

MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

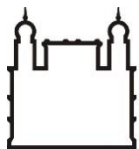
Mestrado em Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO (NPS ZNO) EM  
ALGUNS ASPECTOS DA SOBREVIVÊNCIA, REPRODUÇÃO E  
DESENVOLVIMENTO DE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) (GASTROPODA:  
PULMONATA)

NATÁLIA SOUZA SANTOS

Rio de Janeiro  
Junho de 2020





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde

Natália Souza Santos

Efeitos das nanopartículas de Óxido de Zinco (NPs ZnO) em alguns aspectos da sobrevivência, reprodução e desenvolvimento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gastropoda: Pulmonata)

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

**Orientadora:** Dr<sup>a</sup> Marta Julia Faro dos Santos Costa

RIO DE JANEIRO

Agosto 2020

Souza Santos , Natália .

EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO (NPS ZNO) EM ALGUNS ASPECTOS DA SOBREVIVÊNCIA, REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO DE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) (GASTROPODA: PULMONATA) / Natália Souza Santos . - Rio de janeiro, 2020.

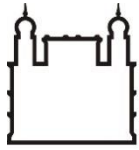
84 f.; il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde, 2020.

Orientadora: Marta Julia Faro .

Bibliografia: f. 69-83

1. nanopartículas. 2. ecotoxicologia aquática. 3. *Biomphalaria glabrata* .  
I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Saúde**

**AUTORA: NATÁLIA SOUZA SANTOS**

Efeitos das nanopartículas de Óxido de Zinco (NPs ZnO) em alguns aspectos da sobrevivência, reprodução e desenvolvimento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)  
(Gastropoda: Pulmonata)

**ORIENTADORA: Dr<sup>a</sup> Marta Julia Faro dos Santos Costa**

#### **EXAMINADORES:**

**Dr. José Augusto Albuquerque dos Santos** - IOC/FIOCRUZ (presidente)

**Dr<sup>a</sup>. Cristiane Barata Silva** - FIOCRUZ/RJ

**Dr<sup>a</sup>. Ana Cláudia Fernandes Amaral** - FIOCRUZ/RJ

**Dr<sup>a</sup>. Clélia Christina Mello Silva Almeida da Costa** - IOC/FIOCRUZ (suplente)

**Dr. Arnaldo Maldonado Junior** - IOC/FIOCRUZ (suplente)

Rio de Janeiro, 17 de agosto de 2020

Dedico este trabalho à minha família, que sempre me apoiou, aos professores que tive durante esta caminhada e, em especial ao Cesar Luis, que contribuiu em todo o processo de pesquisa.

## AGRADECIMENTOS

Este mestrado seguiu como uma travessia, me presenteando com surpresas, desencontros e algumas dificuldades, mas é certo que operou uma revolução em mim. Ora me diverti com os rodopios da razão, ora me assombrei com os achados. Neste instante sobro desolada, mas cheia de felicidade. Uma felicidade que subsiste nos sonhos do tempo, nos seus rastros e utopias.

Um trabalho nunca é realizado por apenas uma pessoa, várias foram as/os que estiveram caminhando ao meu lado nesta estrada.

Não poderia deixar de agradecer declaradamente aos que se seguem:

À sociedade brasileira, cuja organização tornou possível o prosseguimento dos meus estudos até aqui.

À FIOCRUZ, cujo apoio foi imprescindível para a realização desta pesquisa.

À Dr<sup>a</sup> Marta Júlia Faro, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, por ter me orientado não somente nesta dissertação, mas por me acompanhar desde a iniciação científica. Obrigada pela confiança e por compartilhar um pouco do seu vasto conhecimento. Além de todo o auxílio prestado para que esta dissertação pudesse ser realizada.

Ao Dr<sup>o</sup> Darcilio Baptista, Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, por iniciar este projeto, me orientar durante uma parte desta caminhada e pelo incentivo à conclusão deste trabalho.

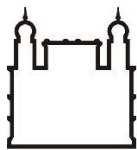
À Cesar Luiz, Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental, meu grande mestre e professor, que durante estes anos compartilhou seus conhecimentos sempre de forma generosa e bem-humorada. Agradeço pela tua existência que sopra esperança nestes tempos tão difíceis. Sua humildade e sabedoria me fascinaram, me inspiraram e me fizeram persistir, mesmo em meio às barreiras que ele sabe que encontrei; Meu mais profundo e verdadeiro: Muito obrigada!

A toda a equipe do LAPSA, que me acolheu em todos estes anos e tornou essa caminhada mais leve e ao LBPMR, Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatórios, que muito me ajudou durante esta jornada.

Às mulheres cientistas, Marina Vianna, Magali Barreto, Claudia Portes, Clelia Christina, Rachel Davis, Lucia Sousa, Tatiana Figueiredo, Natalia Freitas, Ludmila Torralba e Priscila que foram inspiração de força e luta para ocupar seu espaço.

A minha família, amigas e amigos que me acompanharam com amor.





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### Efeitos das nanopartículas de Óxido de Zinco (NPs ZnO) em alguns aspectos da sobrevivência, reprodução e desenvolvimento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gastropoda: Pulmonata)

#### Resumo

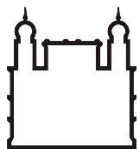
#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIODIVERSIDADE E SAÚDE

**Natalia Souza Santos**

A nanotecnologia representa uma tendência chave na ciência e tecnologia do século XXI. As nanopartículas de óxido de zinco (NPs de ZnO) estão entre as mais utilizadas devido a sua capacidade de refletir, absorver e dispersar a radiação ultravioleta. A partir da sua larga utilização em fotoprotetores, estas nanopartículas podem ser liberadas em efluentes e águas residuais e os ecossistemas aquáticos se tornam alvos diretos da contaminação por estes xenobióticos. A avaliação do impacto biológico das NPs de ZnO se torna de grande importância na área de Ecotoxicologia. Neste trabalho, foram analisados os efeitos das NPs de ZnO na sobrevivência, reprodução, sistema imune e nas alterações bioquímicas por estresse oxidativo em *Biomphalaria glabrata*. As nanopartículas foram caracterizadas quanto ao tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta. O tamanho médio nas NPs de ZnO utilizadas neste estudo foi de 34,2 nm. Foram realizados testes agudos, 48h de exposição para determinar as concentrações letais e subletais (CL<sub>10</sub>, CL<sub>30</sub>, CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub>). Para avaliar os efeitos das NPs de ZnO na atividade reprodutiva, caramujos *B. glabrata*, foram

expostos a concentrações subletais em diferentes períodos (7 e 21 dias). Após a exposição, a fecundidade e fertilidade de *B. glabrata* foi afetada de forma significativa em relação ao grupo controle. Os resultados demonstraram um efeito tempo-dependente e concentração-dependente. A partir destes resultados, fez-se importante a realização de um teste crônico, 4 semanas de exposição, para avaliar o potencial de reversibilidade da atividade reprodutiva de caramujos expostos as concentrações de 1 e 2 mg L<sup>-1</sup>. Os caramujos só apresentaram recuperação da atividade reprodutiva após a exposição a menor concentração, 1 mg L<sup>-1</sup>. Testes agudos também foram realizados a fim de avaliar a viabilidade celular e quantificar espécies reativas de oxigênio (Peróxido de Hidrogênio) envolvidas no estresse oxidativo em diferentes tecidos (massa cefalopediosa e visceral, hemolinfa e glândula digestiva) de *B. glabrata*. A exposição aguda às NPs de ZnO alterou o perfil de hemócitos dos caramujos, com uma tendência ao aumento na população de granulócitos. Concentrações subletais (1, 2 e 6 mg L<sup>-1</sup>) foram capazes de induzir um aumento no nível de peróxido de hidrogênio em amostras de massa cefalopediosa e visceral (partes moles), glândula digestiva e hemolinfa. Este trabalho também avaliou o efeito das NPs de ZnO em diferentes estágios de vida de *B. glabrata*. Neonatos e massas ovíferas foram expostos a concentrações subletais e foram realizados testes agudos e crônicos. Os resultados indicaram que os estágios iniciais de vida apresentam uma sensibilidade maior do que os caramujos adultos. A alta taxa de mortalidade dos embriões e neonatos pode significar uma alteração na população desta espécie e conseqüentemente, implicações ecológicas. Os dados obtidos evidenciam a necessidade da utilização de endpoints mais sensíveis que a mortalidade de organismos adultos. A alteração de processos fisiológicos primordiais como a atividade reprodutiva, não representam efeitos apenas para a população de moluscos *B. glabrata*, mas podem representar um efeito em todo o ecossistema. Isso porque os moluscos estão associados a diferentes níveis tróficos e representam um elo na cadeia trófica. Além disso, são responsáveis pela ciclagem de nutrientes, sendo considerados detritívoros-herbívoros. O protocolo básico deste trabalho poderá vir a ser empregado como ferramenta importante, já que as avaliações ecotoxicológicas dispõem de metodologias eficientes para análise da saúde ambiental e dos ecossistemas aquáticos.

Palavras-chave: nanopartículas, ecotoxicologia aquática, *Biomphalaria glabrata*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### **Efeitos das nanopartículas de Óxido de Zinco (NPs ZnO) em alguns aspectos da sobrevivência, reprodução e desenvolvimento de *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Gastropoda: Pulmonata)**

#### **Abstract**

#### **MASTER DISSERTATION IN BIODIVERSITY AND HEALTH**

**Natalia Souza Santos**

Nanotechnology represents a key trend in 21st century science and technology. Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) are among the most used due to their ability to reflect, absorb and disperse ultraviolet radiation. From their wide use in photoprotectors, these nanoparticles can be released into effluents and wastewater and aquatic ecosystems become direct targets for contamination by these xenobiotics. The assessment of the biological impact of ZnO NPs is of great importance in the area of Ecotoxicology. In this work, the effects of ZnO NPs on survival, reproduction, immune system and biochemical alterations by oxidative stress in *Biomphalaria glabrata* were analyzed. The nanoparticles were characterized in terms of size, polydispersity index and zeta potential. The average size in the ZnO NPs used in this study was 34.2 nm. Acute tests were performed, 48h of exposure to determine lethal and sublethal concentrations (CL<sub>10</sub>, CL<sub>30</sub>, CL<sub>50</sub>, CL<sub>90</sub>). To evaluate the effects of ZnO NPs on reproductive activity, *B. glabrata* snails were exposed to sublethal concentrations in different periods (7 and 21 days). After exposure, the fertility and fertility of *B. glabrata* was significantly affected in relation to the control group. The results demonstrated a time-dependent and concentration-dependent effect. From these results, it was important to carry out a chronic test, 4 weeks of

exposure, to assess the potential for reversibility of the reproductive activity of snails exposed to concentrations of 1 and 2 mg L<sup>-1</sup>. The snails only showed recovery of reproductive activity after exposure to the lowest concentration, 1 mg L<sup>-1</sup>. Acute tests were also carried out in order to assess cell viability and quantify reactive oxygen species (Hydrogen Peroxide) involved in oxidative stress in different tissues (cephalopodium and visceral mass, hemolymph and digestive gland) of *B. glabrata*. Acute exposure to ZnO NPs changed the hemocyte profile of snails, with a tendency to increase in the granulocyte population. Sublethal concentrations (1, 2 and 6 mg L<sup>-1</sup>) were able to induce an increase in the level of hydrogen peroxide in samples of cephalopodium and visceral mass (soft tissue), digestive gland and hemolymph. This work also evaluated the effect of ZnO NPs in different stages of life of *B. glabrata*. Neonates and ovigerous masses were exposed to sublethal concentrations and acute and chronic tests were performed. The results indicated that the early stages of life are more sensitive than adult snails. The high mortality rate of embryos and neonates may mean a change in the population of this species and, consequently, ecological implications. The data obtained show the need to use endpoints that are more sensitive than the mortality of adult organisms. The alteration of primordial physiological processes such as reproductive activity, does not represent effects only for the population of molluscs *B. glabrata*, but can represent an effect on the entire ecosystem. This is because mollusks are associated with different trophic levels and represent a link in the trophic chain. In addition, they are responsible for nutrient cycling, being considered detritivorous-herbivores. The basic protocol of this work may come to be used as an important tool, since ecotoxicological assessments have efficient methodologies for analyzing environmental health and aquatic ecosystems.

Keyword: nanoparticles, aquatic ecotoxicology, *Biomphalaria glabrata*

## INDICE

RESUMO	V
ABSTRACT	VII
<b>1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO, CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA E XENOBIÓTICOS.....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 NANOTECNOLOGIA E NANOPARTÍCULAS.....</b>	<b>18</b>
<b>1.3 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO.....</b>	<b>23</b>
<b>1.4 BIOMONITORAMENTO E BIOMARCADORES.....</b>	<b>24</b>
<i>1.4.1 Espécies reativas de oxigênio, danos a biomoléculas, defesas antioxidantes e estresse oxidativo.....</i>	<i>25</i>
<b>1.5 VIAS DE ENTRADA E MECANISMOS DE AÇÃO DE NANOPARTÍCULAS EM SISTEMAS VIVOS.....</b>	<b>27</b>
<i>1.5.1 Nanopartículas metálicas e biomarcadores do estresse oxidativo.....</i>	<i>29</i>
<i>1.5.2 Sistema imunológico dos invertebrados.....</i>	<i>30</i>
<b>1.6 PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DE EFEITOS EM ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA.....</b>	<b>30</b>
<i>1.6.1 Toxicidade Aguda.....</i>	<i>31</i>
<i>1.6.2 Toxicidade Crônica.....</i>	<i>31</i>
<i>1.6.3 Testes rápidos de efeitos sobre reprodução e desenvolvimento.....</i>	<i>31</i>
<b>1.7 CARACTERIZAÇÃO DO ORGANISMO-TESTE <i>B. glabrata</i>.....</b>	<b>33</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>37</b>
<b>3 METODOLOGIA.....</b>	<b>38</b>
<b>3.1 CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE ZINCO (ZNO).....</b>	<b>38</b>
<b>3.2 ORGANISMO-TESTE.....</b>	<b>38</b>
<b>3.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....</b>	<b>39</b>
<i>3.3.1 Avaliação dos efeitos tóxicos em adultos <i>B. glabrata</i> e determinação das concentrações subletais das NPs de ZnO.....</i>	<i>39</i>
<i>3.3.2 Contagem diferencial de hemócitos e viabilidade.....</i>	<i>40</i>

3.4	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS EM EMBRIÕES DE <i>B. glabrata</i> .....	42
3.5	ENSAIOS REPRODUTIVOS.....	42
3.6	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS DE NPS DE ZNO.....	44
3.7	PREPARO DAS AMOSTRAS PARA POSTERIORES ANÁLISES.....	45
3.8	CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) EM AMOSTRAS TECIDUAIS DE <i>B. glabrata</i> .....	45
3.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	46
4	RESULTADOS.....	47
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE ZINCO (ZnO).....	47
4.2	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS EM ADULTOS E EMBRIÕES DE <i>B. glabrata</i> .....	47
4.3	CITOMETRIA.....	49
4.3.1	<i>Teste Agudo</i> .....	49
4.3.2	<i>Teste Crônico x Teste Agudo</i> .....	51
4.4	CÂMARA DE NEUBAUER.....	51
4.5	ENSAIOS REPRODUTIVOS - EFEITOS NA FECUNDIDADE E FERTILIDADE DE <i>Biomphalaria glabrata</i> EXPOSTAS ÀS CONCENTRAÇÕES SUB-LETAIS DE NPs DE ZnO.....	52
4.5.1	<i>Desempenho reprodutivo e potencial de recuperação a exposição sub-letal às NPs de ZnO</i> .....	54
4.6	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS DE NANOPARTICULAS DE ZnO.....	57
4.7	QUANTIFICAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	57
5	DISCUSSÃO E PERSPECTIVA.....	60
6	CONCLUSÃO.....	68
	REFERÊNCIAS.....	69
	ANEXO A.....	83
	ANEXO B.....	84

## INDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Representação esquemática da seqüência de ordem de respostas à poluição dentro de um sistema biológico.

**Figura 2.** Representação esquemática com as áreas de aplicação dos nanomateriais.

**Figura 3.** Representação esquemática da escala nanométrica em relação a elementos conhecidos.

**Figura 4.** Número de artigos identificados por [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) que contém as palavras-chave: artigos de pesquisa sobre A) nanopartículas, B) nanopartículas engenheiradas, C) nanopartículas e invertebrados marinhos, D) nanopartículas engenheiradas e invertebrados marinhos, E) nanopartículas e bivalves, F) nanopartículas engenheiradas e bivalves, G) toxicidade de nanopartículas para bivalves, G) toxicidade de nanopartículas engenheiradas para bivalves.

**Figura 5.** Principais defesas antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas.

**Figura 6.** Representação das possíveis rotas para a geração de ROS na presença de NP. (1) Internalização poderia gerar ROS devido à dissolução das NPs nas células e/ou à atividade fotocatalítica das NP. (2) Dissolução das NPs levaria ao aumento na concentração de íons metálicos (M) no meio, podendo alguns desses metais serem capturados pelos organismos. (3) NPs podem adsorver/complexar outros metais presentes no meio, podendo ser tomados pelas células. (4) Atividade fotocatalítica das NPs na presença de radiação ultravioleta e/ou luz natural.

**Figura 7.** Principais efeitos tóxicos desencadeados por nanomateriais em células eucarióticas.

**Figura 8.** *Biomphalaria glabrata*: conchas de exemplares adultos.

**Figura 9.** Massa ovígera de *B. glabrata* com 15 ovos.

**Figura 10.** Diagrama mostrando as etapas para a exposição aguda de *Biomphalaria glabrata* as NPs de ZnO.

**Figura 11.** Diagrama mostrando as etapas para a exposição de curta duração e avaliação de desempenho reprodutivo de *Biomphalaria glabrata* expostas as NPs de ZnO.

**Figura 12.** Diagrama mostrando as etapas para os teste de longa duração e avaliação de desempenho reprodutivo de *Biomphalaria glabrata* expostas as NPs de ZnO .

**Figura 13.** Sobrevivência (média ± erro padrão) de neonatos após 48h de exposição às concentrações 0, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2 mg L<sup>-1</sup> de NPs de ZnO. \*\*\*\* p<0.0001

**Figura 14.** Sobrevivência (média ± erro padrão) de neonatos após 21 dias de exposição à concentração 0,1 mg L<sup>-1</sup> de NPs de ZnO e grupo controle.

**Figura 15.** Gráficos representando a porcentagem de hemócitos circulantes de moluscos *Biomphalaria glabrata* expostos às NPs de ZnO e do grupo controle, marcados com a Lectina PNA para as populações pequenas e grandes. Os resultados foram considerados significativos para P<0.05.

**Figura 16.** Gráficos representando a porcentagem de hemócitos circulantes de moluscos *Biomphalaria glabrata* expostos às NPs de ZnO e do grupo controle, marcados com a Lectina PI para as populações pequenas e grandes. Os resultados foram considerados significativos para P<0.05.

**Figura 17.** Gráficos representando a porcentagem de hemócitos circulantes de moluscos *Biomphalaria glabrata* expostos às NPs de ZnO e do grupo controle, marcados com a Lectina 7AAD para as populações pequenas e grandes. Os resultados foram considerados significativos para P<0.05.

**Figura 18.** Gráficos representando a porcentagem de hemócitos circulantes de moluscos *Biomphalaria glabrata* expostos às NPs de ZnO e do grupo controle, marcados com 7AAD, PI e a Lectina PNA para as populações pequenas e grandes. Os resultados foram considerados significativos para P<0.05.

**Figura 19.** Concentração dos hemócitos vivos e mortos circulantes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* exposta às NPs de ZnO e do grupo controle. Os resultados foram considerados significativos para P<0.05.

**Figura 20.** Fecundidade e fertilidade (média ± erro padrão) de *Biomphalaria glabrata* após 48h de exposição às NPs de ZnO (Teste agudo). \*p=0.0337; \*\*p=0.0050; \*p=0.0440.

**Figura 21.** Fecundidade e fertilidade (média ± erro padrão) de *Biomphalaria glabrata* após 7 dias de exposição às NPs de ZnO (Teste estático). Os dados são representados como média ± erro padrão. \* p= 0,042; \*\* p= 0,0092.

**Figura 22.** Fecundidade e fertilidade (média ± erro padrão) de *Biomphalaria glabrata* após 21 dias de exposição às NPs de ZnO (Teste Semi-estático). \*\*\*\* p < 0,0001.



**Figura 23.** Fecundidade e fertilidade (média  $\pm$  erro padrão) de *Biomphalaria glabrata* após 48h, 7 e 21 dias de exposição às NPs de ZnO. \*\*\* $p=0.0005$ ; \*\*\*\* $p<0.0001$ .

**Figura 24.** Fecundidade e fertilidade (média  $\pm$  erro padrão) de *Biomphalaria glabrata* exposta 2,0 mg L<sup>-1</sup> de NPs de ZnO e 0 corresponde ao grupo controle (Teste Semi-estático). a) Numero de massas ovigeras b) Numero de ovos férteis c) Numero de embriões eclodidos. Os parâmetros foram analisados durante: 4 semanas de exposição, 4 semanas de recuperação (Total: 8 semanas) \*\*\*\*  $p < 0,0001$

**Figura 25.** Fecundidade e fertilidade (média  $\pm$  erro padrão) de *Biomphalaria glabrata* exposta a 1,0 mg L<sup>-1</sup> de NPs de ZnO e 0 mg L<sup>-1</sup> corresponde ao grupo controle (Teste Semi-estático). a) Numero de massas ovigeras b) Numero de ovos férteis c) Numero de embriões eclodidos. Os parâmetros foram analisados durante: 4 semanas de exposição, 4 semanas de recuperação (Total: 8 semanas) (\*\*\*\*  $p < 0,0001$  apenas para numero de embriões eclodidos).

**Figura 26.** Sobrevivência de embriões (média  $\pm$  erro padrão) após 10 dias de exposição à 0,2 e 0,1 mg/L de NPs de ZnO. \*\* $p=0.0037$ ; \*\*\* $p=0.0007$ .

**Figura 27.** Concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em amostras de massa cefalopediosa e visceral (partes moles), sem a concha (parte dura) de *Biomphalaria glabrata*, grupo controle (0) e grupo exposto a 2,0 (CL<sub>10</sub>) e 6,0 mg L<sup>-1</sup> (CL<sub>30</sub>) de NP de ZnO extraídas com TCEP e  $\beta$ -mercaptoetanol.

**Figura 28.** Concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em amostras de hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, grupo controle (0) e grupo exposto a 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de NP de ZnO extraídas com TCEP e  $\beta$ -mercaptoetanol.

**Figura 29.** Concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em amostras de glândula digestiva de *Biomphalaria glabrata*, grupo controle (0) e grupo exposto a 1,0 mg L<sup>-1</sup> de NP de ZnO extraídas com TCEP e  $\beta$ -mercaptoetanol.

**Figura 30.** Concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em amostras de hemolinfa e glândula digestiva de indivíduos *Biomphalaria glabrata* expostos à 1,0 mg L<sup>-1</sup> de NPs de ZnO extraídas com TCEP e  $\beta$ -mercaptoetanol.

**Figura 31.** Figura 31 - Concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em amostras de hemolinfa e glândula digestiva de indivíduos *Biomphalaria glabrata* do grupo controle extraídas com TCEP e  $\beta$ -mercaptoetanol.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Características físico-químicas das NPs de ZnO utilizadas

**Tabela 2** - Valores das concentrações letais e subletais ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) obtidos pelo método Probit

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

NPs – nanopartículas  
ZnO – óxido de zinco  
TiO<sub>2</sub> – dióxido de titânio  
SiO<sub>2</sub> - dióxido de silício  
mg/L – miligrama por litro  
ROS – espécies reativas de oxigênio  
O<sub>2</sub><sup>-</sup> - superóxido  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - peróxido de hidrogênio  
DNA – ácido desoxirribonucleico  
Ag – prata  
CuO – óxido de cobre  
MTs – metalotioneínas  
Zn – zinco  
Cu – cobre  
NO – óxido nítrico  
CL – concentração letal  
nm – nanômetros  
μL - microlitros  
PI - iodeto de propídeo  
7AAD - 7- amino actinomicina  
PNA - Peanut agglutinin  
μg/ml – micrograma por litro  
CaCO<sub>3</sub> – carbonato de cálcio

## 1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

### 1.1 DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO, CONTAMINAÇÃO AQUÁTICA E XENOBIÓTICOS

O sistema econômico do pós-guerra da década de 40 e da noção de progresso e crescimento ilimitado começa a ser questionado a partir das décadas de 60 e 70. Com o fracasso deste sistema na esfera social, onde não ocorreu a redução da pobreza e também na esfera ambiental, onde o desenvolvimento e uso dos recursos naturais levaram à degradação e escassez dos mesmos, o modelo de desenvolvimento norte-americano deixa de ser visto como o modelo ideal (SCOTTO, CARVALHO & GUIMARÃES, 2007).

O desenvolvimento passa a estar relacionado a riscos de degradação ambiental e torna-se necessária a criação de órgãos ambientais nacionais. Conciliar o crescimento econômico, superação da pobreza e preservação do meio ambiente resultou em intensos debates, até os dias de hoje, e na utilização da expressão “desenvolvimento sustentável” para designar este modelo (SCOTTO, CARVALHO & GUIMARÃES, 2007).

Em 1992, a água foi o principal tema discutido na Conferência de Dublin. Os ecossistemas aquáticos tornam-se cada vez mais pressionados por fatores como, alterações climáticas, crescimento populacional, demanda por água e a própria poluição (MEYBECK, 2003; FOSTER & CHILTON, 2003).

No Brasil, muitos estudos evidenciam a presença de contaminantes no sedimento ou na coluna d'água de inúmeras regiões brasileiras. Os ecossistemas costeiros sofrem influência da intensa atividade humana como observado pela elevada carga de poluentes derivados da indústria do petróleo em Angra dos Reis (RJ) (AZEVEDO, GONÇALVES & SILVA, 2007), ou da queima de combustíveis na Baía de Guanabara (DA SILVA, AZEVEDO & NETO, 2007). Os grandes centros urbanos e pólos industriais localizados principalmente nas regiões sudeste e sul do país promovem intensa degradação a partir da contaminação das grandes reservas de água doce do Brasil (MOORE *et al.*, 2004).

O ambiente aquático é altamente complexo e diverso. Compreendendo vários tipos de ecossistemas: rios, lagos, estuários, mares e oceanos. A complexidade das

relações e interações entre animais, plantas e microrganismos presente nos ecossistemas aquáticos, demonstram o papel fundamental do mesmo na manutenção de vários ecossistemas e em atividades econômicas brasileiras. As propriedades físicas e químicas dos ecossistemas aquáticos podem afetar significativamente a atividade biológica e o impacto dos agentes químicos e outros xenobióticos. Assim elucidar os mecanismos iniciais de resposta rápida a níveis moleculares e celulares na presença de xenobióticos pode auxiliar a compreender a situação do meio ambiente a fim de evitar danos a níveis macroecológicos (MOORE *et al.*, 2004; WHO, 2001).

A ecotoxicologia é um domínio da ciência que tem como objetivo entender e prever efeitos de xenobiontes em comunidades naturais sob pressão antrópica (CHAPMAN, 2002). Os efeitos dos xenobiontes podem ser percebidos a partir de sua interação com proteínas receptoras celulares, inibições enzimáticas, distúrbios na homeostase celular, entre outros. Os organismos a fim de evitar ou diminuir os efeitos tóxicos destes contaminantes podem responder a nível molecular e celular. Quando estas respostas não são suficientes pode ocorrer diminuição no crescimento, redução da fertilidade e reprodução, distúrbios funcionais, câncer, distúrbios comportamentais ou até morte (FENT, 2004).

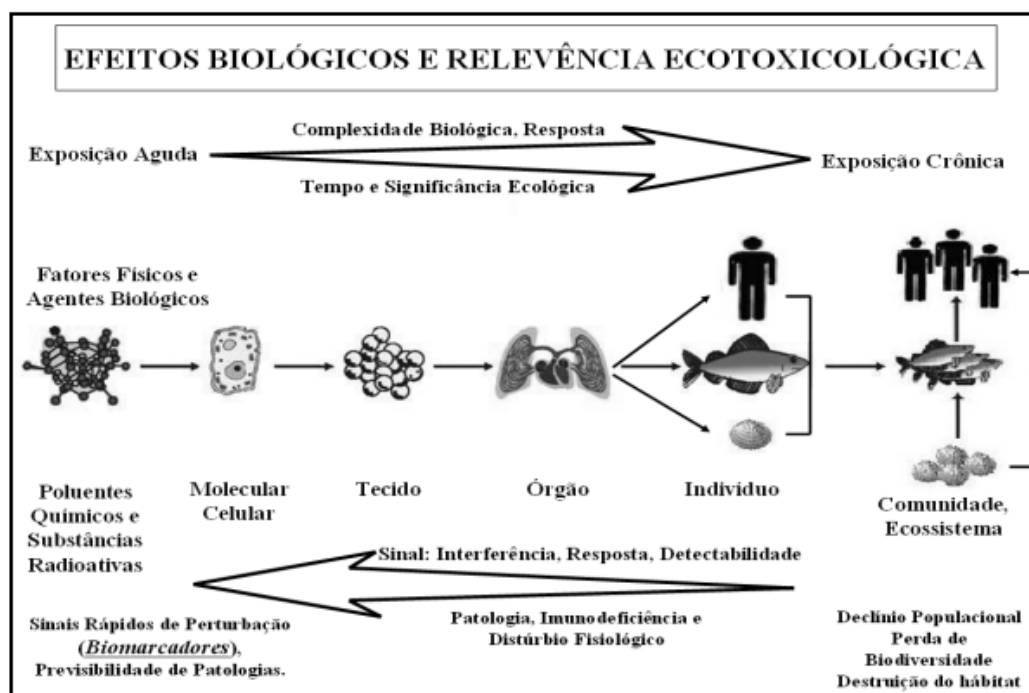


Figura 1 - Representação esquemática da seqüência de ordem de respostas à poluição dentro de um sistema biológico (Fonte: MOORE *et al.*, 2004).

## 1.2 NANOTECNOLOGIA E NANOPARTÍCULAS

A nanotecnologia tem sido considerada um dos campos mais inovadores do século XXI e tem se tornado um campo de interesse científico em todo o mundo. (BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA *et al.*, 2009; KRYSANOV *et al.*, 2010; MINETTO *et al.*, 2014; MINETTO *et al.*, 2016). O prefixo “nano” deriva do grego “anão” e está associado a uma escala de medida em que um nanômetro representa um bilionésimo do metro ou um milionésimo do milímetro. Nesta escala, estruturas apresentam propriedades funcionais únicas que não são apresentadas em escala macro (CHAU *et al.*, 2007; DURÁN; AZEVEDO, 2002).

Devido a estas propriedades associadas a novas interações da física da matéria com a biológica e química, um amplo potencial de aplicação da nanotecnologia tem despertado um interesse crescente em diversas áreas (ROSSETO, 2012). Sendo apresentada como grande inovação da engenharia e a primeira revolução tecnológica do século 21, tanto no apoio ao crescimento econômico, como na esperança de proporcionar soluções para muitos desafios que enfrentaremos como sociedade (GWINN & VALLYATHAN, 2006). Segundo a Resolução EU – EUROPEAN UNION (2011), a definição do termo nanomaterial deve basear-se no tamanho do material, sendo a única propriedade definidora que necessita de uma definição clara. O termo nanoescala é definido como uma faixa de tamanho de aproximadamente 1nm a 100 nm.

A utilização de nanomateriais pela indústria ocorre em larga escala com aplicações no mercado eletrônico, óptica, têxteis, dispositivos médicos, farmacêuticos, telecomunicações, cosméticos, embalagens de alimentos, células de combustível, processo de remediação ambiental e de aplicações catalíticas (MOORE 2006; NOWACK & BUCHELI, 2007; HANDY *et al.*, 2008). De acordo com uma estimativa do Programa das Nações Unidas para o Meio Ambiente, a produção de nanopartículas manipuladas (PEV) deverá atingir 58.000 toneladas por ano até 2020 (BUTT, 2018).

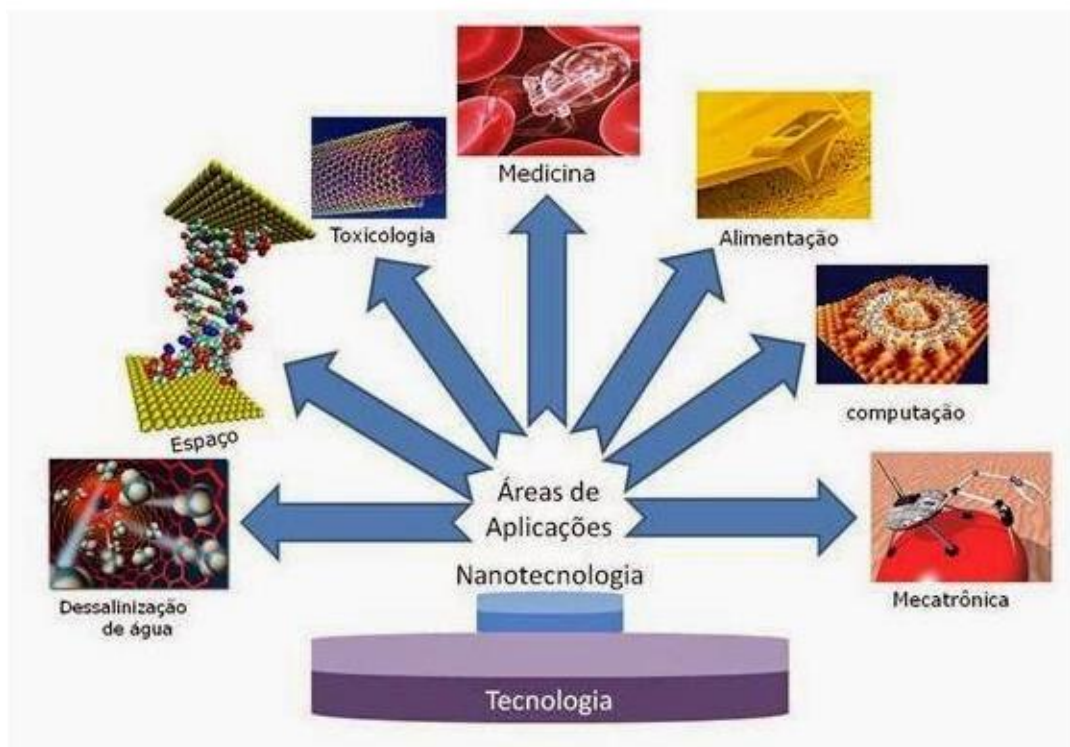


Figura 2 – Representação esquemática com as áreas de aplicação dos nanomateriais (Fonte: <https://betaeq.com.br/index.php/2015/10/31/nanotecnologia-aplicada-a-engenharia-quimica/>)

Entretanto, o ritmo acelerado de produção e o grande número de nanoprodutos (produtos contendo nanopartículas) no mercado, tem sido extensivamente debatido, devido os possíveis riscos de contaminação do meio ambiente e potenciais impactos à saúde humana e a dos ecossistemas (ROSSETO, 2012; NOWACK & BUCHELI, 2007; BHATT & TRPATHI 2011; LAPRESTA-FERNANDEZ *et al.*, 2012; VAN AERLE *et al.*, 2013). Por exemplo, as nanopartículas de óxido de zinco (ZnO) e dióxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) são amplamente utilizadas em produtos para a pele, na década de 2007 ate 2017, mais de 33.000 toneladas de filtros solares produzidos contendo até 25% de nanopartículas de ZnO (JOO e ZHAO, 2017; DANOVARO *et al.*, 2008), apontam que pelo menos 25% do filtro solar usado (~4000–6000 toneladas / ano) foi liberado em áreas de recifes de coral.

O volume de descarga de ZnO nanopartículas foi estimado como o segundo maior, perdendo apenas para o TiO<sub>2</sub> nanopartículas (GOTTSCHALK *et al.*, 2009). A aplicação das nanopartículas em fotoprotetores está relacionada principalmente com a aparência do produto, facilidade de processo e função na formulação. A aparência esbranquiçada dos fotoprotetores tradicionais foi substituída por um produto

transparente, menos viscoso e com maior aceitabilidade do mesmo por parte dos consumidores (BALOGH *et al.*, 2011; COSMETICS & TOILETRIES BRASIL, 2008; MORGANTI, 2010; MU L & SPRANDO, 2010)

As nanopartículas estão dentre os materiais em nano escala que apresentam propriedades físico-químicas incomuns devido ao seu tamanho reduzido, alterando as propriedades elétricas específicas na escala atômica, grau de pureza, cristalinidade, solubilidade, forma de agregação, entre outras (NEL *et al.*, 2006).

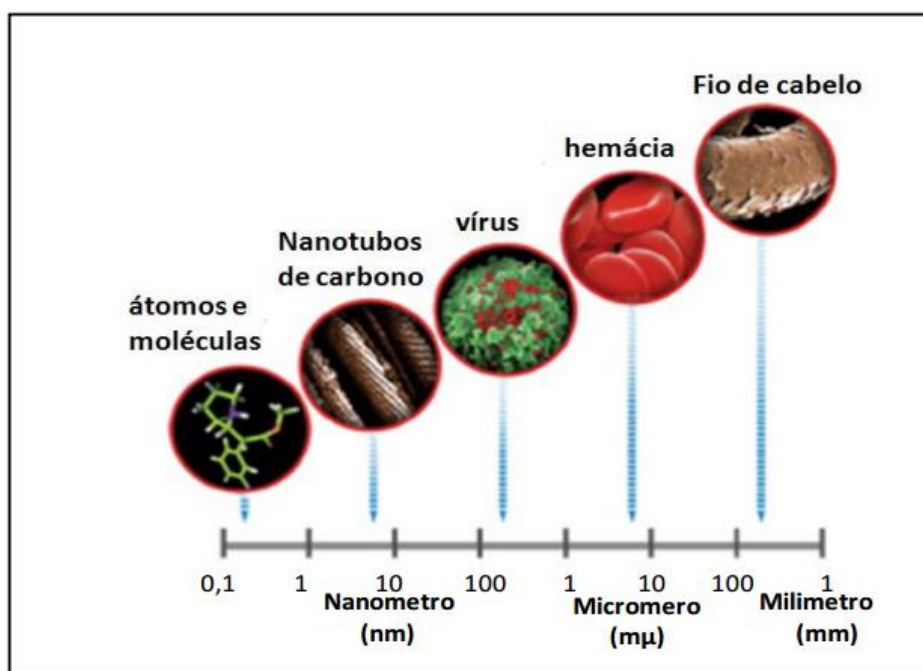


Figura 3 - Representação esquemática da escala nanométrica em relação a elementos conhecidos. (Fonte: GEBARA, 2017)

Algumas características são fatores determinantes na toxicidade, sendo estas, influenciadas pelo estado de agregação, via de exposição/administração; labilidade em meios biológicos ou no ambiente; composição; revestimento de superfície; reatividade e carga de superfície, pureza da amostra; concentração, forma, porosidade, área de superfície e interação com outros fatores ambientais. No entanto, é crescente o número de pesquisas que evidenciam que as propriedades físico-químicas únicas de NPs que tornam os nanomateriais mais eficientes em aplicações industriais, tornam também estes materiais mais prejudiciais para os organismos vivos (BONDARENKO *et al.*, 2013).



Um conjunto complexo de interações entre os fatores, podem produzir efeitos deletérios desde o nível celular (interações bioquímicas intracelular, danos físicos às estruturas celulares ou no DNA) até o nível ecossistêmico (bioacumulação na cadeia trófica) (PAL *et al.*, 2007; PAKRASHI *et al.*, 2014; BRAR *et al.* 2009). Essa imensa matriz de possíveis combinações da matéria e os sistemas biológicos, dificultam responder aos questionamentos relacionados aos potenciais efeitos deletérios sobre o sistema biológico.

Foi em 2006 que o primeiro artigo sobre a toxicidade de nanopartículas para organismos aquáticos, foi publicado. A partir de 2010, a frequência de publicações aumentou (Figura 3) e os potenciais riscos ecotoxicológicos dos nanomateriais para organismos aquáticos foram objetos de várias revisões (CORSI *et al.*, 2014; GRILLO *et al.*, 2015; FABREGA *et al.*, 2011; LAPRESTA-FERNÁNDEZ *et al.*, 2012; MA e LIN, 2013; MATRANGA e CORSI, 2012; MAURER-JONES *et al.*, 2013; MINETTO *et al.*, 2014; MISRA *et al.*, 2012). No entanto o avanço da tecnologia tem acontecido mais rapidamente que o desenvolvimento dos estudos referentes aos seus impactos no meio ambiente, plantas, animais e seres humanos (OBERDÖRSTER *et al.*, 2005; OBERDÖRSTER *et al.*, 2005; KOLESNICHENKO *et al.*, 2008; DYBOWSKA *et al.*, 2011).

Atualmente grande parte dos estudos tem como objetivo analisar os efeitos de nanopartículas “fabricadas” em testes agudos usando organismos pelágicos. E o número de artigos sobre nanopartículas ambientalmente modificadas, com base em efeitos crônicos a longo prazo, bioacumulação e exposição de organismos bentônicos é significativamente menor (BUTT, 2018).

Sendo assim, para o presente estudo foram selecionados moluscos gastrópodes, bentônicos, detritívoros-herbívoros e de água doce, pois não existem muitos dados de toxicidade disponíveis sobre esses organismos. Uma espécie (*Biomphalaria glabrata*) prevalente em cerca de dezesseis estados do Brasil foi escolhida para estudar os efeitos de diferentes concentrações de nanopartículas. Neste estudo experimental de exposição, foram utilizadas concentrações sub-letais e a confirmação da exposição foi feita através da resposta biológica no organismo exposto (SELCK *et al.*, 2016).

Este é o primeiro estudo que se tem conhecimento a avaliar a toxicidade de NP de ZnO sobre *Biomphalaria glabrata*. Espera-se contribuir para a ampliação dos

conhecimentos relacionados à área da nanociência e nanotoxicologia, para que a produção e o descarte dessas NPs bem como a toxicidade ao meio ambiente, sejam melhor compreendidos, a fim de gerar subsídios para formulação de políticas públicas que possibilitem a redução do impacto desses poluentes emergentes nos ecossistemas aquáticos.

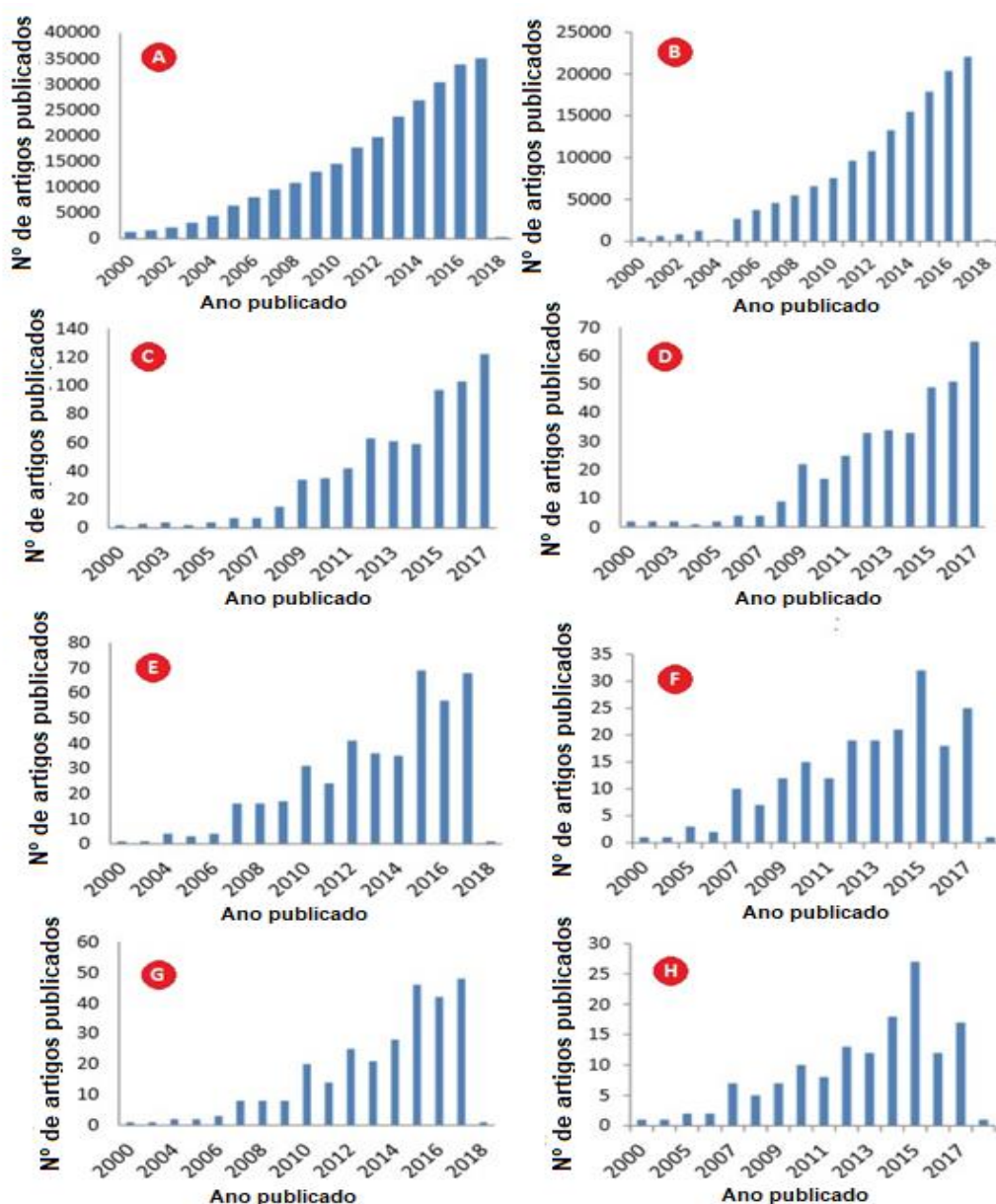


Figura 4 - Número de artigos identificados por [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com) que contém as palavras-chave: artigos de pesquisa sobre A) nanopartículas, B) nanopartículas engenheiradas, C) nanopartículas e invertebrados marinhos, D) nanopartículas engenheiradas e invertebrados marinhos, E) nanopartículas e bivalves, F) nanopartículas engenheiradas e bivalves, G) toxicidade de nanopartículas para bivalves, H) toxicidade de nanopartículas engenheiradas para bivalves. (Fonte: BUTT, 2018)

### 1.3 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO

As nanopartículas de óxido de zinco (NPs de ZnO), são uma das nanopartículas mais utilizadas, com produção de 30.000 toneladas estimadas por ano (VALE *et al.*, 2016). Isso se deve à sua capacidade catalítica e característica óptica-eletrônica. As NPs de ZnO, apresentam grande versatilidade, sendo assim aplicadas em diversos produtos manufaturados, tais como biosensores, materiais eletrônicos (BRAYNER *et al.*, 2010), cerâmica, material de borracha, como um fungicida (NADAFFI *et al.*, 2011), larvicida (UMRANI & PAKNIKAR, 2014), em tratamentos de águas residuais (WONG *et al.*, 2010), revestimentos, tintas (BLINOVA *et al.*, 2010) e indústria têxtil (HEILAAN *et al.*, 2008).

Estudos recentes indicam que as NPs de ZnO estão em terceiro lugar entre as nanopartículas mais produzidas (550 toneladas anuais), ficando atrás apenas da SiO<sub>2</sub> (dióxido de silício) e TiO<sub>2</sub> (dióxido de titânio) (BONDARENKO *et al.*, 2013).

Uma das propriedades únicas das NPs de ZnO está relacionada a atuação de agentes atenuadores de UV que refletem, dispersam e absorvem a radiação, demonstrando uma forma eficaz de proteger a pele e tornando-os uma das NPs mais utilizadas em produtos de cuidados pessoais (filtros solares, pasta de dente, cosméticos) (BLINOVA *et al.*, 2010; XIONG *et al.*, 2011). A produção e uso generalizados das NPs de ZnO aumentam o potencial de liberação no meio ambiente (FRANKLIN *et al.*, 2007; WONG *et al.*, 2010, KHOSHNOOD *et al.*, 2016; MINETTO *et al.*, 2017; WANG *et al.*, 2018; BANERJEE & ROYCHOUDHURY, 2019). Algumas pesquisas apontam que pelo menos 25% da quantidade de protetor solar aplicado na pele é lavado durante o banho (WONG *et al.*, 2010), trazendo alta possibilidade de ser liberado para o meio ambiente (FRANKLIN *et al.*, 2007; WONG *et al.*, 2010). GOTTSCHALK *et al.*, 2009), afirmam que o volume de descarga de nanopartículas de ZnO foi o segundo maior, perdendo apenas para o de nanopartículas de TiO<sub>2</sub>.

Apesar de ser um microelemento essencial, o zinco iônico é tóxico em concentrações mais elevadas para os organismos aquáticos (BRUN *et al.*, 2014; MORTIMER *et al.*, 2010). A toxicidade da NP de ZnO está relacionada a dissociação iônica na água, geração de ROS e consequente desestabilização das membranas lipídicas, danos as proteínas e ao DNA (BUTT, 2018). O acúmulo de NP-ZnO no corpo humano, por exemplo, pode causar toxicidade às células brônquio-epiteliais

(HENG *et al.*, 2010) e do fígado (VYOM *et al.*, 2011). Além disso, em outros estudos relacionados ao meio ambiente, diversos autores relatam a toxicidade das NP-ZnO a organismos sensíveis como microcrustáceos, peixes e mamíferos (LOPES *et al.*, 2013; WEI BAI *et al.*, 2010; VYOM *et al.*, 2012). Os efeitos prejudiciais da toxicidade de NPs de ZnO (50-70 nm) foram relatados por Heinlaan *et al.* (2008), a partir da  $CL_{50}/48h$ , com valores de  $3,2 \text{ mg L}^{-1}$  e  $0,18 \text{ mg L}^{-1}$  para *D. magna* e *T. platyurus*. Em outro estudo, Blinova *et al.* (2010) encontraram  $EC_{50}/48h$  de  $2,6 \text{ mg L}^{-1}$  para *D. magna* e  $CL_{50}/24h$  de  $0,14 \text{ mg L}^{-1}$  para *T. platyurus*. No entanto, as informações sobre os efeitos ecotoxicológicos das NPs de ZnO são muito limitadas em todos os táxons e são necessários mais estudos para explicar os mecanismos de toxicidade a nível celular, do organismo ou da população (MA e LIN, 2013; VALE *et al.*, 2016).

#### 1.4 BIOMONITORAMENTO E BIOMARCADORES

O biomonitoramento consiste na realização de um diagnóstico através de mudanças nas respostas fisiológicas de espécies utilizadas como indicadores de qualidade ambiental (DOS SANTOS, 2013).

Espécies capazes de indicar os primeiros sinais de estresse ambiental em diferentes níveis de organização biológica são denominadas bioindicadores. E são amplamente utilizadas na avaliação da toxicidade de compostos químicos em áreas impactadas (ADAMS, 2002; OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2005). As medidas das respostas à exposição aos contaminantes, os biomarcadores, são cada vez mais usados em estudos de monitoramento ambiental para identificar os efeitos deletérios na biota. Os biomarcadores podem indicar se há contaminação ambiental em grau suficiente para causar efeitos fisiológicos, através das respostas em níveis moleculares, antes mesmo de surgirem em níveis mais altos causando danos histológicos.

Caso ocorra falha nos mecanismos de defesa dos organismos, sua reprodução ou sobrevivência pode ser afetada podendo, eventualmente, acarretar em mudanças a nível populacional/comunidade. Sendo assim, biomarcadores devem ser considerados como indicadores precoces de contaminação ambiental (SCHLENK, 1999).

#### 1.4.1 Espécies reativas de oxigênio, danos a biomoléculas, defesas antioxidantes e estresse oxidativo

O oxigênio é uma parte fundamental da vida aeróbia, uma molécula de grande importância já que participa do processo de produção de energia através da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria dos eucariotos e em inúmeras vias metabólicas fundamentais. Contudo, o consumo desta molécula possibilita a formação de radicais livres e substâncias que podem ser tóxicas a nível intracelular e extracelular, as espécies reativas de oxigênio (ROS) (BARBOSA *et al.*, 2010 CONDESSA, 2014). Entre estas substâncias estão os radicais superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxila ( $OH^\cdot$ ). (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). As ROS apresentam funções biológicas importantes quando em concentrações homeostáticas, estão envolvidas no processo de produção de energia, fagocitose e sinalização intercelular. O peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) desempenha um papel importante na sinalização já que apresenta maior estabilidade e maior tempo meia vida. Assim, a flutuação do nível de  $H_2O_2$  pode refletir as mudanças ambientais. Por exemplo, infecção por patógenos, ferimentos, variações extremas de temperatura, incidência de radiação ultravioleta (NEILL *et al.*, 2003).

No entanto, o excesso destas substâncias pode promover a peroxidação dos lipídios da membrana plasmática e agressão às proteínas, enzimas, carboidratos e DNAs (BARREIROS e DAVID, 2006; (RAMOS *et al.*, 2000). A célula conta com defesas importantes para lidar com estes diferentes efeitos biológicos provocados, as defesas antioxidantes, que podem ser produzidas pela própria célula ou adquiridas a partir da dieta alimentar. O sistema de defesa antioxidante, enzimático ou não enzimático, inibe o estresse oxidativo e limita o excesso da síntese de ROS (DROGE, 2002) (Figura 5). Entre as principais defesas antioxidantes não enzimáticas estão, as vitaminas C e E, carotenoides, flavonoides, pigmentos biliares, urato e o tripeptídeo glutathiona (GSH). As defesas antioxidantes enzimáticas também são fundamentais, dentre elas estão as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (Cat) e glutathiona peroxidase (GPx) (REISCHL *et al.*, 2007; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). Elas são responsáveis por evitar a formação de ROS, neutralizar as espécies reativas assim como realizar uma possível reparação de danos causados. Quando os níveis de ROS extrapolam a defesa antioxidante de um

organismo, e ocorre um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidantes as células entram em estresse oxidativo, podendo resultar em proliferação celular, adaptação (aumento das defesas celulares, deixando a célula superprotegida), dano celular (a um ou mais tipos de biomoléculas como lipídios, proteínas, DNA, carboidratos, etc.), senescência (sistema de divisão celular comprometido) e morte celular (danos oxidativos ao DNA, mitocôndria podem causar morte celular por apoptose ou necrose) (CARBALLAL *et al.*, 2003; DE ALMEIDA *et al.*, 2007; HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007; VALKO *et al.*, 2005) (Figura 6).



Figura 5 - Principais defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas. (Fonte: CAROCHO e FERREIRA 2013).

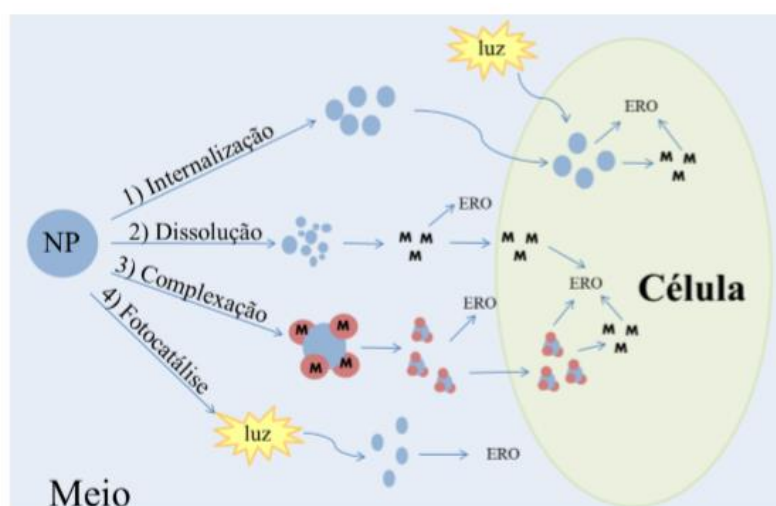


Figura 6 - Representação das possíveis rotas para a geração de ROS na presença de NP. (1) Internalização poderia gerar ROS devido à dissolução das NPs nas células e/ou à atividade fotocatalítica das NP. (2) Dissolução das NPs levaria ao aumento na concentração de íons metálicos (M) no meio, podendo alguns desses metais serem capturados pelos organismos. (3) NPs podem adsorver/complexar outros metais presentes no meio, podendo ser tomados pelas células. (4) Atividade fotocatalítica das NPs na presença de radiação ultravioleta e/ou luz natural. (Fonte: GIRARDELLO, 2016)

## 1.5 VIAS DE ENTRADA E MECANISMOS DE AÇÃO DE NANOPARTICULAS EM SISTEMAS VIVOS

Os sistemas aquáticos, a atmosfera e o contato com o solo são considerados as principais rotas de exposição de um nanomaterial no ambiente (PASCHOALINO *et al.*, 2009). No ambiente terrestre, a absorção por inalação ou ingestão de nanopartículas são as principais vias de entrada nos organismos (MOORE, 2002; HOWARD, 2004; WARHEIT, 2004). Na biota aquática a absorção de nanopartículas pode ocorrer a partir da ingestão direta e/ou a entrada através dos epitélios branquiais ou de superfícies externas (MOORE, 2006; OBERDÖRSTER *et al.*, 2004).

Algumas características como, aglomeração, agregação, adsorção e sedimentação influenciam diretamente o destino das nanopartículas no meio ambiente (LOWRY *et al.*, 2012). Além disso, para prever o comportamento das NPs em ambientes aquáticos deve-se levar em consideração fatores físicos e químicos (pH, eletrólito, matéria orgânica etc.) (BAALOUSHA *et al.*, 2013; ROMANELLO e DE CORTALEZZI, 2013).

As formas e propriedades das NPs também podem ser alteradas a partir da interação com partículas coloidais inorgânicas e orgânicas que estão presentes no ambiente aquático (espeiação dinâmica). Assim, é importante considerar a espeiação dinâmica e a reação das NPs no compartimento ambiental para fazer previsões relevantes do destino e dos riscos das NPs (VALE *et al.*, 2016).

Uma vez no ambiente aquático, as nanopartículas podem ser absorvidas pelos organismos a partir de mecanismos físicos atribuídos ao tamanho das partículas e às propriedades da superfície que podem provocar o rompimento da membrana (BHATT e TRIPATHI, 2011; NEL *et al.*, 2009; HUSSAIN *et al.*, 2005; LEROUEIL *et al.*, 2008) e processos de transporte (OVREVIK *et al.*, 2004). A função da membrana pode ser afetada, já que as NPs podem aderir a uma célula e bloquear os poros da membrana celular. A internalização das nanopartículas também pode ocorrer via endocitose, através do processo de difusão ou transporte de íons. A absorção das NPs também pode ser atribuída a mecanismos químicos que incluem a produção de (ROS), dissolução e liberação de íons tóxicos, dano oxidativo por catálise e peroxidação lipídica (ELSAESSER e HOWARD, 2012) (Figura 7).

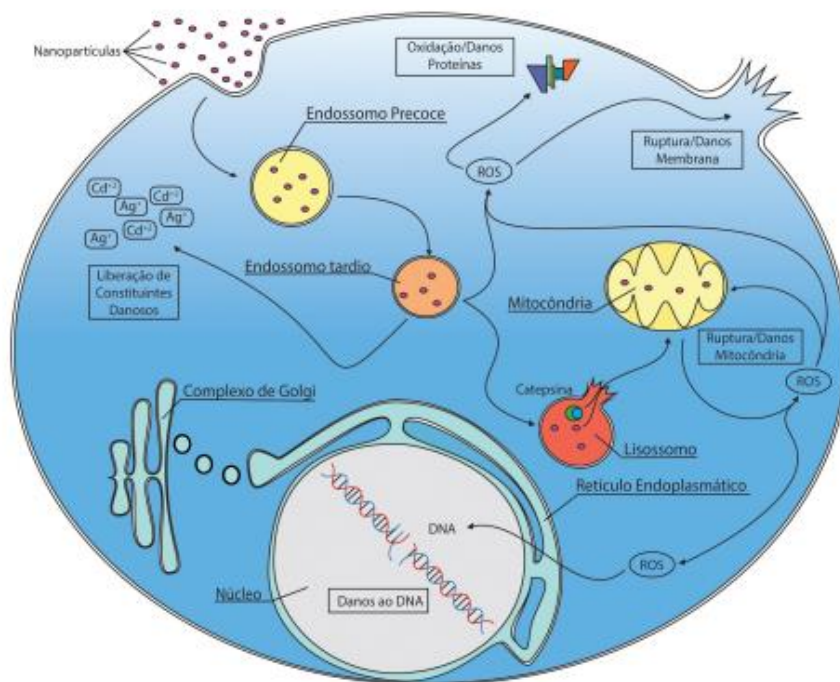


Figura 7 - Principais efeitos tóxicos desencadeados por nanomateriais em células eucarióticas. Fonte: RADAIC *et al.*, 2016)

### 1.5.1 Nanopartículas metálicas e biomarcadores do estresse oxidativo

As NPs metálicas podem induzir a liberação de íons metálicos tóxicos das nanopartículas na fase aquosa e a produção de radicais livres ou espécies reativas de oxigênio (BRUNNER *et al.*, 2006; REGOLI *et al.*, 2002a; REGOLI *et al.*, 2002b; VIARENGO *et al.*, 2007, RADAIC *et al.*, 2016). As NPs podem agir de forma direta, causando danos oxidativos na molécula de DNA ou de forma indireta, causando danos por interação com moléculas intermediárias ou proteínas envolvidas no processo de divisão celular (CHEUNG *et al.*, 2001; LAM *et al.*, 2004; SYCHEVA *et al.*, 2011).

Várias NPs inorgânicas como ZnO, CuO e Ag induziram estresse oxidativo em microorganismos aquáticos (VON MOOS & SLAVEYKOVA, 2013 ). Estudos relatam a que após a exposição à radiação UV, as NPs de TiO<sub>2</sub> promovem a geração de ROS em peixes, invertebrados e algas (KUS *et al.*, 2006; MENARD *et al.*, 2011; ZHAO *et al.*, 2007). Vários relatórios estão disponíveis sobre a toxicidade das NPs de ZnO em crustáceos de água doce, como *Daphnia magna* (BLINOVA *et al.*, 2010; HEINLAAN *et al.*, 2008; WIENCH *et al.*, 2009; ZHU *et al.*, 2009) e *Thamnocephalus platyurus* (BLINOVA *et al.*, 2010; HEINLAAN *et al.*, 2008).



As células apresentam importantes defesas celulares contra os efeitos tóxicos causados por metais. Entre elas está a indução da produção de metalotioneínas (MTs), que são proteínas de baixo peso molecular, ricas em cisteína e responsáveis por transportar, estocar e armazenar íons metálicos e controlar a concentração de elementos traços livres como zinco (Zn) e cobre (Cu). As MTs também apresentam papel protetor no sequestro de metais e na proteção contra condições de estresse (BENALI *et al.*, 2015; VIARENGO *et al.*, 1997; VIARENGO *et al.*, 1999). Estudos demonstram que as MTs são super-expressas em organismos que experimentam altas concentrações de metais em seu ambiente e o nível de metalotioneínas tem sido usado como um biomarcador para contaminação por metais no ambiente aquático (LAP *et al.*, 2005; THIRUMOORTHY *et al.*, 2007; ROY *et al.*, 2011)

#### 1.5.2 Sistema imunológico dos invertebrados

A fim de lidar com os danos provenientes do estresse oxidativo, o sistema imunológico dos invertebrados apresenta mecanismos básicos como, barreiras físico-químicas, defesas celulares e mecanismos humorais (ADAMO, 2012).

Dentre os mecanismos mais comuns estão, fagocitose, produção de ROS e radicais de nitrogênio, síntese e secreção de proteínas antibacterianas e antifúngicas, proteínas semelhantes a citocinas, enzimas hidrolíticas, ativação de cascatas enzimáticas que regulam a melanização e coagulação da hemolinfa. Essas funções são geralmente realizadas por células de circulação livre (hemócitos, coelomócitos) no sangue (hemolinfa, cavidade celômica) (CANESI e PROCHÀZOVÀ, 2013).

As barreiras protetoras anatômicas e químicas constituem a imunidade natural dos moluscos e evitam danos aos tecidos, perdas de fluidos corporais e infecções de microrganismos e parasitas patogênicos. A concha e o muco que cobre o corpo mole constituem a principal barreira física. O tipo celular mais abundante no sangue dos moluscos, são os hemócitos granulares, células maduras capazes de realizar fagocitose, produção de ROS e NO, liberação de enzimas hidrolíticas e peptídeos antimicrobianos (GLINSKI & JAROSZ, 1997; CANESI *et al.*, 2012).

## 1.6 PARÂMETROS PARA AVALIAÇÃO DE EFEITOS EM ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA

A ecotoxicologia visa compreender como os poluentes químicos, de forma isolada ou em combinação com outros estressores, podem afetar os ecossistemas de forma integral (TRUHAUT, 1977). Com o avanço da nanotecnologia surge uma sub-disciplina da ecotoxicologia, a nanoecotoxicologia que visa especificamente entender e identificar os efeitos dos nanomateriais no ecossistema (SCHIRMER *et al.*, 2013).

É crescente o número de estudos que relatam a toxicidade de vários nanomateriais, especificamente nanopartículas, para organismos que vivem no ambiente aquático, incluindo plantas, fungos, algas, invertebrados e peixes (BAUN *et al.*, 2008; FARRE *et al.*, 2009; HANDY *et al.*, 2008; NAVARRO *et al.*, 2008). Inicialmente, grande parte dos estudos tiveram como principal objetivo documentar os efeitos tóxicos e as concentrações de nanopartículas que apresentavam algum efeito tóxico para organismos individuais. Recentemente, deu-se uma maior importância para a adequada caracterização da NP. No entanto, poucos são os estudos que buscam compreender a biodisponibilidade ambiental das NPs ou a sensibilidade das comunidades bióticas e processos ecossistêmicos à exposição a NP. Sendo assim, é importante que haja uma visão ecológica em nanotoxicologia (BERNHARDT *et al.*, 2010; KLAINE *et al.*, 2008).

### 1.6.1 Toxicidade Aguda

Os testes de toxicidade aguda avaliam uma resposta severa e rápida dos organismos a um estímulo que pode se manifestar num período de 0 a 96 horas (RAND & PETROCELLI, 1985). Os efeitos avaliados, em geral, são letalidade e imobilização dos organismos. Os objetivos destes testes são determinar a Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>) ou a Concentração Efetiva Média (CE<sub>50</sub>), isto é, a concentração do xenobiótico que causa mortalidade ou imobilidade, respectivamente, a 50% dos organismos-teste depois de um determinado tempo de exposição (MAGALHÃES & FERRÃO-FILHO, 2008). A avaliação ecotoxicológica aguda dos ecossistemas aquáticos a partir dos modelos biológicos, constitui-se como

uma abordagem exploratória a fim de evidenciar a realidade dos ecossistemas aquáticos que recebem despejos domésticos e industriais (BERTOLETTI & ZAGATTO, 2006). No Brasil, estes testes são utilizados no monitoramento de efluentes industriais com o objetivo de minimizar o impacto ambiental, avaliar a eficiência das estações de tratamento bem como um requisito para obtenção e manutenção da licença junto aos órgãos ambientais alguns Estados.

Determinar a letalidade possibilita estimar a concentração e o risco potencial de uma substância química causar alterações fisiológicas em uma determinada espécie em estudo (HEATH, 1995). As concentrações subletais estão abaixo da CL<sub>50</sub>, e são importantes pois podem revelar as prováveis alterações biológicas induzidas por um dado xenobiótico.

Os testes para determinar efeitos agudos, quando utilizados de forma isolada, são considerados insuficientes para antecipar danos aos ecossistemas causados por substâncias ou misturas de substâncias, entretanto, esses testes continuam sendo ferramentas de grande importância na identificação da periculosidade dessas substâncias (OLIVEIRA-FILHO, 2003).

### 1.6.2 Toxicidade Crônica

A fim de evidenciar os efeitos adversos resultantes de exposições prolongadas dos organismos a concentrações não letais das substâncias químicas, os testes de toxicidade crônica foram elaborados. Estes testes avaliam os seguintes parâmetros (OLIVEIRA-FILHO, 2003):

- Teste de Toxicidade Crônica com Ciclo de Vida Completo;
- Teste de Toxicidade Crônica com Ciclo de Vida Parcial e;
- Teste de Toxicidade para Estágios Iniciais de Vida (ELS – “Early Life Stages”)

O teste de toxicidade crônica é realizado a partir da exposição de um organismo durante seu ciclo reprodutivo completo, ou seja, de ovo a ovo, à pelo menos cinco concentrações da substância-teste (RAND *et al.*, 1995).

Durante a realização dos testes crônicos com ciclo de vida parcial, indivíduos jovens são expostos durante sua maturação até a reprodução, e só termina após a

eclosão da próxima geração. Os testes envolvendo estágios iniciais de vida tem início com a exposição do ovo fertilizado, continuam durante o desenvolvimento embrionário, larval e juvenil, sendo observados principalmente os efeitos sobre a sobrevivência e o crescimento (MCKIM, 1995).

### 1.6.3 Testes rápidos de efeitos sobre reprodução e desenvolvimento

As limitações próprias ao sistema de exposição e ao alto custo do ensaio, em muitos casos, limitam a utilização dos testes crônicos, principalmente, quando o objetivo é o monitoramento da toxicidade de efluentes. Portanto, neste caso, testes crônicos prolongados, envolvendo a exposição por todo o ciclo de vida de um organismo, não são práticos para avaliações toxicológicas de rotina.

Visando a necessidade de respostas rápidas para ações regulatórias, a Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA), formou comissões que desenvolveram 4 testes de curta duração, utilizando estágios iniciais de vida, para estimar os efeitos crônicos de efluentes sobre organismos aquáticos. Esses testes foram bem aceitos pela comunidade científica internacional, e atualmente, são referências em termos de avaliação de toxicidade aquática (OLIVEIRA-FILHO, 2003).

Estes testes são:

- Teste Semi-Estático de 7 dias, para avaliar a sobrevivência e o crescimento de larvas do peixe *Pimephales promelas*;
- Teste Semi-Estático de 7 dias, para avaliar a sobrevivência e a teratogenicidade na fase embrio-larval do peixe *Pimephales promelas*;
- Teste Semi-Estático de 7 dias, para avaliar a sobrevivência e a reprodução do crustáceo *Ceriodaphnia dubia*;
- Teste Estático de 4 dias, para avaliar a inibição do crescimento da microalga verde *Selenastrum capricornutum*.

Devido à percepção do aumento da infertilidade nos países desenvolvidos, (Europa, 16% em 1976 para 20% em 2004) (dados da OMS. Veja: [http://www.euro.who.int / \\_\\_ data / assets / arquivo\\_pdf / 0010/73954 / EN63.p df](http://www.euro.who.int / __ data / assets / arquivo_pdf / 0010/73954 / EN63.pdf)) houve um

crescente aumento no número de trabalhos publicados sobre o papel dos nanomateriais em funções reprodutivas e no desenvolvimento embrionário (CAMPAGNOLO *et al*, 2012). Sendo assim, estes fatores estimularam o surgimento de uma nova área na ciência que têm como objetivo analisar as interações nano-bio com foco em sistemas reprodutivos e desenvolvimento embrionário, a “nanoreprotoxicologia”. (TAYLOR *et al.*, 2012; POMA *et al.*, 2014).

### 1.7 CARACTERIZAÇÃO DO ORGANISMO-TESTE *B. glabrata*

O organismo-teste adotado no presente estudo é o molusco da classe gastrópoda, da espécie *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) (Figura 8). Frequentemente, os gastrópodos do gênero *Biomphalaria* são utilizados como biomarcadores para estudos sobre poluição em ecossistemas aquáticos (WAGNER, 2000), pois, são excelentes modelos para estudos ecotoxicológicos de efeitos deletérios em ambientes aquáticos (OLIVEIRA-FILHO, 2014; RIVERO-WENDT, 2014).



Figura 8 – *Biomphalaria glabrata*: conchas de exemplares adultos. (Fonte: CARVALHO *et al*, 2007).

Algumas características são fundamentais para identificação do gênero *Biomphalaria* como, concha discoidal, hemolinfa vermelha, mandíbula em T, olhos na base interna dos tentáculos, dente central da rádula bicúspide e sem dentículo acessório, glândulas salivares por fora do anel nervoso periesofágico, complexo peniano sem órgão acessório, pênis simples coincidindo sua ponta com a abertura do canal do esperma (PARAENSE, 1972).

A espécie *B. glabrata* habita ambientes límnicos que apresentam condições ecológicas necessárias para sua sobrevivência e reprodução e são capazes de se reproduzir através da auto-fecundação (hermafroditas), porém, apresentam preferência pela fecundação cruzada. Sendo assim, em condições adequadas de luz, temperatura, pH, salinidade podem reproduzir durante todo o ano, proliferando rapidamente pelo ambiente (COSTA, 2011). Geralmente, a oviposição ocorre durante a noite e a massa de ovos ou desova é colocada sobre o lado inferior de folhas flutuantes, plantas, rochas, conchas de outros moluscos, madeira, etc. Os ovos ao serem depositados são envolvidos por uma cápsula (Figura 9), constituída por uma substância gelatinosa, produzida pela glândula nidamental (MORAES *et al.*, 2008). O enrijecimento da massa ovígera ocorre de forma lenta a partir do contato com a água, e em torno de meia hora passa a apresentar a forma de um disco transparente, firme e flexível. (PARAENSE, 1972). O ovo começa a se dividir cerca de duas horas após a postura (KAWANO *et al.*, 1992), e entre sete e dez dias pode ocorrer a eclosão (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 1999a). O desenvolvimento do embrião pode ser considerado como um “elo fraco” no ciclo de vida de um organismo. Ao longo deste período, processos celulares e moleculares são realizados visando gerar um organismo multicelular complexo. Na maior parte dos casos, esses processos são sensíveis e facilmente perturbados por substâncias químicas (BANTLE, 1995).

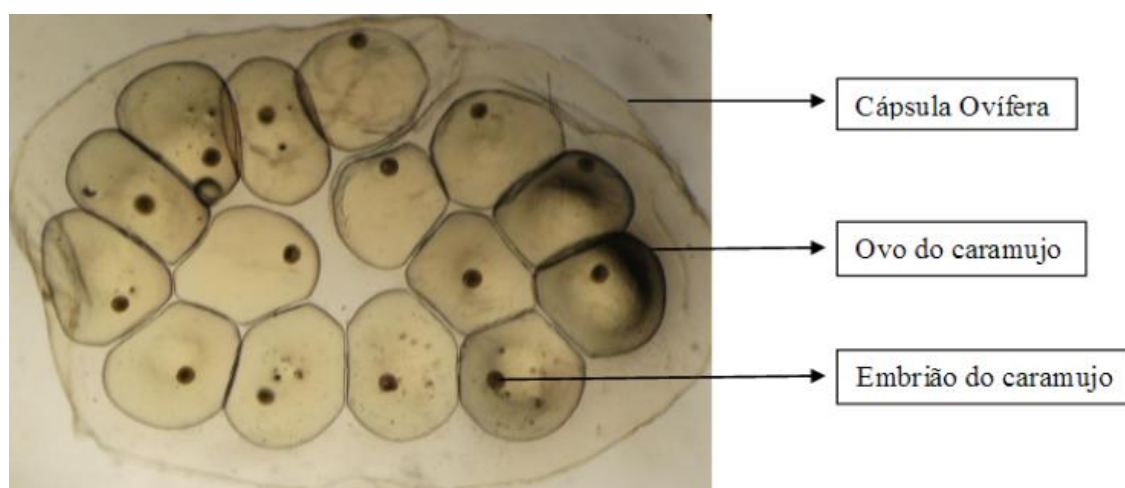


Figura 9 – Massa ovígera de *B. glabrata* com 15 ovos. (Fonte: SOUZA, 2006)

A análise da oviposição é baseada em dois fatores, fecundidade e fertilidade. Na fecundidade é avaliado o número de massas ovígeras, de ovos por caramujo e de ovos/massa ovígera.

A fertilidade avalia a taxa de eclosão dos caramujos e a proporção de ovos férteis e não férteis (KAWAZOE, 1977; COSTA *et al.*, 2004).

Nos caramujos do gênero *Biomphalaria*, o número de ovos por massa ovígera pode variar de 1 a 100. Alguns fatores podem interferir na reprodução dos caramujos, tendo até a capacidade de impedir a oviposição (MORAES *et al.*, 2008). Dentre estes fatores estão, infecção do caramujo pelo parasita *Schistosoma Mansoni*, exposição à metais e o tipo de alimentação (ANSALDO, *et al.*, 2009).

Segundo Paraense (1970), o gênero *Biomphalaria* pode ser encontrado em uma variedade de coleções de água doce, parada ou pouco corrente, tais como lagoas, lagos, poças, cisternas, pântanos, banhados, remansos de rios, riachos, canais de irrigação e de drenagem, etc. Preferencialmente, em águas rasas, tendo como substrato o leito lodoso ou rochoso e a vegetação enraizada ou flutuante mais próxima das margens. Sendo assim, na maioria dos habitats favoráveis à sua colonização, é possível observar algumas características comuns, como riqueza de microflora e matéria orgânica, boa insolação, pouca turbidez, pH entre cerca de 6 e 8 e temperatura média entre 20 e 25 °C.

A espécie *Biomphalaria glabrata* Say, 1818, é o maior molusco da família Planorbidae e sua distribuição geográfica se dá por cerca de dezesseis estados do Brasil, além do Distrito Federal. (CARVALHO *et al.*; 2008.)

Tal como, os moluscos pulmonados aquáticos típicos, os caramujos do gênero estudado, predominantemente apresentam respiração atmosférica, resultante do processo adaptativo dos moluscos branquiados aquáticos ao ambiente terrestre (PARAENSE, 1955). Sua hemolinfa circula em um sistema circulatório semi-aberto, e difere de outros planorbídeos por conter hemoglobina dissolvida como pigmento respiratório (COSTA, 2011). Os hemócitos, células presentes na hemolinfa são responsáveis por mediar seu sistema de defesa celular e podem ser estimulados por alterações externas no meio. Em razão do alto investimento em pesquisa decorrente da sua importância como hospedeiro intermediário do *S. mansoni* muitos aspectos de sua biologia e ainda suas respostas a ensaios ecotoxicológicos já foram estudados (BAPTISTA *et al.*, 1992; MENDES *et al.*, 1992; BAPTISTA & JURBERG 1993; BAPTISTA *et al.*, 1994; VASCONCELLOS & BAPTISTA 1996; MENDES *et al.*, 1997; BAPTISTA *et al.*, 1997; SCHALL *et al.*, 1998; COELHO DA SILVA *et al.*, 2013).

Entretanto ainda existem poucos estudos de avaliação dos efeitos de nanopartículas sobre espécies do grupo (BERNOT & BRANDENBURG, 2013; FAHMY, *et al.*, 2014). Moluscos aquáticos, em particular, os caracóis, acumulam metais persistentes, portanto, esses organismos podem servir como excelentes espécies bioindicadoras para o monitoramento biológico de toxinas de poluentes metálicos para melhorar os padrões de qualidade da água para diversos usos (SAWASDEE & KOHLER, 2009; SCHAMPHELAERE *et al.*, 2007, LALAH *et al.*, 2007; WAGNER, 2000; OLIVEIRA-FILHO, 2014; RIVERO- WENDT, 2014).

Além disso, outros trabalhos foram realizados a fim de avaliar efeitos induzidos por xenobióticos sobre o desenvolvimento embrionário do caramujo *Biomphalaria glabrata* (GERALDINO, 2004; OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2019). No entanto, poucos trabalhos avaliam os efeitos ecotoxicológicos das nanopartículas sobre reprodução, desenvolvimento embrionário e eclosão.



## 2 OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos das nanopartículas de óxido de zinco (NPs de ZnO) sobre o gastrópode *Biomphalaria glabrata*, durante exposições aguda e crônica, de maneira a identificar os possíveis impactos no ciclo de vida (reprodução, resposta imunológica, estresse oxidativo) desses moluscos.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos ecotoxicológicos agudos sobre a espécie *Biomphalaria glabrata* com a determinação das concentrações letais e sub-letais (CL<sub>10</sub>, CL<sub>30</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) de nanopartículas de óxido de zinco.
- Analisar os efeitos celulares por Citometria de Fluxo, na fase adulta dos moluscos submetidos aos testes ecotoxicológicos;
- Avaliar a viabilidade dos embriões de *Biomphalaria glabrata* expostos as concentrações sub-letais de nanopartículas de Óxido de Zinco.
- Realizar testes ecotoxicológicos agudo e crônico (concentrações subletais) com a finalidade de avaliar os efeitos da exposição contínua no desempenho reprodutivo de indivíduos de *Biomphalaria glabrata* expostos às concentrações sub-letais de NPs de ZnO e sua possível recuperação.
- Quantificar a espécie reativa de oxigênio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Peróxido de Hidrogênio) por espectrofotometria de absorção molecular no ultravioleta-visível (UV-Vis) em diferentes matrizes dos moluscos expostos às Nanopartículas de Óxido de Zinco (massa cefalopediosa visceral, glândula digestiva e hemolinfa).

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE ZINCO (ZNO)

Neste trabalho avaliou-se o efeito das NPs de ZnO, com diâmetro <100 nm com média de 35 nm, 50% do peso em H<sub>2</sub>O, pH 7±0.1 (para meio aquoso), Densidade: 1.7 g/mL± 0.1 g/mL a 25 °C, Produto No 721077 (Sigma-Aldrich). É um produto de natureza analítica, com as suas propriedades físico-químicas definidas: Pureza de 99,9 %, Potencial Zeta >-30 e <30 Mv.

Anterior à realização dos experimentos de toxicidade e reprodução as nanopartículas foram caracterizadas para fornecer uma base para a compreensão dos efeitos tóxicos observados. As propriedades físico-químicas que foram determinadas incluíram tamanho da partícula, polidispersão, potencial zeta, pH e dureza. As medidas foram realizadas a 25 °C, após diluição apropriada das amostras em água tipo II. As diluições analisadas correspondem as concentrações letais e subletais encontradas durante a realização do trabalho 2 mg L<sup>-1</sup> (CL<sub>10</sub>), 6 mg L<sup>-1</sup> (CL<sub>30</sub>), 10 mg L<sup>-1</sup>(CL<sub>50</sub>) e 17 mg L<sup>-1</sup> (CL<sub>90</sub>). O Tamanho das partículas, o Índice de Polidispersão e o Potencial Zeta das nanopartículas de óxido de zinco foram determinados usando o SZ-100 Nanopartica (HORIBA Scientific). Cada análise de tamanho durou 150s e para determinar o potencial zeta, as amostras foram colocadas em célula eletroforética, onde um potencial de ± 150 mV foi estabelecido.

#### 3.2 ORGANISMO-TESTE

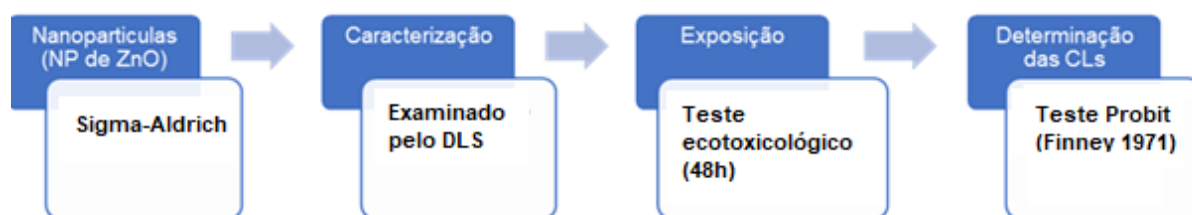
O molusco de água doce (Mollusca, Gastropoda), *Biomphalaria glabrata*, foi utilizado como organismo-teste. Frequentemente, os gastrópodos do gênero *Biomphalaria* são utilizados como biomarcadores para estudos sobre poluição em ecossistemas aquáticos (WAGNER, 2000), pois, são excelentes modelos para estudos ecotoxicológicos de efeitos deletérios em ambientes aquáticos (OLIVEIRA-FILHO, 2014; RIVERO-WENDT, 2014).

Todos os espécimes de *B. glabrata* utilizadas neste estudo são oriundos de Sumidouro/RJ de criadouros semi-naturais mantidos no Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental do Instituto Oswaldo Cruz, sob condições livres de contaminação ambiental.

### 3.3 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

#### 3.3.1 Avaliação dos efeitos tóxicos em adultos e neonatos de *B. glabrata* e determinação das concentrações letais e subletais das NPs de ZnO

Os primeiros testes de ecotoxicidade foram realizados objetivando a determinação das concentrações letais e subletais das NPs de ZnO. Testes de ecotoxicidade aguda foram realizados com base na exposição de 3 réplicas contendo 10 caramujos adultos cada para cada uma das concentrações testes (2, 5, 10, 15, 25 e 50 mg L<sup>-1</sup>). O mesmo procedimento foi replicado em intervalos de concentrações menores até serem definidas a série das concentrações letais e subletais (CL<sub>10</sub>, CL<sub>30</sub>, CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>). As definições das séries subletais foram realizadas pelas análises do teste Probita (FINNEY, 1971). As etapas descritas acima foram representadas no diagrama a seguir (Figura 10).



Concentração	Nº de indivíduos	Nº de réplicas
0 (controle)	10	3
1 mg/L	10	3
5 mg/L	10	3
10 mg/L	10	3
15 mg/L	10	3
25 mg/L	10	3
50 mg/L	10	3

Figura 10 - Diagrama mostrando as etapas para a exposição aguda de *Biomphalaria glabrata* as NPs de ZnO

A partir da determinação das CLs, outros testes foram realizados com o objetivo de analisar o desempenho reprodutivo de caramujos adultos, a sobrevivência de embriões expostos, os efeitos celulares das NPs e a alteração na produção de espécies reativas de oxigênio.

A partir de testes preliminares, foi identificado que a CL<sub>10</sub> dos adultos causava a morte de 100% da população de neonatos. Assim, para os experimentos realizados com neonatos, utilizou-se concentrações mais baixas de NPs de ZnO. Para os testes de curta duração (48h) utilizou-se tais concentrações, 0,1; 0,2; 0,4; 1,0; 2,0 mg L<sup>-1</sup>, e para o teste de 21 dias, foi escolhida a menor concentração, 0.1 mg L<sup>-1</sup>. Em todos os testes, foram seguidas as seguintes metodologias: 3 réplicas para cada concentração e 10 neonatos em cada réplica, sendo um total de 30 neonatos por concentração analisada. Para estes experimentos foram utilizadas placas de poliestireno de 100 ml, já que os neonatos apresentam tamanho bem reduzido em relação aos indivíduos adultos. Os neonatos utilizados nesta etapa foram obtidos anteriormente de um grupo controle, não exposto, escolhidos aleatoriamente após a eclosão. O objetivo destes experimentos foi analisar a taxa de mortalidade dos neonatos na presença das nanopartículas e a relação entre o tempo de exposição e a sobrevivência de *B. glabrata*.

### 3.3.2 Contagem diferencial de hemócitos e viabilidade

#### Coleta de hemolinfa

A coleta da hemolinfa foi realizada através da punção da região cardíaca segundo Zelck & Becker, (1990) e Bezerra *et al.*, (1997). A fim de manter a integridade dos hemócitos e evitar a aglutinação celular, a hemolinfa foi coletada diretamente em CBSS contendo Citrato /EDTA [50 mM Citrato de Sódio, 10 mM EDTA, e 25 mM de sacarose] pH 7,2, a temperatura ambiente, na proporção de 1 de solução para 1 de hemolinfa, colocada em tubos de eppendorf e mantida em gelo. Para avaliar as alterações da população de hemócitos circulantes, foi retirada a hemolinfa de 10 caramujos de cada grupo analisado (controle, CL<sub>10</sub>, CL<sub>30</sub>, Cl<sub>50</sub> e Cl<sub>90</sub>).

### Câmara de Neubauer

A viabilidade dos hemócitos presentes nas amostras da hemolinfa dos grupos expostos às concentrações pré-determinadas e do grupo controle foi estimada através da incubação das células em meio CBSS com 10µl de Azul de Tripán (diluição 1:1). Os hemócitos foram caracterizados entre vivos e mortos com o auxílio de uma Câmara de Neubauer espelhada. Em cada lado da câmara foi depositado 10 µl da hemolinfa já diluída e analisada em microscópio óptico com objetiva de 40X. Foram utilizados 10 moluscos para cada grupo presente neste estudo. A contagem na câmara de Neubauer foi realizada imediatamente após a adição do corante. Desta forma, as células coradas de azul foram consideradas mortas (MARTINS-SOUZA, 1999).

### Citometria de fluxo

Para o estudo morfológico, fenotípico e funcional das células utiliza-se a técnica de citometria de fluxo. Isto se deve à sua capacidade de analisar vários parâmetros simultaneamente numa única célula. Esta técnica baseia-se na detecção da dispersão da fluorescência emitida por substâncias/moléculas fluorescentes – chamadas fluorocromos que conjugadas com anticorpos monoclonais ou não, se ligam a moléculas na superfície ou no interior das células, e são excitadas por uma fonte luminosa (LASER) (BERTHO e FERRAZ, 2013). As análises foram realizadas na Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular, do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro/RJ. Para a análise na Citometria de Fluxo as amostras contendo hemolinfa obtida dos moluscos foram diluídas na proporção de 1:1 com Solução Salina Balanceada de Chernin – CBSS, depositada em tubos de Eppendorf e mantida em gelo durante todo processo. Para a caracterização da morfologia, viabilidade e subpopulações dos hemócitos obtidos da hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* foram realizados ensaios no citômetro de fluxo CytoFlex (Beckman Coulter, FL, E.U.A.) instalado no Núcleo de Purificação Celular (sorting), da Plataforma de Citometria de Fluxo do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, RJ, Brasil. Posteriormente, utilizou-se o software específico Kaluza 1.5 (BECKMAN COULTER) para realizar a análise dos dados obtidos na aquisição no citômetro. As análises de

viabilidade e morfologia foram feitas baseadas nas descritas anteriormente por Martins-Souza et al. (2009), com algumas modificações.

Cinco tubos contendo 200 µL da hemolinfa total do molusco foram incubados com 100 µL do marcador de necrose iodeto de propídeo (PI), 20 µL do marcador de apoptose 7AAD e 5 µL da lectina PNA, respectivamente. Esta suspensão de hemócitos foi incubada por 20 minutos no gelo e ressuspendidas com 200µL de CBSS. Em seguida, as amostras foram imediatamente submetidas à análise pela citometria de fluxo e um protocolo foi elaborado, onde o sinal relativo ao tamanho (forwardscatter - FSC) e a granulosidade (sidescatter – SSC), assim como o de intensidade de fluorescência do PI, 7AAD e PNA capturado pelo citômetro de fluxo foram expressos em histogramas e dot-plots. Em cada amostra de hemolinfa foram analisados o total de 20.000 eventos. Para as análises no citômetro utilizou-se um pool da hemolinfa de 10 caramujos de cada grupo, pois, a quantidade de hemolinfa retirada de cada caramujo é muito pequena o que impossibilitou a análise nesta tecnologia de modo individual como foi feita na leitura da Câmara de Neubauer e na diferenciação dos hemócitos.

### 3.5 ENSAIOS REPRODUTIVOS

Nesta etapa os caramujos adultos foram expostos a 1 e 2 mg L<sup>-1</sup> de NPs de ZnO. Estes testes têm como base, a exposição de 10 moluscos adultos (3 meses após a eclosão e com 1cm de diâmetro) por réplica, para cada uma das concentrações testes. Os caramujos foram mantidos em beckers de vidro de 1L, tendo como suporte para as posturas, placas de espuma de poliestireno de 3 cm x 3 cm. Foram realizados testes de curta duração, com 48h de exposição e testes mais longos, de 7 e 21 dias. Durante a realização de todos os os experimentos, as desovas foram coletadas semanalmente. Os parâmetros observados foram, fecundidade (nº de massas ovíferas, nº de ovos férteis e inférteis) e fertilidade (nº de embriões eclodidos) (COSTA, 2011). Os caramujos foram alimentados com alface fresca *ad libitum*.

No teste agudo, após as 48h de exposição os caramujos foram transferidos para beckers de 1L, contendo água tipo II, sem a presença de nanopartículas e foram

observados ao longo das 5 semanas seguintes.

O diagrama abaixo (Figura 11) demonstra as etapas dos testes com curta duração (48h).

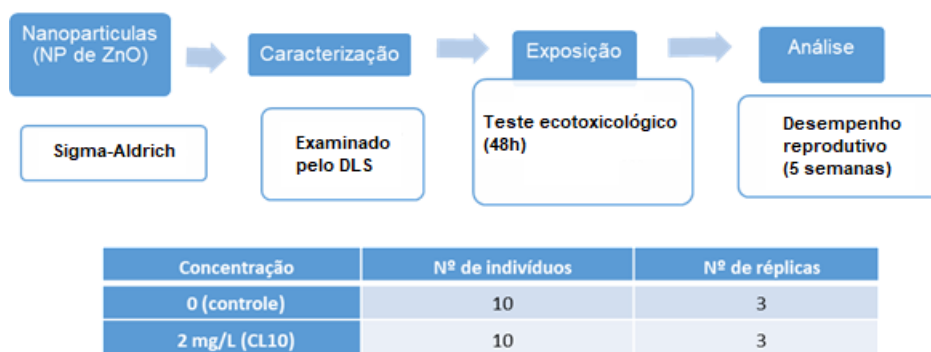


Figura 11 - Diagrama mostrando as etapas para a exposição de curta duração e avaliação de desempenho reprodutivo de *Biomphalaria glabrata* expostas as NPs de ZnO

Para a avaliação dos efeitos a longo prazo, foram seguidas duas metodologias distintas. A primeira consiste na exposição de caramujos adultos durante 7 dias, onde não ocorre renovação nem alteração da concentração e por isso, chamou-se de estático. A segunda, uma exposição denominada de semi-estática, pois a cada 7 dias a solução com a nanopartícula era substituída por outra com as mesmas características (KNIE & LOPES, 2004) (Figura 12). Para as duas metodologias descritas seguiu-se o mesmo protocolo em relação a observação dos parâmetros reprodutivos, fecundidade e fertilidade, descritos no início deste tópico.

Todos estes testes têm como objetivo esclarecer os efeitos das NPs de ZnO no desempenho reprodutivo de *B. glabrata*. Concentrações subletais a longo prazo podem afetar a fecundidade e a fertilidade destes caramujos? Além disso, esta interferência seria reversível após a retirada destes moluscos do ambiente exposto?

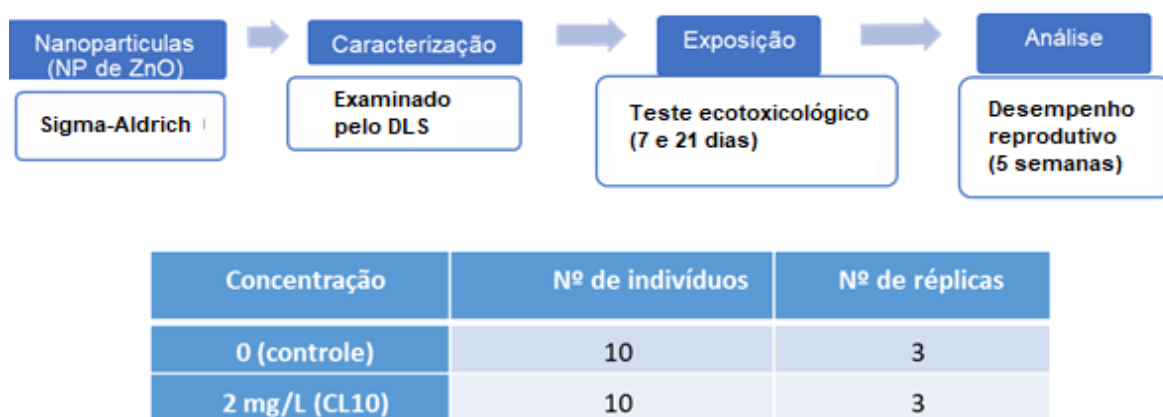


Figura 12 - Diagrama mostrando as etapas para os testes de longa duração e avaliação de desempenho reprodutivo de *Biomphalaria glabrata* expostas as NPs de ZnO

- Desempenho reprodutivo e potencial de recuperação a exposição sub-letal às NPs de ZnO

Para avaliar a possível recuperação da atividade reprodutiva, foram realizados 2 ensaios com as seguintes concentrações, 1 e 2 mg L<sup>-1</sup>. Os bioensaios foram realizados em trélicas de dez indivíduos adultos para controle e grupo exposto. A quantificação dos parâmetros reprodutivos (o número de desovas e o número de ovos) foi feita semanalmente durante 8 semanas (4 semanas de exposição – 4 semanas de recuperação).

### 3.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS DE NPS DE ZNO

Esta etapa consiste em avaliar o efeito das NPs de ZnO no desenvolvimento e eclosão dos embriões. Sendo assim, utilizou-se massas ovígeras de *B. glabrata* obtidas pela exposição de placas de petri, dispostos na superfície de aquários mantidos em condições controladas de (luz e temperatura) do Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental (LAPSA), IOC/FIOCRUZ.

Para esta etapa foram utilizadas concentrações ainda mais baixas, levando em consideração a sensibilidade das massas ovígeras. As concentrações usadas foram, 0,1 e 0,2 mg L<sup>-1</sup> e o tempo de exposição foi de 96h. Para cada concentração



testada foi utilizado um número mínimo de 100 ovos, com até 15 horas (após a postura) estando, portanto, no período de desenvolvimento máximo correspondente ao estágio blástula (CAMEY & VERDONK, 1970). As desovas foram distribuídas em placas de Petri contendo as diversas concentrações testadas. A partir de 96 horas de exposição às desovas foram transferidas para água tipo II sem nanopartículas, e observadas até o 10º dia após a postura. Ao final dos 10 dias (período considerado adequado para eclosão dos ovos não expostos) foram avaliadas a embrioletalidade e a proporção de ovos que eclodiram (retardo de desenvolvimento).

Para o registro dos dados nesse estudo serão utilizadas as seguintes definições:

- Organismos mortos
- Organismos vivos
- Organismos eclodidos
- Organismos não eclodidos

### 3.7 PREPARO DAS AMOSTRAS PARA POSTERIORES ANÁLISES

Após o término dos ensaios ecotoxicológicos, foi realizada a dissecação dos moluscos do grupo controle e grupos expostos. As amostras teciduais (hemolinfa, glândula digestiva), indivíduos inteiros e as massas ovígeras coletadas durante os ensaios reprodutivos foram armazenadas e congeladas a -20 °C em tubos de polipropileno estéreis para determinação da atividade e caracterização de enzimas.

### 3.8 CARACTERIZAÇÃO DOS NÍVEIS DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) EM AMOSTRAS TECIDUAIS DE *B. glabrata*

Ao final de cada experimento descrito ao longo deste trabalho, os caramujos do grupo controle e do grupo exposto foram armazenados para que fossem realizadas análises posteriores. Sendo assim, para caracterizar e quantificar os níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, as amostras escolhidas para a análise foram, massa cefalopediosa e visceral (partes moles) sem a concha (partes duras) de *B. glabrata* do grupo controle

e do grupo exposto a 2,0 mg L<sup>-1</sup> (CL<sub>10</sub>), hemolinfa de caramujos expostos a 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup>, glândula digestiva de caramujos expostos a 1,0 mg L<sup>-1</sup> e do grupo controle. Depois que as amostras foram escolhidas seguiu-se o seguinte desenho experimental. Em microtubos para amostra de 2 mL foram adicionadas 0,1% de TCA (m/v). as amostras (indivíduos inteiros, hemolinfa, glândula digestiva e massas ovígeras) foram homogeneizadas, e centrifugadas a 10.000 x g, durante 15 minutos, a 4°C. Uma alíquota de 50 µl do sobrenadante foi extraída e adicionada a 50 µl de tampão fosfato de potássio 100 mM (pH 7,5) e 1000 µl de iodeto de potássio 1 mol L<sup>-1</sup>. Os tubos com a solução foram colocados no gelo sob ausência de luz por uma hora.

As amostras foram analisadas em espectrofotômetro (UV-1800, Shimadzu, Tokyo, Japan) a 390 nm e a quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi expressa em µmol g<sup>-1</sup> de massa seca, baseado em curva padrão de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pré-estabelecida (ALEXIEVA *et al.*, 2001).

### 3.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

O cálculo da série das CLs e respectivos intervalos de confiança de 95% no teste de toxicidade aguda das NP Zinco, foi realizado pelo método Probit, utilizando o pacote estatístico SPSS 8.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, the USA). Esse método propõe a utilização de concentrações em escala crescente para que se obtenha um resultado efetivo, pois é um método de análise de sensibilidade.

Para comparar as diferentes concentrações testadas com o controle, tanto na avaliação do desempenho reprodutivo como na avaliação do desenvolvimento embrionário, foram utilizados os testes ANOVA, Man-Whitney e Teste T de Student. O programa utilizado foi o GraphPad Prism (Versão 8.0). Em todos os casos a normalidade dos dados foi verificada e a hipótese de nulidade foi rejeitada quando  $p < 0,05$ .

## 4 RESULTADOS

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE ZINCO (ZNO)

As medidas dos parâmetros analisados estão representadas na tabela 1. As nanopartículas foram caracterizadas quanto ao tamanho, polidispersão e potencial zeta. O pH e dureza da solução-mãe preparada para diluição nas concentrações letais e subletais também é apresentado na tabela 1.

**Tabela 1** Características físico-químicas das NPs de ZnO utilizadas

Análise	Propriedade/Unidade	NPs ZnO
Tamanho da partícula	nm	34,02
Potencial zeta	(mV) <sup>a</sup>	- 59,72
Polidispersão	(IP) <sup>a</sup>	0,485
pH	-	7,5
Dureza	mg/L CaCO <sub>3</sub>	15

### 4.2 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS TÓXICOS EM ADULTOS E NEONATOS DE *Biomphalaria glabrata*

Como descrito na metodologia, os primeiros testes tiveram como objetivo a determinação das concentrações letais e subletais das NPs de ZnO.

Os caramujos foram expostos as seguintes concentrações 2, 5, 10, 15, 25 e 50 mg L<sup>-1</sup> durante o período de 48h. Os dados de sobrevivência obtidos nestes testes foram analisados através dos cálculos realizados pelo método Probit, e assim foi possível determinar as CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>, sendo 10 e 17 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente (Tabela 1). Tais resultados embasaram a definição de outras concentrações sub-letais da nanopartícula de óxido de zinco para *B. glabrata*, de maneira que pudessem ser utilizadas nos testes de avaliação nos efeitos sobre atividade reprodutiva e na viabilidade dos embriões. Assim sendo, foram estabelecidas as CL<sub>10</sub> (2 mg L<sup>-1</sup>) e CL<sub>30</sub> (6 mg L<sup>-1</sup>) para o organismo teste.

**Tabela 2** - Valores das concentrações letais e subletais ( $\mu\text{g/ml}$ ) obtidos pelo método Probit

	CL 10	CL 30	CL 50	CL 90
NPs de ZnO	2	6	10	17

A exposição realizada com os neonatos, com as concentrações controle, 0,1; 0,2; 0,4; 1,0; 2,0  $\text{mg L}^{-1}$ , resultou em uma grande diferença na taxa de mortalidade, entre o grupo controle e os grupos expostos, sendo significativa ( $p < 0.0001$  Teste ANOVA) (Figura 13).

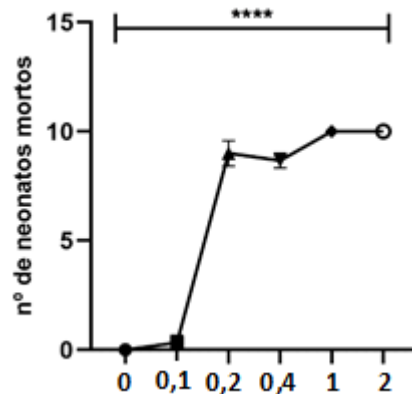


Figura 13 - Sobrevivência (média  $\pm$  erro padrão) de neonatos após 48h de exposição às concentrações 0, 0,1, 0,2, 0,4, 1, 2  $\text{mg/L}$  de NPs de ZnO. \*\*\*\*  $p < 0.0001$

Como podemos observar na figura 14, ao longo dos 21 dias de exposição o grupo exposto apresentou um número maior de neonatos mortos, no entanto não houve diferença significativa quando comparado ao grupo controle.

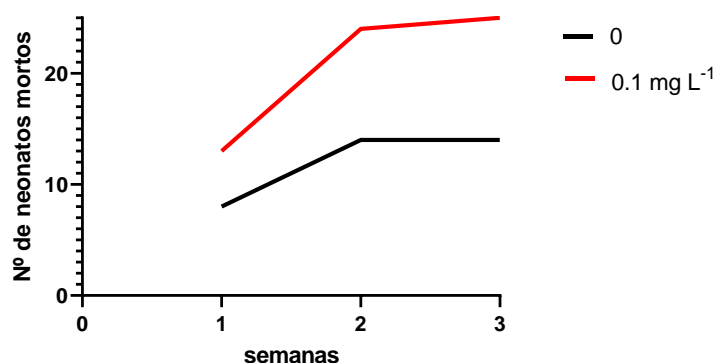


Figura 14 – Sobrevivência (média ± erro padrão) de neonatos após 21 dias de exposição à concentração 0,1 mg L<sup>-1</sup> de NPs de ZnO e grupo controle.

### 4.3 CITOMETRIA

#### 4.3.1 Teste Agudo

Através da citometria de fluxo foram observadas 2 subpopulações distintas em relação ao tamanho (forward scatter) e granularidade (side scatter), que a partir da análise por tamanho e granulosidade puderam ser denominadas granulócitos e hialinócitos.

O perfil apresentado no gráfico abaixo é representativo da espécie de *B. glabrata* dos grupos expostos e grupo controle. Conforme observado na figura 15, os hemócitos recuperados na hemolinfa de *B. glabrata*, podem ser separados, inicialmente, através da lectina PNA, de debris e células mortas.

#### PNA (Peanut agglutinin)

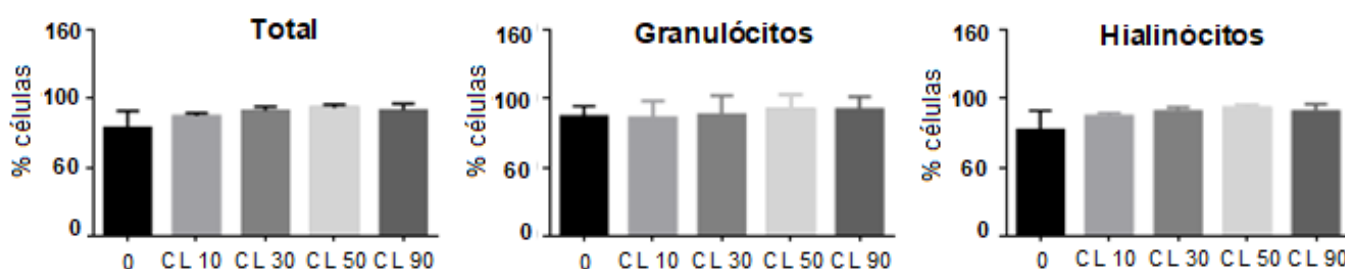


Figura 15 – Gráficos representando a porcentagem de hemócitos circulantes de moluscos *Biomphalaria glabrata* expostos às NPs de ZnO e do grupo controle, marcados com a Lectina PNA para as populações pequenas e grandes.

Comparando os grupos expostos com o grupo controle é possível identificar uma tendência ao aumento nos percentuais de células marcadas com PI e 7AAD, indicando maiores níveis de apoptose e necrose nos grupos expostos (Figura 16 e 17).

### PI (Iodeto de Propídeo)

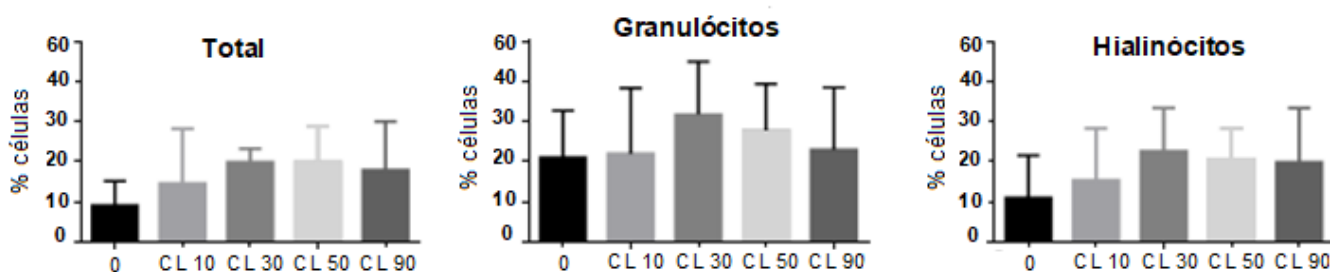


Figura 16 - Gráficos representando a porcentagem de hemócitos circulantes de moluscos *Biomphalaria glabrata* expostos às NPs de ZnO e do grupo controle, marcados com a Lectina PI para as populações pequenas e grandes.

### 7AAD (7-Aminoactinomycin D)

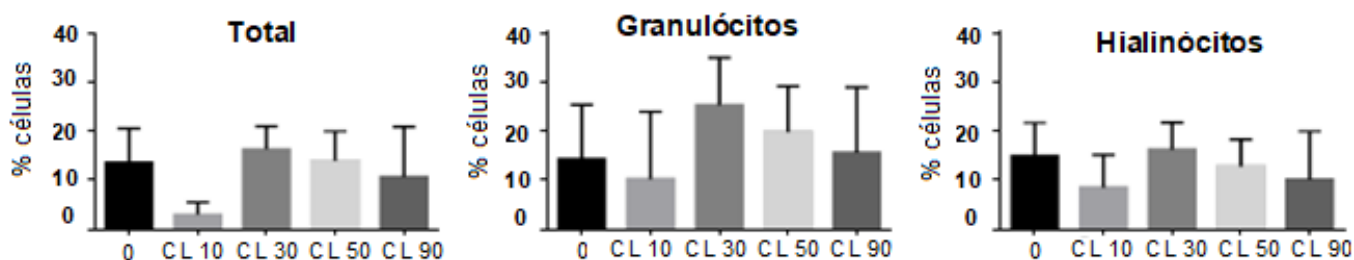


Figura 17 - Gráficos representando a porcentagem de hemócitos circulantes de moluscos *Biomphalaria glabrata* expostos às NPs de ZnO e do grupo controle, marcados com a Lectina 7AAD para as populações pequenas e grandes.

#### 4.3.2 Teste Crônico x Teste agudo

Ao comparar o grupo que foi exposto às NPs de ZnO durante 48h e o grupo que foi exposto durante o período de 3 semanas, é possível observar uma tendência no aumento dos hemócitos do grupo exposto cronicamente em todas as populações, quando utilizado o 7AAD e uma diminuição quando utilizado o PI (Figura 18).

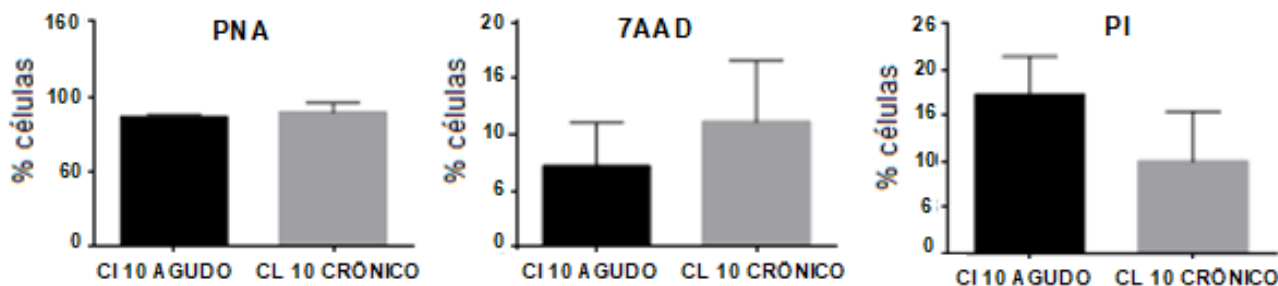


Figura 18 - Gráficos representando a porcentagem de hemócitos circulantes de moluscos *Biomphalaria glabrata* expostos às NPs de ZnO e do grupo controle, marcados com 7AAD, PI e a Lectina PNA para as populações pequenas e grandes.

#### 4.4 VIABILIDADE DOS HEMÓCITOS

A partir da utilização da Azul de Trypan, pode-se analisar os hemócitos vivos e mortos, onde os mortos ficaram roxos quando vistos pela microscopia óptica em câmara de Neubauer, auxiliando assim a diferenciação deste tipo celular. Ao comparar os grupos controle e exposto, pode-se verificar que o número de hemócitos recuperados da hemolinfa nos grupos expostos foi estatisticamente superior ao recuperado de caramujos não expostos. Em relação à mortalidade, é possível constatar um aumento significativo na quantidade de células mortas nos grupos que foram expostos às NPs de ZnO (Figura 19).

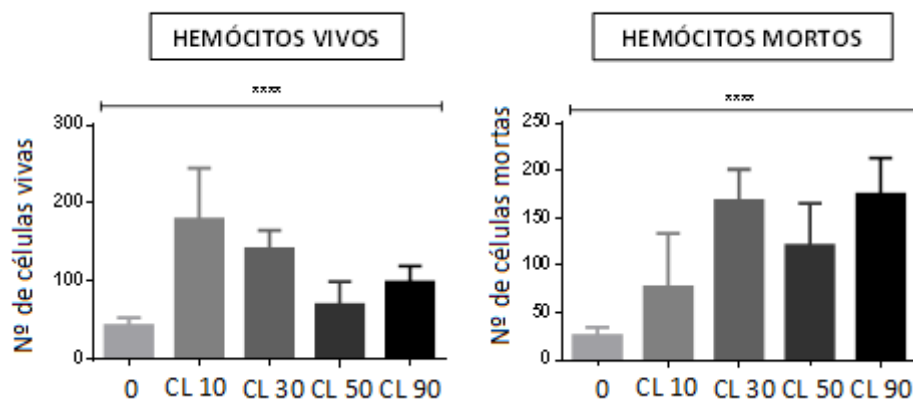


Figura 19 – Concentração dos hemócitos vivos e mortos circulantes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* exposta às NPs de ZnO e do grupo controle. Os resultados foram considerados significativos para  $P < 0.05$

#### 4.5 ENSAIOS REPRODUTIVOS - EFEITOS NA FECUNDIDADE E FERTILIDADE DE *Biomphalaria glabrata* EXPOSTAS ÀS CONCENTRAÇÕES SUB-LETAIS DE NPS DE ZnO

No teste agudo, é possível observar que o número médio de massas ovíferas, de ovos férteis, e ovos inférteis tiveram um aumento no grupo exposto em relação ao grupo controle. No entanto o grupo exposto apresentou uma taxa de eclosão significativamente menor do que a encontrada no grupo controle (Figura 20).

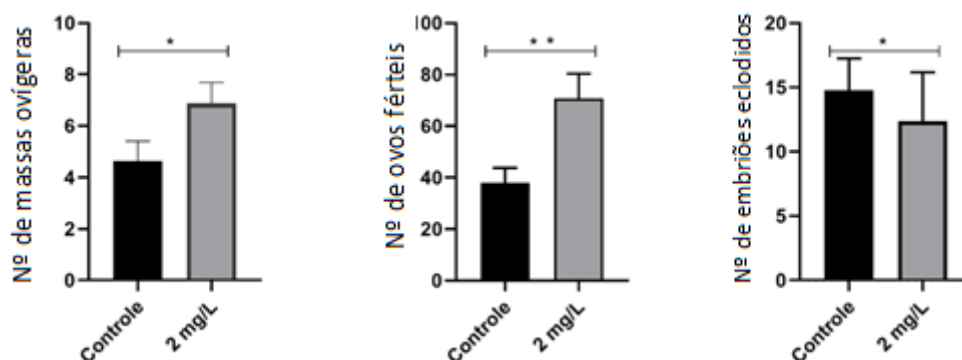


Fig 20 - Fecundidade e fertilidade (média  $\pm$  erro padrão) de *Biomphalaria glabrata* após 48h de exposição às NPs de ZnO (Teste agudo). \* $p=0.0337$ ; \*\* $p=0.0050$ ; \* $p=0.0440$



No primeiro teste de longa duração denominado, estático, anteriormente na metodologia. Os caramujos foram expostos por 7 dias às NPs de ZnO, e tiveram seu desempenho reprodutivo acompanhado ao longo de 21 dias. O grupo exposto apresentou uma diminuição significativa na produção de massas ovíferas e no número de embriões eclodidos (Figura 21).

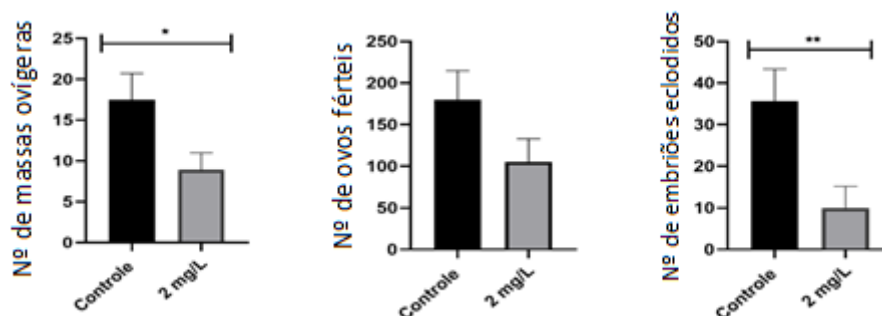


Figura 21 - Fecundidade e fertilidade (média  $\pm$  erro padrão) de *Biomphalaria glabrata* após 7 dias de exposição às NPs de ZnO (Teste estático). Os dados são representados como média  $\pm$  erro padrão. \*  $p=0,042$ ; \*\*  $p=0,0092$ .

No teste de longa duração, denominado como semi-estático, constatou-se que entre os grupos controle e exposto houve diferença significativa para todos os parâmetros analisados (Figura 22).

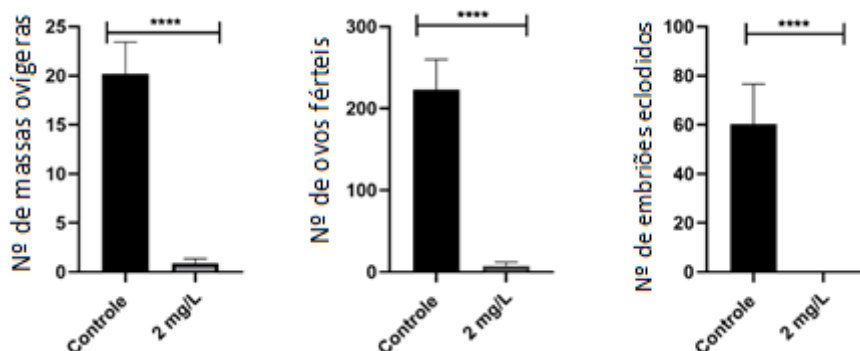


Figura 22 - Fecundidade e fertilidade (média  $\pm$  erro padrão) de *Biomphalaria glabrata* após 21 dias de exposição às NPs de ZnO (Teste Semi-estático). \*\*\*\*  $p < 0,0001$

Após a realização dos testes de curta e longa duração, foi feita uma comparação entre os parâmetros analisados com os diferentes tempos de exposição. A exposição às NPs de ZnO promove aumento na produção de massas ovíferas e ovos férteis. No entanto, no teste com exposição longa e contínua, semi estático, a atividade

reprodutiva dos caramujos é interrompida como podemos visualizar na figura 23.

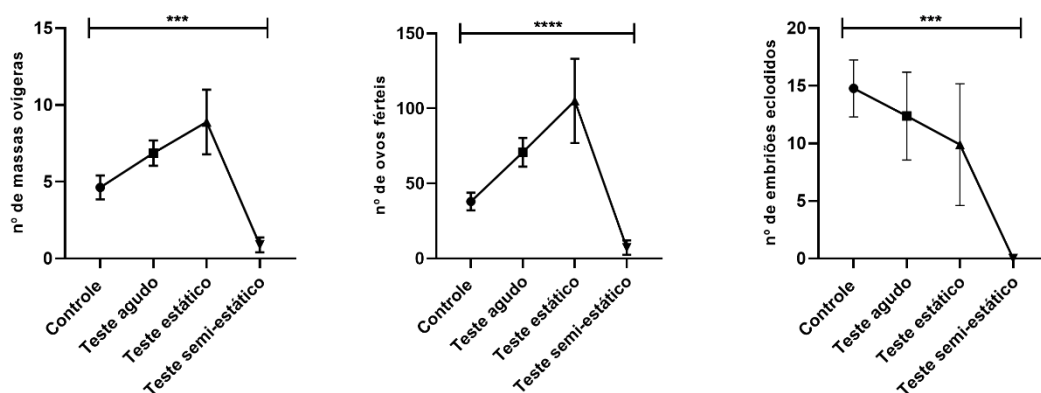


Figura 23 - Fecundidade e fertilidade (média  $\pm$  erro padrão) de *Biomphalaria glabrata* após 48h, 7 e 21 dias de exposição às NPs de ZnO. \*\*\*p=0.0005; \*\*\*\*p<0.0001

#### 4.5.1 Desempenho reprodutivo e potencial de recuperação a exposição sub-letal às NPs de ZnO

Os caramujos expostos à maior concentração, 2 mg L<sup>-1</sup>, apresentaram uma diminuição significativa na produção de massas ovíferas e ovos, como também uma redução na taxa de eclosão. Após o período de exposição o desempenho reprodutivo destes caramujos se manteve alterado (padrão grupo Controle). Na figura 24 é possível acompanhar o número de massas ovíferas, ovos férteis e embriões eclodidos do grupo controle e do grupo exposto ao longo das 8 semanas do experimento.

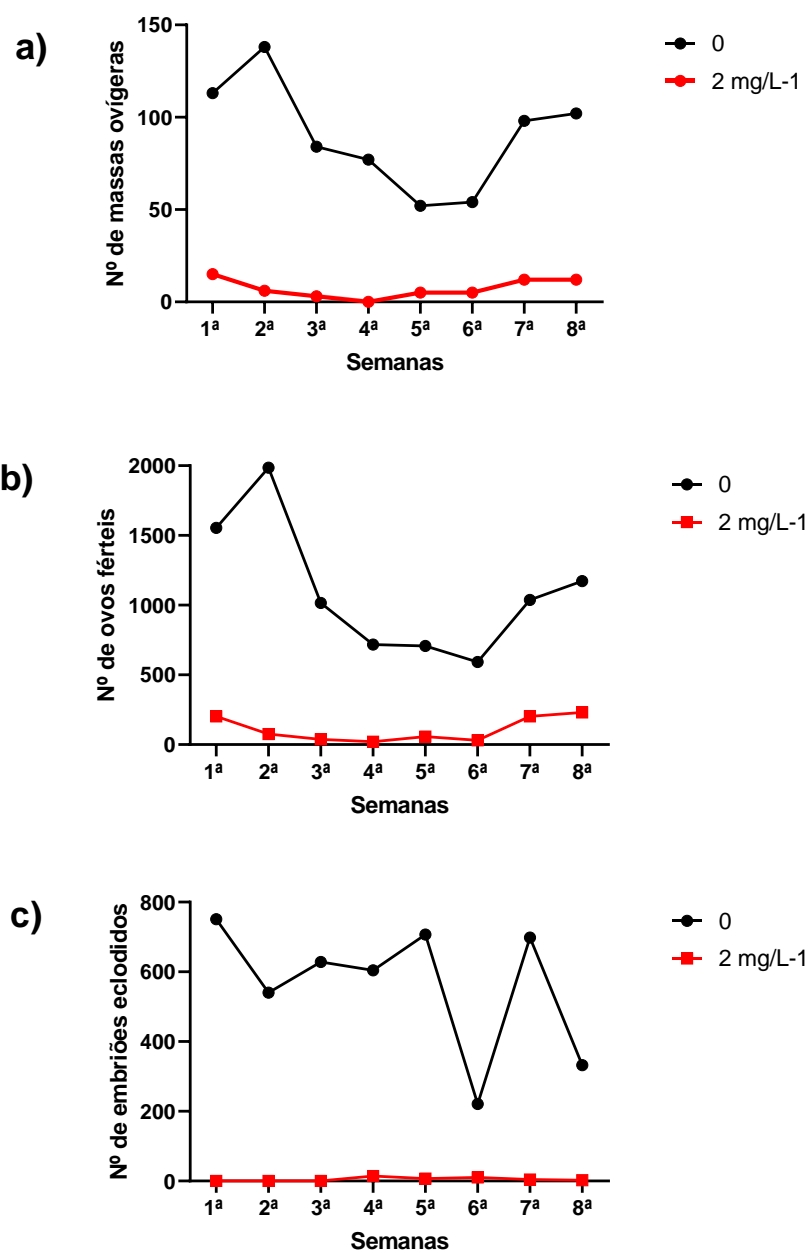


Figura 24 - Fecundidade e fertilidade (média  $\pm$  erro padrão) de *Biomphalaria glabrata* exposta 2,0 mg L<sup>-1</sup> de NPs de ZnO e 0 corresponde ao grupo controle (Teste Semi-estático). a) Numero de massas ovigeras b) Numero de ovos férteis c) Numero de embriões eclodidos. Os parâmetros foram analisados durante: 4 semanas de exposição, 4 semanas de recuperação (Total: 8 semanas) \*\*\*\* p < 0,0001

No experimento onde foi utilizado uma concentração menor,  $1\text{ mg L}^{-1}$ , os indivíduos expostos apresentaram padrões reprodutivos um pouco mais próximos do que foi observado no grupo controle. Parâmetros relativos à fecundidade (produção de massas ovíferas e ovos) não sofreram alterações significativas. Entretanto, os ovos em sua maioria não eram viáveis o que afetou diretamente a taxa de eclosão deste grupo, provocando uma diminuição significativa se comparado com o grupo controle (Figura 25).

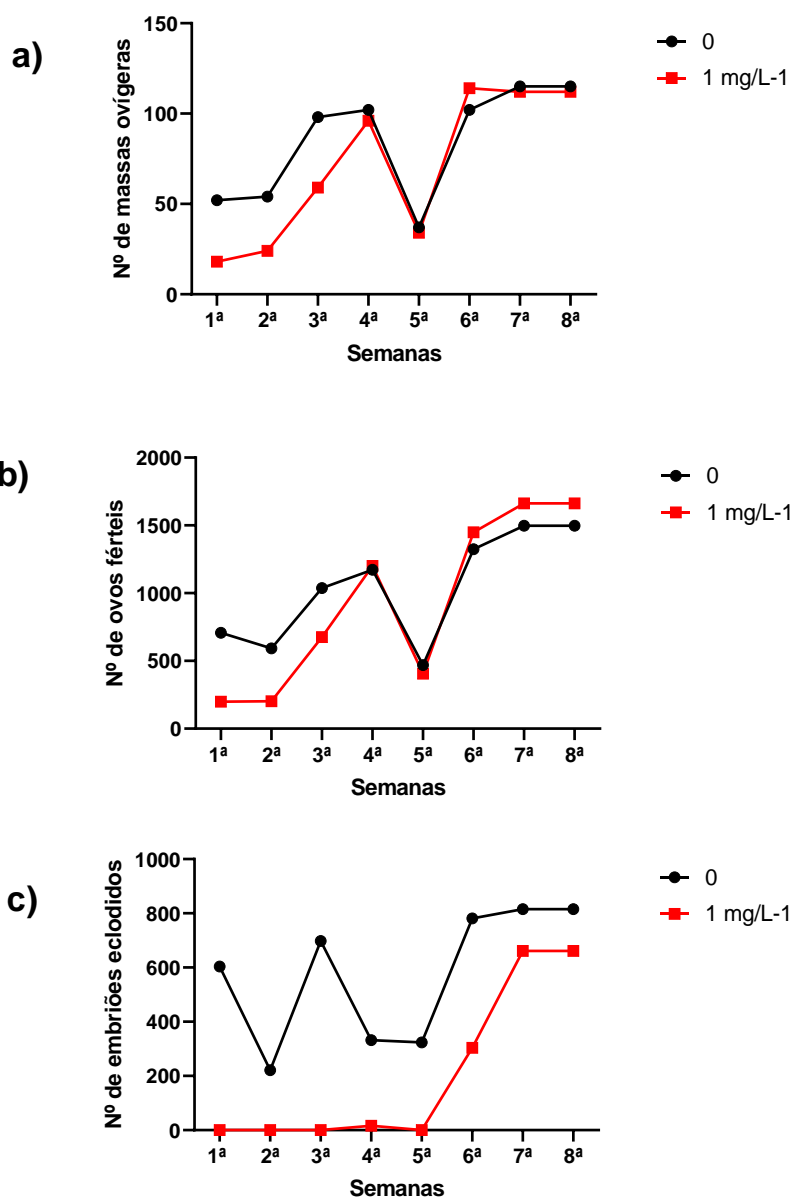


Figura 25 - Fecundidade e fertilidade (média  $\pm$  erro padrão) de *Biomphalaria glabrata* exposta a  $1,0\text{ mg L}^{-1}$  de NPs de ZnO e  $0\text{ mg L}^{-1}$  corresponde ao grupo controle (Teste Semi-estático). a) Número de massas ovíferas b) Número de ovos férteis c) Número de embriões eclodidos. Os parâmetros foram analisados durante: 4 semanas de exposição, 4 semanas de recuperação (Total: 8 semanas) (\*\*\*\*  $p < 0,0001$  apenas para número de embriões eclodidos).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS EMBRIOTÓXICOS DE NANOPARTÍCULAS DE ZnO

Após os 10 dias de exposição, a taxa de mortalidade do grupo exposto foi significativamente maior quando comparada ao grupo controle. Apresentando uma resposta dependente da concentração (Figura 26).

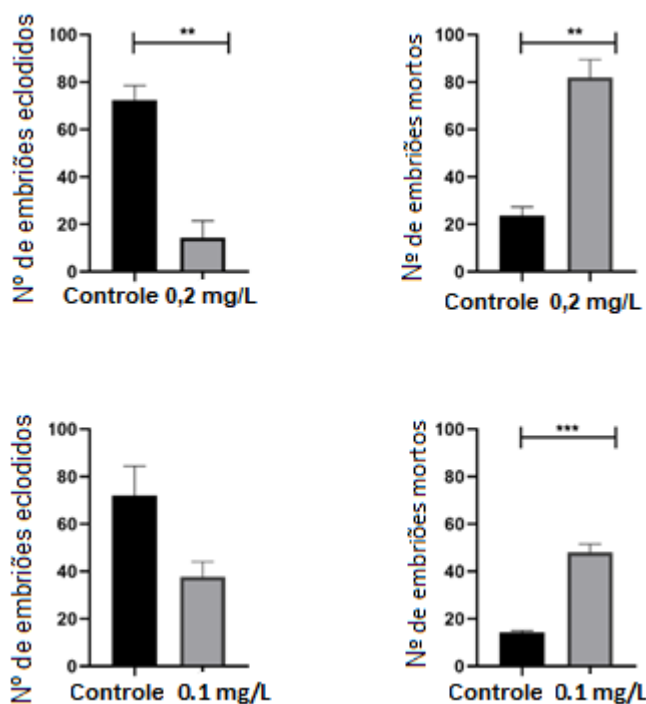


Fig 26 - Sobrevivência de embriões (média  $\pm$  erro padrão) após 96 horas de exposição à 0,2 e 0,1 mg L<sup>-1</sup> de NPs de ZnO. \*\*p=0.0037; \*\*\*p=0.0007

#### 4.7 QUANTIFICAÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

As concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, em amostras de massa cefalopédica e visceral (partes moles) sem a concha (partes duras) de *B. glabrata* expostos a CL<sub>10</sub> de NPs de ZnO foram significativamente maiores do que nos indivíduos do grupo controle (Figura 27). Não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo controle e o grupo exposto à CL<sub>30</sub>.

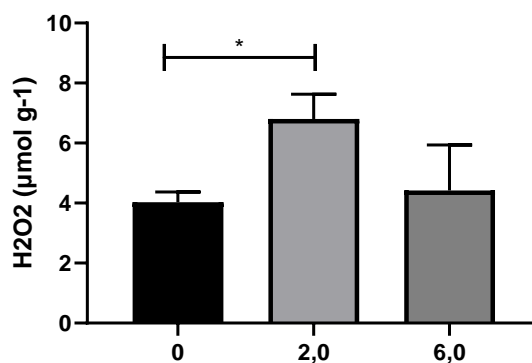


Figura 27 - Concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em amostras de massa cefalopediosa e visceral (partes moles), sem a concha (parte dura) de *Biomphalaria glabrata*, grupo controle (0) e grupo exposto a 2,0 (CL<sub>10</sub>) e 6,0 mg L<sup>-1</sup> (CL<sub>30</sub>) de NP de ZnO extraídas com TCEP e β-mercaptoetanol.

A figura 28 mostra que as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram significativamente mais elevadas na hemolinfa de caramujos expostos a 1,0 mg L<sup>-1</sup> de NPs de ZnO. Comparando o grupo controle e o grupo exposto a 2 mg L<sup>-1</sup>, não houve diferença significativa.

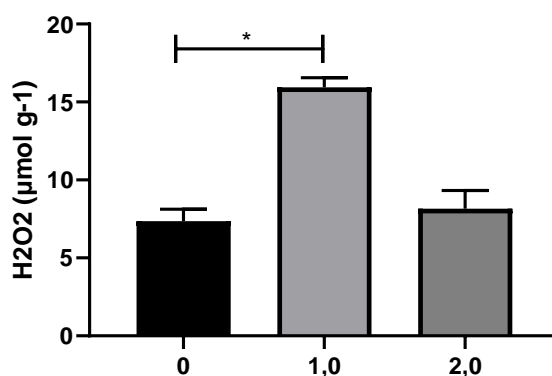


Figura 28 – Concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em amostras de hemolinfa de *Biomphalaria glabrata*, grupo controle (0) e grupo exposto a 1,0 e 2,0 mg L<sup>-1</sup> de NP de ZnO extraídas com TCEP e β-mercaptoetanol.

Comparando as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> encontradas em amostras de glândula digestiva de caramujos expostos a 1,0 mg L<sup>-1</sup> e do grupo controle, observamos uma diminuição desta ROS no grupo exposto (Figura 29).

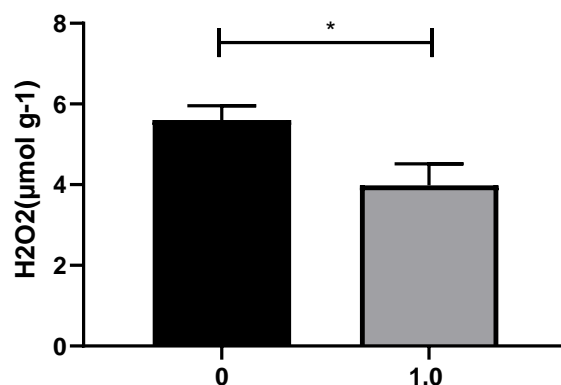


Figura 29 – Concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em amostras de glândula digestiva de *Biomphalaria glabrata*, grupo controle (0) e grupo exposto a 1,0 mg L<sup>-1</sup> de NP de ZnO extraídas com TCEP e β-mercaptoetanol.

A diferença entre a concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> presente na hemolinfa e glândula digestiva de indivíduos expostos a 1,0 mg L<sup>-1</sup>, está representada na figura 30, onde o símbolo \*\* representa uma diferença significativa (p < 0.05).

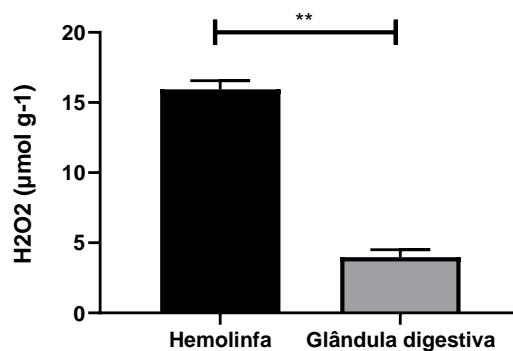


Figura 30 - Concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em amostras de hemolinfa e glândula digestiva de indivíduos *Biomphalaria glabrata* expostos à 1,0 mg L<sup>-1</sup> de NPs de ZnO extraídas com TCEP e β-mercaptoetanol.

Já no grupo controle, não foram encontradas diferenças significativas entre os tecidos analisados.

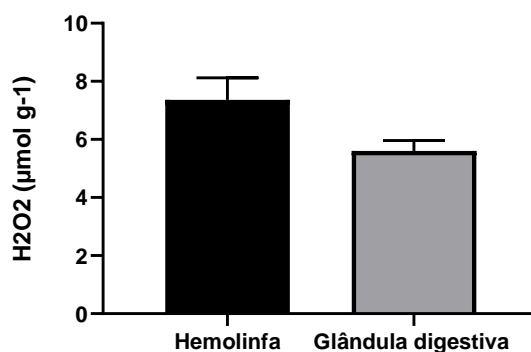


Figura 31 - Concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em amostras de hemolinfa e glândula digestiva de indivíduos *Biomphalaria glabrata* do grupo controle extraídas com TCEP e β-mercaptoetanol.

## 5 DISCUSSÃO

Como não existem dados publicados sobre toxicidade das NPs de ZnO em *B. glabrata*, esta discussão objetiva apresentar o efeito de outras nanopartículas metálicas, testadas com o mesmo organismo-teste, *B. glabrata*.

Os resultados para dispersão das NPs de ZnO, demonstraram que as NPs apresentaram tamanho hidrodinâmico inferior a 100 nm e índice de polidispersão (<0,5). Indicando que os organismos foram expostos ao ZnO na forma nanoparticulada.

As NPs de ZnO, apresentaram efeitos tóxicos agudo e crônico, em gastrópodes *Biomphalaria glabrata*, com CL<sub>50</sub> 10 mg L<sup>-1</sup>. Diversos estudos, indicam a toxicidade desta NP para outros bioindicadores (WIENCH *et al.*, 2009; XIAO *et al.*, 2015; LOPES *et al.*, 2014; FAHMY *et al.*, 2014).

Utilizando o cladóceros *Daphnia magna*, como modelo biológico, alguns autores definiram os seguintes valores para CL<sub>50</sub>: 1 mg L<sup>-1</sup> (WIENCH *et al.*, 2009), 1,10 mg L<sup>-1</sup> (LOPES *et al.*, 2014) e 0,99 mg L<sup>-1</sup> (XIAO *et al.*, 2015). Para gastrópodes, os valores da CL<sub>50</sub> apresentam certa diferença. Fahmy. *et al.*, (2014), determinaram que a CL<sub>50</sub> para *Biomphalaria alexandrina*, seria de 145 µg/ml. OLIVEIRA FILHO *et al.*, (2019) determinaram que para *B. glabrata*, a CL<sub>50</sub> 18,57 mg L<sup>-1</sup>.

Em nosso estudo, o valor da CL<sub>50</sub> (10 mg L<sup>-1</sup>) para *Biomphalaria glabrata*, foi menor que os valores descritos na literatura, o que pode indicar uma diferença na sensibilidade dos organismos.

Hai-zhou *et al.*, (2012), indicam que a dispersão de íons metálicos no meio experimental, pode ser uma das causas da toxicidade das nanopartículas de óxidos metálicos. Alguns estudos, corroboram com esta ideia (BLINOVA *et al.*, 2010; BACCHETTA *et al.*, 2016). No entanto, a partir da avaliação da toxicidade em bactérias (*E. coli*, *B. subtilis* e *S. aureus*), BAEK *et al.*, (2011) observaram que os íons liberados pelas NPs de ZnO não causaram efeitos tóxicos significativos, sendo a toxicidade atribuída a própria NP de ZnO. XIAO *et al.*, (2015), também atribuem a toxicidade das NPs de ZnO às partículas em si e não aos íons metálicos.

Muitos fatores se relacionam com essa diferença dos resultados encontrados na literatura: presença de revestimentos em NP-ZnO (MERDZAN *et al.*, 2014), tamanho das partículas avaliadas (MEULENKAMP, 1998) e valores das variáveis



monitoradas na solução-teste, como por exemplo, o pH (LI *et al.*, 2013). O mecanismo de toxicidade de nanopartículas de óxidos metálicos, é um assunto de grande complexidade, necessitando de estudos mais aprofundados para sua completa compreensão.

O tamanho, a forma, as características de superfície e taxa de dissolução influenciam a interação das NPs com sistemas biológicos (CASTRANOVA, 2011). Sendo assim, ainda que o tamanho das NPs (<100 nm) utilizadas neste estudo e no trabalho realizado por FAHMY *et al.*, (2014), sejam iguais, a toxicidade pode estar relacionada a outros fatores como, a dissolução, que é dependente dos detalhes da nanoestrutura, do tamanho, estrutura dos aglomerados e também da metodologia utilizada (LOPES, 2013).

Segundo Prentera *et al.*, (2004), a determinação do valor da CL<sub>50</sub> é de extrema importância, pois, concede dados substanciais e os valores obtidos são úteis na avaliação de níveis seguros ou níveis de tolerância a poluentes. Pode-se afirmar que os resultados obtidos, apresentam uma relação entre o grau de resposta dos organismos-teste e a quantidade de exposição ao produto químico, assumindo uma forma de concentração-resposta (DI GIULIO e HINTON, 2008). A determinação das CLs, também foi de extrema importância para a realização dos testes de toxicidade crônica, onde as concentrações subletais são calculadas a partir da CL<sub>50</sub> (SILVA, 2002).

Após 48h de exposição, os neonatos apresentaram maior sensibilidade às NPs de ZnO, com letalidade de 90% quando expostos a CL<sub>10</sub> (concentração que nos adultos provocou a mortalidade de apenas 10%). Das *et al.*, (2013), observaram que o efeito agudo das nanopartículas de Ag e TiO<sub>2</sub> na sobrevivência de neonatos de *D. magna*, aumentou de maneira concentração-dependente.

Os embriões de *B glabrata*, expostos a 0,1 mg L<sup>-1</sup> (menor concentração utilizada na exposição dos neonatos), apresentaram alta mortalidade (>40%). Em estudo semelhante, as massas ovígeras expostas a 100 mg L<sup>-1</sup> de NPs de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, não sofreram alterações significativas no desenvolvimento embrionário (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2016). Por outro lado, Zhu *et al.*, (2012) observou considerável mortalidade e redução significativa na taxa de incubação de embriões de *Danio rerio*, após exposição a 50 e 100 mg L<sup>-1</sup> de NPs de  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

A letalidade embrionária dos caramujos se deve a fácil penetração de

compostos químicos dentro dos ovos. Quando um produto químico tóxico penetra facilmente e, é extremamente tóxico (por exemplo, moluscidas clássicos), mata os embriões (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2010).

A análise por citometria de fluxo, mostrou-se como uma ferramenta importante para investigar a transformação dos hemócitos, através de sua capacidade de detectar perturbações celulares físicas e bioquímicas, em um período de tempo relativamente curto. Estas células, apresentam propriedades morfológicas funcionais que vêm sendo investigadas como biomarcadores no monitoramento ambiental e representam os principais mediadores da imunidade em invertebrados (PEREZ & FONTANETTI, 2011).

JOHNSTON & YOSHINO (2001), caracterizaram qualitativa e funcionalmente as células envolvidas no sistema de defesa dos moluscos. A partir da citometria de fluxo, foram caracterizadas três populações de hemócitos (granulócitos, hialinócitos e células intermediárias). Os granulócitos, representam 70 a 80% de células circulantes presentes na hemolinfa, enquanto que os hialinócitos representam 20 a 30% do total (BARRACO *et al.*, 1993; GOEDKEN & DE GUISE, 2004; MARTINS-SOUZA *et al.*, 2003).

A presença de patógenos e xenobióticos, a disponibilidade de nutrientes entre outros fatores de estresse, podem promover um aumento no total de hemócitos circulantes resultante da proliferação ou movimento de células dos tecidos para a hemolinfa, ou uma diminuição como consequência da lise celular ou recrutamento da hemolinfa para os tecidos (PIPE & COLES, 1995; RENWRANTZ & SPIELVOGEL, 2011; COMESAÑA *et al.*, 2012; ALLAM *et al.*, 2000; PARRINO *et al.*, 2018).

Durante a infecção pelo *Schistosoma mansoni*, caramujos *B. tenagophila*, apresentam aumento da população de hialinócitos (SOUZA, 2006). Monte (2018), observou que *B. glabrata* infectados por *Echinostoma paraensei*, apresentaram uma diminuição no número absoluto de hemócitos circulantes. Outros estudos, analisaram o efeito de herbicidas em *B. glabrata* e *Lymnaea* e observaram um aumento no total de hemócitos (RUSSO & LAGADIC, 2000; RUSSO e LAGADIC, 2004; MOHAMED, 2011). MOHAMED (2011), avaliou o efeito do Roundup® no número de hemócitos circulantes de *B. alexandrina*, infectada ou não pelo *S. mansoni*, e observou uma subpopulação dominante, os granulócitos, em todos os grupos.

Em nosso estudo, os grupos expostos apresentaram um aumento significativo

no percentual de hemócitos circulantes, com ênfase no aumento do percentual de granulócitos. Estes dados, podem indicar que o sistema de resposta imunológica dos caramujos reaja de forma diferente a exposição às nanopartículas. Até o momento, este é o primeiro estudo que investiga os efeitos das NPs de ZnO em *B. glabrata*, revelando a necessidade de mais estudos, que colaborem para uma compreensão aprimorada da imunologia de moluscos.

Em relação ao número de ovos e neonatos, houve um efeito tempo-dependente. A exposição aguda às NPs de ZnO, na concentração de 2 mg L<sup>-1</sup>, provocou um aumento significativo no número de massas ovíferas e ovos e redução na eclosão dos embriões. Segundo Silva *et al.*, (2007), o aumento do número de ovos reflete uma tentativa de compensar perdas reprodutivas e é comumente observado em caramujos fisiologicamente estressados. Nos testes com maior tempo de exposição, os efeitos deletérios foram percebidos tanto na fecundidade quanto na fertilidade. Estes efeitos, podem estar associados ao stresse oxidativo decorrente da exposição (FAHMY *et al.*, 2014).

Apesar do aumento na taxa de fecundidade, é possível perceber que a viabilidade dos embriões diminui ao longo das semanas. Chapman (2001), define “Hormesis” como um efeito estimulatório, que ocorre quando uma substância produz efeitos negativos em altas dose/concentrações (ex. Inibição do crescimento ou da fecundidade) e efeitos positivos em baixas doses (ex. estímulo no crescimento ou da fecundidade). A “hormesis”, tem sido interpretada como uma super compensação à uma alteração na homeostasia do organismo (STEBBING, 1998).

Segundo Oliveira-Filho (2003), as definições de efeitos positivos ou negativos nesse contexto, as implicações desse fenômeno para as avaliações ecotoxicológicas e risco ecológico, ainda necessitam ser melhor compreendidas.

Após a exposição crônica, caramujos *B. glabrata*, apresentaram diminuição na produção de massas ovíferas, ovos e na taxa de eclosão. No teste semi-estático, a taxa de eclosão chega a 0%. Lopes *et al.*, (2014), descrevem resultados semelhantes, com redução de 62% no número de neonatas produzidas após exposição a NPs de ZnO. Adam *et al.*, (2014), analisaram os efeitos de nanopartículas de ZnO em *D. magna* em exposições crônicas, e indicam que concentrações subletais (0,058 mg L<sup>-1</sup>) são capazes de provocar alterações na atividade reprodutiva, com diminuição no número de neonatos.

Em estudo semelhante ao nosso, Oliveira-Filho *et al.*, (2016), testaram o efeito tóxico de NPs de  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$  na reprodução de *B. glabrata*. Os autores indicaram que a partir da exposição à 1, 10 e 100 mg L<sup>-1</sup> durante 4 semanas, não houve diferença significativa em relação ao grupo controle.

Como as nanopartículas apresentam uma menor degradação quando atingem o meio ambiente, exposições crônicas em baixas concentrações dariam mais realismo aos resultados (MA *et al.*, 2013; LOPES, 2012). Para esclarecer se os efeitos observados na reprodução de *B. glabrata* são atribuíveis aos revestimentos específicos da substância, ao tamanho específico das nanopartículas, ou um efeito crônico geral da exposição à NPs de ZnO, são necessários mais estudos.

Zhao & Wang (2010), relataram em seu estudo que as NPs de Ag foram capazes de inibir significativamente a reprodução e o crescimento de *D. magna*. Wiench *et al.*, (2009), também realizaram testes agudo e crônico com *D. magna*, porém avaliando os efeitos das NPs de TiO<sub>2</sub> e ZnO e indicaram a reprodução como *endpoint* mais sensível, que a mortalidade adulta.

Quando expostos as NPs de ZnO, tendem a investir a energia disponível para sua própria manutenção e sobrevivência ao invés de investir em crescimento e reprodução (SOUZA *et al.*, 2018; LOVER *et al.*, 2007; SMOLDERS *et al.*, 2005).

Estes resultados e diversos estudos ecotoxicológicos, ressaltam a importância da realização de testes com maior tempo de exposição e, sugerem que a fecundidade seja considerada como um *endpoint* mais sensível para avaliar possíveis efeitos das nanopartículas em moluscos (RAMSKOV *et al.*, 2014).

O conhecimento das taxas de desenvolvimento das diferentes fases do ciclo de vida e particularidades reprodutivas possibilita, aperfeiçoar o quadro de informações acerca da biologia deste animal, manejo adequado e preservação de ecossistemas aquáticos.

A partir destes trabalhos e dos resultados apresentados nesse estudo, sugere-se que as NPs de ZnO são capazes de atravessar a massa que envolve os ovos, atingindo o embrião, apresentando alta letalidade e interferindo na eclosão dos indivíduos. De acordo com Wirth *et al.*, (2001), um simples retardo na eclosão dos ovos pode gerar graves implicações ecológicas. Se, uma população continua exibindo retardo até o período propício para o acasalamento, os seus integrantes deverão estar mais jovens do que os de uma população normal, e isso pode levar ao declínio desse

grupo em um ambiente contaminado.

O retardo da eclosão, é um indicador de efeito importante para a população afetada. O teste com massas ovígeras e indivíduos recém eclodidos pode ser considerado com uma alternativa ou suplemento para estudos ecotoxicológicos, devido a maior sensibilidade em relação aos caramujos adultos.

Estas questões, acentuam a importância dos efeitos tóxicos não letais avaliados no presente estudo, incluindo o desempenho reprodutivo propriamente dito, por se tratar de uma função fisiológica primordial para a sobrevivência das espécies. Schiavo *et al.*, (2017), ressaltam que a sensibilidade das espécies às NPs de ZnO depende da complexidade do organismo e, destaca importância de se identificar as fases mais sensíveis para cada organismo ao longo da exposição.

A exposição às concentrações subletais de NPs de ZnO, estão associadas ao aumento da concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As CL<sub>5</sub> e CL<sub>10</sub>, apresentam valores significativamente maiores do que encontrados no grupo controle e grupo exposto à CL<sub>30</sub>. Outros trabalhos (SCHRECK *et al.*, 1991; HUNG *et al.*,2005), demonstram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> atua como mensageiro secundário em células de mamíferos e plantas, servindo como um sinal de estresse comum em diversos organismos.

Neill *et al.*, (2002), mostraram que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> modula a expressão de vários genes importantes na codificação de enzimas antioxidantes. No entanto, os dados apresentados aqui, compoem apenas uma parte do quebra-cabeça, sendo difícil visualizar toda a imagem de como os caramujos respondem a exposição às NPs.

Torres (2008), demonstrou em seu estudo, que células de microalgas *Minutocellus polymorphus* apresentaram uma liberação maior de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando expostas à xenobióticos (oxifluorfeno e benzo[a]pireno) e, ressaltam o potencial que esta molécula tem de causar lesões à célula quando se associam aos metais de transição (CHOO *et al.*,2004;SHAO *et al.*, 2007).

Avelar *et al.*,(2013), indicam que durante a infecção pelo *Schistosoma mansoni*, as células de hospedeiros *Biomphalaria glabrata* produzem o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como resposta a presença vermes adultos e e dos ovos deste parasita. Portanto, a produção de ROS pode ser um vantajoso mecanismo de defesa dos indivíduos *B. glabrata* contra parasitas e xenobióticos (DIKKEBOOM *et al.*, 1988; LOVERDE, 1998). Isso explicaria o significativo aumento na concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em indivíduos expostos à CL<sub>10</sub> de NPs de ZnO.

Indivíduos expostos à CL<sub>30</sub>, não apresentaram grande diferença em relação ao grupo controle, estes resultados são semelhantes aos apresentados a partir da técnica de citometria de fluxo. Na figura 16, observamos uma diminuição na quantidade de hemócitos circulantes nos indivíduos expostos à CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>. Enquanto os grupos expostos à CL<sub>10</sub> e CL<sub>30</sub>, apresentam uma tendência ao aumento. Nos dados apresentados na figuras 27, essa tendência se repete, a menor concentração, 2 mg L<sup>-1</sup>, esteve associada a maior quantidade de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em amostra de massa cefalopodiosa e visceral (parte mole) sem a concha (parte dura). Sendo assim, o aumento da concentração da NP, não significa necessariamente um aumento da resposta imunológica gerada.

Grupos expostos à 1 mg L<sup>-1</sup>, apresentaram maiores concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na hemolinfa do que na glândula digestiva. Já no grupo controle, essa diferença significativa não foi encontrada. São necessários mais estudos e uma avaliação de outros biomarcadores de estresse oxidativo. Desta forma, será possível elucidar os efeitos das nanopartículas de óxido de zinco em *Biomphalaria glabrata*.

Considerando nossos achados em relação aos efeitos das NPs de ZnO e os dos demais autores, podemos afirmar que as NPs de ZnO podem afetar a sobrevivência, atividade reprodutiva, resposta imunológica e produção de espécies reativas de oxigênio de moluscos gastrópodes. A espécie *B. glabrata*, é um elo na teia trófica, ocupando a posição de detritívoro-herbívoro e podem ser indicadores de integridade ecológica ou endemismo (LEWINSOHN *et al.*, 2004). Além disso, os invertebrados são importantes na manutenção dos serviços de reciclagem dos nutrientes, incluindo retenção e regulação do fluxo (FONSECA & DIAS, 2004)

## 6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho, permitem concluir que as NPs de ZnO afetam a sobrevivência, reprodução e desenvolvimento de *B. glabrata*, confirmando sua utilização como um organismo biomonitor apropriado na exposição as NPs e no biomonitoramento de NP em coleções hídricas que recebem efluentes.

Este trabalho permitiu obter as seguintes conclusões específicas:

- As NPs de ZnO apresentaram efeitos tóxicos, agudo e crônico, com efeito tempo-dependente e concentração-dependente
- Embriões de *B. glabrata* apresentaram uma maior sensibilidade aos efeitos das nanopartículas.
- Após exposição, observou-se aumento significativo no percentual de hemócitos circulantes, especialmente os granulócitos.
- A atividade reprodutiva foi afetada, apresentando um efeito tempo dependente e concentração dependente. Após exposições de curto período houve aumento da fecundidade enquanto após exposições crônicas houve redução na fecundidade e fertilidade.
- As NPs de ZnO foram capazes de induzir aumento na concentração espécies reativas de oxigênio ( $H_2O_2$ ) na hemolinfa de caramujos expostos.

## REFERÊNCIAS

- ADAM, N. et al. 2014. The chronic toxicity of ZnO nanoparticles and ZnCl<sub>2</sub> to *Daphnia magna* and the use of different methods to assess nanoparticle aggregation and dissolution. *Nanotoxicology*, v. 8, n. 7, p. 709–17, nov.
- ADAMO, S. A., 2012, The effects of the stress response on immune function in invertebrates: An evolutionary perspective on an ancient connection: Hormones and Behavior, v. 62, p. 324-330.
- ADAMS, M. 2002. Biological indicators of aquatic ecosystem stress. Maryland: American Fisheries Society Bethesda: 644.
- ALI, D., ALARIFI, S., KUMAR, S., AHAMED, M., SIDDIQUI, M, A. 2012. Oxidative stress and genotoxic effect of zinc oxide nanoparticles in freshwater snail *Lymnaea luteola* L. *Aquat Toxicol* 124-125, 83-90.
- AVELAR, A, G, L. 2013. O papel da via de sinalização p38 MAPK no desenvolvimento do *Schistosoma mansoni* (Platyhelminthes:Trematoda) e na proteção contra o estresse oxidativo. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais.
- AZEVEDO, D. A.; GONÇALVES, M. L.; SILVA, D. B. 2007. Organic geochemistry of the Angra dos Reis marine sediments: Aliphatic and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environ Forensics*, v.8, n.3, p.245-256.
- BACCHETTA, R. MARAN, B. MARELLI, M. SANTO, N. TREMOLADA, P. 2016. Role of soluble zinc in ZnO nanoparticle cytotoxicity in *Daphnia magna*: a morphological approach. *Environ. Res.* 148, 376-385
- BAKER, T. J., C. R. TYLER, AND T. S. GALLOWAY, 2014, Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms: *Environmental Pollution*, v. 186, p. 257-271.
- BALOGH, T. S; VELASCO, M, V, R; PEDRIALI, C, A; KANEKO, T,M; BABY, A,R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. *An. Bras. Dermatol.* 86(4): 732–742, 2011.
- BANERJEE, A.; ROYCHOUDHURY, A. 2019. Nanoparticle-Induced Ecotoxicological Risks in Aquatic Environments: Concepts and Controversies. *Nanomaterials in Plants, Algae and Microorganisms*, p. 129–141.
- BARRACO, M. A.; A. A. STEIL & R. GARGIONI. 1993. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 88 (1): 73-83.
- BAUN, A., HARTMANN, N.B., GRIEGER, K., AND KUSK, K.O. 2008. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future ecotoxicity testing. *Ecotoxicology*, 17(5): 387-395.
- BENALI, I., BOUTIBA, Z., MERABET, A., CHÈVRE, N. 2015. Integrated use of biomarkers



and condition indices in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) for monitoring pollution and development of biomarker index to assess the potential toxic of coastal sites, Marine Pollution Bulletin, Volume 95, Pages 385-394,ISSN 0025-326X,https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2015.03.041.

- BERNHARDT, E.S., ET AL. 2010. Uma perspectiva ecológica sobre os impactos nanomateriais no meio ambiente. Journal of Environmental Quality, 39 (6): 1954–1965.
- BERTOLETTI, E & ZAGATTO P, A. 2006. Aplicação dos ensaios ecotoxicológicos e Legislação pertinente. Pp 347-379. In: P, A. ZAGATTO & E, BERTOLETTI (eds). Ecotoxicologia Aquática Princípios e Aplicações. Rima. São Paulo. 478p
- BHATT, I., AND B. N. TRIPATHI, 2011, Interaction of engineered nanoparticles with various components of the environment and possible strategies for their risk assessment: Chemosphere, v. 82, p. 308-317.
- BLINOVA, I; IVASK, A; HEILAN, M; MORTIMER, M; KAHRU A. 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. Environmental Pollution 158 (1), 41-47
- BONDARENKO, O. JUGANSON, K; IVASK, A; KASEMETS, K; MORTIMER, M; Kahru, a. 2013. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: a critical review. Archives of Toxicology. 87(7):1181-1200. doi:10.1007/s00204-013-1079-4..
- BOX, A., A. SUREDA, F. GALGANI, A. PONS, AND S. DEUDERO, 2007, Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*: Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 146, p. 531-539.
- BRAYNER, R., FERRARI-ILIOU, R., BRIVOIS, N., DJEDIAT, S., BENEDETTI, M.F., FIEVET, F., 2006. Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. Nano Lett. 6, 866e870.
- BRUN, N. R., M. LENZ, B. WEHRLI, AND K. FENT, 2014, Comparative effects of zinc oxide nanoparticles and dissolved zinc on zebrafish embryos and eleuthero-embryos: importance of zinc ions: Science of the Total Environment, v. 476, p. 657-666.
- BUTT, A, S. 2018. Toxicity of Engineered Nanoparticles to Marine Bivalve Molluscs. School of Marine Science and Technology. July
- CARBALLAL, S.; , RADI, R.; KIRK, M. C.; BARNES, S.; FREEMAN, B. A.; ALVAREZ, B. 2003. Sulfenic acid formation in human serum albumin by hydrogen peroxide and peroxytrite. Biochemistry, v.42, p.9906-9914.
- CAROCHO, M., & FERREIRA, I. C. 2013. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association, 51, 15–25.

<https://doi.org/10.1016/j.fct.2012.09.021>

- CASTRANOVA, V. 2011. Overview of current toxicological knowledge of engineered nanoparticles. *J Occup Environ Med.* 53(6Suppl):S14–S17. DOI: 10.1097/JOM.0b013e31821b1e5a.
- CAMPAGNOLO, L. et al. 2012. Physico-Chemical Properties Mediating Reproductive and Developmental Toxicity of Engineered Nanomaterials. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 26, p. 4488–4494.
- CANESI, L., AND P. PROCHÁZOVÁ, 2013, The invertebrate immune system as a model for investigating the environmental impact of nanoparticles: Nanoparticles and the Immune System. *Safety and Effects*, v. 7, p. 91-112.
- CANESI, L; CIACCI, C; FABBRI, R; MARCOMINI, A; POJANA, G; GALLO, G. 2012, Bivalve molluscs as a unique target group for nanoparticle toxicity: *Marine Environmental Research*, v. 76, p. 16-21.
- CARVALHO, O, S., SCHOLTE, R, G, C., AMARAL, R, S. 2007. Distribuição dos Moluscos Hospedeiros Intermediários de *Schistosoma mansoni* no Brasil, *Biomphalaria glabrata*, *B. straminea*, *B. tenagophila*. In *Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica: diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)*. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde
- CARVALHO, O, S., SHOELTE, R, G, C., AMARAL, R, S. 2008. Técnicas malacológicas .In: Amaral R S, Thiengo S C , O Pieri (Org) *Vigilância e controle de moluscos de importância epidemiológica -Diretrizes técnicas: Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose*. Brasília: Ministério da Saúde;.43-70p.
- CHAPMAN, P, M. 2001. The implications of hormesis to ecotoxicology and ecological risk assessment. *Human & Experimental Toxicology*.
- CHAPMAN, P. M. 2002. Integrating toxicology and ecology: putting the "eco" into ecotoxicology. *Mar Pollut Bull*, v.44, n.1, p.7-15.
- CHAN, P, K; Cheng, S, H. 2003. Cadmium-induced ectopic apoptosis in zebrafish embryos, *Arch. Toxicol.* 69–79.
- CHEUNG, C. C. C., G. J. ZHENG, P. K. S. LAM, AND B. J. RICHARDSON, 2002, Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*: *Marine Pollution Bulletin*, v. 45, p. 181-191.
- CHEUNG, C. C. C., G. J. ZHENG, A. M. Y. LI, B. J. RICHARDSON, AND P. K. S. LAM, 2001, Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic

hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*: Aquatic Toxicology, v. 52, p. 189-203.

- CHOO, K, S., SNOEJIS, P., PEDERSEN, M. 2004. Oxidative stress tolerance in the filamentous green algae *Cladophora glomerata* and *Enteromorpha ahlneri*. J.Exp.Mar.Ecol 298, 11-123
- CORSI, I; CHERR, G, N; LENIHAN, S, H; LABILLE, J; HASSELLOV, M; CANESI, L; DONDERO, F; FRENZILLI, G; HRISTOZOV, D; PUNTES, V. 2014. Common strategies and technologies for the ecosafety assessment and design of nanomaterials entering the marine environment: ACS Nano, v. 8, p. 9694-9709.
- COSMETICS & TOILETRIES BRASIL. Nanotecnologia em cosméticos. 2008. Disponível em: Acesso em julho de 2020.
- COSTA, F, J, M. 2011 Estudo da interação *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Pulmonata: Planorbidae) *Schistosoma mansoni* Sambon, 1907 (Trematoda: Schistosomatidae): aspectos biológicos, bioquímicos e histológicos da reprodução do hospedeiro intermediário. Rio de Janeiro, Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária 87pp.
- DANOVARO, R., L. BONGIORNI, C. CORINALDESI, D. GIOVANNELLI, E. Damiani, P. Astolfi, L. Greci, and A. Pusceddu, 2008, Sunscreens cause coral bleaching by promoting viral infections: Environmental Health Perspectives, v. 116, p. 441-447.
- DAS, P.; XENOPOULOS, M. A.; METCALFE, C. D. 2013. Toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticle suspensions to the aquatic invertebrate, *Daphnia magna*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 91, n. 1, p. 76–82, jul.
- DA SILVA, T. F.; AZEVEDO, D. D.; NETO, F. R. D. 2007. Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface sediments and waters from Guanabara Bay, Rio de Janeiro, Brazil. J Brazil Chem Soc, v.18, n.3, p.628-637.
- DAVE, G; XIU, R. 1991. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio* , Arch. Environ. Contam. Toxicol. 21. 126–134
- de ALMEIDA, E. A., A. C. D. BAINY, A. P. DE MELO LOUREIRO, G. R. MARTINEZ, S. MIYAMOTO, J. ONUKI, L. F. BARBOSA, C. C. M. GARCIA, F. M. PRADO, AND G. E. RONSEIN, 2007, Oxidative stress in *Perna perna* and other bivalves as indicators of environmental stress in the Brazilian marine environment: antioxidants, lipid peroxidation and DNA damage: Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, v. 146, p. 588-600.
- DE ZWART, L. L., J. H. N. MEERMAN, J. N. M. COMMANDEUR, AND N. P. E. VERMEULEN, 1999, Biomarkers of free radical damage applications in experimental animals and in humans: Free Radical Biology and Medicine, v. 26, p. 202-226.
- DI GIULIO, R, T; Hinton, D, E. 2008. The Toxicology of fishes. Taylor & Francis, London, pp 19–884.

- DIKKEBOOM, R.; VAN DER KNAAP, W. P. W.; VAN DEN BOVENKAMP, W.; TIJNAGEL, J. M. G. H.; BAYNE, C. J. 1988. The production of toxic oxygen metabolites by hemocytes of different snail species. *Dev Comp Immunol*, v. 12, 509-20,
- DOS SANTOS, D. R. Uso de biomarcadores na avaliação da resposta de peixes à poluição aquática nos reservatórios do Iraí e Passaúna. 2013. 92p. Departamento de Biologia Celular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- ELSAESSER, A., AND C. V. HOWARD, 2012, *Toxicology of nanoparticles: Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 129-137.
- EPA (2007)
- FABREGA, J., S. N. LUOMA, C. R. TYLER, T. S. GALLOWAY, AND J. R. LEAD, 2011, Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment: *Environment International*, v. 37, p. 517-531.
- FAHMY, S. R.; SAYED, D. A. 2017. Toxicological perturbations of zinc oxide nanoparticles in the *Coelatura aegyptiaca* mussel. *Toxicology and Industrial Health*.
- FARRE, M., GAJDA-SCHRANTZ, K., KANTIANI, L., AND BARCELO, D. 2009. Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393(1): 81–95.
- FENT, K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. 2004. *Toxicology*, v.205, n.3, p.223-240.
- FERRY, J.L., et al. 2009. Transfer of gold nanoparticles from the water column to the estuarine food web. *Nature Nanotechnology*, 4(7): 441–444.
- FOSTER, S. S.; CHILTON, P. J. 2003. Groundwater: the processes and global significance of aquifer degradation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, v.358, n.1440, p.1957-1972.
- FRANKLIN, N, M; ROGERS, N, J; APTE, S, C; BATLEY, G, E; GADD, G, E; CASEY, P, S. 2007. Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO, bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a freshwater microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): the importance of particle solubility. *Environ. Sci. Technol.* 41, 8484-8490.
- GAGNE, F., et al. 2008 Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: Impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. *Aquatic ecotoxicology*, 86 (3): 333-340.
- GEBARA, C, R. 2017. Toxicidade de nanopartículas de óxido de ferro (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) para o cladóceros tropical *Ceriodaphnia silvestrii*. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos / SP
- GERALDINO, R, B. 2004. Estudo dos Efeitos Embriotóxicos de Xenobióticos em *Biomphalaria glabrata*. Rio de Janeiro, ENSP/FIOCRUZ, Laboratório de Toxicologia Ambiental.

- GIRARDELLO, F. 2016. Nanopartículas de dióxido de titânio e avaliação da sua toxicidade no mexilhão dourado (*Limnoperna fortunei*). Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Instituto de Biotecnologia. Universidade de Caxias do Sul.
- GLINSKI, Z., AND J. JAROSZ. 1997. Molluscan immune defenses: *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, v. 45, p. 149-155
- GOMOT, A. 1998. Toxic effects of cadmium on reproduction, development, and hatching in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* for water quality monitoring, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 41. 288–297.
- GOTTSCHALK, F., T. SONDERER, R. W. SCHOLZ, AND B. NOWACK. 2009. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions: *Environmental Science & Technology*, v. 43, p. 9216-9222.
- GRILLO, R., A. H. ROSA, AND L. F. FRACETO. 2015. Engineered nanoparticles and organic matter: a review of the state-of-the-art: *Chemosphere*, v. 119, p. 608-619.
- HANDY, R.D., HENRY, T.B., SCOWN, T.M., JOHNSTON, B.D., AND TYLER, C.R. 2008. Manufactured nanoparticles: their uptake and effects on fish—a mechanistic analysis. *Ecotoxicology*, 17(5): 396–409.
- HEATH, A.G. 1995. *Water pollution and fish physiology*. 2ed. Lewis Publishers, Boca Raton.
- HEINLAAN, M., IVASK, A., BLINOVA, I., DUBOURGUIER, H. C., & KAHRU, A. 2008. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, 71(7), 1308–1316. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.11.047>
- HUSSAIN, S. M., K. L. HESS, J. M. GEARHART, K. T. GEISS, AND J. J. SCHLAGER, 2005, In vitro toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells: *Toxicology in Vitro*, v. 19, p. 975-983.
- JOO, S. H., and D. Zhao, 2017, Environmental dynamics of metal oxide nanoparticles in heterogeneous systems: a review: *Journal of Hazardous Materials*, v. 322, p. 29-47.
- KHOSHNOOD R. ; JAAFARZADEH N. ; JAMILI SH. ; FARSHCHI P. ; TAGHAVI L. 2017. Acute toxicity of TiO<sub>2</sub>, CuO and ZnO nanoparticles in brine shrimp, *Artemia franciscana*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences* 16(4) 1287-1296
- KLAINÉ, S, J; ET A, L. 2008. Nanomateriais no ambiente: Comportamento, destino, biodisponibilidade e efeitos. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27 (9): 1825-1851.
- KNIE, J, L, W; LOPES, E, W, B. 2004. Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. Florianópolis: FATMA/GTZ. 289p

- KOEHLER, A., MARX, U., BROEG, K., BAHNS, S., AND BRESSLING, J. 2008. Effects of nanoparticles in *Mytilus edulis* gills and hepatopancreas—A new threat to marine life? *Marine Environmental Research*, 66(1): 12–14.
- LALAH, J, O; SEVERIN, G, F; SCHRAMM, K, W; LENOIR, D; BEHACHTI, A; GUENTHER, K; KETTRUP, A. 2007. Effects of a branched p-nonylphenol isomer (4(36 -dimethyl-3-heptyl)-phenol) on embryogenesis in *Lymnaea stagnalis* L., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 52 104–112.
- LAM, C.-W., J. T. JAMES, R. MCCLUSKEY, AND R. L. HUNTER, 2004, Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation: *Toxicological Sciences*, v. 77, p. 126-134.
- LAP A, LAM V, CHAN K, CHAN K. 2005. Tilapia metallothionein genes: PCRcloning and gene expression studies. *Biochim Biophys Acta.* 1731:191–201.
- LAPRESTA-FERNÁNDEZ, A., A. FERNÁNDEZ, AND J. BLASCO, 2012, Nanoecotoxicity effects of engineered silver and gold nanoparticles in aquatic organisms: *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 32, p. 40-59.
- LEWINSOHN, T. M.; FREITAS, A. V. L.; PRADO, P. I. 2005. Conservation of Terrestrial Invertebrates and Their Habitats in Brazil. *Conservation Biology*, v. 19, n. 3, p. 640-645, jun.
- LEROUEIL, P. R., S. A. BERRY, K. DUTHIE, G. HAN, V. M. ROTELLO, D. Q. MCNERNY, J. R. BAKER, B. G. ORR, AND M. M. BANASZAK HOLL, 2008, Wide varieties of cationic nanoparticles induce defects in supported lipid bilayers: *Nano Letters*, v. 8, p. 420-424.
- LIONETTO, M. G., R. CARICATO, M. E. GIORDANO, M. F. PASCARIELLO, L. MARINOSCI, AND T. SCHETTINO, 2003, Integrated use of biomarkers (acetylcholinesterase and antioxidant enzymes activities) in *Mytilus galloprovincialis* and *Mullus barbatus* in an Italian coastal marine area: *Marine Pollution Bulletin*, v. 46, p. 324-330.
- LOPES, S. et al. 2014. Zinc oxide nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*: Size-dependent effects and dissolution. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 33, n. 1, p. 190–198, jan.
- LOVER, S.B. et al. 2007. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx). *Environ. Sci. Technol.*, v. 41, p. 4465-4470.
- LOVERDE, P, T. 1998. "Do antioxidants play a role in schistosome host-parasite interactions?" *Parasitol Today* 14(7): 284-289.
- LOWRY, G. V., K. B. GREGORY, S. C. APTE, AND J. R. LEAD, 2012: Transformations of nanomaterials in the environment. *Environmental Science and Technology*, v. 46, p. 6893–6899.

- MA, H.; WILLIAMS, P. L.; DIAMOND, S. A. 2013. Ecotoxicity of manufactured ZnO nanoparticles - A review Environmental Pollution.
- MA, S., AND D. LIN, 2013, The biophysicochemical interactions at the interfaces between nanoparticles and aquatic organisms: adsorption and internalization: Environmental Science: Processes & Impacts, v. 15, p. 145-160.
- MAGALHÃES, P, D & FERRÃO, F, S, A. 2008. A Ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. *Oecol. Bras.*, 12: 335-381.
- MANDUZIO, H., B. ROCHER, F. DURAND, C. GALAP, AND F. LÉBOULENGER, 2005, The point about oxidative stress in molluscs: The Information Systems Journal, v. 2, p. 91-104.
- MATRANGA, V., AND I. CORSI, 2012, Toxic effects of engineered nanoparticles in the marine environment: model organisms and molecular approaches: Marine Environmental Research, v. 76, p. 32-40.
- MAURER-JONES, M. A., I. L. GUNSOLUS, C. J. MURPHY, AND C. L. HAYNES, 2013, Toxicity of engineered nanoparticles in the environment: Analytical Chemistry, v. 85, p. 3036-3049.
- MELLO-SILVA, C. C. et al. 2007. Reproductive activity alterations on the *Biomphalaria glabrata* exposed to Euphorbia splendens var. hislopii latex. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.
- MELÃO, M. G. G. 1999. Desenvolvimento e aspectos reprodutivos dos cladóceros e copépodos de águas continentais brasileiras. In: POMPEO, M. L. M. ed. Perspectivas na Limnologia do Brasil. São Luís, Gráfica e Editora União, p. 1-198.
- MERDZAN V, DOMINGOS RF, MONTEIRO CE, HADIOUI M, WILKINSON KJ. 2014. The effects of different coatings on zinc oxide nanoparticles and their influence on dissolution and bioaccumulation by the green alga, *C. reinhardtii*. Sci Total Environ.;488-489:316-24. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.04.094>
- MEULENKAMP, A, E. Synthesis and Growth of ZnO Nanoparticles. J. Phys. Chem. B 1998, 102, 29, 5566-5572. Publication Date: June 25, 1998. <https://doi.org/10.1021/jp980730h>
- MEYBECK, M. 2003. Global analysis of river systems: from Earth system controls to Anthropocene syndromes. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, v.358, n.1440, p.1935-1955.
- MINETTO, D., G. LIBRALATO, AND A. V. GHIRARDINI, 2014, Ecotoxicity of engineered TiO<sub>2</sub> nanoparticles to saltwater organisms: an overview: Environment International, v. 66, p. 18-27.
- MINETTO, D.; VOLPI GHIRARDINI, A.; LIBRALATO, G. 2016. Saltwater ecotoxicology of Ag, Au, CuO, TiO<sub>2</sub>, ZnO and C60 engineered nanoparticles: An overview Environment International Elsevier Ltd, , 1 jul.

- MISRA, S. K., A. DYBOWSKA, D. BERHANU, S. N. LUOMA, AND E. VALSAMI-JONES, 2012, The complexity of nanoparticle dissolution and its importance in nanotoxicological studies: *Science of the Total Environment*, v. 438, p. 225-232.
- MOHAMED, A, H. 2011. Sublethal toxicity of Roundup to immunological and molecular aspects of *Biomphalaria alexandrina* to *Schistosoma mansoni* infection. *Ecotoxicol Environ Saf*; 74: 754-760.
- MONTE, T, C, C. 2018. Ação de herbicida à base de glifosato sobre o ciclo biológico de *Echinostoma paraensei* LIE & BASCH, 1967 (Trematoda: Echinostomatidae), em condições experimentais. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.
- MOORE, M. N.; DEPLEDGE, M. H.; READMAN, J. W.; PAUL LEONARD, D. R. 2004. An integrated biomarker-based strategy for ecotoxicological evaluation of risk in environmental management. *Mutat Res*, v.552, n.1-2, p.247-268.
- MORGANTI P. 2010. Use and potential of nanotechnology in cosmetic dermatology. *Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.* 3: 5–13,
- MORTIMER, M., K. KASEMETS, AND A. KAHRU, 2010, Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*: *Toxicology*, v. 269, p. 182-189.
- MU L & SPRANDO, R, L. 2010. Application of Nanotechnology in Cosmetics. *Pharm. Res.* 27(8): 1746–1749
- MUSEE, N. et al. 2010. The effects of engineered nanoparticles on survival, reproduction, and behaviour of freshwater snail, *Physa acuta* (Draparnaud, 1805). *Chemosphere*.
- NAVARRO, E., et al. 2008. Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nbanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, 17: 372–386.
- NEL, A. E., L. MÄDLER, D. VELEGOL, T. XIA, E. M. V. HOEK, P. SOMASUNDARAN, F. KLAESSIG, V. CASTRANOVA, AND M. THOMPSON, 2009, Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface: *Nature Materials*, v. 8, p. 543.
- NEILL, S, J., DESIKAN, R., HANCOCK, J, T. 2003. Nitric oxide signalling in plants. *New Phytol.*, v. 159, n. 1, p. 11-35.
- OLIVEIRA-FILHO, E. C. 2003. Efeitos de substâncias químicas sobre a reprodução de moluscos de água doce: estudos com caramujos do gênero *Biomphalaria*. Tese de Doutorado, v. Escola Nac, p. 138.
- OLIVEIRA-FILHO, E. C. 2014. Implications of water hardness in ecotoxicological assessments for water quality regulatory purposes: a case study with the aquatic snail *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *Braz J Biol*; 74(1): 175-180.



- OLIVEIRA-FILHO E, FILHO J, NOVAIS L, PETERNELE W, AZEVEDO R, GRISOLIA C. 2015. Effects of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on the survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and their elimination from this benthic aquatic snail. *Environ Sci Pollut Res*
- OLIVEIRA-FILHO, E. C. et al. 2016. Effects of  $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles on the survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) and their elimination from this benthic aquatic snail. *Environmental Science and Pollution Research*.
- OLIVEIRA-FILHO, E. C.; NAKANO, E.; TALLARICO, L. DE F. 2017. Bioassays with freshwater snails *Biomphalaria* sp.: from control of hosts in public health to alternative tools in ecotoxicology. *Invertebrate Reproduction and Development*.
- OLIVEIRA-FILHO, E. et al. 2019. Effects of AgNPs on the Snail *Biomphalaria glabrata*: Survival, Reproduction and Silver Accumulation. *Toxics*, v. 7, n. 1, p. 12, 1 mar.
- OLIVEIRA-RIBEIRO, C. A. et al. 2005. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. *Aquatic Toxicology*, v. 74, p. 53-69.
- OBERDORSTER, G; MAYNARD, A; DONALDSON, K. 2005. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Particle and Fibre Toxicology* 2: 8.
- PRENTERA J. 2004. Lethal and sublethal toxicity of ammonia to native, invasive and parasitized freshwater amphipods. *Water Res* 38:2847–2850.
- PREMANATHAN, M., KARTHIKEYAN, K., JEYASUBRAMANIAN, K., MANIVANNAN, G., 2011. Selective toxicity of ZnO nanoparticles toward Gram-positive bacteria and cancer cells by apoptosis through lipid peroxidation. *Nanomed-Nanotechnol* 7,184 e 192.
- POMA, A; COLAFARINA, S; FONTECCHIO, G; CHICHIRICCÒ, G. 2014. Transgenerational Effects of NMs. In: Capco D., Chen Y. (eds) *Nanomaterial. Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol 811. Springer, Dordrecht.
- QADERMARZI, A. POULADI, M. REZAMAND, A. HOSEINIFAR, H, S. HEDAYATI, A, A. 2018. Investigation of sub-acute levels of zinc oxide nanoparticles on the filtration rate of *Mytilaster lineatus* and *Dressina polymorpha* in the short term. *NUSANTARA BIOSCIENCE* 10 (1): 53-57, February
- RAMSKOV, T. et al. 2014. Bioaccumulation and effects of different-shaped copper oxide nanoparticles in the deposit-feeding snail *Potamopyrgus antipodarum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 33, n. 9, p. 1976–1987,
- RAND, G, M & PETROCELLI, S, R. 1985. *Fundamentals of aquatic toxicology*. Washington. 665p.
- REGOLI, F., S. GORBI, G. FRENZILLI, M. NIGRO, I. CORSI, S. FOCARDI, AND G. W. WINSTON. 2002a. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual

antioxidants to a more integrated approach: *Marine Environmental Research*, v. 54, p. 419-423.

REGOLI, F., D. PELLEGRINI, G. W. WINSTON, S. GORBI, S. GIULIANI, C. VIRNO-LAMBERTI, AND S. BOMPADRE. 2002b. Application of biomarkers for assessing the biological impact of dredged materials in the Mediterranean: the relationship between antioxidant responses and susceptibility to oxidative stress in the red mullet (*Mullus barbatus*): *Marine Pollution Bulletin*, v. 44, p. 912-922.

REGOLI, F., AND G. PRINCIPATO, 1995, Glutathione, glutathione-dependent and antioxidant enzymes in mussel, *Mytilus galloprovincialis*, exposed to metals under field and laboratory conditions: implications for the use of biochemical biomarkers: *Aquatic Toxicology*, v. 31, p. 143-164.

REISCHL, E.; DAFRE, A. L.; FRANCO, J. L.; WILHELM FILHO, D. 2007. Distribution, adaptation and physiological meaning of thiols from vertebrate hemoglobins. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, v.146, n.1-2, p.22-53.

RIVERO-WENDT, C, L, G. 2014. Effects of 17 $\alpha$ -methyltestosterone on the reproduction of the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. *Genet. Mol. Res.* 13(1): 605-615.

ROMANELLO, M. B., AND M. M. F. DE CORTALEZZI, 2013, An experimental study on the aggregation of TiO<sub>2</sub> nanoparticles under environmentally relevant conditions: *Water Research*, v. 47, p. 3887-3898.

ROY, U., CHATTOPADHYAY, B., DATTA, S., MUKHOPADHYAY, S. 2011. Metallothionein as a biomarker to assess the effects of pollution on Indian major carp species from wastewater-fed fishponds of east Calcutta wetlands (a Ramsar site). *Environ Res Eng Manag.* 4:10–17.

SÁNCHEZ, A. et al. 2011. Ecotoxicity of, and remediation with, engineered inorganic nanoparticles in the environment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 30, n. 3, p. 507–516, 1 mar.

SAWASDEE, B.; KÖHLER, H.-R. 2009. Embryo toxicity of pesticides and heavy metals to the ramshorn snail, *Marisa cornuarietis* (Prosobranchia). *Chemosphere*, v. 75, n. 11, p. 1539–1547, 1 jun.

SELCK, H., R. D. HANDY, T. F. FERNANDES, S. J. KLAINÉ, AND E. J. PETERSEN, 2016, Nanomaterials in the aquatic environment: A European Union–United States perspective on the status of ecotoxicity testing, research priorities, and challenges ahead: *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 35, p. 1055-1067.

SCHIRLING, M; BOHLEN, A; TRIEBSKORN, R; KÖHLER, H, R. 2006. An invertebrate embryo test with the apple snail *Marisa cornuarietis* to assess effects of potential developmental and endocrine disruptors, *Chemosphere* 64. 1730– 1738.

SCHAMPHELAERE, K, A, C; KOENE, J, M; HEIJERICK, D, G; JANSSEN, C, R. 2007. Reduction of growth and haemolymph Ca levels in the freshwater snail *Lymnaea stagnalis* chronically exposed to cobalt, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 71. 65–70.

- SCHRECK, R; RIEBER, P; BAEUERLE, A, P. 1991. Reactive oxygen intermediates as apparently widely used messengers in the activation of the NF-kappa B transcription factor and HIV-1. *EMBO J.* 10(8):2247-2258.
- SCHLENK, D. 1999. Necessity of defining biomarkers for use in ecological risk assessments. *Marine Pollution Bulletin*, v. 39, n. 1-12, p. 48-53.
- SCHIRMER, K; BEHRA, R; SIGG, L; SUTER, J, M. 2013. Safety Aspects of Engineered Nanomaterials Edited by Wolfgang Luther and Axel Zweck Copyright © Pan Stanford Publishing Pte. Ltd. ISBN 978-981-4364-85-0 (Hardcover), 978-981-4364-86-7 (eBook) [www.panstanford.com](http://www.panstanford.com)
- SCOTTO, G.; CARVALHO, I. C. D. M.; GUIMARÃES, L. B. Desenvolvimento Sustentável. Petrópolis: Vozes, v.1. 2007. 107 p
- SIMONA SCHIAVO & MARIA OLIVIERO & JIJI LI & SONIA MANZO. 2018. Environmental Science and Pollution Research 25:4871–4880 <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0815-3>
- SHAO, N., KRIEGUER-LISZKAY, A., SCHORDA, M., BECK, C, F. 2007. A reporter system for the individual detection of hydrogen peroxide and singlet oxygen: its use for the assay of reactive oxygen species produced *in vivo*. *Plant J.* 50,475-487
- SHARMA, V., ANDERSON, D., DHAWAN, A., 2012. Zinc oxide nanoparticles induce oxidative DNA damage and ROS triggered mitochondria mediated apoptosis in human liver cells (HepG2). *Apoptosis* 17, 852e870.
- SILVA, A. C. 2002. Tratamento do percolado de aterro sanitário e avaliação da toxicidade do efluente bruto e tratado. Dissertação (Mestrado em Engenharia Civil) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- SMOLDERS, R; BAILLIEUL, M; BLUST, R. 2005. Relationship between the energy status of *Daphnia magna* and its sensitivity to environmental stress. *Aquat. Toxicol.*, v.73, p. 155-170
- SOUZA, M, L, R. 2006. Caracterização fenotípica e funcional de hemócitos circulantes de *Biomphalaria glabrata* e *Biomphalaria tenagophila*, linhagens resistentes e susceptíveis, durante a infecção por *Schistosoma mansoni*. Universidade Federal de Minas Gerais Belo Horizonte.
- SOUZA, J, P; VENTURINI, P, F; SANTOS, F; ZUCOLOTTI, V. 2018. Chronic toxicity in *Ceriodaphnia dubia* induced by graphene oxide. *Chemosphere*, v.190, p. 218-224.
- SYCHEVA, P, L., ZHURKOV, S, V., IURCHENKO, V, V., DAUGEL-DAUGE, N, O., KOVALENKO, M, A., KRIVTSOVA, E, K., DURNEV, A, D, 2011. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice *in vivo*, *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental*

- STEBBING A, R, D. 1998. A theory for growth hormesis. *Mutat Res*; 403: 249–258
- TAYLOR, U. et al. Impact of metal nanoparticles on germ cell viability and functionality. *Reproduction in Domestic Animals*, v. 47, n. SUPPL.4, p. 359–368, ago. 2012.
- TEDESCO, S., DOYLE, H., REDMOND, G., AND SHEEHAN, D. 2008. Gold nanoparticles and oxidative stress in *Mytilus edulis*. *Marine Environmental Research*, 66 (1):131-133.
- TORRES, A, M. 2008. Marcadores de estresse oxidativo em *Minutocellus polymorphus* (Heterokontophyta) sob exposição a oxifluorfenol e ao benzo[a]pireno. Instituto de Química. Universidade de São Paulo.
- THIRUMOORTHY N, MANISENTHIL KUMAR KT, SHYAM SUNDAR A, PANAYAPPAN L, CHATTERJEE M. 2007. Metallothionein: An overview. *World J Gastroenterol*. 13:993–996.
- TRUHAUT, R. 1997. Ecotoxicology: objectives, principles and perspectives. *Ecotoxicology Safety*, 1:151-173
- TSUJI, J. S. et al. 2006. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: Risk assessment of nanoparticles. *Toxicological Sciences*, v. 89, n. 1, p. 42–50, jan.
- UE – EUROPEAN UNION. Commission Recommendation N° 2011/696/EU, de 18 October 2011.
- VALAVANIDIS, A., T. VLAHOGIANNI, M. DASSENAKIS, AND M. SCOULLOS, 2006, Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants: *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 64, p. 178-189.
- VALE, G., K. MEHENNAOUI, S. CAMBIER, G. LIBRALATO, S. JOMINI, AND R. F. DOMINGOS, 2016, Manufactured nanoparticles in the aquatic environment-biochemical responses on freshwater organisms: a critical overview: *Aquatic Toxicology*, v. 170, p. 162-174.
- VALKO, M., H. MORRIS, AND M. T. D. CRONIN, 2005, Metals, toxicity and oxidative stress: *Current Medicinal Chemistry*, v. 12, p. 1161-1208.
- VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. 1997. A Simple Spectrophotometric Method For Metallothionein Evaluation In Marine Organisms: an Application to Mediterranean and Antarctic Molluscs. *Marine Environmental Research*. Vol. 44: 69-84.
- VIARENGO, A.; BURLANDO, B.; CAVALETTO, M.; MARCHI, B.; PONZANO, E.; BLASCO, J. 1999. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Am J Physiol*. 277: R1612-19.
- VIARENGO, A., D. LOWE, C. BOLOGNESI, E. FABBRI, AND A. KOEHLER, 2007, The use of biomarkers in biomonitoring: a 2-tier approach assessing the level of

pollutant-induced stress syndrome in sentinel organisms: Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, v. 146, p. 281-300.

- VON MOOS N., SLAVEYKOVA VI. 2013. Oxidative stress induced by inorganic nanoparticles in bacteria and aquatic microalgae – state of the art and knowledge gaps. Nanotoxicology. DOI: 10.3109/17435390.2013.809810.
- WAGNER A. 2000. Influence of sewage from different water treatment plants in the Cracow Region (Poland) on early developmental stage of water snails. Lakes Reserv Res Manag; 5: 83-88.
- WANG, C. et al. 2016. Effects of long-term exposure to zinc oxide nanoparticles on development, zinc metabolism and biodistribution of minerals (Zn, Fe, Cu, Mn) in mice. PLoS ONE,
- WANG, R. et al. 2018. Potential adverse effects of nanoparticles on the reproductive system International Journal of Nanomedicine Dove Medical Press Ltd.
- WANG, Z. L. 2004. Nanostructures of zinc oxide. Materials Today, v. 7, n. 6, p. 26–33, 1 jun.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2001. Biomarkers in Risk Assessment: Validity and Validation. Environmental Health Criteria. Geneva: World Health Organization. v.222. 238 p.
- WIENCH, K. et al. 2009. Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO<sub>2</sub> and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. Chemosphere.
- WIRTH, E, F; LUND, S, A; FULTON, M, H; SCOTT, G, I. 2001. Determination of acute mortality in adults and sublethal embryo responses of *Palaemonetes pugio* to endosulfan and methoprene exposure. Aquatic Toxicology, 53:9-18.
- WONG, S, W, Y. 2010. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. Analytical and Bioanalytical Chemistry 396, 609-618.
- XIAO, Y. VIJVER, G, M. CHEN, G. PEIJNENBURG, W. 2015. Toxicity and Accumulation of Cu and ZnO Nanoparticles in *Daphnia magna*. Environ. Sci. Technol. 2015, 49, 7, 4657-4664. Publication Date: March 18. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00538>
- ZHANG, C., WANG, J., TAN, L., CHEN, X., 2016. Toxic effects of nano-ZnO on marine microalgae *Skeletonema costatum*: attention to the accumulation of intracellular Zn. Aquat. Toxicol. 178, 158e164.
- ZHAO, C. M.; WANG, W. X. 2011. Comparison of acute and chronic toxicity of silver nanoparticles and silver nitrate to *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry, v. 30, n. 4, p. 885–892, abr.
- ZHU, X.; TIAN, S.; CAI, Z. 2012. Toxicity Assessment of Iron Oxide Nanoparticles in Zebrafish (*Danio rerio*) Early Life Stages. PLoS ONE, v. 7, n. 9, p. 1–6.

## **ANEXO A – RESUMOS SUBMETIDOS**

- XV Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia – ECOTOX 2018

**EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO EM  
ALGUNS ASPECTOS DA SOBREVIVÊNCIA, REPRODUÇÃO E DESENVOLVIMENTO  
EMBRIONÁRIO DE *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)**

Natália S. Santos<sup>1</sup>, Cesar Luiz P. A. C. da Silva<sup>1</sup>, Darcilio F. Baptista<sup>1</sup>, Marta Julia Faro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental – IOC / FIOCRUZ – RJ/ BRASIL <sup>2</sup>Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatório, IOC/FIOCRUZ – RJ/ BRASIL

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ECOTOXICOLÓGICOS DE NANOPARTÍCULAS DE  
ÓXIDO DE ZINCO (NPS ZNO) EM *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (GASTROPODA:  
PULMONATA): CITOMETRIA DE FLUXO COMO FERRAMENTA DE ANÁLISE DA  
VIABILIDADE CELULAR DA HEMOLINFA.**

Natália S. Santos<sup>1</sup>, Cesar Luiz P. A. C. da Silva<sup>1</sup>, Darcilio F. Baptista<sup>1</sup>, Marta Julia Faro<sup>2</sup>,  
Alvaro I. B. dos Santos<sup>3</sup>, Thaize Q. C. Pedro<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental – IOC / FIOCRUZ <sup>2</sup> Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatório, IOC/FIOCRUZ – RJ <sup>3</sup>Laboratório de Imunoparasitologia, IOC/FIOCRUZ – RJ

- II Simpósio de Ecotoxicologia e Ecofisiologia Animal da UFV – Março 2019

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE ZINCO SOBRE A  
REPRODUÇÃO DE *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818)**

Natália Souza Santos<sup>1</sup>, Cesar Luiz Pinto Ayres Coelho da Silva<sup>1</sup>,  
Darcilio Fernandes. Baptista<sup>1</sup>, Marta Julia Faro<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Avaliação e Promoção da Saúde Ambiental – IOC / FIOCRUZ – RJ/ BRASIL <sup>2</sup>Laboratório de Biologia e Parasitologia de Mamíferos Silvestres Reservatório, IOC/FIOCRUZ – RJ/ BRASIL