colocadas numa câmara climática a $23 \pm 1^\circ\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas de luz (3000-4000lx) e 8 horas de escuro durante 96h.

Decorridas as 96h de exposição foram descartados todos os indivíduos mortos e fotografados os restantes com recurso a uma lupa Leica MS5 com uma câmara Dino-Eye®, Microscope Eyepiece Camera acoplada. Seguidamente realizaram-se medições de todos os organismos fotografados com recurso ao software Dinocapture 2.0. Após a medição, foi calculada a percentagem de redução do tamanho corporal relativamente ao controlo, através da fórmula:

$$\% \text{inibição} = ((\text{MCC} - \text{MCT}) / \text{MCC}) * 100, \text{ em que}$$

MCC representa a média de crescimento dos organismos no controlo e **MCT** a média de crescimento dos organismos expostos às várias concentrações dos HMPAAs.

VIII. Análise de dados

Para todas as seis variações de HMPAA foram calculadas as concentrações letais (LC_x) e efetivas (EC_x) que provocaram 10%, 20% ou 50% de efeitos nos organismos teste, e os respetivos limites de confiança a 95%, através do ajuste das curvas dose-resposta de acordo com os modelos Probit (Finney, 1997) e logísticos respetivamente. Os cálculos foram efetuados com recurso ao software Statistica 7.0 para Windows. No caso dos dados recolhidos no ensaio com *Vibrio fischeri*, os valores de EC_{20} e EC_{50} foram calculados através do uso do software MicrotoxOmni Azur (AZUR Environmental, 1998).

3. Resultados

I. *Caracterização física dos NMs HMPAA*

Os resultados obtidos da caracterização dos parâmetros físicos, nas concentrações mais altas que foram testadas dos seis HMPAAs (2000mg/L), estão indicados na tabela 2.

De um modo geral, os valores de pH medidos em todas as suspensões dos HMPAAs foram semelhantes e mantiveram-se próximo da neutralidade, variando entre 7,0 e 7,3. Relativamente aos valores de condutividade, estes apresentaram algumas variações quer entre meios quer entre HMPAAs. Os valores de condutividade mais elevados foram registados nas suspensões efetuadas com HMPAA6 (770mS/cm) e HMPAA3 (707mS/cm) em meio ASTM e MBL, respetivamente. Os valores de condutividade mais baixos foram medidos nas suspensões efetuadas em água destilada (valor mínimo 49mS/cm e valor máximo 71mS/cm). O diâmetro hidrodinâmico não apresentou grandes variações entre os seis HMPAAs suspensos em MBL (685-817nm). No entanto, nos restantes meios o intervalo de valores para este parâmetro foi mais alargado: 333 a 2081nm em água destilada, 390 a 839nm em ASPM, 680 a 3353nm em ASTM e 805 a 1649nm em FETAX. Dos seis HMPAAs estudados, nenhum apresentou, de forma consistente, um diâmetro hidrodinâmico maior ou menor relativamente às outras variações. A maioria das suspensões de HMPAAs apresentou valores de potencial zeta que se incluem nas categorias de coagulação e floculação rápidas (≤ 5 mv) e de estabilidade incipiente (10 to 30 mV) (classificação ASTM, 1985). No entanto, é de realçar que o valor medido para a suspensão de HMPAA2 em ASTM foi o único a corresponder a uma categoria de estabilidade excelente (>60 mV) (ASTM, 1985). O HMPAA2 apresentou os valores de índice de polidispersão (PDI) mais altos, acima de 0,7, indicando uma grande amplitude e tamanhos em suspensão. Este HMPAA também apresentou o valor mais baixo de PDI quando suspenso em água destilada, indicando elevada uniformidade de tamanhos na suspensão (Malvern Instruments Limited, 2010). Para as restantes suspensões os valores de PDI variaram entre 0.122 e 0.511, indicando uma distribuição heterogénea de tamanhos nas suspensões. Finalmente, no que respeita à carga de superfície, apresentou-se negativa em praticamente todos os HMPAA quando suspensos nos

vários meios de ensaio, foram apenas observadas as seguintes exceções: HMPAA1 suspenso em ASPM, de HMPAA2 suspenso em MBL, HMPAA4 suspenso em água destilada, HMPAA5 suspenso em ASTM e FETAX e HMPAA6 suspenso em FETAX.

Tabela 2 – Parâmetros físicos medidos na concentração de 2000mg/L de cada HMPAA nos diferentes meios de diluição (MBL, H2O+água destilada, ASPM, ASTM, FETAX). Pdi – Índice de polidispersão.

Tamanho médio (nm)					
	MBL	H2Od	ASPM	ASTM	FETAX
HMPAA1	685	656	839	737	805
HMPAA2	712	333	390	3353	1272
HMPAA3	797	2081	667	1395	1529
HMPAA4	817	1206	717	1196	997
HMPAA5	764	638	678	6801	1083
HMPAA6	787	1411	683	1322	1649
Potencial Zeta (mv)					
HMPAA1	-32,3	-9,1	0,02	-40,8	-0,08
HMPAA2	0,11	-21,3	-24,0	-97,3	-57,5
HMPAA3	-0,0095	-16,6	-38,4	-0,0251	-53,3
HMPAA4	-0,0563	0,0008	-46,0	-0,006	-45,5
HMPAA5	-29,5	-43,7	-25,6	0,06	0,08
HMPAA6	-39	-21,3	-0,02	-46,3	0,02
PDI					
HMPAA1	0,215	0,243	0,282	0,266	0,254
HMPAA2	0,133	0,07	0,723	1	0,897
HMPAA3	0,276	0,419	0,246	0,213	0,511
HMPAA4	0,211	0,25	0,212	0,257	0,232
HMPAA5	0,359	0,149	0,485	0,335	0,386
HMPAA6	0,122	0,195	0,175	0,213	0,232
Condutividade (µS/cm)					
HMPAA1	579	53	348	522	676
HMPAA2	551	49	357	633	307
HMPAA3	707	51	362	686	324
HMPAA4	539	71	332	338	439
HMPAA5	537	54,8	340	662	648
HMPAA6	554	53	347	770	250

Ainda relativamente aos tamanhos dos HMPAAs, na figura 5 é possível observar o seu padrão de distribuição, para cada composto, nos vários meios utilizados nos ensaios. A distribuição de tamanhos mais homogénea, entre os diferentes HMPAAs, foi observada no meio MBL (meio com mais elementos químicos), enquanto a mais heterogénea foi observada no meio água destilada (meio com menos elementos químicos).

De um modo geral as curvas de distribuição de tamanhos apresentaram-se monomodais, com exceções observadas para HMPAA3 suspenso em água destilada e FETAX, HMPAA2 suspenso em ASPM, ASTM e FETAX, e HMPAA6 em ASTM, em que foi observada uma distribuição bimodal.

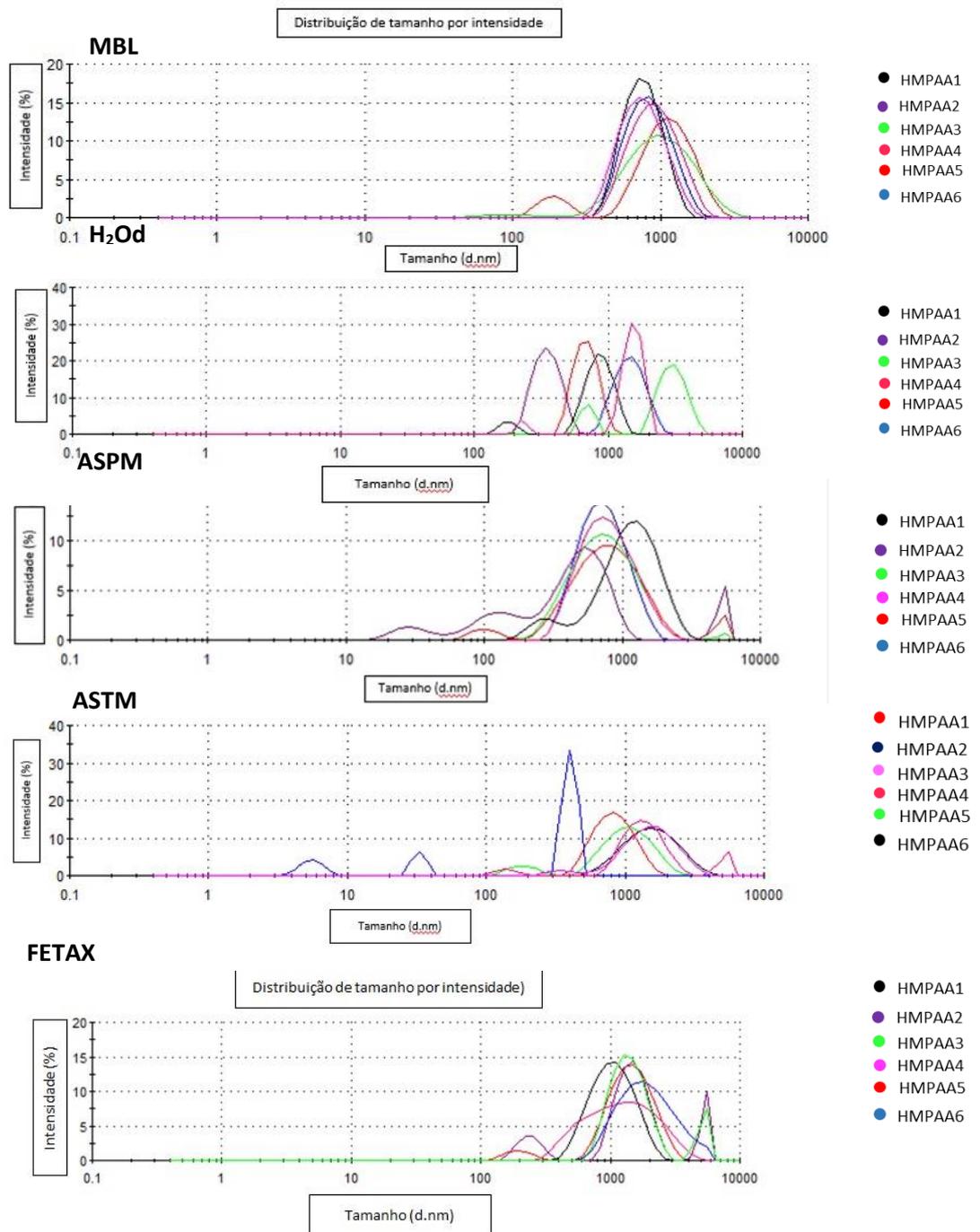


Figura 4 – Distribuição de tamanho dos seis HMPAAs quando suspensos em meio MBL, água destilada-H₂Od, ASPM, ASTM, e FETAX (de cima para baixo).

II. Ensaios ecotoxicológicos com HMPAAs

II.a) *Raphidocelis subcapitata*

As concentrações de HMPAA que provocaram 20% e 50% de inibição no crescimento ($EC_{20,72h}$ e $EC_{50,72h}$) da microalga *R. subcapitata* variaram entre 80 e 360 mg/L e entre 240 e 700 mg/L, respetivamente (Fig. 6).

HMPAA1 foi a variação que provocou maior toxicidade para *R. subcapitata* ($EC_{20,72h}=80$ mg/L e $EC_{50,72h}=200$ mg/L) e os NMs HMPAA 5 e HMPAA 6 os que causaram menor toxicidade para esta microalga ($EC_{20,72h}=360$ mg/L e $EC_{50,72h}=500$ mg/L; HMPAA 5 e $EC_{20,72h}=320$ mg/L e $EC_{50,72h}=500$ mg/L HMPAA 6 respetivamente).

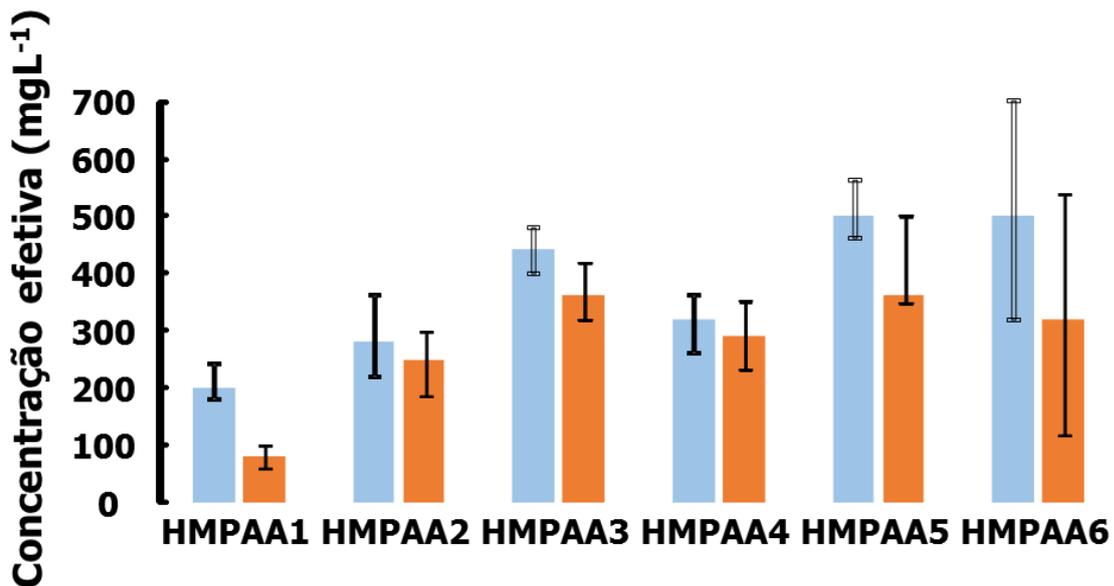


Figura 5 - Valores das concentrações dos seis HMPAAs que provocaram 20% (barras laranja) e 50% (barras azuis) de inibição no crescimento de *Raphidocelis subcapitata*. Barras de erro correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

A variação HMPAA1 apresentou o maior valor do quociente $EC_{50,72h}/EC_{20,72h}$, para *R. subcapitata*, sugerindo que para este composto as concentrações que provocam maior intensidade de efeito (50%) são bastante mais elevadas das que produzem menor efeito (20%). Para os restantes HMPAAs os valores deste quociente variaram entre 1,1 e 1,6, sugerindo uma proximidade maior entre as concentrações que provocam maior e menor intensidade de efeitos (50% e 20%, respetivamente).

Tabela 3- Quociente entre os valores das concentrações que provocam 50% e 20% ($EC_{50,72h}$ e $EC_{20,72h}$, respectivamente) de inibição no crescimento de *Raphidocelis subcapitata*, após serem expostas durante 72h às seis variações de HMPAAs.

NM	$EC_{50,72h}/EC_{20,72h}$
HMPAA1	2,5
HMPAA2	1,1
HMPAA3	1,2
HMPAA4	1,1
HMPAA5	1,4
HMAPP6	1,6

II.b) *Chlorella vulgaris*

As concentrações de HMPAA que provocaram 20% e 50% de inibição de crescimento ($EC_{20,72h}$ e $EC_{50,72h}$) na microalga *C. vulgaris* variaram entre 140 e 1300 mg/L.

A variação HMPAA4 induziu a toxicidade mais elevada ($EC_{20,72h}=140$ mg/L e $EC_{50,72h}=280$ mg/L) enquanto HMPAA5 a toxicidade mais baixa para *Chlorella vulgaris* ($EC_{20,72h}=940$ mg/L e $EC_{50,72h}=1300$ mg/L).

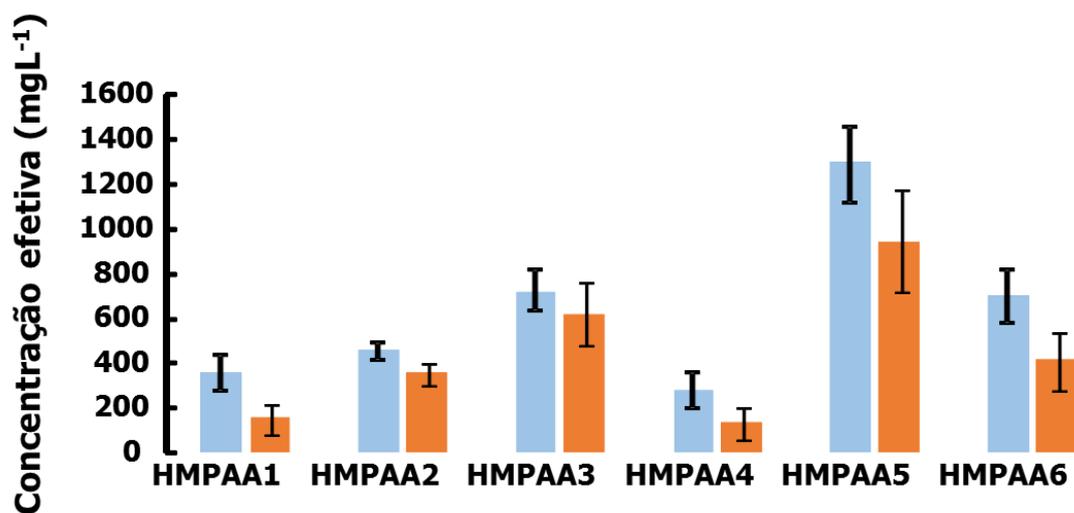


Figura 6 - Valores das concentrações dos seis HMPAAs que provocaram 20% (barras laranja) e 50% (barras azuis) de inibição no crescimento de *Chlorella vulgaris*. Barras de erro correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

Em *C. vulgaris* as variações HMPAA1 e 4 são as que apresentaram maior valor de quociente $EC_{50,72h}/EC_{20,72h}$ (tabela 6), sugerindo que as concentrações que provocaram 50% de efeitos no crescimento de *C. vulgaris* são bastante mais elevadas que as que produzem 20% para estes dois NMs. As restantes variações de HMPAAs apresentaram valores entre 1,2 e 1,4 sugerindo uma proximidade maior entre as concentrações que provocam 50% e 20% de efeitos

Tabela 4 - Quociente entre os valores das concentrações que provocam 50% e 20% ($EC_{50,72h}$ e $EC_{20,72h}$, respetivamente) de inibição no crescimento de *Chlorella vulgaris*, após serem expostas durante 72h às seis variações de HMPAAs.

NM	$EC_{50,72h}/EC_{20,72h}$
HMPAA1	2,3
HMPAA2	1,3
HMPAA3	1,2
HMPAA4	2
HMPAA5	1,4
HMAPP6	1,7

II.c) *Vibrio fischeri*

As concentrações dos diferentes HMPAA que provocaram 20 e 50% de inibição de luminescência para a bactéria *V. fischeri* (Figura 8) variaram entre 0,75 mg/L e 1177,8 mg/L. As variações que provocaram maior toxicidade foram HMPAA1 ($EC_{20,30min}=0,75$ mg/L e $EC_{50,30min}=9,64$ mg/L) e HMPAA2 ($EC_{20,30min}=9,058$ mg/L e $EC_{50,30min}=28,4$ mg/L). HMPAA6 induziu a menor toxicidade ($EC_{20,30min}=224$ mg/L e $EC_{50,30min}=1177,8$ mg/L). De ressaltar que não foi possível o cálculo de valores de $EC_{20,30min}$ e $EC_{50,30min}$ para HMPAA5, o valor de maior efeito observado (*Highest effect concentration) foi de 276,8 mg/L.

Figura 7 - Valores das concentrações dos seis HMPAAs que provocaram 20% (barras laranja) e 50% (barras azuis) de inibição da bioluminescência na bactéria *Vibrio fischeri*. Barras de erro correspondem ao intervalo de confiança a 95%. HEC* – Highest Effect Concentration (maior efeito observado) observada à concentração de 276,8mg/L.



(barras azuis) de inibição da bioluminescência na bactéria *Vibrio fischeri*. Barras de erro correspondem ao intervalo de confiança a 95%. HEC* – Highest Effect Concentration (maior efeito observado) observada à concentração de 276,8mg/L.

Vibrio fischeri é a espécie que demonstra valores mais elevados de quociente EC_{50}/EC_{20} . HMPAA1 é uma vez mais o NM com o valor mais elevado para este parâmetro, sugerindo que para este composto a concentração que provocou 50% de inibição de bioluminescência na bactéria é muito mais elevada que aquela que provoca 20% de efeitos.

Tabela 5 – Quociente entre os valores das concentrações que provocam 50% e 20% ($EC_{50,30min}$ e $EC_{20,30min}$, respectivamente) de inibição de bioluminescência na bactéria *Vibrio fischeri*.

NP	$EC_{50,30min}/EC_{20,30min}$
HMPAA1	12,8
HMPAA2	3,1
HMPAA3	4,8
HMPAA4	3,2
HMPAA5	-
HMAPP6	5,2

II.d) *Brachyonus calyciflorus*

No ensaio de mortalidade com *Brachyonus calyciflorus* (Figura 9) os valores que causaram 50% de mortalidade dos organismos ($LC_{50,24h}$) variaram entre 56,4 mg/L e 905 mg/L, sendo que HMPAA2 ($LC_{50,24h}=56,4$ mg/L) foi o NM mais tóxico para este organismo e HMPAA6 ($LC_{50,24h}=905$) aquele que apresentou menor toxicidade.

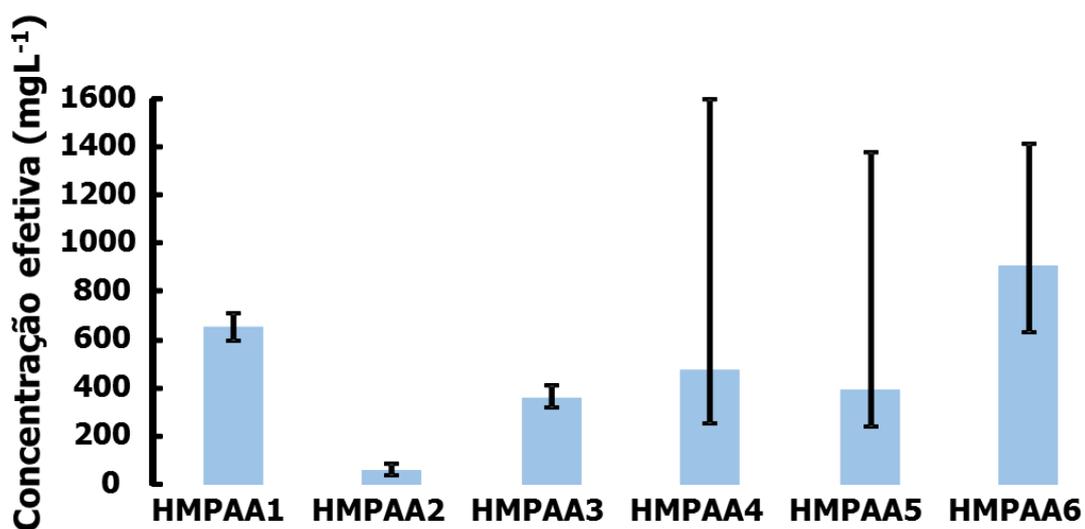


Figura 8 - Valores das concentrações dos seis HMPAAs que provocaram 50% (barras azuis) de mortalidade em *Brachyonus calyciflorus*. Barras de erro correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

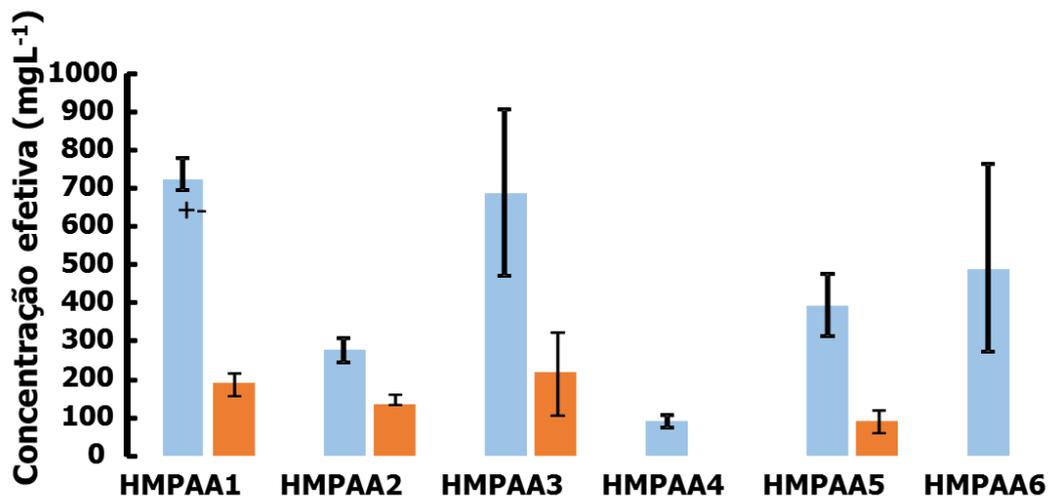
II.e) *Daphnia magna*

As concentrações dos diferentes HMPAA que provocaram 20% e 50% de inibição no crescimento ($EC_{20,72h}$ e $EC_{50,72h}$) do organismo *D. magna* (figura 10) variaram no intervalo de 91 mg/L a 724,8 mg/L.

HMPAA4 foi o NM que apresentou maior toxicidade ($EC_{50,72h}=92,4$ mg/L), seguido de HMPAA2 ($EC_{20,72h}=133,4$ mg/L e $EC_{50,72h}=276,8$ mg/L). HMPAA1 ($EC_{20,72h}=189,4$ mg/L e $EC_{50,72h}=724,8$ mg/L) e HMPAA3 ($EC_{20,72h}=217,4$ mg/L e $EC_{50,72h}=689,8$ mg/L) foram os materiais testados que apresentaram menor toxicidade.

Não foi possível o cálculo dos valores de $EC_{20,72h}$ para HMPAA 4 e HMPAA6, uma vez que as concentrações testadas provocaram sempre efeitos superiores a 20% de inibição no crescimento dos organismos testados nestes dois NMs.

Figura 9 - Valores das concentrações dos seis HMPAAs que provocaram 20% (barras laranja) e 50% (barras azuis) de inibição de crescimento em *Daphnia magna*. Barras de erro correspondem ao intervalo



de confiança a 95%.

A tabela 8 indica que HMPAA5 é o NM com quociente EC₅₀/EC₂₀ mais elevado, enquanto HMPAA2 demonstrou o menor valor para este parâmetro.

Tabela 6 – Quociente entre os valores das concentrações que provocam 50% e 20% (EC_{50,72h} e EC_{20,72h}, respetivamente) de inibição de crescimento em *Daphnia magna*.

NP	EC_{50,72h}/EC_{20,72h}
HMPAA1	3,8
HMPAA2	2,1
HMPAA3	3,2
HMPAA4	-
HMPAA5	4,3
HMAPP6	-

II.f) *Pelophylax perezii*

Para o organismo *Pelophylax perezii* não são apresentados valores de EC_{50} uma vez que a concentração mais alta testada (2000mg/L) não foi suficiente para causar 50% de inibição no crescimento corporal dos organismos, optando-se assim pelo cálculo de valores de $EC_{10,96h}$ (correspondente à concentração mais alta que não produz efeito significativo) e $EC_{20,96h}$ (correspondente à concentração mais baixa que produz efeito significativo).

As concentrações de HMPAA que provocaram 10% ($EC_{10,96h}$) e 20% ($EC_{20,96h}$) de efeitos no crescimento de *P. perezii* (figura 11) variaram entre 313 mg/L e 2000 mg/L. Os NMs que evidenciaram maior toxicidade para este organismo foram HMPAA3 ($EC_{10,96h}=313$ mg/L e $EC_{20,96h}=651,2$ mg/L) e HMPAA5 ($EC_{10,96h}=504,4$ mg/L e $EC_{20,96h}=697$ mg/L), contrariamente HMPAA1 ($EC_{10,96h}=1134$ mg/L e $EC_{20,96h}=2000$ mg/L) é aquele que apresenta menor toxicidade.

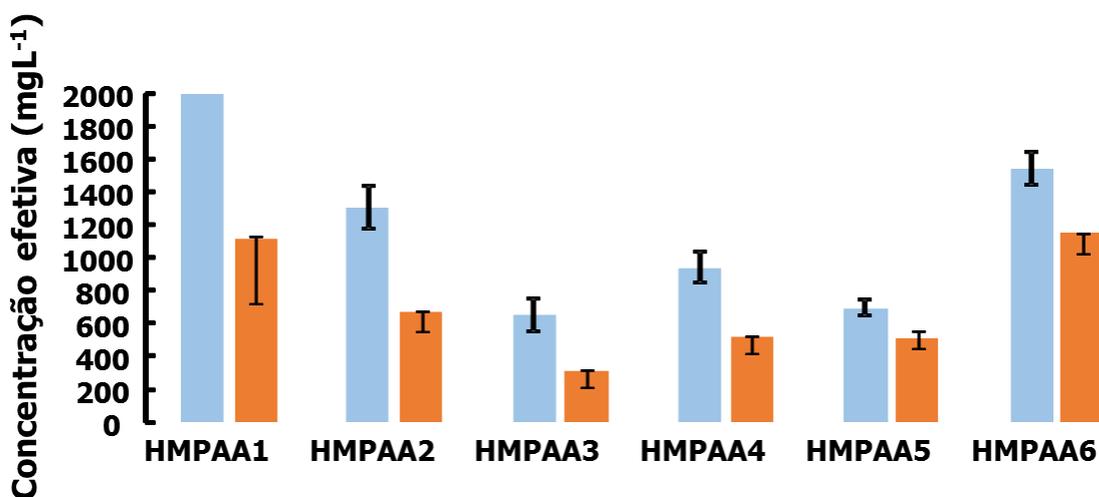


Figura 10 - Valores das concentrações dos seis HMPAAs que provocaram 10% (barras laranja) e 20% (barras azuis) de inibição de crescimento corporal em *Pelophylax perezii*. Barras de erro correspondem ao intervalo de confiança a 95%.

Os resultados da tabela 9 indicam que HMPAA5 e HMPAA6 são os HMPAAs com menor quociente $EC_{20,96h}/EC_{10,96h}$. Os restantes apresentam valores entre 1,8 e 2.

Tabela 7 - Quociente entre os valores das concentrações que provocam 50% e 20% ($EC_{50,72h}$ e $EC_{20,72h}$, respetivamente) de inibição de crescimento corporal em *Pelophylax perezii*.

NP	$EC_{20,96h}/EC_{10,96h}$
HMPAA1	1,8
HMPAA2	1,9
HMPAA3	2
HMPAA4	1,8
HMPAA5	1,4
HMAPP6	1,3

A tabela 10 mostra a ordem de toxicidades dos diferentes HMPAA para as diferentes espécies testadas.

De um modo geral, os NMs HMPAA 5 (já comercializado) e HMPAA6 apresentaram menor toxicidade para as espécies testadas, com exceção de *D. magna* e *P. perezi*. Em oposição, a variação HMPAA2 foi a que apresentou uma das toxicidades mais elevadas para as espécies testadas, com exceção de *P. perezi*.

Verificou-se que os organismos unicelulares (*R. subcapitata*, *C. vulgaris* e *V. fischeri*) apresentaram uma elevada sensibilidade à variação HMPAA1, enquanto os pluricelulares apresentaram uma maior tolerância a este composto (*B. calyciflorus*, *D. magna* e *P. perezi*).

Tabela 8 - Ordem de toxicidades relativas das seis variações de HMPAA para as seis espécies estudadas.

<i>R. subcapitata</i> (EC ₅₀)	<i>C. vulgaris</i> (EC ₅₀)	<i>V. fischeri</i> (EC ₅₀)	<i>B. calyciflorus</i> (LC ₅₀)	<i>D. magna</i> (EC ₅₀)	<i>P. perezi</i> (EC ₂₀)
HMPAA1	HMPAA4	HMPAA1	HMPAA2	HMPAA4	HMPAA3
HMPAA2	HMPAA 1	HMPAA2	HMPAA3	HMPAA2	HMPAA5
HMPAA4	HMPAA2	HMPAA3	HMPAA5	HMPAA5	HMPAA4
HMPAA3	HMPAA3	HMPAA4	HMPAA4	HMPAA6	HMPAA2
HMPAA5/H MPAA6	HMPAA6	HMPAA5	HMPAA1	HMPAA3	HMPAA6
HMPAA5/H MPAA6	HMPAA5	HMPAA6	HMPAA6	HMPAA1	HMPAA1



4. Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que a alteração da estrutura do ácido poliacrílico hidrofobicamente modificado HMPAA5 altera também as suas propriedades físicas quando em suspensões aquosas. No entanto, não foi encontrado um padrão consistente na associação entre alteração nas conformações estruturais (aumento das ligações reticuladas, aumento dos grupos hidrofóbicos à superfície, alteração de forma) e a alteração nos parâmetros físicos, *id est*, por exemplo com um aumento da malha reticulada ou grupos hidrofóbicos à superfície não ocorreu um aumento ou diminuição gradual e sistemática do tamanho dos NMs. Na literatura científica já existem outros artigos publicados que referem a ausência de um padrão coerente entre as alterações conformacionais em NM e as alterações em algumas das suas propriedades físicas quando em suspensões aquosas. Por exemplo, Afrooz *et al.* (2012) observaram que a forma de nanopartículas de ouro, esferas (Au-NE) e bastonete (Au-NB), influenciavam a sua estabilidade, sendo a conformação em bastonete mais estável em suspensões aquosas, no entanto, a forma não influenciou do mesmo modo os tamanhos das nanopartículas, que se apresentaram semelhantes (AuNE=520nm e AUNB=518nm). Estes resultados sugerem que provavelmente existem outras forças de interação e processos a determinar o comportamento dos NM em suspensão; quer entre as partículas de NMs, quer entre as partículas e os vários elementos (ex. Na⁺, Ca²⁺) presentes em solução.

Resultados similares foram observados relativamente à associação entre as alterações nos parâmetros físicos das suspensões dos HMPAAs nos diferentes meios, em que também não foi observado um padrão consistente nas alterações observadas. Estar-se-ia à espera que em meios com maior força iónica, como o caso do MBL, ocorresse uma maior agregação de todos os HMPAAs. A agregação dos NMs é controlada pelo balanço das forças eletrostáticas repulsivas entre a camada dupla eléctrica dos NMs e as forças van der Waals (atractivas). Uma maior força iónica promove uma redução da camada eléctrica dupla à superfície dos NMs, diminuindo as forças electrostáticas repulsivas entre eles e aumentando a probabilidade de ocorrer agregação (Suttiponparnit *et al.*, 2011). No entanto, os HMPAAs apresentaram um dos

menores tamanhos no meio MBL. Na literatura científica existem exemplos de NMs cujos tamanhos em suspensões aquosas aumentam com a força iónica do meio, mas também de NMs cujos tamanhos não se alteram com o aumento da força iónica do meio. Enquanto Lopes *et al.* (2012) reportaram um maior tamanho de NMs de TiO₂ em suspensões em meio ASTM (maior força iónica) relativamente aos mesmos NMs em suspensões em água destilada (meio com menor força iónica), Suttiponparnit *et al.* (2011) referiram que o aumento da força iónica do meio conduziu à formação de agregados de NMs TiO₂ e ao aumento do seu tamanho hidrodinâmico; Pottier *et al.* (2003) não observaram alteração do tamanho de NMs de TiO₂ em meios com maior força iónica e Lopes *et al.* (2012) verificaram que os tamanhos de vários tipos de NMs (inorgânicos e orgânicos) eram semelhantes quando suspensos em ASTM (maior força iónica) e em água Milli Q (menor força iónica). Mais ainda, com o aumento da força iónica seria também expectável uma diminuição do potencial zeta, uma vez que a dupla camada eléctrica à superfície dos NMs tende a reduzir. No entanto, os resultados observados neste trabalho, uma vez mais, não refletem esta hipótese. Por exemplo, HMPAA3 e HMPAA4, quando suspensos em MBL, apresentam valores de potencial zeta de -0,0095 e -0,0563mV, respetivamente; mas, quando suspensos em ASPM apresentam valores de -38,4 e -46,0mV. Esta variabilidade nos resultados, corroboram a hipótese de que provavelmente existem outros processos que têm uma maior influência no comportamento destas NMs quando em suspensões aquosas. Por exemplo, Suttiponparnit *et al.* (2011) refere que um eletrólito pode gerar iões que podem ser absorvidos pelos NMs influenciando as suas propriedades de dispersão/agregação. De acordo com esta hipótese, por exemplo, a composição do meio MBL, rica em diversos iões principalmente Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺, K⁺, Cu²⁺, pode ter influenciado fortemente os resultados que foram observados devido a características inerentes dos NMs HMPAA que podem causar maior ou menor afinidade para estes iões.

Relativamente aos resultados ecotoxicológicos, esperar-se-ia que a carga de superfície dos NMs de HMPAA testados apresentasse uma grande influência na sua toxicidade para os diferentes organismos. Isto porque vários trabalhos na literatura já reportaram que NMs catiónicos são de um modo geral mais tóxicos para o biota do que NMs aniónicas. Por exemplo, Badawy *et al.* (2010) observou que nanopartículas de

prata com carga negativa exerciam menor toxicidade letal e sublethal (medida com base no consumo de oxigénio) para uma bactéria do Género *Bacillus* do que as que apresentavam carga positiva. Estes autores avançaram a hipótese de que a carga negativa das nanopartículas interage de forma repulsiva com a membrana celular dos organismos formando uma barreira electroestática reduzindo, assim, a sua absorção, internalização e subsequente toxicidade. Ainda, Goodman *et al.* (2004) demonstraram que nanopartículas de aglomerados catiónicos de arquitectura mista em monocamadas apresentaram maior citotoxicidade do que os seus correspondentes aniónicos. Estes autores observaram também que as primeiras nanopartículas provocavam mais facilmente a disrupção de vesículas aniónicas de fosfatidilcolina/fosfatidulserina devido às interações fortes que ocorriam com a camada bilipídica carregada negativamente.

No entanto, no presente trabalho as variações das HMPAAs que apresentaram carga positiva não apresentaram consistentemente uma maior toxicidade, nem quando comparando a toxicidade de uma mesma variação para as diferentes espécies nem quando comparando diferentes variações para uma mesma espécie. Por exemplo, HMPAA6 só apresentou carga positiva quando suspensa em FETAX. No entanto, foi a variação a apresentar uma das menores toxicidades para *P. perezi* e os valores de ECs registados para esta espécie exposta a HMPAA6 foram dos mais elevados comparativamente aos registados para as outras espécies (>1000 mg/L). Assim, no caso específico das variações de HMPAA estudadas a carga de superfície parece não apresentar uma elevada influência na sua toxicidade.

O tamanho das NMs parece também não ter sido um factor determinante na toxicidade observada para cada variação de HMPAA. Vários trabalhos publicados na literatura científica reportam que nanomateriais, de um mesmo composto, de menor tamanho provocam maior toxicidade para o biota. Por exemplo, Pan *et al.* (2007) descreveu que nanopartículas de ouro com tamanhos de 1.4nm apresentaram valores de EC₅₀, para 4 linhas celulares, entre 30 a 56µM, enquanto nanopartículas de ouro com tamanho de 15nm não apresentaram toxicidade para as mesmas linhas celulares a concentrações entre 60 a 100 vezes superiores estes valores de EC₅₀. No presente trabalho, este padrão de menor tamanho-maior toxicidade não foi observado. A título de exemplo, HMPAA2 apesar de ter apresentado tamanhos médios de 333 e 3353nm,

em água destilada e ASTM, em ambos os casos foi a segunda variação mais tóxica para as espécies testadas.

Ao contrário do exposto para os fatores carga de superfície e tamanho, é sugerido que as diferentes variações na conformação dos HMPAAs foram o fator mais importante na determinação da sua toxicidade, que pode ter determinado quer diferentes modos de ingestão/incorporação por parte do biota, quer a sua degradação/metabolização por parte dos organismos.

No caso de HMPAA1, em que se aumentou a conformação para semi-densa relativamente a HMPAA5 verificou-se que para organismos unicelulares (*R. subcapitata*, *C. vulgaris* e *V. fischeri*) este aumento de densidade da matriz provocou um aumento de toxicidade do NM. No entanto, para organismos pluricelulares e mais complexos (*B. calyciflorus*, *D. magna*, *P. perezi*), ocorreu uma diminuição da toxicidade. Este resultado pode estar relacionado com a internalização dos NMs pelos diferentes organismos. Matrizes mais densas podem favorecer interações intra-NM HMPAA criando maior estabilidade dos NMs em solução (Antunes *et al.*, 2011). Assim a agregação das mesmas torna-se mais difícil uma vez que forças intra-NM podem superar as inter-NM (Antunes *et al.*, 2011), o que explicaria a maior toxicidade de HMPAA1 para organismos unicelulares. Para organismos pluricelulares mais complexos a incorporação de agregados de NMs continua a acontecer facilmente por ingestão, não sendo esse um fator tão limitante (Bergin *et al.*, 2013), explicando a maior toxicidade de HMPAA5 para estes organismos. Mais ainda, a presença de órgãos nos organismos pluricelulares pode ter promovido a metabolização do HMPAA5 alterando a sua toxicidade. Esta variação de HMPAA, também foi a que apresentou para maioria das espécies testadas um quociente EC_{50}/EC_{20} maior, sugerindo modos de ação diferentes das outras variações. No caso de HMPAA4, em que a conformação passou a densa, de um modo geral a sua toxicidade também foi superior (ou semelhante no caso de *B. calyciflorus* e *P. perezi*) à de HMPAA5, o que pode ser devido ao exposto anteriormente para HMPAA1.

No caso de HMPAA2, a forma do NM foi alterada relativamente à de HMPAA5, i.e. de forma esférica passou a forma globular alongada. Esta alteração, com exceção do caso de *Pelophylax perezi*, provocou um aumento de toxicidade relativamente a HMPAA5. A forma não esférica de HMPAA2 pode explicar a sua maior toxicidade.

Vários autores já sugeriram na literatura científica que a forma dos NMs pode, em diversos casos, ter maior influência sobre a sua toxicidade que outros fatores como por exemplo o tamanho (Ispas *et al.*, 2009; Afrooz *et al.*, 2012). Afrooz *et al.* (2012) sugeriram que nanopartículas de ouro com forma de bastonete seriam mais tóxicas para o ambiente que nanopartículas de ouro com forma esférica. Mais ainda, nanopartículas de níquel com forma de dendrímeros foram também apontadas como mais tóxicas do que nanopartículas do mesmo material com forma esférica (Ispas *et al.*, 2009). No entanto, a presença de cadeias alifáticas curtas que podem apresentar-se tanto à superfície como interior de HMPAA2 poderia também ser a causa da alteração de toxicidade observada relativamente a HMPAA5. No entanto, no caso de HMPAA6 estas cadeias alifáticas curtas também ocorrem à superfície do NM, e neste caso apresentou sempre menor toxicidade que HMPAA5. Deste modo, é sugerido que a presença destas cadeias alifáticas curtas na superfície de HMPAA2 não terá sido determinante no aumento de toxicidade.

Comparando a estrutura de HMPAA5 e HMPAA6, foi observado que a mudança da posição dos grupos hidrofóbicos, com cadeias alifáticas de grandes e pequenas dimensões, do interior para a superfície do NM (i.e. de HMPAA5 para HMPAA6), provocou um decréscimo ou manteve a toxicidade destas NMs em todos os organismos com exceção de *C. vulgaris* para a qual HMPAA6 demonstrou maior toxicidade que HMPAA5. É sugerido que a presença destes grupos hidrofóbicos à superfície dos NMs possa limitar o número de locais disponíveis no NM para se ligar a recetores das membranas biológicas. Mais ainda, estes grupos hidrofóbicos podem também apresentar menor afinidade para se ligarem às membranas celulares, diminuindo assim a incorporação destes NM pelos organismos e subseqüentemente diminuindo a sua toxicidade.

Finalmente, os valores mais baixos de EC₅₀ registados para cada variação de HMPAA foram os seguintes: 9,64mg/L (em *V. fisheri*) para HMPAA1; 28,4 mg/L (em *V.* para HMPAA2; 96,6mg/L (em *V. fisheri*) para HMPAA3; 92,4mg/L (em *D. magna*) para HMPAA4; 276,8mg/L (em *V. fisheri*) para HMPAA5, e 491,2mg/L (em *D. magna*) para HMPAA6. Deste modo, e de acordo com a classificação estabelecida pela Norma 93/67/EEC (Anexo 1) da Comissão Europeia para substâncias químicas (“Extremamente tóxica” se E(L)C₅₀ < 0,1mg/L; “Muito tóxica” se E(L)C₅₀ entre 0,1-1mg/L; “Tóxica” se

E(L)C₅₀ entre 1-10mg/L; “Prejudicial” se E(L)C₅₀ entre 10-100mg/L, e “Não tóxica” se E(L)C₅₀ > 100mg/L) a variação HMPAA1 é considerada “Tóxica”, as variações HMPAA2 a HMPAA4 “Prejudiciais” e as variações HMPAA5 e HMPAA6 “Não tóxicas”. Com base nestes resultados, é sugerido que as diferentes conformações estruturais de cada variação influenciam a sua toxicidade. Mais ainda, o facto de se terem observado diferentes valores para os quocientes EC₅₀/EC₂₀ entres as variações de HMPAA e entre as espécies para uma mesma variação de HMPAA evidencia diferentes mecanismos de ação destes NMs.

5. Conclusões

Com base nos resultados de toxicidade obtidos para as seis variações de HMPAA estudadas, em que a variação comercializada HMPAA5 e HMPAA6 apresentaram-se como não tóxicas, e no facto de que HMPAA5 ter sido uma das variações menos tóxicas para as espécies unicelulares e uma das mais tóxicas para as espécies pluricelulares, enquanto HMPAA6, de uma forma mais consistente, ter sido uma das variações menos tóxicas para todas as espécies testadas, é sugerido que esta última seja estudada relativamente à sua eficácia no espessamento de matrizes líquidas de modo a poder ser proposta para substituir a variação comercializada HMPAA5. Mais ainda, de modo a promover a seleção da variação que efetivamente provocará menor risco para o biota, é importante proceder a mais estudos no sentido de compreender qual a variação que apresenta maior biodegradação e qual a toxicidade dos produtos resultantes da degradação de cada uma destas variações.

Bibliografia

Afrooza A.R.M.N., Sean T. Sivalapalanb S. T., Murphyb C. J., M. Hussainc S. M., Schlagerd J. J., B. Saleha N. B., 2012, Spheres vs. rods: The shape of gold nanoparticles influences aggregation and deposition behaviour, *Chemosphere*, 91, 93-98.

Antunes F., Alves L., Duarte C., Lindman B., Klotz B., Bottcher A., and Haake H., 2011, Ionization by pH and Anionic Surfactant Binding Gives the Same Thickening Effects of Crosslinked Polyacrylic Acid Derivatives, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 33:9, 1368-1372.

Aruoja V., Dubourguier H., Kasemes K., Kahru A., 2008, Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Science of The Total Environment*, 407, 1461-1468

American Society for testing and Materials (ASTM), 2006 International, Standard Terminology Relating to Nanotechnology.

American Society for testing and Materials (ASTM), 1980. Standard practice for conducting acute toxicity tests with fishes, macroinvertebrates and amphibians. Philadelphia, P.A, American Standards for testing and Materials.

American Society for testing and Materials (ASTM) (1985) Methods of test for zeta potential of colloids in water and waste water, D4187-82, Philadelphia.

ASTM, Standard Guide for Acute Toxicity Test with the Rotifer *Brachionus*, E1440-91, 1998

AZUR Environmental, Microtox® Omni Manual. Carlsbad, CA, USA, 1998.

AZUR Environmental, Microtox® Toxicity test, 1998, <http://www.leederconsulting.com/pdf/microtox.pdf>, acedido a 20/05/2014

Badawy A. M. El., Silva R. G., Morris B., Sheckel K. G., Suidan M. T., Tolayma T. M., 2010, Surface Charge-Dependent Toxicity of Silver Nanoparticles, *Environ. Sci. Technol.*, 45 (1),283–287

Bard S.M., *Ecotoxicology: The focal Topics*, 2008, *Encyclopedia of Ecology*, Jorgensen, S.E., 1194-1195

Barnes R. S. K., Mann H., 1991, second Edition, *Fundamentals of Aquatic Ecology*, R. S. K. Barnes, K. H. Mann, John Wiley and Sons, Oxford, London

Bellinger E. G., Sigee D. C., 2012, Freshwater Algae: Identification and Use as Bioindicators, *Journal of Applied Phycology*, 25, 1265-1266

Bergin I. L., Witzmann F. A., 2013, Nanoparticle toxicity by the gastrointestinal route: evidence and knowledge gaps, *Int J Biomed Nanosci Nanotechnol*, 3, 163–210

Bour A., Mouchet F., Verneuil L., Evariste L., Silvestre J., Pinelli E., Gauthier L., 2014, Toxicity of CeO₂ nanoparticles at different trophic levels – Effects on diatoms, chironomids and amphibians, *Chemosphere*, 120, 230–236

Bystrzejewska-Piotrowska G., Golimowski J., 2009, Urban P. L., Nanoparticles: Their Potential Toxicity, *Waste and Environmental Management, Waste Management*, 29, 2587–2595

Chakraborty L. B., 2009, Effects of Man-made Nanoparticles on the Aquatic Biosphere, *Master Studies in Environmental Sciences*, 25

Clément L., Hurel C., Marmier N., 2012, Toxicity of TiO₂ nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants – Effects of size and crystalline structure, *Chemosphere*, 90, 1083–1090

Colvin V. L., 2003, The Potential Environmental Impact of Engineered Nanoparticles, *Nature Biotechnology* 21, 1166 - 1170

Dawson D., A., Bantle J., A., Development of a reconstituted water medium and preliminary validation of the frog embryo teratogenesis assay—*Xenopus* (FETAX), 1987, *Journal of Applied Toxicology*, 7, 237-244

Duarte C., 2011, Caracterização Químico-Física de Novos Polímeros Estabilizantes para Formulações da Indústria de Cosméticos, Tese de Mestrado em Química, Departamento de Química, FCTUC, 103.

Eckelman M. J., Mauter M. S., Isaacs J. A., and Elimelech M., 2012, New Perspectives on Nanomaterial Aquatic Ecotoxicity: Production Impacts Exceed Direct Exposure Impacts for Carbon Nanotubes, *Environ. Sci. Technol.*, 46, 2902–2910

EC, Environment Canada, 1992. Biological Test Method: Growth Inhibition Test Using the Freshwater Alga *Selenastrum capricornutum*. Report EPS 1/RM/25, Environment Canada, Ottawa, ON, Canada, 53

European Commission, Communication from the Commission to the European Parliament, the Council and the European Economic and Social Committee on the Second Regulatory Review on Nanomaterials 2011, Brussels.

European Community, 2011. Recommendation on the definition of a nanomaterial (2011/696/EU). Off. J. Eur. Communities.

Finney, D.J., 1971. Probit Analysis, third ed. Cambridge Univ., Press, 32 E. 57th St., New York, Ny.

Goodman C, McCusker C, Yilmaz T, Rotello V, 2004, Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. Bioconjug Chem. 15, 897-900.

Gonçalves S. F., Calado R., Gomes N. C. M., Soares, A. M. V. M., Loureiro S., 2013, An ecotoxicological analysis of the sediment quality in a European Atlantic harbor emphasizes the current limitations of the Water Framework Directive, Marine Pollution Bulletin, 72, 197–204

Guo X., Abdala A. A., May B. L., Lincoln S. F., Khan S. A., Prud'homme R. K., 2006, Rheology control by modulating hydrophobic and inclusion associations in modified poly(acrylic acid) solutions, Polymer 47, 2976–2983

Heinlaan M., Ivask A., Blinova I., Dubourguier H. C., Kahru A., 2008, Toxicity of Nanosized and Bulk ZnO, CuO and TiO₂ to Bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*, Chemosphere, 71, 1308–1316

Hu X., Cook S., Wang P., Hwang H., 2009, In Vitro Evaluation of Cytotoxicity of Engineered Metal Oxide Nanoparticles, Science of The Total Environment, 407, 3070–3072

ISO 22412:2008(en), Particle size analysis — Dynamic light scattering (DLS). <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:22412:ed-1:v1:en> , acedido a 23/10/2014

Ispas C., Andreescu D., Patel A., Goia D., V., Andreescu S., Wallace K. N., 2009, Toxicity and Developmental Defects of Different Sizes and Shape Nickel Nanoparticles in Zebrafish, Environ. Sci. Technol., 43, 6349–6356

Kahru A., Dubourguier H. C., 2009, From Ecotoxicology to Nanoecotoxicology, Toxicology, 269, 105–119

Krysanov E., D. S. Pavlov, T. B. Demidova, and Yu. Yu. Dgebuadze, 2009, Effect of Nanoparticles on Aquatic Organisms, Biology Bulletin, 37, 406-412

Lefcort H., Meguire R. A., Wilson L. H., Ettinger W. F., 1998, Heavy Metals Alter the Survival, Growth, Metamorphosis, and Antipredatory Behavior of Columbia Spotted Frog (*Rana luteiventris*) Tadpoles, Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 35, 447-456.

Malvern Instruments Limited, Dynamic light scattering common terms defined, 2010, <http://www.malvern.com/en/products/technology/dynamic-light-scattering/> acedido a 02/11/2014

Meikle J L., 1997, American Plastic: A Cultural History, Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey, 290

Minetto D., Libralato G., Volpi Ghirardini A. V., 2014, Ecotoxicity of engineered TiO₂ nanoparticles to saltwater organisms: An overview, *Environment International* 66, 18–27

Mortimer M., Kasemets K., Heinlaan M., Kurvet I., Kahru A., 2008, High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles, *Toxicology in Vitro*, 22, 1412–1417

Muna L., Guido P., Colin J., Wim D.C., Karl S., 1995, Toxicity Evaluations of Wastewaters in Austria with Conventional and Cost-Effective Bioassays, *Ecotoxicology and Environmental Safety* 32, 139–146

nanoComposix, Zeta Potential Analysis Of Nanoparticles, 2012, Malvern Instruments, https://cdn.shopify.com/s/files/1/0257/8237/files/nanoComposix_Guidelines_for_Zeta_Potential_Analysis_of_Nanoparticles.pdf , acedido a 15/10/2014

Newman M.C., Zhao Y., 2008, Ecotoxicology Nomenclature: LC, LD, LOC, LOEC, MAC. In: Jorgensen, S.E., Fath, B, *Encyclopedia of Ecology*, Amsterdam, Netherlands, Elsevier, 1187-1193

Nowack B., Bucheli T.D., 2007, Occurrence, Behavior and Effects of Nanoparticles in the Environment, *Environmental Pollution*, 150, 5–22

Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J., 2005. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles, *Environmental Health Perspectives*, 113, 7

OECD (Organization for Economic Co-Operation and Development), 2006. Freshwater Alga and Cyanobacteria Growth Inhibition Test. OECD Guideline for Testing of Chemicals 201, Paris, France.

OECD (2008), Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2, OECD Publishing.

Ostiguy C., Soucy B., Lapointe G., Woods C., Ménard L., Trottier M., 2008, Health Effects of Nanoparticles - Second Edition, , IRRST, Quebec, Canada, 89.

Oukarroum A., Perreault F., Radovan Popovic R., 2011, Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 78, 80–85

Pal S., Tak Y.K., Song J.M., 2007, Does the Antibacterial Activity of Silver Nanoparticles Depend on the Shape of the Nanoparticle? A Study of the Gram-Negative Bacterium *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 1712-1720

Pan Y., Neuss S., Leifert A., Fischler M., Wen F., Simon U., Schmid G., Brandau W., Jahnen-Dechent W., 2007, Size-Dependent Cytotoxicity of Gold Nanoparticles. *Small*, 3, 1941-1949.

Parvez S., Venkataraman C., Mukherji S., 2006, A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environment International*, 32, 265–26

Paschoalino M. P., Marcone G. P. S., and Jardim W. F., 2010, Os Nanomateriais e a Questão Ambiental, *Quím. Nova*, São Paulo, 33, nº2

Petosa A., Quevedo I., R., Elimelech M., Tufenkji N., 2010, Aggregation and Deposition of Engineered Nanomaterials in Aquatic Environments: Role of Physicochemical Interactions, *Environ. Sci. Technol*, 44, 6532–6549

Pottier A, Cassaignon S, Chane´ac C, Villain F, Tronc E, Jolivet J-P (2003) Size tailoring of TiO₂ anatase nanoparticles in aqueous medium and synthesis of nanocomposites. Characterization by Raman spectroscopy. *J Chem Mat* 13, 877–882

Preuss T. G., Hammers-Wirtz M., Hommen U., Rubach M., N., 2009, Development and validation of an individual based *Daphnia magna* population model: The influence of crowding on population dynamics, *Ecological Modelling* 220, 310–329

Rocha L, Rodrigues S. M., Lopes I., Soares A.M.V.M., Duarte A.C., Pereira E., 2011, The water-soluble fraction of potentially toxic elements in contaminated soils: Relationships between ecotoxicity, solubility and geochemical reactivity, *Chemosphere*, 84, 1495–1505

Rossetto A. L. O. F., Melegari S., P., Ouriques C. L., Matias W., G., 2014, Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*,

ROTOXKIT FTM 24h Acute and 48h Short-Chronic, MicroBioTests Inc. - Kleimoer 15 - 9030 Mariakerke (Gent) – Belgium.

Salvaterra T., Alves M. G., Domingues I., Pereira R., Rasteiro M. G., Carvalho R. A., Soares A.M.V.M., Lopes I., 2012, Biochemical and metabolic effects of a short-term

exposure to nanoparticles of titanium silicate in tadpoles of *Pelophylax perezii* (Seoane), *Aquatic Toxicology*, 128–129, 190–192

Saria R., Mouchet F., Perrault A., Flahaut E., Laplanche C., Boutonnet J., Pinelli E., Gauthier L., 2014, Short term exposure to multi-walled carbon nanotubes induce oxidative stress and DNA damage in *Xenopus laevis* tadpoles, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 107, 22–29

Saunders B.R., and Vincent B., 2002, *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*; Ponisseril Somasundaran, Marcel Dekker, New York, 5, 698

Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR), 2006, The Appropriateness of Existing Methodologies to Assess the Potential Risks Associated with Engineered and Adventitious Products of Nanotechnologies, European Commission Health and Consumer Protection, 79

Shayestehfar A., Soleimani M., Mousavi S.N., Shirazi F., 2008, Ecological study of rotifers from Kor river, Fars, Iran, *J Environ Biol*, 29, 715–20

Sharei A., J Zoldan J., Adamo A., Sim Y. W., Cho N., Jackson E., Mao S., Schneider S., Lytton-Jean A., Basto P., Jhunjhunwala S., Lee J., Heller D., Kang J., Langer R., Jensen K., 2013. A vector-free microfluidic platform for intracellular delivery, *PNAS*, 110, 2082–2087

Simón-Vázquez R., Peleteiro M., Lzano T., González-Fernández A., 2012, *Nanobiotechnology, Inorganic Nanoparticles vs Organic Nanoparticles*, volume 4, 443–474,

Stein J., 1973, *Handbook of physiological methods Culture Methods and Growth Measurements*, Cambridge University Press, London, UK, 446

Strigul N., Vaccari L., Galdun C., Wazne M., Liu X., Christodoulatos C., Jasinkiewicz K., 2008, Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminium nanoparticles to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*, *Desalination* 248, 771–782

Suarez I. J., Rosal R., Rodriguez A., Ucles A., Fernandez-Alba A. R., Hernando M. D., García-Calvo E., 2011, Chemical and ecotoxicological assessment of poly(amidoamine) dendrimers in the aquatic environment, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 30, 492–

Suttiponparnit K., Jiang J., Sahu M., Suvachittanont S., Charinpanitkul T., Biswas P., 2011, Role of Surface Area, Primary Particle Size, and Crystal Phase on Titanium Dioxide Nanoparticle Dispersion Properties, *Nanoscale Res Lett*, 6, 27

Takeda H.H., Fernandes T.F., 2010, *Nanotecnologia: Uma Breve História e Algumas Aplicações*, *Ciências e Tecnologia de Ariquemes*, 1, No 1

- Taniguchi N., 1974, On the Basic Concept of Nanotechnology, Proc. ICBP Tokyo.
- Snell T. and Hicks D, 2009 Assessing toxicity of nanoparticles using *Brachionus manjavacas*(Rotifera), *Environ Toxicol.* 26, 146-52
- Tian X, Ning L, Nel E. A., 2009, Potential Health Impact of Nanoparticles, *Public Health* 30, 137-150
- USEPA (United States Environmental Protection Agency), 1994. Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms. EPA 600/7-91-002. Washington, DC, EUA.
- Valsami-Jones E., Handy R. D., Owen R., 2008, The Ecotoxicology of Nanoparticles and Nanomaterials: Current status, Knowledge gaps, Challenges, and Future needs, *Ecotoxicology*, 17, 315-25
- Walker C. H., Sibly R. M., Hopkin S. P. , D.B. Peakall D. B., 2012, Principles of Ecotoxicology, Fourth Edition, CRC Press, Fourth Edition, Taylor and Francis Group, Usa
- Wells G., Lee K., Blaise C., Férard J., F, 1998., testing in Aquatic Toxicology: a review advances techniques and practice, CRC Press LCL, USA
- Woodrow Wilson International Center for Scholars, Washington DC, Nanotechnol. Consum. Products Inventory, 2008, <http://www.nanotechproject.org/cpi/>, acedido a 16/05/2014
- Woodrow Wilson International Center for Scholars, Washington DC, 2013, The Project on Emerging Nanotechnologies, Consumer Products Inventory, <http://www.nanotechproject.org/>, acedido a 13/11/2014
- Yslas E. I., Ibarra L. E., Peralta D. O., Barbero C. A., Rivarola V. A., Bertuzzi M. L., 2012, Polyaniline nanofibers: Acute toxicity and teratogenic effect on *Rhinella arenarum* embryos, *Chemosphere*, 87, 1374-80
- Zhu S., Oberdörster E., Haasch M. L., 2004, Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C₆₀) in two aquatic species, *Daphnia* and fathead minnow, *Mar Environ*; 62, Suppl:S5-9
- Zhu X., Zhu L., Chen Y., Tian, S., 2008, Acute toxicities of six manufactured nanomaterial suspensios to *Daphnia magna*, *Nanoparticles and Occupational Health*, 11, 67–75

