

Determinação da ecotoxicidade crônica de nanopartículas de ouro utilizando *Ceriodaphnia dubia*

**Esther Miranda Fracaro da Silva, Sizue Ota Rogero e José Roberto Rogero
Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares - IPEN**

A Nanotecnologia compreende a investigação e o desenvolvimento de projetos e materiais em nível molecular e atômico, dentro da escala nanométrica de 1-100 nm (MILLER, SERRATO E KUNDAHL, 2005). O crescente aumento das indústrias que utilizam nanopartículas, devido suas múltiplas atividades biológicas, têm levado a uma constante preocupação sobre a toxicidade dos rejeitos que podem ser lançados no ambiente aquático. Este fato tem direcionado os pesquisadores ao estudo da toxicidade em organismos de várias espécies de interesse biológico. Dentre essas nanopartículas, as nanopartículas de ouro (NPAu) tem sido altamente utilizada na detecção biomédica e como contrastante de imagem, devido sua biocompatibilidade, facilidade de bioconjugação, propriedades ópticas (GERALDES et al, 2015) e como marcadores radioativos in vivo desde a década de 50. Há muito a se estudar sobre a toxicidade das NPAu à saúde humana assim como os impactos ao ambiente aquático.

A Ecotoxicologia é o ramo da Toxicologia que estuda a relação dos efeitos tóxicos de substâncias químicas presentes no ambiente, sobre os organismos vivos dos ecossistemas. São caracterizados pela exposição de organismos aquáticos a várias concentrações de um efluente ou de uma substância química em um determinado período de seu ciclo de vida (LAMEIRA, 2009). Podem ser

realizados com organismos aquáticos vivos (organismos-teste), dulcícolas ou continentais, estuarinos e marinhos em condições laboratoriais e/ou de campo (BERTOLETTI, 1990). Testes de toxicidade são utilizados para avaliar os efeitos agudos, assim como os efeitos crônicos. Os testes de toxicidade aguda avaliam os efeitos sofridos pelos organismos aquáticos em um curto período de exposição ao agente tóxico ou à amostra ambiental. Normalmente o efeito observado é a letalidade ou outra manifestação que a anteceda, como o estado de imobilidade em alguns microcrustáceos. Os testes de toxicidade crônica, por sua vez, são caracterizados por uma maior duração, podendo abranger todo o ciclo de vida do organismo ou parte dele, envolvendo, geralmente os estágios de vida mais sensíveis. Pode-se observar a letalidade, como também os organismos podem sobreviver, porém frequentemente apresentam suas funções biológicas afetadas, como crescimento, reprodução, desenvolvimento de ovos e etc (ZAGATTO e BERTOLETTI, 2006). Os Cladóceros são largamente utilizados como organismos-teste devido sua extrema sensibilidade aos tóxicos no ambiente, por serem de fácil manejo em laboratório e pela importância ecológica. Dentre os Cladóceros, a espécie escolhida como organismo-teste foi *Ceriodaphnia dubia*, conhecida como pulga d'água. Estes microcrustáceos são consumidores

primários na cadeia alimentar aquática, e são animais filtradores. Medem 0,8 – 0,9 mm de comprimento e sua reprodução se dá por partenogênese (ESTEVES, 2011). Neste trabalho serão realizados teste de ecotoxicidade crônica em *Ceriodaphnia dubia*.

OBJETIVO

Avaliar a ecotoxicidade crônica, de acordo com a norma ABNT NBR 13373 (2010), utilizando como organismo-teste *Ceriodaphnia dubia*, para obtenção da CE_{50} (concentração efetiva das NPAu que causa imobilidade em 50% dos organismos expostos).

METODOLOGIA

Para a realização dos ensaios crônicos, as NPAu são fornecidas pelo Laboratório Nanothera do Centro de Química e Meio Ambiente (CEQMA) do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares da CNEN (IPEN/CNEN-SP), e os organismos-teste são cultivados e mantidos no Laboratório de Ecotoxicologia do CEQMA do IPEN/CNEN-SP, de acordo com a norma da ABNT NBR 13373.

Os organismos são cultivados em béqueres de 600 mL, em incubadora com temperatura controlada de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com fotoperíodo de 16 horas-luz e luminosidade difusa. A água utilizada tanto para os cultivos quanto para as diluições nos testes, foi a água deionizada reconstituída, com dureza ajustada entre 40 e 48 mg L^{-1} de CaCO_3 e pH na faixa de 7,0 - 7,6. A alga utilizada como alimento é a *Pseudokirchneriella subcapitata*, uma alga clorofícea, unicelular, administrada diariamente na concentração de 1 a 5×10^6

células por organismo. Para a alimentação complementar é utilizado uma solução à base de ração para peixe da marca *Tetramin*, fornecida 3 vezes por semana na concentração de 0,02 mL de alimento por organismo.

Ensaio de sensibilidade para obtenção da carta-controle

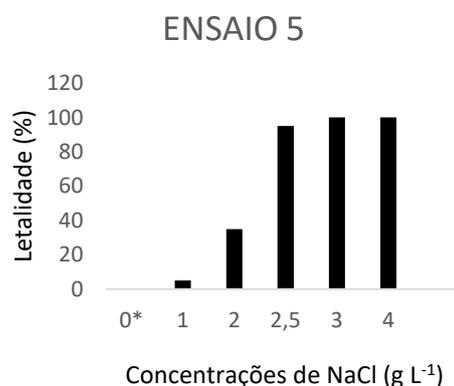
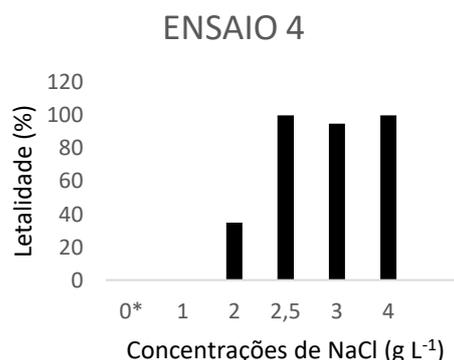
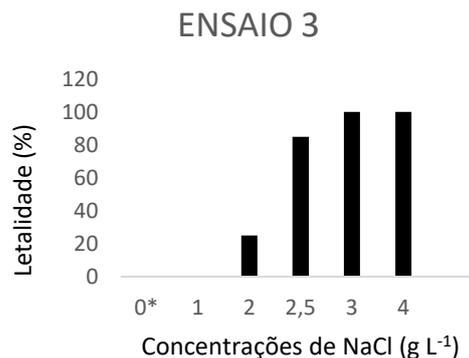
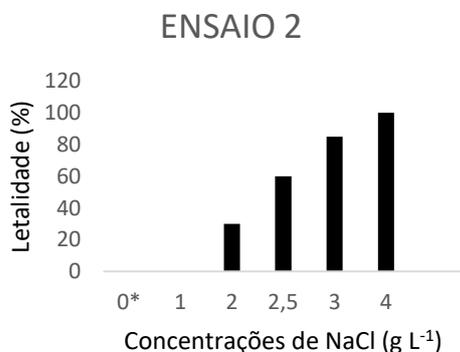
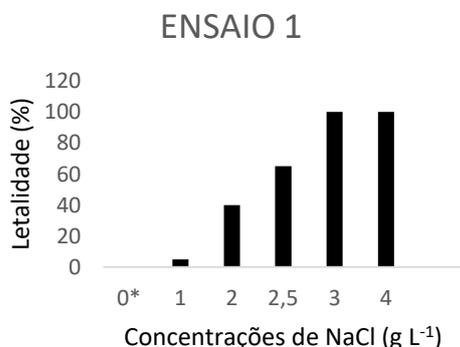
Como solicita a norma ABNT NBR 13373 (2010), para garantir que a sensibilidade dos organismos esteja adequada, e assim conceder maior confiabilidade aos ensaios crônicos com as NPAu, faz-se necessário a realização de ensaios de sensibilidade mensalmente com uma substância de referência. A substância de referência é um agente químico, denominado de controle positivo, que atua em testes de toxicidade detectando efeitos fora da variação normal, mediante a utilização de uma série de múltiplas concentrações. Representam assim, um meio de detectar mudanças do organismo-teste e de avaliar a precisão destes testes. Os experimentos foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia do CEQMA, do IPEN/CNEN-SP. Neste trabalho, como substância de referência foi utilizado o cloreto de sódio (NaCl). As soluções-teste foram preparadas no momento da realização do ensaio, a partir da solução-estoque de 5 g L^{-1} . Os organismos na fase neonatal (de 6 a 24 horas), foram expostos as seguintes concentrações de NaCl: 1; 2; 2,5; 3 e 4 g L^{-1} , além do controle com água deionizada reconstituída, por 48 horas. A exposição ocorreu em 4 réplicas para cada concentração, contendo 10 mL de solução, com 5 organismos por réplica, totalizando 20 organismos por concentração. Os organismos foram mantidos a

temperatura de $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com luminosidade difusa e fotoperíodo de 16 horas de luz. O parâmetro pH foi verificado previamente e ao término dos ensaios. No final do período de exposição, com base no número de organismos imóveis em função da concentração do NaCl, foi calculada a CE_{50} usando o programa *Trimmed Spearman-Kärber*.

Devido a pandemia do Covid-19, não foi possível ainda realizar os ensaios de ecotoxicidade crônica das NPAu em *Ceriodaphnia dubia* de acordo com a norma ABNT NBR 13373 (2010).

RESULTADOS

As figuras abaixo representam os resultados dos ensaios de sensibilidade, com a substância de referência (NaCl), em microcrustáceos *Ceriodaphnia dubia*.



A tabela 1 representa a CE_{50} dos ensaios de sensibilidade realizados.

TAB 1. CE_{50} dos ensaios de sensibilidade com *Ceriodaphnia dubia*

ENSAIOS	CE_{50}
1	1,99 g L ⁻¹
2	2,19 g L ⁻¹
3	2,06 g L ⁻¹
4	1,93 g L ⁻¹
5	1,92 g L ⁻¹

CONCLUSÕES

Foi verificado que os organismos da espécie *Ceriodaphnia dubia* estavam aptos para os ensaios de ecotoxicidade crônica, já que os valores das CE₅₀ obtidos em cada ensaio, que foram realizados mensalmente (a partir de agosto de 2020), estão próximos, o que significa que a sensibilidade dos organismos se manteve constante. Devido a quarentena estabelecida pela pandemia do Covid-19 a rotina laboratorial foi interrompida, sendo assim, não foi possível realizar os testes definitivos de ecotoxicidade crônica das NPAu e chegar a uma conclusão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia Aquática
- ABNT - Associação Brasileira de Normas Técnicas. Ecotoxicologia aquática - Toxicidade crônica - Método de Ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera). Norma ABNT - NBR 13373. 20p. 2017.
- LAMEIRA, V. Estudo dos efeitos letais e subletais (Reprodução e Teratogênese) do fármaco Triclosan para *Daphnia similis*, *Ceriodaphnia dubia* e *Ceriodaphnia silvestrii* (CLADOCERA, CRUSTACEA). Dissertação de Mestrado na Área de Tecnologia Nuclear. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Autarquia associada à Universidade de São Paulo. São Paulo. 210p. 2008.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. Ecotoxicologia aquática – princípios e aplicações. São Carlos: Rima, 2006. 478 p.
- MILLER, J. C; SERRATO, R; KUNDAHL, G. The handbook of nanotechnology: business, policy and intellectual property law. **Weley**, 1 Ed., New Jersey. 2005.

ESTEVES, F.A. Fundamentos da Limnologia. 2ª ed. Editora Rio de Janeiro, 2011.

APOIO FINANCEIRO AO PROJETO
CNPq/PIBIC