

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

MAÍRA DE VASCONCELOS LIMA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE SUSPENSÕES DE PONTOS QUÂNTICOS EM
MOLUSCOS DA ESPÉCIE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818)**

Recife
2017

MAÍRA DE VASCONCELOS LIMA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE SUSPENSÕES DE PONTOS QUÂNTICOS EM
MOLUSCOS DA ESPÉCIE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818)**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Orientação: Prof^a Dr^a. Adriana Fontes.

Coorientação: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo.

Recife
2017

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Lima, Maíra de Vasconcelos

Avaliação da toxicidade de suspensões de pontos quânticos em moluscos da espécie *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818) / Maíra de Vasconcelos Lima. – Recife: O Autor, 2017.

81 f.: il.

Orientador: Adriana Fontes, Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, 2017.

Inclui referências e anexos

1. *Biomphalaria glabrata* 2. Nanotecnologia 3. Testes de toxicidade I. Fontes, Adriana (orient.) II. Melo, Ana Maria Mendonça de Albuquerque (coorient.) III. Título.

594.3

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2017-202

MAÍRA DE VASCONCELOS LIMA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DE SUSPENSÕES DE PONTOS QUÂNTICOS EM
MOLUSCOS DA ESPÉCIE *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818)**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 03 de fevereiro de 2017.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a Dr^a Adriana Fontes

Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE (Orientadora - Presidente)

Dr^a. Rebeca da Silva Cantinha

Centro Regional de Ciências Nucleares do Nordeste - CRCN/NE (Titular- Membro externo)

Dr. Paulo Euzébio Cabral Filho

Departamento de Biofísica e Radiobiologia – UFPE (Titular - Membro externo)

Recife
2017

DAS UTOPIAS

Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!

Mário Quintana.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus e a Nossa Senhora que me proporcionaram chegar até aqui, e muitas vezes, apesar da minha pouca fé, sempre me guiaram na direção certa.

Aos meus pais amados, Josemar e Luci, por tudo o que ainda fazem por mim, todos os dias da minha vida. Por serem minha maior inspiração e meu exemplo de amor e honestidade.

As minhas irmãs, Mona Lizza e Monique, pelo amor sincero, pela confiança e pelo apoio.

A Lucas, que mais uma vez se mostrou companheiro e meu melhor amigo, me apoiando em todos os momentos difíceis (e não foram poucos)!!

A minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Adriana Fontes, que aceitou embarcar junto comigo nesse campo desconhecido, mas sempre foi muito solícita e dedicada a pesquisa. Seus ensinamentos foram essenciais para minha formação durante o mestrado. Obrigada pela confiança!

A minha co-orientadora Prof.^a Dr.^a Ana Melo, por confiar no meu trabalho, por todos os ensinamentos e dedicação, não só no âmbito acadêmico, mas nos pequenos momentos do dia-a-dia. E sem dúvida pela oportunidade de poder dar continuidade a minha carreira acadêmica. Muito obrigada!

A todos do Grupo NanoBio, que sem dúvida são as melhores pessoas, não existe tempo ruim com vocês, obrigada por toda ajuda! Em especial a Isabela e Paulo, que sempre estiveram disponíveis em tirar minhas dúvidas e dividir comigo seus conhecimentos.

A todos do Laboratório de Radiobiologia, em especial ao professor Amâncio, que sempre que possível colaborou com este trabalho. A Hianna, Will, Luís, Douglas, Katarine, Luiza, Vinícius e Ricardo, que aguentaram minha bipolaridade, por sempre oferecerem café, mesmo sabendo que nunca ia aceitar. Vocês de fato me mostraram todos os dias o verdadeiro significado da palavra amizade e perseverança.

Obrigada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas por todo o suporte durante o mestrado, a CAPES pelo apoio financeiro (demorou, mas chegou, hehehe).

E a todos que de alguma forma contribuíram, muito obrigada!

RESUMO

A utilização de nanopartículas, de diferentes tipos e finalidades, vêm crescendo a cada ano. Provocando uma inevitável exposição ao meio ambiente e à saúde humana, o que tem motivado a realização de estudos direcionados aos impactos desses nanomateriais. Entre essas nanopartículas, estão os nanocristais fluorescentes de semicondutores, os pontos quânticos (PQs), que vêm sendo bastante aplicados nas áreas biomédica e eletrônica. Dentro deste contexto, estudos com bioindicadores ambientais sensíveis, tais como os moluscos *Biomphalaria glabrata*, se faz relevante. Este trabalho teve por objetivo avaliar o potencial impacto de suspensões de PQs de CdTe no meio aquático, através do molusco *Biomphalaria glabrata*. Foram utilizadas suspensões de PQs de CdTe, estabilizados com ácido mercaptossuccínico (AMS) - 3 nm de diâmetro e pH 7,0. Para os bioensaios, primeiramente retirou-se o excesso de precursores da síntese, utilizando-se colunas de ultrafiltração, 10 kDa. Para os estudos de toxicidade aguda, foram utilizados embriões na fase de blástula e caramujos adultos pigmentados. Os embriões foram expostos às concentrações de 1,2; 2,5; 5; 10 e 20 nM e os animais adultos à 50; 100; 200 e 400 nM de PQs de CdTe, ambos por 24 h. Com a finalidade de verificar a fonte dos efeitos tóxicos, os animais foram submetidos ao AMS (50%) e ao sobrenadante da suspensão (SBS), em volumes de 2,5; 5; 10; 20 e 40 µL para embriões e 200; 400 e 800 µL para adultos. O grupo controle negativo continha água filtrada e decolorada e o grupo controle positivo, niclosamida (Bayluscide-Bayer) à 3 µM, submetidos às mesmas condições dos grupos testes. Os embriões foram observados por 8 dias consecutivos através de microscópio estereoscópico. Os parâmetros observados foram viabilidade (eclosão) e inviabilidade (mortos e malformados). Os moluscos adultos foram avaliados quanto a sobrevivência e a mortalidade. Os indivíduos que sobreviveram à exposição foram submetidos a análise mutagênica, por meio do ensaio do micronúcleo. Em cada grupo foram analisadas 1000 células, em triplicata. Os PQs apresentaram aproximadamente 60 e 80% de mortalidade de embriões, para as concentrações de 1,2 e 2,5 nM respectivamente, e 100% de letalidade para as demais concentrações. A mortalidade teve um comportamento dose-dependência, aproximadamente 20; 56 e 68% para as concentrações de 50; 100 e 200 nM respectivamente, e 100% para 400 nM. Testes com AMS e o SBS não apresentaram mortalidade dos moluscos adultos e nem diferença significativa nos embriões. O controle negativo apresentou 100% de sobrevivência, o controle positivo 100% de mortalidade em relação aos embriões e aos moluscos adultos. Os hemócitos dos moluscos adultos sobreviventes às exposições apresentaram micronúcleos (MN), binucleações (BN) e apoptose celular (AP), e a AP apresentou diferença significativa quando comparada ao grupo controle negativo e demais grupos testes. Portanto, os resultados demonstraram que quanto maior a concentração de PQ de CdTe maior a toxicidade aos moluscos *B. glabrata*. Sugere-se que estes eventos estejam relacionados ao tempo de exposição à suspensão e à concentração de Cd²⁺. Assim o *B. glabrata* mostrou ser um bioindicador sensível para avaliar a toxicidade de PQs de CdTe em ambientes aquáticos.

Palavras chaves: Pontos quânticos. CdTe. Toxicidade. Bioindicador. *Biomphalaria glabrata*.

ABSTRACT

The use of nanoparticles, of different types and purposes, has been growing every year. It causes an unavoidable exposure to the environment and to human health, which has motivated the realization of studies directed to the impacts of these nanomaterials. Among these nanoparticles are semiconductor fluorescent nanocrystals, quantum dots (QDs), which have been widely applied in biomedical and electronic areas. Within this context, studies with sensitive environmental bioindicators, such as the mollusks *Biomphalaria glabrata*, become relevant. The objective of this work was to evaluate the potential impact of suspensions of CdTe QDs on the aquatic environment, through the mollusks *Biomphalaria glabrata*. CdTe QDs suspensions, stabilized with mercaptosuccinic acid (MSA) - 3 nm in diameter and pH 7.0, were used. For bioassays, first the excess precursors came from the synthesis were removed using 10 kDa ultrafiltration columns. For the acute toxicity studies, it was used embryos in the blastula phase and adult pigmented snails. Embryos were exposed to CdTe QDs concentrations of 1.2; 2.5; 5; 10 and 20 nM and the adult animals at 50; 100; 200 and 400 nM, both for 24 h. In order to verify the source of the toxic effects, animals were also submitted to MSA (50%) and to the supernatant of the suspension (SBS), in volumes of 2.5; 5; 10; 20 and 40 μ L for embryos and 200; 400 and 800 μ L for adults. The negative control group contained filtered and dechlorinated water and the positive control group, niclosamida (Bayluscide-Bayer) at 3 μ M, submitted to the same conditions as the test groups. Embryos were observed for 8 consecutive days using a stereomicroscope. The parameters observed were viability (embryos that hatch) and non-viability (dead and malformed). Adult mollusks were evaluated for survival and mortality. The individuals who survived the exposure were submitted to mutagenic analysis, by means of the micronucleus assay. In each group, 1000 cells were analyzed in triplicate. The QDs presented approximately 60 and 80% of embryo mortality, for the concentrations of 1.2 and 2.5 nM respectively, and 100% of lethality for the other concentrations. Mortality had a dose-dependence behavior, approximately 20; 56 and 68% for the concentrations of 50; 100 and 200 nM respectively, and 100% for 400 nM. Tests with AMS and SBS showed no adult mollusks mortality and no significant difference in embryos. The negative control presented 100% survival, the positive control 100% mortality in relation to the adult embryos and mollusks. The hemocytes of adult mollusks which survive the exposures presented micronuclei (MN), binucleations (BN) and cellular apoptosis (AP), and AP presented a significant difference when compared to the negative control group and other test groups. Therefore, results demonstrated that the higher the CdTe QDs concentration, the greater the toxicity to *B. glabrata* mollusks. It is suggested that these events are related to the time of exposure to the suspension and the concentration of Cd²⁺. Thus, *B. glabrata* showed to be a sensitive bioindicator to evaluate the CdTe QDs toxicity on aquatic environments.

Key words: Quantum dots. CdTe. Toxicity. Bioindicator. *Biomphalaria glabrata*.

LISTA DE FIGURAS DO REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Fluorescência em semicondutores: o elétron (e^-) é excitado e promovido para a banda de condução (BC), há formação de éxciton, e após relaxação e recombinação excitônica, finalmente é gerada a emissão de fluorescência. Onde: h^+ representa o buraco gerado na banda de valência (BV), pela excitação do elétron; $h\nu$ é a energia de um fóton (E) necessária para excitar a amostra ($E = h\nu$, onde h é a constante de Planck e ν é a frequência de luz).	17
Figura 2 – Espectros de absorção e emissão típicos de PQs e corantes orgânicos convencionais.	18
Figura 3 – Comparação da resistência à fotodegradação dos PQs ao longo do tempo em comparação ao corante orgânico AlexaFluor. Antígenos nucleares marcados por PQs (630 nm), em vermelho, e microtúbulos marcados pelo corante orgânico (488 nm), em verde. Barra de escala, 10 μ m.	18
Figura 4 – Relação entre tamanho e comprimento de onda de fluorescência dos PQs.	18
Figura 5 – Representação esquemática de um PQ revestido por um agente estabilizante.	20
Figura 6 - Fórmulas das estruturas químicas dos principais agentes estabilizantes utilizados para obtenção de PQs: (A) ácido mercaptopropiônico (AMP), (B) L-cisteína (CYS) e (C) ácido mercaptosuccínico (AMS).	20
Figura 7 - Ilustração esquemática da citotoxicidade induzida por PQs à base de cádmio (Cd^{2+}). As nanopartículas de PQs de CdTe são transportadas através da membrana celular para o interior da célula, enquanto que os íons de Cd^{2+} que compõem os PQs são liberados no citoplasma e se acumulam no retículo endoplasmático.	25
Figura 8 - Molusco <i>Biomphalaria glabrata</i> , concha 10 a 14 mm.	31
Figura 9 - Imagem de um animal do gênero <i>Biomphalaria</i> retirado da concha, para a visualização dos órgãos internos. Massa cefalopodal (ms), cavidade pulmonar (cp), mufla (mf), tentáculo (te), colo (c), abertura genital masculina (om), colar ou borda do manto (cm), pseudobrânquia (ps), pneumóstoma (pn), abertura anal (an), músculo columelar (mc), crista lateral (cl), crista retal (ct), veia renal (vr), veia pulmonar (vp), tubo renal (tr), reto (rt), glândula do albúmen (ga), intestino anterior (ia), intestino médio (im), intestino posterior (ip), estômago (et), glândula digestiva (gd), pé (p), ovoteste (ot).	31
Figura 10 – Ciclo embrionário do <i>B. glabrata</i> . (A) Blástula, (B) Gástrula, (C) Trocófora Jovem, (D) Trocófora, (E) Véliger Jovem, (F) Véliger, (G) <i>Hipo stage</i> e (H) animais eclodidos.	32
Figura 11 – Células da hemolinfa: granulócito.	34

Figura 12 - Células da hemolinfa: hialinócito.	34
Figura 13 - Embriões de <i>Biomphalaria glabrata</i> com desenvolvimento anormal. (A) Embrião teratomórfico (et) e (B) embriões mortos (em) e malformação de concha (mc).	36
Figura 14 - Alterações celulares encontradas após o teste do micronúcleo. Hemócito com micronúcleo (A). Hemócito com Binucleação (B). Hemócito em apoptose (C).	37

LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO

Figure 1 – CdTe QDs absorption (dashed line) and emission (solid line) spectra.	43
Figure 2 – Toxicity of <i>Biomphalaria glabrata</i> embryos exposed to CdTe QDs suspension, where C is negative control and NCL is niclosamide. Asterisks indicate significant results when compared to negative control *** $p < 0.001$	44
Figure 3 – Abnormalities in <i>Biomphalaria glabrata</i> embryos resulting from exposure to different concentrations of CdTe QDs suspension: (A) 1 – hatched animal (negative control); (B) 2 – stunted growth and death, 3 - hatched animal (1.3 and 2.7 nM); (C) 4 - stunted growth and death (5.5 nM); (D) 5 - stunted growth and death (11.1 and 22.2 nM) and (E) 6 – dead embryos (niclosamide – 3 μ M).	44
Figure 4 – Acute toxicity of adult snails of <i>Biomphalaria glabrata</i> exposed to CdTe QDs suspension: C: negative control and NCL: niclosamida. Significant results compared to negative control *** $p < 0.001$	46
Figure 5 – <i>Biomphalaria glabrata</i> hemolymph cells (100x objective): (A) Hemocyte normal – hyalinocyte; (B) Hemocyte normal – granulocyte; (C) Binucleation; (D) Micronucleus and (E) Apoptosis.	47
Figure 6 – Alterations analyzed in the hemocytes of <i>B. glabrata</i> exposed to CdTe QDs suspension: (A) Frequency of binucleations; (B) Frequency of micronucleus; (C) Frequency of apoptosis, where C is negative control. Asterisks indicate significant results when compared to negative control *** $p < 0.001$	49

LISTA DE ABREVIACES

AMP	cido Mercaptopropinico
AMS	cido Mercaptosuccnico
AMU	cido Mercaptoundecanico
BC	Banda de Conduo
<i>B. glabrata</i>	<i>Biomphalaria glabrata</i>
BV	Banda de Valência
Caco-2	Adenocarcinoma
Cd ²⁺	Cádmio
CdCl ₂	Cloreto de Cádmio
CdTe	Telureto de Cádmio
CdTe/ZnS	Telureto de Cádmio passivado com Sulfeto de Zinco
CdS/Cd(OH) ₂	Sulfeto de Cádmio passivado com Hidróxido de Cádmio
CdSe/ZnS	Seleneto de Cádmio passivado com Sulfeto de Zinco
CdSe/ZnSe	Seleneto de Cádmio passivado com Seleneto de Zinco
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
CYS	L-cisteína
DBTRG-05MG	Glioblastoma recorrente
DNA	cido Desoxirribonucleico
<i>D. tertiolectam</i>	<i>Dunaliella tertiolecta</i>
GA	Tri-n-octilfosfina/Goma Arábica
HD	Diâmetro Hidrodinâmico
MCF-7	Células de câncer de mama
MN	Micronúcleos
N9	Células da Microglia
NPs	Nanopartículas
PC-PQ-PEG	Polímero Anidrido Maleico Octadeceno e Polietilenoglicol
PEG	Polietilenoglicol
PEG-PE	N-polietilenoglicol Fosfatidiletanolamina
<i>P. tricornutum</i>	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>
PQs	Pontos Quânticos
-SH	Grupo tiol

ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
U87	Glioblastoma
UV-B	Ultravioleta tipo B
WTK-1	Células de linfoblastoma
ZnSe	Seleneto de Zinco
ZnS	Sulfeto de Zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 Objetivos geral	16
2.2 Objetivos específicos.....	16
3 REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1 Pontos quânticos	17
3.2 Toxicidade relacionada aos PQs.....	21
3.2.1 Tamanho	21
3.2.2 Superfície.....	22
3.2.3 Interação biológica - Liberação de íons.....	23
3.2.4 Produção de ROS (espécies reativas de oxigênio)	25
3.3 Bioindicadores aquáticos	27
3.3.1 Modelos ecotoxicológicos	28
3.4 Moluscos	29
3.4.1 <i>Biomphalaria glabrata</i>	30
3.4.2 Características anatômicas.....	30
3.5 Testes ecotoxicológicos	35
3.5.1 Alterações embriológicas	35
3.5.2 Alterações Morfológicas.....	36
4 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO A ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY	38
5 CONCLUSÕES.....	54
6 PERSPECTIVAS.....	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO A - Normas para submissão a <i>Ecotoxicology and Environmental Safety</i>.....	74

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é um dos ramos da ciência que mais tem se desenvolvido atualmente. Muitos dos nanomateriais se encontram em produtos inovadores, como cosméticos e eletrônicos, e até mesmo nas áreas da biologia e medicina. Devido à crescente produção e aplicação de nanopartículas (NPs), sabe-se que a maior parte dos rejeitos produzidos nas indústrias é liberado no meio ambiente, em especial nos ecossistemas aquáticos, e isto tem provocado uma ampla discussão sobre os riscos potenciais destes nanomateriais, sua liberação no meio ambiente e para a saúde humana, bem como sua interação, bioacumulação ou transferência em cadeias alimentares aquáticas (KIM et al., 2003; JACKSON et al., 2012; MA; LIN, 2013).

Pontos quânticos (PQs) são nanocristais fluorescentes de semicondutores com tamanhos que variam de 2 a 10 nm. E vêm sendo bastante empregados em Ciências da Vida e na produção de dispositivos eletrônicos, por apresentarem únicas propriedades ópticas, tais como: largo espectro de absorção; estreito espectro de emissão; comprimento de onda sintonizável com o tamanho; superfície ativa e resistência à fotodegradação (RESCH-GENGER et al., 2008; PEREIRA et al., 2016; WANG et al., 2016).

Muitos desses PQs podem vir a ser descartados, tendo como destino final o ambiente aquático, e este fato representa uma atual preocupação, visto que podem causar danos diretos ou indiretos à saúde e à sobrevivência dos organismos quando expostos. Quando constituídos por cádmio, a ecotoxicologia relaciona a liberação desse íon como o principal mecanismo de toxicidade associado a esses nanocristais, porém outros fatores também podem modular a sua ação biológica, tais como: tamanho, forma e composição da superfície dessas nanopartículas, além do tipo de organismo exposto (TANG et al., 2013; ALI et al., 2014; BOUR et al., 2015; ABD-ALLA; NAJDY; KHALAF, 2016). Como a nanotecnologia é uma área relativamente nova e os parâmetros relacionados à sua toxicidade são muitos, não há protocolos totalmente estabelecidos e avaliados para muitas nanopartículas, o que mantém essa discussão aberta.

O monitoramento das águas, até recentemente, era feito basicamente utilizando apenas parâmetros físico-químicos e microbiológicos, os quais não são suficientes para demonstrar a toxicidade que pode vir a ser induzida nos organismos habitantes desses ecossistemas. O CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) tem sugerido a investigação

ecotoxicológica com organismos e ensaios adequados, os quais são determinados pelos órgãos estaduais. Atualmente, parte dos estudos de toxicidade aquática tem gerado respostas com base em efeitos agudos observados em peixes, anfíbios e algas. No entanto, a maior parte dos organismos existentes nesses ecossistemas é de invertebrados, e os moluscos merecem destaque, pois são os mais abundantes nesse habitat (KRISTOFF et al., 2010).

Neste sentido, o molusco *Biomphalaria glabrata* tem sido aplicado como um sensível bioindicador de agentes químicos (agrotóxicos, óleo essencial, extratos vegetais) e físicos (radiação ionizante e não ionizante) e o mesmo tem se mostrado um promissor modelo experimental (OKAZAKI et al., 1996; TALLARICO et al., 2004; ESTEVAM et al., 2006; CANTINHA et al., 2010). Isso se deve às suas características biológicas e ambientais, ideais a um bioindicador, tais como ampla distribuição geográfica, fácil manutenção em laboratório, alta sensibilidade, curto ciclo de vida e fácil reprodução facilitando assim a detecção de fatores que podem interferir no curso normal do ecossistema (ESTEVAM et al., 2006; CANTINHA et al., 2010). Dentro desse contexto, este trabalho explorou a sensibilidade do caramujo *B. glabrata*, contemplando tanto sua fase embrionária como adulta, a fim de avaliar parâmetros de toxicidade quando estão expostos aos pontos quânticos de Telureto de Cádmio (CdTe).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivos geral

Avaliar os efeitos tóxicos e citotóxicos de suspensões de pontos quânticos (CdTe) em ambientes aquáticos utilizando os moluscos *Biomphalaria glabrata*.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar e caracterizar os PQs do CdTe com o agente estabilizante: ácido mercaptossuccínico (AMS).
- Analisar os efeitos tóxicos das suspensões de CdTe sobre os embriões, no estágio de blástula, de moluscos *Biomphalaria glabrata*.
- Avaliar a toxicidade aguda das suspensões de CdTe em caramujos adultos *B. glabrata*, por meio dos seguintes parâmetros: mortalidade e sobrevivência
- Verificar a citotoxicidade das suspensões de CdTe por meio da análise das células hemocitárias dos caramujos adultos.

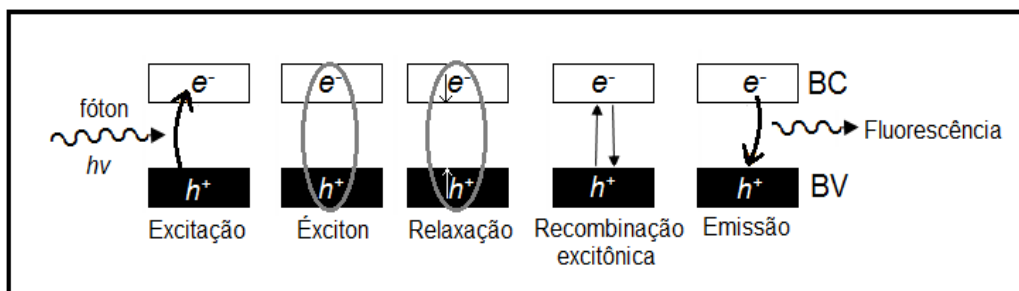
3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Pontos quânticos

Pontos quânticos (PQs) são nanocristais de semicondutores, que representam uma nova classe de sondas fluorescentes, e que estão ganhando popularidade frente aos fluoróforos orgânicos em diversas aplicações biológicas, tais como em ensaios bioanalíticos, aquisição de imagens *in vitro* de células e tecidos, além da aquisição de imagens *in vivo* de pequenos animais (SINGH et al., 2012; PROBST et al., 2013; ZHANG et al., 2014), além da sua vasta aplicação em dispositivos eletrônicos, tais como displays, sensores e telefones celulares (WANG et al., 2016; SHEHAB; EBRAHIM; SOLIMAN, 2016; QUESADA-GONZALEZ; MERKOÇI, 2017).

Os semicondutores sólidos apresentam um *band gap* relativamente pequeno (menor que 4 eV) localizado entre as bandas de valência (BV) e de condução (BC). Se for fornecida energia suficiente através de fótons, por exemplo, assim como mostra a Figura 1, irá ocorrer a excitação de elétrons da BV para a BC, gerando um par elétron-buraco (éxciton). Com o decaimento energético os elétrons vão retornar para a BV, resultando assim na emissão de luz ou fluorescência por esses materiais (SMITH; GAO; NIE, 2004; YONG et al., 2012).

Figura 1 – Fluorescência em semicondutores: o elétron (e^-) é excitado e promovido para a banda de condução (BC), há formação de éxciton, e após relaxação e recombinação excitônica, finalmente é gerada a emissão de fluorescência. Onde: h^+ representa o buraco gerado na banda de valência (BV), pela excitação do elétron; $h\nu$ é a energia de um fóton (E) necessária para excitar a amostra ($E = h\nu$, onde h é a constante de Planck e ν é a frequência de luz).

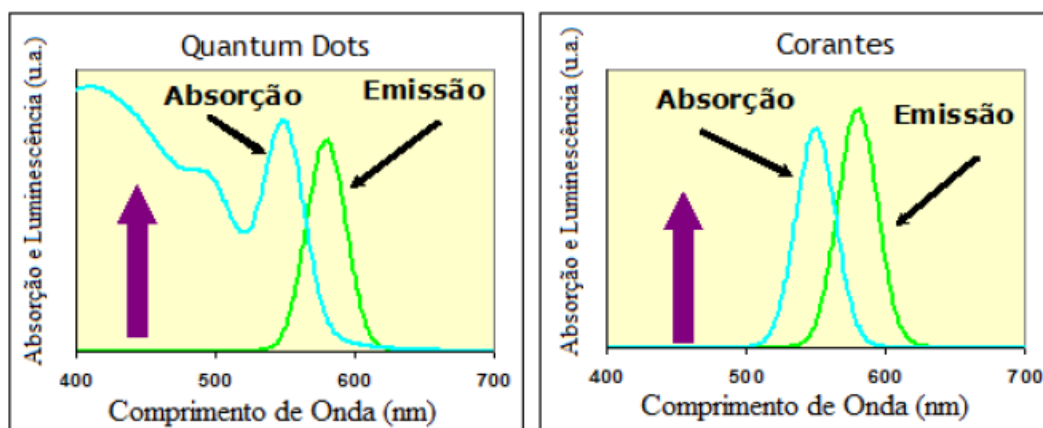


Fonte: PEREIRA, 2014.

Em relação aos corantes orgânicos convencionais, os PQs possuem várias propriedades únicas que lhes conferem algumas vantagens, dentre elas: (1) largo espectro de absorção, propiciando que uma única fonte de luz possa excitar a fluorescência de várias nanopartículas (NPs), assim como observado na Figura 2; (2) estreito espectro de emissão permitindo múltiplas

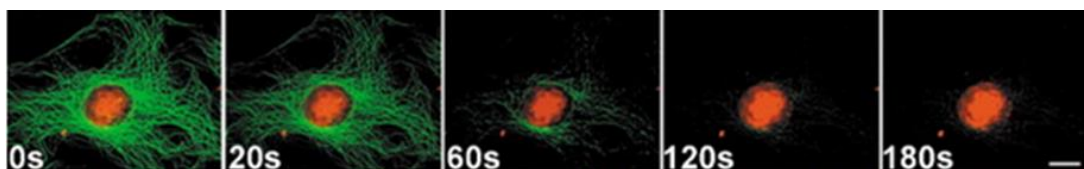
marcações simultâneas; (3) forte resistência à fotodegradação, permitindo o estudo de sistemas biológicos por um longo período de tempo (Figura 3); (4) emissão de luz em diferentes regiões do espectro, sendo o comprimento de onda de emissão sintonizável com o tamanho (Figura 4) (PENG et al., 1997; JAISWAL et al., 2003; RESCH-GENGER et al., 2008).

Figura 2 – Espectros de absorção e emissão típicos de PQs e corantes orgânicos convencionais.



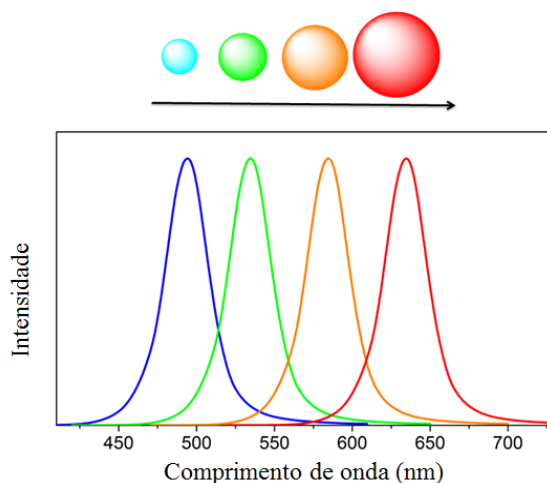
Fonte: Adaptada de FARIAS et al., 2007.

Figura 3 – Comparação da resistência à fotodegradação dos PQs ao longo do tempo em comparação ao corante orgânico AlexaFluor. Antígenos nucleares marcados por PQs (630 nm), em vermelho, e microtúbulos marcados pelo corante orgânico (488 nm), em verde. Barra de escala, 10 μ m.



Fonte: Adaptada de WU et al., 2003.

Figura 4 – Relação entre tamanho e comprimento de onda de fluorescência dos PQs.



Fonte: AUTORA.

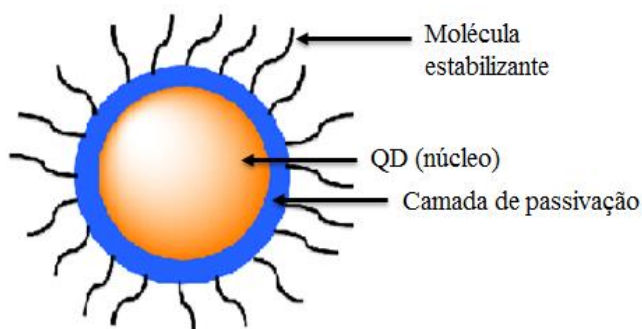
PQs apresentam diâmetros que podem variar aproximadamente de 2 a 10 nm, e serem controlados pelos seus parâmetros da síntese, tais como tempo de reação e quantidade de precursores, e dependendo dos elementos químicos é possível obter determinadas “cores” de fluorescência, podendo sintonizar no comprimento de onda de emissão do azul (menores PQs) até o comprimento de onda vermelho (maiores PQs), dependendo do semicondutor utilizado (CHAN; NIE, 1998; YANG et al., 2016). As propriedades ópticas dos PQs podem ser então moduladas espectralmente por meio do ajuste do *band gap*. Quando uma nanopartícula de semicondutor é menor do que o raio de Bohr¹, ela está em regime de confinamento quântico e é chamada de *quantum dot*. O *band gap* será menor conforme o aumento do tamanho dos PQs, gerando nesse caso nanocristais fluorescentes na região do vermelho (uma vez que o comprimento de onda emitido é inversamente proporcional ao *band gap*).

PQs apresentam uma estrutura complexa, onde o núcleo ou “*core*”, responsável pelas propriedades ópticas (como absorção e emissão de fluorescência), é frequentemente revestido por uma camada de passivação, composta geralmente de outro material semicondutor, chamada de casca ou “*shell*”, a qual está relacionada com a fotoestabilidade e com a qualidade de emissão das nanopartículas (FONTES et al., 2012; ESTUPIÑÁN-LÓPEZ et al., 2016; PEREIRA et al., 2016). Ambos (núcleo e casca) normalmente são feitos de semicondutores compostos por elementos dos grupos da tabela periódica, II-VI ou III-V. Sendo os do tipo II-VI os sistemas mais estudados, onde se enquadram o CdTe (telureto de cádmio) e o ZnSe (seleneto de zinco), por exemplo (ALIVISATOS; GU; LARABELL, 2005; FONTES et al., 2012).

No decorrer da síntese, em meio orgânico ou aquoso, os PQs podem ser revestidos por moléculas orgânicas ou inorgânicas – que agem como estabilizantes/funcionalizantes (Figura 5) (SANTOS; FARIAS; FONTES, 2008; PEREIRA et al., 2016). A síntese aquosa dos nanocristais é de grande interesse, pois, é reproduzível, de baixo custo e hidrofílica (LI et al., 2004; PILLA et al., 2012). Para os procedimentos da síntese aquosa, as principais classes de moléculas orgânicas utilizadas como agentes estabilizantes/funcionalizantes são: ácido mercaptopropiônico (AMP), L-cisteína (CYS) e ácido mercaptossuccínico (AMS), entre outros (FONTES et al., 2012).

¹ Quando um elétron (e^-) é excitado e vai para a BC, ele deixa um “buraco” na BV, o elétron-buraco. Uma força atrativa mantém este par elétron-buraco movendo-se juntos e sempre com uma distância média entre eles (distância entre e^- e h^+), o que é então chamado de raio de Bohr, em referência ao átomo de hidrogênio.

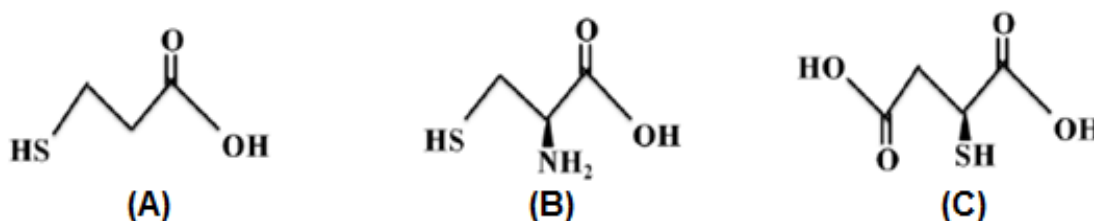
Figura 5 – Representação esquemática de um PQ revestido por um agente estabilizante.



Fonte: AUTORA.

Os agentes estabilizantes utilizados na síntese dos PQs apresentam em sua estrutura o grupamento tiol ($-SH$), como podemos analisar na Figura 6, possibilitando que os átomos de enxofre se liguem aos átomos de cádmio do núcleo, formando assim, a camada de passivação da nanopartícula. Adicionalmente, estes agentes estabilizantes possuem normalmente um grupamento carboxílico ou amina, que podem ainda atuar como funcionalizantes, permitindo a ligação com outras biomoléculas, como proteínas e lipídeos (SHAVEL; GAPONIK; EYCHMÜLLER, 2006; ROGACH et al., 2007).

Figura 6 - Fórmulas das estruturas químicas dos principais agentes estabilizantes utilizados para obtenção de PQs: (A) ácido mercaptopropiônico (AMP), (B) L-cisteína (CYS) e (C) ácido mercaptosuccínico (AMS).



Fonte: Adaptada de CABRAL FILHO, 2013.

Pontos quânticos são tidos como sondas promissoras para dispositivos químicos/biológicos, diagnóstico e compreensão de processos biológicos. Por exemplo, Geng et al. (2016) utilizaram PQs-hemina como modelos de sondas fluorescentes na detecção da absorção do grupo heme, pelas células Caco-2 (adenocarcinoma). Cabral Filho et al. (2016) demonstraram que PQs de CdTe conjugados a transferrina permitiram uma melhor compreensão do tráfego dos receptores dessa proteína presentes na superfície celular em glioblastomas, através da incubação de PQs com as linhagens celulares U87 (glioblastoma) e DBTRG-05MG (glioblastoma recorrente). O principal obstáculo para o êxito dessas aplicações

é o controle da sua possível toxicidade, que pode depender, por exemplo, do tamanho, da composição e principalmente da química da superfície desses nanocristais (BEARD et al., 2009).

3.2 Toxicidade relacionada aos PQs

Conforme as suas propriedades ópticas já mencionadas, os PQs estão sendo extensivamente explorados em diversos campos da biologia em experimentos *in vitro* e *in vivo*, e no campo dos dispositivos eletrônicos, sendo portanto expostos a diversos grupos de seres vivos e ao meio ambiente, assim é importante investigar a biocompatibilidade dessas nanopartículas. Até agora, pouco se sabe sobre os efeitos nocivos da introdução de alguns metais sob a forma de nanopartículas e as consequências para os ecossistemas naturais, bem como a sua interação, bioacumulação ou transferência em cadeias alimentares, uma vez que com sua popularização também vão precisar ser descartados (KIRCHNER et al., 2005; JACKSON et al., 2012; MA; LIN, 2013; YONG et al., 2013; ZENG et al., 2014).

Algumas características que geralmente são associadas com a toxicidade dos PQs são: (1) o tamanho da nanopartícula, (2) o revestimento de sua superfície, (3) a sua interação biológica, associada à liberação de íons (4) a produção de espécies reativas de oxigênio e (5) até mesmo o tipo de sistema biológico envolvido no estudo (ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012; LOVE et al., 2012).

Com os diferentes tipos existentes de PQs, as diferentes vias sintéticas, diferentes formas de concentrações de NPs aplicadas, além das diversas linhagens celulares e/ou sistemas *in vivo* que são testados, tais como ratos, peixes, moluscos, torna-se bastante complicado padronizar de fato a real toxicidade desses nanomateriais.

3.2.1 Tamanho

O tamanho e a morfologia das nanopartículas são fatores importantes que, provavelmente, regulam as interações nano-biológicas. Pontos quânticos menores podem ter uma velocidade de adsorção mais rápida do que as nanopartículas maiores (ZHANG; RITTMANN; CHEN, 2011). Devido ao tamanho pequeno das nanopartículas, elas podem ser transportadas pelo sangue e ir em direção a vários órgãos e tecidos, tais como fígado e baço, podendo entrar nos órgãos por meio da absorção pelas membranas celulares, dependendo do tamanho das NPs, ou serem endocitadas por células, como os macrófagos (WANG et al., 2013).

PQs de CdTe catiônicos de tamanho 5,7 nm foram localizados em todo o citoplasma de células N9 (linhagem de células da microglia), mas não no núcleo, em contraste, aos PQs de 2,3 nm foram observados predominantemente no compartimento nuclear. Após 1 h de exposição foi possível observar que as células começaram a mudar sua morfologia, exibindo núcleos picnóticos (em processo de apoptose). Assim, neste exemplo, o tamanho, e não a carga, foi um fator determinante na localização subcelular (LOVRIĆ et al., 2005a).

Em estudos sistemáticos com camundongos, observou-se que os PQs de CdSe/ZnS revestidos com Cys (cisteína) e com menores diâmetros hidrodinâmicos² (HD = 4,36 nm) foram eliminados de maneira mais rápida e eficaz, através do processo de depuração renal, do que os PQs de diâmetros hidrodinâmicos maiores (HD = 8,65 nm), que não foram encontrados na bexiga, mas ficaram presos no fígado, pulmão e baço (CHOI et al., 2007).

A parede celular de microrganismos, como as algas, é o principal meio de interação com PQs, porém como o tamanho dos poros na parede é em média de 5-20 nm de diâmetro, esta acaba atuando como uma barreira impedindo a absorção dos PQs, pois apesar de apresentarem diâmetros entre 2-10 nm, possuem também a capacidade em se agregar em meio aquoso (podendo chegar a HD > 50 nm) (ROCHA et al., 2017).

3.2.2 Superfície

PQs catiônicos hidrofílicos (positivamente carregados), ou hidrofóbicos, podem em geral causar maior toxicidade celular do que os PQs aniônicos (negativamente carregados) e hidrofílicos. A toxicidade dos PQs catiônicos pode ser atribuída às interações de cargas, uma vez que as membranas celulares são negativas e essas NPs são positivas, o que pode levar até a desestabilização da membrana, porém essa toxicidade pode ser reduzida com a adição de polietilenoglicol (PEG) na superfície dos PQs, tornando-os mais biocompatíveis (HARDMAN, 2006; TAN et al., 2010; ZENG et al., 2014).

No entanto, alguns estudos sugerem que PQs, mesmo revestidos, podem afetar o crescimento e viabilidade celular. PQs de CdSe/ZnS com núcleo hidrofóbico revestido com n-polietilenoglicol fosfatidiletanolamina (PEG-PE) resultou em anormalidades celulares (viabilidade, motilidade) quando injetados em blastômeros de embriões de *Xenopus* em

² O tamanho físico dos pontos quânticos é determinado pelo raio-X ou por microscopia eletrônica, já o diâmetro hidrodinâmico é medido pelo DLS (Dynamic light Scattering - Dispersão de luz dinâmica) e inclui as cargas de superfície.

concentrações de 5×10^9 PQs/célula, enquanto que as células injetadas com 2×10^9 PQs/célula exibiu um fenótipo normal e estatisticamente semelhante aos embriões não injetados (DUBERTRET et al., 2002), indicando também o papel da concentração dessas NPs.

Em outro estudo, Hoshino et al. (2004) avaliaram a toxicidade em células de linfoblastoma (WTK-1) com 12 h de tratamento através do ensaio do cometa. Para o primeiro grupo foi utilizada a concentração de 4 μ M de PQs estabilizados com cisteamina e para o segundo grupo foi aplicada uma concentração de 2 μ M de PQs estabilizados com ácido mercaptoundecanóico (AMU), este por sua vez, tratado também por 2 h. Os autores observaram que os PQs com cisteamina apresentaram-se sendo fracamente genotóxicos após as 12 h de tratamento. Enquanto que PQs/AMU, mostraram maior genotoxicidade, com aumento significativo no comprimento da cauda dos cometas, ao serem tratados por 2 h, e logo após o tratamento de 12 h eles não visualizaram danos ao DNA, supondo assim o reparo celular.

Lovrić et al. (2005a) avaliaram a toxicidade de PQs de CdTe carboxilados estabilizados com AMP (negativamente carregado) e cisteamina (positivamente carregado) e observaram que eles eram citotóxicos para células de feocromocitoma de rato em culturas em concentrações de 10 μ g/mL, e os PQs de CdTe não revestidos (sem a presença de estabilizantes) foram citotóxicos a 1 μ g/mL, e não houve diferença em relação a carga. Galeone et al. (2012) trataram *Drosophila melanogaster* com PQs de CdTe/ZnS revestidos com AMU e também com PC-PQ-PEG (polímero anidrido maleico octadeceno e PEG) a uma concentração de 130 nM, e eles observaram que com AMU houve uma queda no tempo de vida dos insetos, cerca de 58%, enquanto que com PC-PQ-PEG foi de apenas 18% de mortalidade. Assim, estudos como esses mostram a falta de consenso que ainda existe sobre a toxicidade de PQs.

3.2.3 Interação biológica - Liberação de íons

Os nanomateriais podem entrar na corrente sanguínea após inalação, injeção, ingestão, ou exposição dérmica, circulando rapidamente dentro do corpo e podendo ser absorvidas por células de órgãos e tecidos (WANG et al., 2013). A maioria das pesquisas, nesta área de estudo, conclui que a via de endocitose constitui o principal processo do transporte final de PQs ao interior das células. Quando armazenadas no interior das células, as NPs podem causar efeitos prejudiciais, mesmo que sejam absolutamente inertes e que não sejam degradadas ou não reajam (JORDAN et al., 1999; LAM et al., 2004; KIRCHNER et al., 2005).

As nanopartículas, tais como os PQs, podem ser excretadas do corpo através da urina ou fezes. Porém, os PQs podem acabar não sendo totalmente excretados do organismo, ficando retidos nas células, órgãos e tecidos, por exemplo, no interior do trato digestivo, impedindo as trocas normais (absorção de nutrientes), resultando na perturbação das funções dos órgãos ou tecidos, e consequentemente, podem induzir a toxicidade crônica do órgão (metabólica, imunotóxica ou até mesmo a genotóxica) (GEYS et al., 2009; LI et al., 2014; BOUR et al., 2015; CABALLERO-DÍAZ; CASES, 2016).

PQs de CdTe hidrofílicos podem chegar a ultrapassar a barreira biológica e entrar no sistema circulatório dos animais, como já foi demonstrado no inseto *Drosophila*, devidamente facilitado por possuir o sistema circulatório aberto, assim como os moluscos, o que pode promover a ocorrência de danos às células, levando a formação de ROS (espécies reativas de oxigênio) e induzindo a morte celular (REY, 2001; PESSÔA; MARTINS, 2011; GALEONE et al., 2012; LIU et al., 2014).

Ma-Hock et al. (2012) investigaram a toxicidade por inalação de um aerossol líquido composto por PQs de CdS/Cd(OH)₂ em ratos e constataram que após a inalação durante 6 h por 5 dias consecutivos o cádmio foi detectado nos pulmões, fígado, rins e fezes, mas não na urina. E que os PQs que se sedimentaram nos brônquios poderiam passar para faringe, e acabar entrando no trato gastrointestinal, o que explicaria a excreção de Cd²⁺ nas fezes. Após 3 semanas de exposição, os pulmões ainda apresentavam sinais de Cd²⁺, o que foi definido como pertencente ao PQ, uma vez que cádmio livre não perduraria por tanto tempo. Os resultados deste estudo indicam que existe pouca eliminação de PQs depois que eles se tornam acessíveis no organismo, apesar de não terem sido observados sinais de toxicidade durante o período de exposição em nenhum dos animais em estudo.

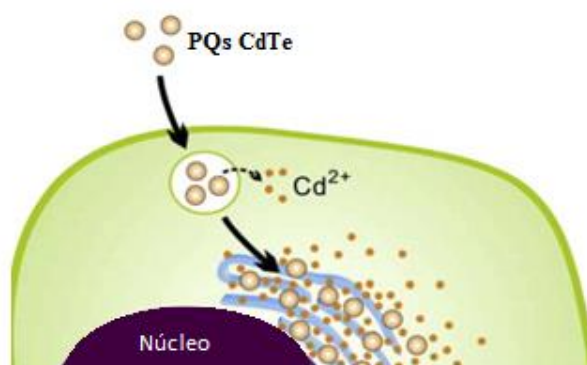
Peixes adultos da espécie *Fundulus heteroclitus* foram alimentados com dieta rica em PQs CdSe/ZnS (10 µg/dia) e CdCl₂ (5,9 µg/dia) ambos durante 85 dias. Apesar da dieta de PQs conter mais cádmio que na dieta de CdCl₂, foi encontrada uma concentração menor de cádmio no intestino e no fígado dos peixes alimentados com a primeira dieta, aproximadamente 180 e 130 vezes menor do que os peixes que receberam a dieta com Cd²⁺ livre, respectivamente (BLICKLEY et al., 2014).

Mexilhões *Mytilus galloprovincialis*, após a ingestão de PQs de CdTe a uma concentração de 10 µg/L (6 nm) após 14 dias, apresentaram concentração de Cd²⁺ em seus tecidos referente

aos PQs (brânquias = 35 vezes; glândula digestiva = 55 vezes) e Cd^{2+} dissolvido (brânquias = 84 vezes; glândula digestiva = 135 vezes) quando comparado com o grupo não exposto. Um acúmulo maior pelas células da glândula digestiva, que ocorreu através do mecanismo de endocitose, corrobora com a função desta glândula em armazenar e desintoxicar ambas as formas de Cd^{2+} nos organismos (ROCHA et al., 2015a).

A liberação de íons é bastante relatada como um dos principais aspectos de toxicidade relacionada aos PQs, principalmente o íon cádmio (Cd^{2+}), alguns pontos quânticos ao serem endocitados pelas células, sofrem dissolução e liberam Cd^{2+} a partir das partículas, que acabam se alojando no retículo endoplasmático (Figura 7) (CHEN et al., 2012; MORELLI et al., 2012; TANG et al., 2013; ROCHA et al., 2015c).

Figura 7 - Ilustração esquemática da citotoxicidade induzida por PQs à base de cádmio (Cd^{2+}). As nanopartículas de PQs de CdTe são transportadas através da membrana celular para o interior da célula, enquanto que os íons de Cd^{2+} que compõem os PQs são liberados no citoplasma e se acumulam no retículo endoplasmático.



Fonte: CHEN et al., 2012.

O cádmio é um metal não-essencial, que pode alterar as vias metabólicas, danificar as células, tecidos e órgãos, romper as cadeias de DNA e inibir a síntese de biomoléculas, classificado como uma substância carcinogênica humana pela Agência Internacional de Investigação sobre o Câncer (*International Agency for Research on Cancer*, IARC) (IARC, 1993; BAE; LIM, 2012; LI et al., 2014; FILIMONOVA et al., 2016).

3.2.4 Produção de ROS (espécies reativas de oxigênio)

De acordo com Yan; Gu; Zhao (2013), pode também ocorrer a produção de ROS mediada por nanomateriais, tais como os PQs. Devido ao tamanho dos nanomateriais, sua área de superfície é elevada fazendo com que esses materiais se tornem altamente reativos. Em especial,

como os PQs são fluorescentes, ao serem ativados pela luz, pode ocorrer uma maior produção de ROS por mecanismos do tipo I e tipo II. No mecanismo tipo I pode haver transferências de elétrons para moléculas que contêm oxigênio, levando à produção de superóxido, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio, por exemplo. Já no mecanismo tipo II pode acontecer também a transferência de energia para o oxigênio molecular presente no meio, gerando assim a sua forma tóxica, o oxigênio singlete.

A formação de ROS por sua vez pode contribuir para a inflamação de células, resultando na desregulação de suas funções fisiológicas normais, além de outros danos oxidativos, tais como a peroxidação lipídica e genotoxicidade (danos ao DNA) (WILLARD; VAN ORDEN, 2003; LOVRIĆ et al., 2005b; GAGNÉ et al., 2008; FU et al., 2014). Devido à exposição a ROS pode ocorrer o aumento nos níveis de cálcio intracelular, desse modo a interferência através de PQs nos sinais de cálcio também pode ser um possível mecanismo de toxicidade, uma vez que a alteração na quantidade de cálcio intracelular pode prejudicar diversas funções no organismo, por exemplo, desregular a função mitocondrial, causar danos a cromatina, e pode também ocasionalmente acarretar a morte da célula (WANG; JOSEPH, 2000; MACREZ; MIRONNEAU, 2004; LIU et al., 2014).

Lovrić et al. (2005b) analisaram células de câncer de mama (MCF-7) incubadas com os PQs CdTe revestido com AMP - ácido mercaptopropiônico (10 µg/mL) e verificaram a produção de ROS após 4 h de incubação, mesmo sem ativação direta da luz, provavelmente devido à exposição mínima à luz visível durante a preparação do experimento. Em 24 h, as mitocôndrias estavam agregadas à região perinuclear das células incubadas com PQs CdTe, enquanto que as células do controle mostravam a viabilidade celular normal. Um estudo com *Daphnia magna* expostas a PQs de CdSe/ZnSe revestido com óxido de tri-n-octilfosfina/goma arábica (GA), e irradiado com UV-B, verificou-se um aumento significativo para a geração de ROS ($p < 0,01$) a uma concentração de 30 µg/L, durante 24 h (KIM et al., 2010).

Um estudo com *Drosophila melanogaster* demonstrou que PQs de CdTe/ZnS induziram a liberação de íons de cádmio a partir do ambiente lisossomal aumentando assim os níveis de ROS, reduzindo então a capacidade hematopoiética (GALEONE et al., 2012). Em outro estudo feito com PQs de CdSe/ZnS a uma concentração de 0,5 a 2,5 nM, exposição durante 4 dias, observou-se um aumento dose-dependência na produção de ROS em células de *Phaeodactylum tricornutum*, mas o mesmo não ocorreu nas células de *Dunaliella tertiolecta*. Na concentração

máxima, o nível de ROS em *P. tricornutum* foi de aproximadamente três vezes maior do que no controle negativo (MORELLI et al., 2013).

3.3 Bioindicadores aquáticos

As nanopartículas não são uma invenção da humanidade, existem naturalmente desde o início da história da Terra, como por exemplo, poeira vulcânica, minerais de erosões no solo, nanopartículas de carbono encontradas em núcleos de gelo, entre outras. Levando em consideração as diversas formas dos nanomateriais naturais presentes no ambiente, e dentro das estruturas biológicas de organismos, supõe-se que os organismos evoluíram e se adaptaram a viver com esses materiais. Porém, a questão ainda é até que ponto os organismos estão adaptados às nanopartículas naturais, e se a forma de exposição, a dose e a velocidade com que essas nanopartículas chegam aos organismos, iram mudar as condições de habitat da fauna e da diversidade ambiental (LEAD; WILKINSON, 2006; HANDY; OWEN; VALSAMI-JONES, 2008).

Biomonitoração consiste na teoria em que os organismos são os indicadores da saúde do ambiente que estão inseridos (USEPA, 2002). A utilização de bioindicadores permite detectar os impactos acumulativos de agentes físicos e químicos (radiação, temperatura, pH, nutrientes dissolvidos, etc) que são antagônicos às atividades de um sistema natural (CALLISTO; GONÇALVES JR; MORENO, 2005; BIRK et al., 2012; MEHARI et al., 2014).

Os bioindicadores são espécies, grupos de espécies ou comunidades biológicas as quais estão em grande quantidade e distribuição, indicando "sinais de alerta" do desequilíbrio ambiental em um ecossistema (CALLISTO; GONÇALVES, 2002; WU; SIU; SHIN, 2005; GALLOWAY, 2006). De acordo com Rosenberg e Resh (1993), um bioindicador “ideal” deve possuir características como: (1) ser sensível aos diferentes impactos de maneira gradual e em função da intensidade e magnitude; (2) ser abundante na maioria dos ecossistemas aquáticos; (3) ser de fácil amostragem e apresentar reduzido custo de processamento; (4) possuir ciclo de vida curto e responder espaço-temporalmente aos impactos; (5) ser de fácil identificação; (6) ser relativamente sedentário e de ampla distribuição e (7) ter possibilidade de uso em estudos ecotoxicológicos.

Os organismos aquáticos são geralmente expostos a numerosos contaminantes químicos, dentre eles, os metais essenciais ou não-essenciais, esses últimos em geral são tóxicos para os

organismos aquáticos, e a bioacumulação dos mesmos pode causar efeitos adversos ao longo prazo. Os efeitos conjugados da bioacumulação e da toxicidade aguda podem levar a mudanças dos ecossistemas aquáticos (CAREW et al., 2007; JOHNSON et al., 2011; STEPHANSEN et al., 2016; FILIMONOVA et al., 2016).

A compreensão das propriedades físicas, químicas e ecotoxicológicas das nanopartículas em sistemas aquáticos são importantes, a fim de proteger os consumidores primários e secundários em cadeias alimentares dos seus efeitos nocivos, adequando da melhor maneira o destino biológico destas quando eliminadas no meio ambiente (JACKSON et al., 2012). Atualmente a utilização de invertebrados aquáticos têm se destacado como organismos teste para ecotoxicidade das nanopartículas (TiO₂, ZnO, CdTe, etc.) (BAUN et al., 2008; ZHANG et al., 2012; TANG et al., 2013).

Os invertebrados representam cerca de 95% das espécies de animais, possuem um importante papel ecológico, e representam um grande potencial em transferência de partículas e nanopartículas através das cadeias alimentares (BAUN et al., 2008). Entre os invertebrados, os moluscos são essenciais na sustentabilidade de muitos ecossistemas, e são por sua vez considerados bons indicadores da saúde do ecossistema, por serem principalmente muito sensíveis às mudanças do ambiente, alertando então na deterioração dos habitats (WELLS; CHATFIELD, 1992; TALLARICO, 2015).

3.3.1 Modelos ecotoxicológicos

Visto que estas nanopartículas podem ser descartadas, direta ou indiretamente, no ambiente aquático, é necessário a compreensão ecotoxicológica dessas NPs em ecossistemas naturais e seus efeitos sobre organismos, em diferentes níveis tróficos. A toxicidade de PQs tem sido bastante estudada em vários modelos biológicos, tais como células, camundongos, ratos, peixes e até mesmo primatas (YOUNG et al., 2009; KING-HEIDEN et al., 2009; HAUCK et al., 2010; YE et al., 2012). Se os PQs estiverem no sistema aquático, por exemplo, eles podem interagir com diversos organismos, promovendo efeitos tóxicos e desregulando o metabolismo das células em diferentes níveis, dependendo da concentração e do tempo de exposição (GIRARDELLO et al., 2016). Os possíveis efeitos genotóxicos e cancerígenos de metais, por exemplo, o do íon Cd²⁺, para organismos aquáticos têm sido relatados pela Agência de Proteção Ambiental dos EUA (U.S. *Environmental Protection Agency*) (USEPA, 1999). Estudos com *Daphnia magna* tem mostrado grande sensibilidade às suspensões de PQs de CdSe/ZnS. Alguns autores demonstraram que a toxicidade dos PQs em dafinídeos pode estar relacionada com a

sua absorção e acumulação no trato digestivo, devido a interações entre o lúmen do intestino e os grupos carboxílicos funcionais dos PQs (LEWINSKI et al., 2010; FESWICK et al., 2013).

Estudos em embriões de peixe-zebra relataram que o PQs de CdTe induziram malformações, incluindo edema no pericárdico e cisto vitelino (ZHANG et al., 2012; DUAN et al., 2013). Estudo em mexilhões marinhos, *Mytilus galloprovincialis*, expostos a PQs de CdTe demonstraram o acúmulo de cádmio na glândula digestiva do *Mytilus* e a retenção de agregados de PQs no lúmen do sistema digestivo, o que pode facilitar a sua digestão e absorção, bem como a liberação de íons de Cd^{2+} livres no sistema digestivo (ROCHA et al., 2015b).

Morelli et al. (2013) avaliaram a toxicidade de PQs de CdSe/ZnS (concentrações de 0,5 a 2,5 nM) em *Dunaliella tertiolecta* e *Phaeodactylum tricornutum*, em exposição durante 4 dias em meio de cultura, e observaram que de 1 a 2,5 nM a taxa de crescimento de *P. tricornutum* diminuiu progressivamente, tendo uma inibição de 50%. Ao contrário da alga *D. tertiolecta*, que apresentou um efeito estimulador de crescimento (em torno de 16%), entre 1 e 2,0 nM. Nenhum efeito nos parâmetros indicando estresse oxidativo foi observado para essa última alga. No entanto, um aumento da taxa de crescimento pode ser considerada uma resposta adaptativa e de compensação do sistema biológico e portanto um sinal de estresse celular (CALABRESE; IAVICOLI; CALABRESE, 2012).

Na detecção dos danos ocasionados nos sistemas biológicos, a ecotoxicologia faz uso de inúmeras metodologias, tais como: teste do micronúcleo, teste do cometa, letal dominante e troca de cromátides irmãs (BICKHAM et al., 2000). Apesar da grande quantidade dos gastrópodes estarem presentes em habitats de água doce, ainda é pequena a sua utilização em estudos ecotoxicológicos, porém dados descritos na literatura evidenciam o potencial desses organismos na avaliação dos danos ambientais, referentes a diversas substâncias orgânicas e inorgânicas, tais como pesticidas, (ESTEVAN, 2006; SILVA et al., 2008). Dentre estes, o *Biomphalaria glabrata* vem se destacando, devido as suas características intrínsecas, tais como curto ciclo de vida, fácil reprodução e ampla distribuição geográfica.

3.4 Moluscos

Pertencem ao reino Animallia, filo Mollusca, classe Gastropoda, subclasse Pulmonata, ordem Basommatophora, família Planorbidae e gênero *Biomphalaria* (REY, 2001).

Algumas das principais características dos gastrópodes, que compõem a maior classe do filo, são: (1) presença de rádula (dentes quitinosos móveis dispostos em séries), (2) cavidade do manto: onde ocorrem a circulação, a respiração, a excreção e a reprodução, (3) sistema circulatório aberto; respiração branquial, pulmonar ou tegumentar, (4) tubo digestivo completo, isto é, com boca e ânus, além de glândulas anexas, (5) sistema nervoso ganglionar, (6) concha: geralmente univalva e espiralada, (7) reprodução: hermafroditas ou dioicos, (8) habitats: marinhos, límnicos (água doce) e terrestres (AMARAL; THIENGO; PIERI, 2008).

A espécie *Biomphalaria glabrata* é o maior molusco da família Planorbidae, e vem desatacando-se como modelo de estudo perante os agentes físicos (NEVES, 2005; CANTINHA et al., 2010; CANTINHA et al., 2013; SILVA et al., 2013) e químicos (FERREIRA et al., 2005; ANSALDO et al., 2006; ANSALDO et al., 2009; KRISTOFF; GERRERO; COCHÓN 2010), devido a sua ampla distribuição geográfica, curto ciclo de vida, alta sensibilidade, facilidade na coleta e manutenção, acomodação às condições laboratoriais e por se reproduzirem o ano inteiro (NAKANO et al., 2003; TALLARICO et al., 2004; ESTEVAM et al., 2006; CANTINHA, 2008).

3.4.1 *Biomphalaria glabrata*

Habitantes preferencialmente das coleções de águas doces com temperatura entre 20 a 30 °C, com pH de 6,8 a 7,8, boa insolação, ricas em matéria orgânica e vegetação enraizada ou flutuante (REY, 2001). Em geral são encontrados em pequenas coleções de água com velocidade inferior a 30 cm/s, podendo ocorrer também em pântanos, córregos, lagoas, reservatórios ou coleções artificiais (pequenos açudes, caixas d'água etc.) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Sua alimentação é baseada em folhas e algas; possuem vida média de aproximadamente um ano, podendo refletir as mudanças ambientais rapidamente através de mudanças na composição da sua comunidade, em condições laboratoriais podem atingir um pouco mais de tempo; atingem a maturidade sexual por volta de um mês após a eclosão; ocupam pouco espaço físico com baixo custo de manutenção laboratorial; e possuem grande sensibilidade a poluentes (REY, 2001; NEVES, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

3.4.2 Características anatômicas

Cor natural da concha é amarelo-palha, mas quando em contato com substâncias corantes dissolvidas na água dos criadouros pode se modificar, como o óxido de ferro, que confere às

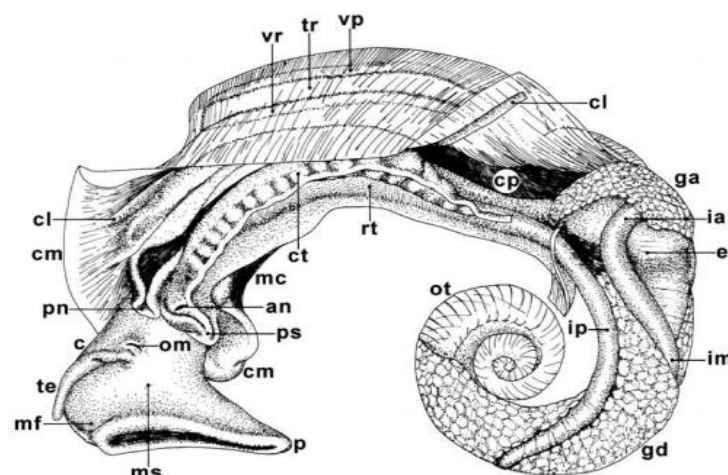
conchas coloração mais escura, passando por vários tons de marrom até o negro (Figura 8) (AMARAL; THIENGO; PIERI, 2008; REY, 2008; CANTINHA, 2012). Os caramujos adultos apresentam um diâmetro de concha que varia de 10 a 40 mm; de 5 mm a 8 mm de largura e cerca de 6 a 7 giros, as paredes laterais dos giros são arredondadas, com a função de proteção, mineralizada, com presença de mais de 95% de carbonato de cálcio, além disto, a concha é o abrigo do corpo do molusco, encontrando-se as vísceras envolvidas pelo manto (Figura 9) (AMARAL; THIENGO; PIERI, 2008).

Figura 8 - Molusco *Biomphalaria glabrata*, concha 10 a 14 mm.



Fonte: AUTORA.

Figura 9 - Imagem de um animal do gênero *Biomphalaria* retirado da concha, para a visualização dos órgãos internos. Massa cefalopodal (ms), cavidade pulmonar (cp), mufla (mf), tentáculo (te), colo (c), abertura genital masculina (om), colar ou borda do manto (cm), pseudobrânquia (ps), pneumóstoma (pn), abertura anal (an), músculo columelar (mc), crista lateral (cl), crista retal (ct), veia renal (vr), veia pulmonar (vp), tubo renal (tr), reto (rt), glândula do albúmen (ga), intestino anterior (ia), intestino médio (im), intestino posterior (ip), estômago (et), glândula digestiva (gd), pé (p), ovoteste (ot).



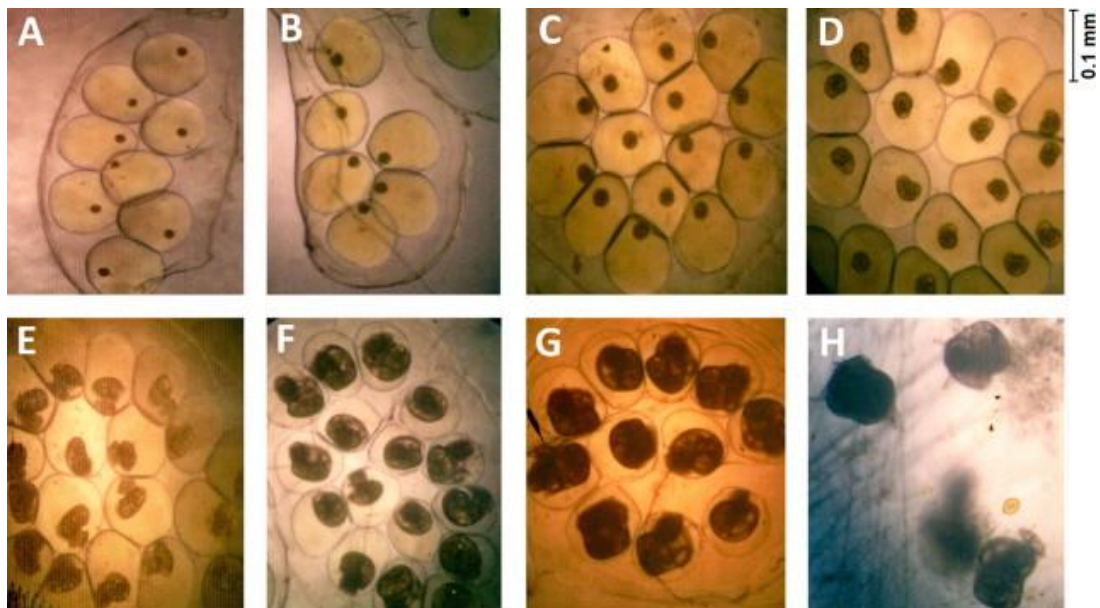
Fonte: PARAENSE, 1975.

Esses moluscos são hermafroditas, podendo realizar a autofecundação ou a fecundação cruzada, e possuem gônada em forma de cacho, o ovoteste, no qual os óvulos e espermatozóides

são produzidos lado a lado. O ovoteste composto por vários folículos, onde cada unidade corresponde a produção de gametas femininos e masculinos. Por viverem em colônias, esses moluscos optam pela fecundação cruzada, o que propicia uma maior variabilidade genética e realizando a autofecundação em circunstâncias críticas (NEVES, 2005; CANTINHA, 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

Nos moluscos, em geral, a maturação do ovo acontece independentemente da fertilização, e continua até a metáfase da primeira divisão meiótica de maturação, permanece nesse estágio até a penetração do espermatozóide; ovos que não foram fertilizados ficam bloqueados nesse estágio, após a ovoposição da desova, o ovo maduro tem 100 µm de diâmetro (Figura 10). (KAWANO; NAKANO; WATANABE, 2008). Além disso, fase embrionária dos moluscos em geral, demonstram alta eficiência na sensibilidade para uma vasta gama de poluentes (USEPA, 2003).

Figura 10 – Ciclo embrionário do *B. glabrata*. (A) Blástula, (B) Gástrula, (C) Trocófora Jovem, (D) Trocófora, (E) Véliger Jovem, (F) Véliger, (G) *Hipo stage* e (H) animais eclodidos.



Fonte: ALBUQUERQUE et al., 2014.

O trato digestivo desses animais consiste em uma boca, cavidade bucal, esôfago, estômago, intestino, reto e ânus (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005). A rádula, órgão de alimentação altamente desenvolvido, usada para ralar e cortar os alimentos, encontra-se no interior da cavidade bucal (REY, 2001; CANTINHA, 2008; PARAENSE, 2008). As glândulas salivares secretam muco, que misturam-se ao alimento ingerido pelo animal, e por ação de cílios são direcionados ao esôfago e estômago. Órgão que por sua vez, se comunica com a glândula

digestiva, onde são produzidas as enzimas digestivas, encarregadas da digestão extracelular, ocorre também a absorção dos nutrientes, reserva e excreção (MOORE, 2003; RUPPERT; FOX; BARNES, 2005; REY, 2008). Ansaldo et al. (2006) apontam a glândula digestiva como sendo o depósito final de certos poluentes do meio ambiente, como os metais. Logo em seguida vem, o intestino e o ânus que participam na reabsorção da água e evacuação dos resíduos, respectivamente (RUPPERT; FOX; BARNES, 2005; REY, 2008).

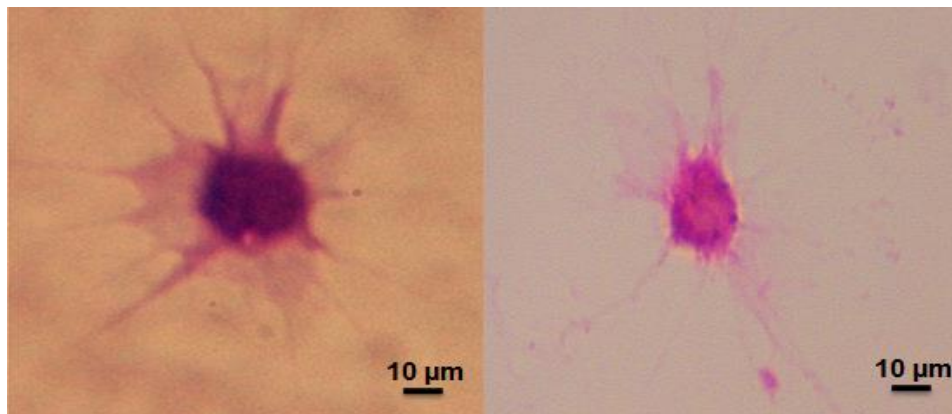
Os moluscos pertencentes ao gênero *Biomphalaria*, possuem na região entre o pericárdio e o epitélio posterior da cavidade do manto, uma estrutura que é considerada como o órgão principal para hematopoiese. Segundo alguns autores, este seria o órgão responsável pela produção de células circulantes, denominadas de hemócitos ou amebócitos. Tais células, após sua formação, podem ser encontradas tanto na hemolinfa quanto nos espaços intersticiais (SALAMAT; SULLIVAN, 2009).

Como o sistema circulatório é aberto, os hemócitos (constituídos por dois tipos celulares, os granulócitos e hialinócitos), que são as principais células efetoras do sistema de defesa do caramujo, se movem espontaneamente por entre os vasos, banhando os tecidos, retornando posteriormente ao coração. O plasma é rico em água, cloreto de sódio, bicarbonatos e hemoglobina contendo ferro dissolvido, o que permite a utilização do oxigênio à baixa tensão. A hemoglobina constitui 97% das proteínas totais presentes na hemolinfa (KNAAP; LOKER, 1990; BUGGE; WEBER, 1999; REY, 2001; PESSÔA; MARTINS, 2011). Diferentemente de outros invertebrados, a hemolinfa dos moluscos não apresenta grande capacidade de coagulação (IWANAGA, 1993). De acordo com Pan (1965), comparável a um tecido linfoide, a hemolinfa se torna frequentemente hiperativa durante as cinco primeiras semanas de infecção, mas comumente os elementos celulares se tornam escassos no momento em que as respostas teciduais generalizadas aparecem.

As células hemocitárias apresentam um papel essencial no sistema de defesa dos moluscos, operando em atividades fagocitárias, encapsulação, liberação de substâncias citotóxicas e no transporte de cálcio no reparo tecidual (BAYNE; BUCKLEY; DEWAN, 1980; AMEN et al., 1992). Os granulócitos (Figura 11) possuem muitos pseudópodes, têm em média 7-11 µm de diâmetro, similares na aparência, em sua forma com os macrófagos dos animais vertebrados, são responsáveis pela fagocitose e a imobilização de parasitas por encapsulamento. Os grânulos basofílicos distribuídos no citoplasma dessas células, são conhecidos como lisossomos (CHENG; GARRABRANT, 1977; RATCLIFFE et al., 1985; BARRACCO;

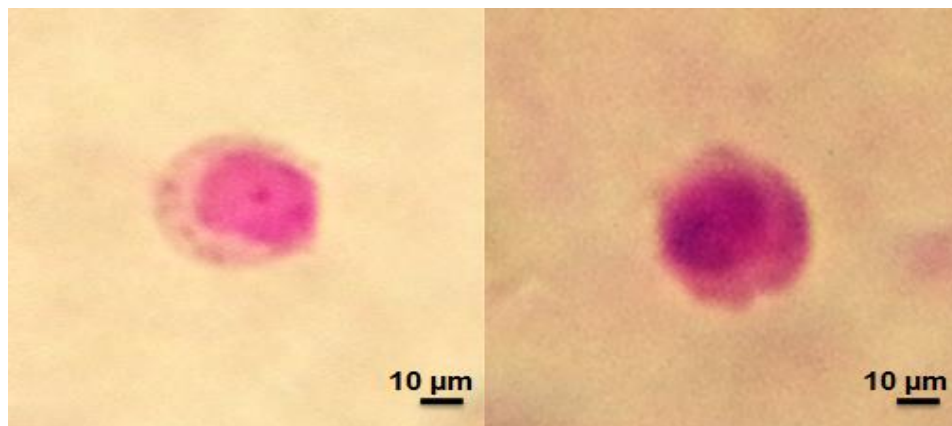
STEIL; GARGIONI, 1993; CAVALCANTI et al., 2012). Por sua vez, os hialinócitos (Figura 12), são menores (5-8 μm de diâmetro) do que os granulócitos, possuem um contorno circular quando em contato com superfícies, núcleo localizado numa posição central, pouca tendência para formar pseudópodes e estrutura lisossômica escassa. Não há um papel definido na defesa e há evidências de que eles reagem ao antígeno solúvel (CHENG; GARRABRANT, 1977; BARRACCO; STEIL; GARGIONI, 1993; CAVALCANTI et al., 2012).

Figura 11 – Células da hemolinfa: granulócito.



Fonte: AUTORA.

Figura 12 - Células da hemolinfa: hialinócito.



Fonte: AUTORA.

Os granulócitos e hialinócitos têm sido sugeridos como sendo de dois tipos celulares diferentes (SMINIA; VAN DER KNAAP; VAN ASSELT, 1983; LIE, 1987), embora alguns pesquisadores acreditem que estas células representam diferentes fases de desenvolvimento e que em condições apropriadas os hialinócitos podem tornar-se granulócitos (SETA; MAGALHÃES; CARVALHO, 1996; PAN, 1996).

Há cada vez mais ensaios biológicos com fins de avaliar os riscos subletais de poluentes ao ecossistema mesmo em baixas concentrações. O molusco *Biomphalaria glabrata* vem apresentando uma elevada sensibilidade, sugerindo ser uma espécie adequada para o monitoramento de água doce. Como Tallarico et al. (2014) que constataram a sensibilidade dos embriões na presença de amostras de água com cromo, avaliando a taxa de mortalidade e as malformações que induzem a inviabilidade do animal. Os aspectos mais relatados em estudos para detecção dos efeitos tóxicos de substâncias químicas em *Biomphalaria glabrata* são os testes de mortalidade (a taxa de sobrevivência dos moluscos diante da substância testada), a avaliação protéica, danos ao DNA e atividade ou inibição enzimática, além do acompanhamento do desenvolvimento no período embrionário (KRISTOFF et al., 2012; MONA et al., 2013; ESTEVAN, 2006; SILVA, 2008, SILVA, 2013).

3.5 Testes ecotoxicológicos

Quando um organismo está sob condições de estresse é possível estimar sua tentativa de reverter a agressão causada pelo agente xenobiótico por meio da avaliação comportamental e/ou biológica (biomarcadores). Em protocolos experimentais, os moluscos são utilizados tanto na fase embrionária quanto na fase adulta (MÜNZINGER, 1987; ALLEN; MOORE, 2004; BOLOGNESI; FENECH, 2012).

Os principais parâmetros observados após o efeitos da exposição de substâncias nocivas ao organismo biológico, tende avaliar crescimento, metabolismo reprodutivo, anomalias no processo embrio-larval, bem como mutações e até mesmo a morte do indivíduo (ou população) (SILVA, 2002). Os testes de toxicidade aguda são caracterizados pela curta duração da exposição, onde a letalidade (resposta severa e rápida) e a imobilização dos organismos jovens são os efeitos mais avaliados (ABEL, 1996; FIGUEIREDO, 2011).

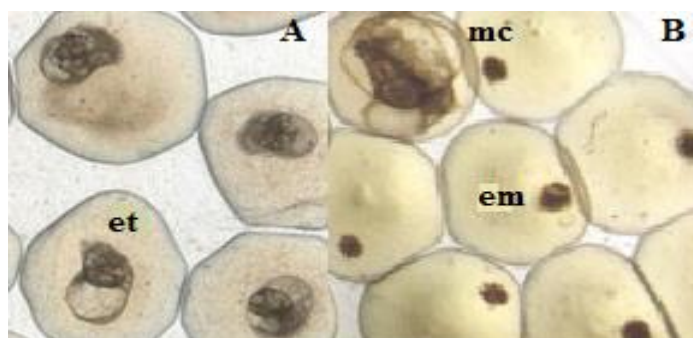
3.5.1 Alterações embriológicas

Programas de monitorização ambiental têm intensificado a análise dos potenciais perigos subletais para os ecossistemas aquáticos mesmo em baixas concentrações de poluentes, verificando os danos sobre gametas, fecundação, reprodução e desenvolvimento embrionário e larval (LLANOS-RIVERA et al., 2009). Mortalidade e malformações no desenvolvimento embrionário são empregadas como biomarcadores em testes de mutagenicidade, uma vez que são um dos efeitos da indução de mutações nas células germinativas (KAWANO; OKAZAKI; RÉ, 1992; NAKANO et al., 2003).

A fase de blástula, a primeira fase do ciclo embrionário, é também a que mais ocorre proliferações celulares, além do que, a massa que protege os ovos, por ser constituída de gelatina, pode não estar predominantemente igual ao redor do ovo, variando a sua proteção e facilitando assim a penetração de substâncias químicas (GOMOT, 1998; RAPADO et al, 2011; BANDOW; WELTJE, 2012).

As anormalidades durante o desenvolvimento embrionário (Figura 13) são classificadas de acordo com: (1) Embriões mortos; (2) Exogastrulação: aparecimento de vesículas, em que os embriões com estas anomalias não se desenvolvem e morrem em poucos dias; (3) Malformações inespecíficas, embriões teratomórficos e (4) malformação na concha ou rádula (GEILENKIRCHEN, 1966).

Figura 13 - Embriões de *Biomphalaria glabrata* com desenvolvimento anormal. (A) Embrião teratomórfico (et) e (B) embriões mortos (em) e malformação de concha (mc).



Fonte: Adaptada de TALLARICO et al., 2014.

3.5.2 Alterações Morfológicas

A hemolinfa é proposta como o tecido mais adequado para estudos de biomonitoramento, devido ao seu papel fisiológico no transporte de materiais tóxicos e em vários mecanismos de defesa, significando então que ela está diretamente em contato com contaminantes ambientais (MERSCH; BEAUVAIS; NAGEL, 1996). O ensaio do micronúcleo (MN), avalia indiretamente ambas as quebras cromossômicas e disfunções mitóticas, mostrando danos clastogênicos e aneugênicos, podendo ser utilizado como bioindicador de mutagenicidade, para análise a nível celular (VILLELA et al., 2006; ARIAS et al., 2007; SCHAUMBURG et al., 2012; ZAPATA et al., 2016).

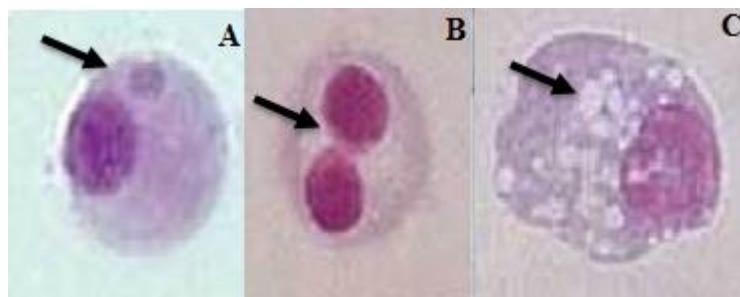
Os micronúcleos (Figura 14-A) são núcleos estruturalmente pequenos, que representam o material genético perdido pelo núcleo principal, como consequência de um dano genético que pode ser causado por agentes físicos, químicos ou biológicos, capazes de interferir no processo

de ligação do cromossomo às fibras do fuso ou que possam induzir a perda de material genético, como cromossomos inteiros ou fragmentos de cromossomos, e portanto eles não possuem um centrômero. Os fragmentos de DNA deixados para trás são incorporados dentro de núcleos secundários, e por serem muito menores que o núcleo principal da célula, recebem o nome de micronúcleos (HEDDLE et al., 1983; FENECH, 2000; VILLELA et al., 2006; SILVA, 2010).

Outro fenômeno relatado em estudos feitos com o ensaio do MN, são as células binucleadas ou binucleação (Figura 14-B), que podem ser formadas através de um processo de divisão celular incompleta, ou como um resultado da divisão mitótica atrasada. Relatos na literatura indicam o aparecimento de células binucleadas como decorrentes de agentes tóxicos e mutagênicos em vários tipos celulares. O aparecimento dessas alterações celulares serve como um bioindicador de ações antrópicas em uma variedade de organismos em diversos ecossistemas (RODILLA, 1993; SILVA et al., 2013).

Apoptose, morte celular programada (Figura 14-C), reconhecida morfologicamente como um fenômeno distinto de morte há mais de 30 anos por Kerr; Wyllie; Durrie (1972), geralmente encontradas após a exposição às substâncias que elevam o nível de estresse do organismo. Inclui a formação de vacúolos citoplasmáticos, encolhimento e diminuição do contato entre células vizinhas, fragmentação da membrana nuclear e condensação da cromatina (MCCONKEY, 1998; MELO et al., 2000). Sendo portanto, um importante mecanismo envolvido nas respostas adaptativas a estresses, estando envolvida no apuramento das células danificadas para manutenção da homeostase do organismo (ROMERO et al., 2011; ESTÉVEZ-CALVAR et al., 2013).

Figura 14 - Alterações celulares encontradas após o teste do micronúcleo. Hemócito com micronúcleo (A). Hemócito com Binucleação (B). Hemócito em apoptose (C).



Fonte: Adaptada de BOLOGNESI e FENECH, 2012.

4 MANUSCRITO A SER SUBMETIDO A ECOTOXICOLOGY AND ENVIRONMENTAL SAFETY

Studies on Toxicity of CdTe Quantum Dots Applying *Biomphalaria glabrata* Mollusks (SAY, 1818) as Bioindicators

Maíra de Vasconcelos Lima¹, Maria Isabela de Andrade Pereira¹, Paulo Euzébio Cabral Filho¹, Williams Nascimento de Siqueira^{1,2}, Beate Saegesser Santos³, Francisco Fernandes Amâncio¹, Ana Maria Mendonça de Albuquerque Melo¹ and Adriana Fontes¹.

¹ Departamento de Biofísica e Radiobiologia, UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

² Serviço de Monitoração Ambiental, CRCN-NE, Recife, Pernambuco, Brazil.

³ Departamento de Ciências Farmacêuticas, UFPE, Recife, Pernambuco, Brazil.

Abstract

Quantum Dots (QDs) have aroused a great interest due to their optical properties, both to life sciences and electronics applications. However, the possible risks to human and environmental health, when these nanoparticles are deposited in the aquatic environment, are still under discussion. The *Biomphalaria glabrata* mollusk has been applied as an aquatic environmental bioindicator for physical and chemical agents. Thus, the aim of this study was to evaluate the toxicity of CdTe QDs on embryos and adult mollusks of *B. glabrata* species. In order to define the main source of the toxic effects, tests with the stabilizing agent and the suspension supernatant were also carried out. Evaluations of embryotoxicity, acute toxicity in adults, and cytotoxicity in hemocytes were performed. Animals were exposed to CdTe QDs for 24 h at concentrations from 1.2 to 20 nM for embryos at blastulae phase, and at concentrations from 50 to 400 nM for adults. Results showed that QDs induced malformations and mortality in embryos, and mortality in adults, in a dose-dependent way. In addition, the frequency of apoptosis observed in hemocytes was statically different from control, also in a dose-dependent behaviour. Exposures to the stabilizing agent and the suspension supernatant did not change the embryo or adult survival rate, showing that the toxicity came from Cd²⁺ presented in nanocrystals composition. Thus, the present study demonstrates that *B. glabrata* is a sensitive bioindicator for assessing risk factors related to CdTe QDs in aquatic environments.

Key words: Quantum dots, CdTe, toxicity, *Biomphalaria glabrata*.

1. Introduction

The widespread use of nanomaterials in the electronic and/or in the biomedical field tends to introduce nanoparticles (NPs) into the waterways after their disposal, leading to major concerns about the possible impacts on human and environmental health (Jackson et al., 2012; Baker et al., 2014). NPs when released into aquatic systems may interact with organisms in this ecosystem and induce toxic effects at different levels of the biological organization (Rocha et al., 2015).

Quantum dots (QDs) are semiconductor fluorescent nanocrystals, with nanometer sizes from 2 to 10 nm, that have been widely applied in electronic materials and as fluorescent probes for biological investigation, due to their unique optical properties, specially their resistance to photobleaching (Yang et al., 2016; Pereira et al., 2016). Despite the numerous benefits, little is still known, or standardized, about the overall health risks associated with exposure to these nanomaterials. Taking into account that many types of QDs are composed by cadmium, there is a crescent interest in identifying the risks involved with these exposures. Much has been discussed regarding the release of Cd^{2+} as the main cause of QDs' toxicity, but other parameters such as size, surface modification, biological system under investigation, and others, can affect on the toxicity of these nanocrystals. Since there are no fully established and evaluated protocols yet, it makes this discussion extremely important.

Much emphasis has been placed on the importance of invertebrates to monitor the aquatic toxicity, since they represent about 95% of the animal species in this environment. Among aquatic invertebrates, the *Biomphalaria glabrata* mollusk has been revealed as a potential experimental model to perform this kind of study, since presents a short life cycle, easy reproduction and high sensitivity (Cantinha et al., 2010; Kristoff et al., 2010; Tallarico et al., 2014; Pila et al., 2016).

The study with bioindicators sensitive to chemical pollutants is of great value to evaluate the water quality. *B. glabrata* embryos can be considered a valuable developing system model of embryotoxicity, where embryogenic mortality and malformations suggest morphogenic effects caused by teratogenic substances (Camey; Verdonk, 1969; Kawano et al., 1992; Rapado et al., 2011; Tallarico et al., 2014). Moreover, the adult animal mortality and cytogenetic damages consist additional tools for early warning of environmental risk assessments, since physiological changes and chromosomal damage are the result of exposure to genotoxic pollutants (Schaumburg et al., 2012; Habib et al., 2016; Zapata et al., 2016). In this work we

evaluated the toxicity of CdTe QDs by using adult mollusks and embryos of *B. glabrata* as an environmental bioindicator.

2. Materials and methods

2.1 Synthesis and characterization of QDs

CdTe QDs were synthesized according to a method previously reported by Cabral Filho et al. (2016). QDs were prepared in two simultaneous steps: (1) metallic tellurium (Te^0 , Sigma-Aldrich) was reduced to telluride (Te^{2-}) using sodium borohydride (NaBH_4 , Sigma-Aldrich), at high pH adjusted with NaOH (2M), under inert nitrogen atmosphere and heating at 80 °C; and (2) a cadmium chloride solution (CdCl_2 , Sigma-Aldrich) in the presence of MSA (mercaptosuccinic acid – Sigma-Aldrich) as a stabilizing/functionalizing agent was prepared at pH > 10, also adjusted with NaOH (2M). Finally, the NaHTe solution obtained in the first step was added into the Cd^{2+} /MSA solution (prepared in the second step) and the reaction proceeded during 9 h under constant stirring and heating at 80 °C. The molar ratio was 5:1:6 of Cd:Te:MSA, respectively.

After the synthesis, QDs were optically characterized by absorption and emission spectroscopies, carried out on a spectrophotometer Shimadzu 1800 UV-VIS (Thermo Scientific) and on a spectrometer LS 55 (PerkinElmer). The emission spectrum was obtained at 365 nm excitation.

Before experiments, QDs suspension were purified with ultracentrifuge filters (10 KDa MWCO – Vivaspin 6, GE Healthcare), in order to remove excess of residues from the synthesis, in five centrifugation cycles ($525 \times g$ for 3 min) at 25 °C.

2.2 Bioassays

2.2.1 Maintenance of *Biomphalaria glabrata*

In this work, we used pigmented adult mollusks of *Biomphalaria glabrata* species, with two months old and a shell diameter between 10 – 14 mm, obtained from São Lourenço da Mata (Pernambuco state, Brazil). Animals, serologically *Schistosoma mansoni* negative, were created in the Radiobiology Laboratory at the Biophysics and Radiobiology Department at the Federal University of Pernambuco. Animals were maintained in a plastic aquarium with filtered

and dechlorinated water (exchanged once a week), in a pH = 7.0 at 25 °C ($\pm$ 3 °C), in light and dark cycle, and nourished by fresh lettuce (*Lactuca sativa*).

2.2.2 Embryotoxicity Assay

The embryotoxicity assay was performed according to the methodology described by Kawano et al. (1992). Groups, comprising approximately by 100 embryos each, were selected in the blastula stage and placed in 24 wells cell culture plates containing 2 mL of QDs suspension diluted in water. Embryos were exposed during 24 h to different QDs concentrations (1.2, 2.5, 5, 10 and 20 nM). After the exposure time, embryos were washed with filtered and dechlorinated water, then they were kept in a Petri plates (7 mL capacity) for 8 days.

In the analysis, the embryos were classified into unviable embryos (malformed or dead embryos) and live (viable) embryos (hatched embryos). The egg masses containing the embryos were analyzed by a stereomicroscope (Wild M3B, Heerbrugg, Switzerland). The negative control consisted of embryos exposed only to filtered and dechlorinated water and, the positive control compromised embryos exposed to niclosamide (3 μ M - Bayluscide Bayer), a molluscicide recommended by the World Health Organization (WHO). This molluscicide is used against vector mollusks, hosts of the *S. mansoni*, and acts on the respiratory system of these vectors, causing death by suffocation in early stages of the development. Assays were performed in triplicate for each QDs concentration.

In order to try to distinguish toxic effects came from the nanoparticles to other components of the suspension, the embryos were also evaluated using MSA (at 50% of the concentration used for the synthesis) and the suspension supernatant (SBS), in volumes of 2.5; 5; 10; 20 and 40 μ L, equivalent to that ones applied for the whole CdTe suspension. All experiments were performed at the same conditions used for embryos exposed to the full suspension.

2.2.3 Acute toxicity test in *Biomphalaria glabrata*

In the acute toxicity test, we used adult and sexually mature mollusks. For verification of sexual maturity, 150 mollusks with shell size between 10 - 14 mm, were placed in individual tanks with filtered and dechlorinated water (180 mL capacity). The mollusks selected for experiments produced only healthy embryos, 100% alive. After the pre-selection, 5 animals were separated by groups, specified as follows: (1) negative control; (2) positive control; (3)

QDs suspension at 50 nM; (4) QDs suspension at 100 nM; (5) QDs suspension at 200 nM, and (6) QDs suspension at 400 nM. Assays were performed in quintuplicate for each group.

The same procedures were repeated for adult animals also submitted to MSA (at 50% of the concentration used for the synthesis) and SBS, applying volumes of 200; 400 and 800 μ L.

Mollusks were incubated for a period of 24 h and subsequently washed with filtered and dechlorinated water to remove all suspension of QDs. After this time, mollusks were placed individually in containers (180 mL capacity) with filtered and dechlorinated water and nourished by fresh lettuce. Then, after 48 h, the rate of survival and mortality was assessed. The parameters analyzed related to mortality considered aspects such as shell depigmentation, lack of body movements, loss of hemolymph and absence of heartbeats. Live mollusks should present body movements and heart rate. To observe these characteristics we used a stereoscopic microscope.

2.2.4 Cytotoxicity assay in hemocytes of *Biomphalaria glabrata*

To evaluate the cytotoxic effect of the QDs, MSA and SBS the surviving adult mollusks of the toxicity tests were used. The technique used in this experiment was established by Pavlica et al. (2000) and Silva et al. (2013). For this, we collected the hemolymph (100 μ L) of each mollusk, which was added to microscopic slides. Then, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA – 100 μ L) in Ringer 10 mM solution was deposited on the sample to prevent cells' aggregation. After this procedure, slides remained for 40 min in a humid chamber. Afterward, cells were fixed with 200 μ L of glutaraldehyde in Ringer's solution at 1% (v/v), for 10 min.

Subsequently, slides were cleaned using Ringer's solution and stained with Giemsa (5%) for 8 min. Then, slides were washed with distilled water and dried at room temperature (25 °C). We analyzed 1.000 cells/group using an optical microscope (Medilux), performed in triplicate for each group. Morphological changes observed were classified in cell apoptosis (AP), micronuclei (MN) and binucleates (BN).

2.3 Statistical analysis

Statistical analyses of the results for embryotoxicity and acute toxicity of mollusks were performed using GraphPad Prism 5.0 software for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA), applying the ANOVA (analysis of variance) test followed by the Newman-Keuls post-test. The results were considered significant when $p < 0.05$.

The significant difference related to cells alterations between the groups was calculated using the nonparametric Kruskal-Wallis test, with 95% of confidence and $p < 0.05$. In this study, statistical analyses were performed using the BioEstat 5.0 software for Windows (Institute Mamirauá – Amazon Conservation, Brazil).

3. Results and discussion

3.1 CdTe QDs Optical Characterization

Figure 1 presents the optical characterization of the CdTe QDs aqueous suspension stabilized in MSA, showing a maximum absorption peak at 552 nm and maximum emission at 595 nm. From the absorption spectrum, the mean particle diameter was 3 nm and the QDs concentration was estimated as 5.4×10^{15} particles/mL or 9.1 μM .

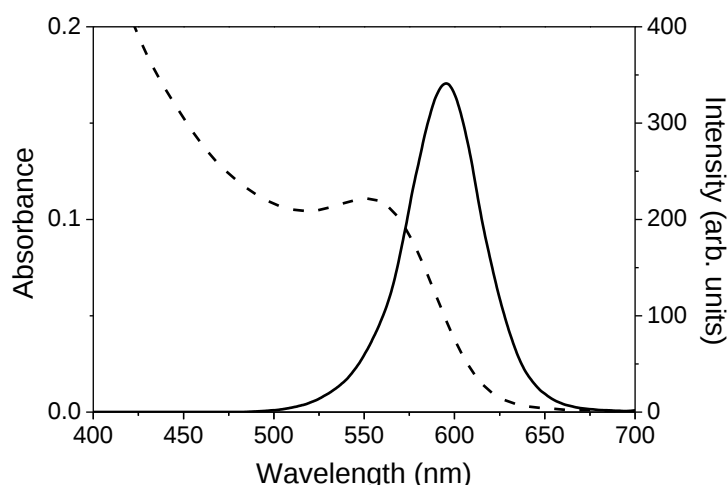


Figure 1 - CdTe QDs absorption (dashed line) and emission (solid line) spectra.

3.2 Embryotoxicity Assay

Figure 2 shows the toxicity of QDs on *B. glabrata* embryos after 24 h of exposure. It is noted that the concentrations of 5; 10 and 20 nM presented 100% embryo lethality after the sixth day of exposure. The number of unviable embryos was approximately 80% and 60% at concentrations of 2.5 and 1.2 nM, respectively. Results suggest a dose-dependent embryotoxicity, where all concentrations presented a significant difference when compared to the negative control group (the group that developed normally) ($p < 0.001$).

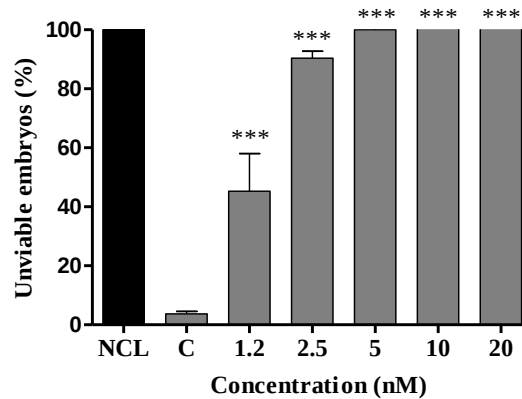


Figure 2 - Toxicity of *Biomphalaria glabrata* embryos exposed to CdTe QDs suspension, where C is negative control and NCL is niclosamide. Asterisks indicate significant results when compared to negative control *** $p < 0.001$.

Teratogenic abnormalities were observed in the embryos (atrophied growth) after exposure to concentrations of 5; 10 and 20 nM. Few animals in the groups exposed to 1.2 and 2.5 nM were able to hatch, as opposed to the negative control, which had 96% hatching (Figure 3). There are no data in the literature that define which defects in embryonic development will result in higher numbers of mortality. Ansaldo et al. (2009) demonstrated that exposure to metals, such as lead and cadmium, caused a reduction in the viability of *B. glabrata* eggs. Similar data were found in this work with CdTe QDs.

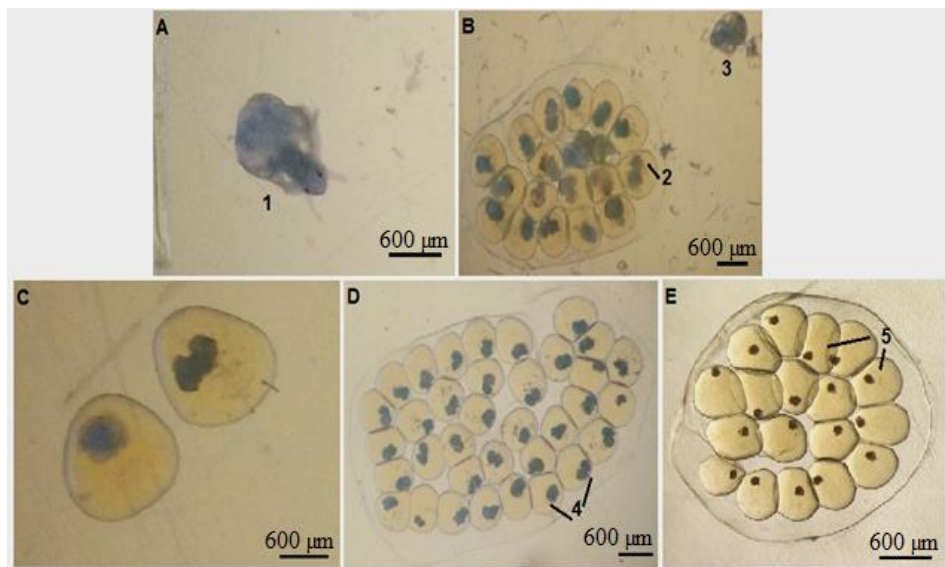


Figure 3 - Abnormalities in *Biomphalaria glabrata* embryos resulting from exposure to different concentrations of CdTe QDs suspensions: (A) 1 – hatched animal (negative control); (B) 2 – stunted growth and death, 3 – hatched animal (1.2 and 2.5 nM); (C) stunted growth and death (5 nM); (D) 4 – Stunted growths and death (10 and 20 nM) and (E) 5 – dead embryos (niclosamide – 3 μ M).

The vast majority of embryos failed to develop and those who tried promptly were blocked at the Young Veliger stage (96 h after first cleavage), similar aspects were observed with *Lymnaea stagnalis*, which exhibits toxic effect induced by cadmium on the development and reproduction of these snails (Gomot, 1998). Heavy metals act generally as a mitotic poison, as an inhibitor of morphogenetic disruption in cellular metabolism, and also disturb ions equilibrium, such as calcium, retarding embryonic development and causing abnormalities in embryogenesis (Gomot, 1998).

Moreover, our results also showed that the blastula stage was sensitive to CdTe suspensions, probably due to the high permeability of the embryo egg membrane to QDs, which are small nanoparticles. According to Rapado et al. (2011), the greater sensitivity in the stage of blastula could be attributed to an intense activity of the cellular proliferation in this phase. Furthermore, embryotoxicity in *B. glabrata* may be correlated with solubility, polarity, and size of the tested samples, because for chemicals reaching the embryos, they must penetrate the gelatinous capsule and cross the egg membrane (Miyasato et al., 2012).

The permeability of the altered membrane may intensify access to cadmium ion, presented in QDs, reducing essential growth metabolism, which generates insufficient energy for development and stops the mechanics of hatching (De chavez; De lara, 2003; Factor; Chavez, 2012).

3.3 Acute toxicity test in *Biomphalaria glabrata*

The effect of the CdTe QDs suspension on adult mollusks showed that the mortality for the concentrations of 100 and 200 nM was 56% and 68%, respectively. For the concentration of 400 nM, 100% mortality was observed. These results showed a significant lethality when compared to the negative control ($p < 0.001$) (Figure 4).

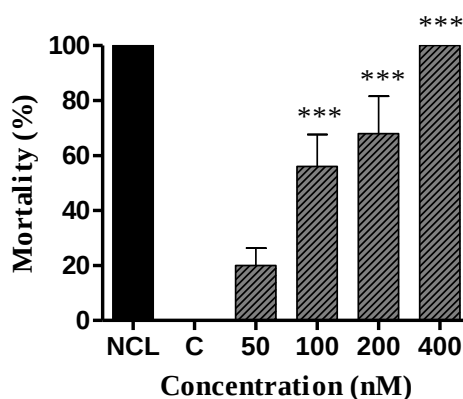


Figure 4 - Acute toxicity of adult snails of *Biomphalaria glabrata* exposed to CdTe QDs suspension: C: negative control and NCL: niclosamide. Significant results compared to negative control *** $p < 0.001$.

One aspect observed in mollusks that died after exposure to CdTe suspensions was the release of hemolymph (one of the mortality signals). This type of behavior is often caused by rupture of the outer membranes, then the hemolymph can be released by the hemal pore, that is the structure responsible for fluid circulation and defense of the organism (Duncan, 1985).

Evaluating the toxicity of CdSe/ZnS QDs (concentrations from 0.5 to 2.5 nM – 4 days of exposure in culture medium) on algae *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum*, Morelli et al. (2013) observed that from 1 to 2.5 nM, the *P. tricornutum* obtained a 50% inhibition of growth rate. On the other hand, *D. tertiolecta* showed a growth of around 16% between 1 and 2.0 nM. We obtained 56% mortality of the mollusks at 100 mM. Considering that a concentration smaller than 200 nM are sufficient to label cells and that the mollusk has an open circulatory system, favoring the flow of substances throughout the whole organism, making it a very sensitive bioindicator, this result can be considered quite reasonable (Pessôa; Martins, 2011; Cabral Filho et al., 2016). Nanotoxicity can vary according to size, composition, shape, surface coating and aggregation state of QDs, as well as the type of exposure (*in vivo* or *in vitro*), the type of the biological system, and also the conditions under which they were exposed (Hardman, 2006; Ali et al., 2014).

Other indications of QDs suspensions toxicity observed in this study, included a reduction in food consumption and mollusk reproduction, resembling results reported by Salice and Roesijadi (2002) which studied *B. glabrata* mollusks exposed to cadmium, and found that the degree of mortality was followed by a reduction in lettuce consumption and egg production.

Although death is an obvious sign of metal toxicity, in this study it is not known exactly how it was caused. Until now, it has been known that the reduction in alimentation can change the survival rate, besides the reproduction of the species, and is, therefore one of the first altered behaviors in aquatic organisms that are exposed to environmental pollutants (Jensen et al., 2001; Khangarot; Das, 2010).

Another important factor, which has been demonstrated in the literature, is that the ions of Cd^{2+} , compete for Ca^{2+} binding sites in cells, disturbing calcium homeostasis, which can cause harmful effects on central nervous system (CNS) function and can lead to the death of the organism (Kobayashi et al., 1994; Przelecka et al., 2004; Mebane, 2006). This may explain why the animals were immobile and insensitive to the withdrawal of the hemolymph during the micronucleus test.

3.4 Cytotoxicity assay in hemocytes of *Biomphalaria glabrata*

The cellular morphology of *Biomphalaria glabrata* hemocytes exposed to CdTe QDs suspensions was also analyzed. During the analysis of the slides, normal cells (hyalinocyte and granulocyte) were observed as well as the presence of different morphological changes in the mollusks hemocytes submitted to the suspensions. These modifications were: binucleations (BN), micronucleus (MNs) and apoptosis (AP). Figure 5 shows the presence of normal hemocytes and with alterations, found in the slides.

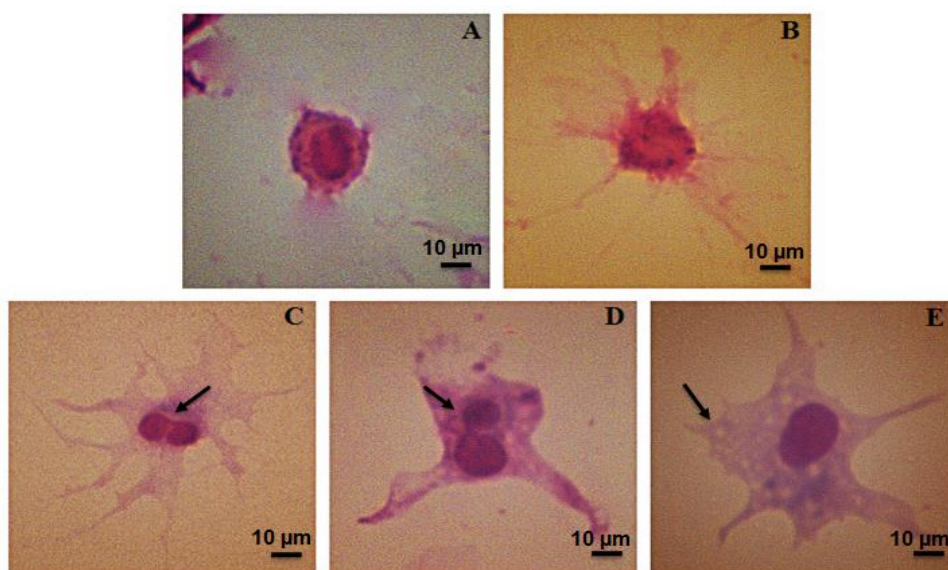


Figure 5 - *Biomphalaria glabrata* hemolymph cells (100x objective): (A) Hemocyte normal – hyalinocyte; (B) Hemocyte normal – granulocyte; (C) Binucleation; (D) Micronucleus and (E) Apoptosis.

The hemocytes represent a well-established model for *in vivo* studies with the objective of evaluating DNA lesions and the response of the immune system, which are directly linked to the toxic substances that are absorbed by gastrointestinal tissue. The MN assay is considered a sensitive tool to determine the chromosomal damage induced by DNA breakage (Carmona et al., 2011; Bolognesi; Fenech, 2012). Reports in the literature indicate the appearance of binucleate cells as a result of toxic and mutagenic agents in several cell types. The appearance of these cellular alterations serves as a bioindicator of anthropic actions in a variety of organisms in diverse ecosystems (Figure 5) (Rodilla, 1993; Silva et al., 2013).

The data presented in Figure 6 A present a dose-dependence relation regarding the presence of binucleate cells, although there was no significant difference between the experimental group and the control group ($p > 0.1$). The appearance of BN cells is related to decreased cytokinesis, and this may be caused by the cellular internalization and the following Cd^{2+} interaction with limbs during the cell cycle (Bolognesi; Fenech, 2012). Despite the small frequency of BN cells (around 6%, observed at the highest concentration tested), this work is corroborated by the study of Rocha et al. (2014) that exposed hemocytes of *Mytilus galloprovincialis* to CdTe QDs, reporting the onset of BN, around 13%.

Figure 6 B shows the frequency of MNs found in the hemocytes of the exposed and not-exposed CdTe QDs, with no significant difference between the groups ($p > 0.1$). Bolognesi and Fenech (2012) suggests that the frequency of MNs in hemocytes is probably related to the type and amount of contaminants and is also modulated by other environmental factors, such as salinity, temperature, pH, and food availability.

Analysis of the results showed that the highest concentration (200 nM) leads to the highest incidence of cell apoptosis (Figure 6 C), with a statically significant difference when compared to the control group ($p < 0.001$). This confirms that the higher the dose, the greater the damage caused to cells, consequently cells entered their last stage of defense against the aggressive agent, the cellular apoptosis. Metals such as cadmium, which can be released from QDs, are considered to be a major cause of cytotoxicity. When absorbed by mollusks this ion can interfere in the modulation of their immune response and interact in the hemocytes function, which play a phagocytic role in these mollusks (Santos et al., 2005; Ambrosone et al., 2012). The presence of apoptotic cells was also found in hemocytes of mollusks of the species *Mytilus galloprovincialis*, after exposure to different nanomaterials such as N-oxides (N-TiO₂) and CdTe QDs (Barmo, et al., 2013; Rocha et al., 2014).

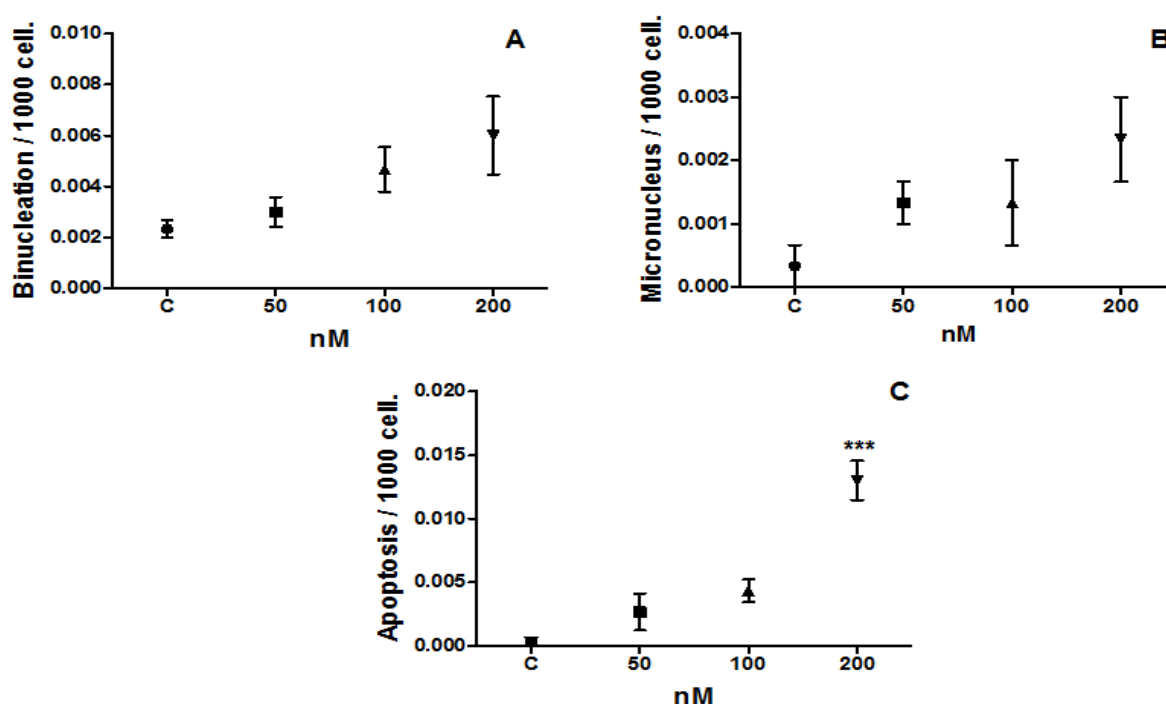


Figure 6 - Alterations analyzed in the hemocytes of *B. glabrata* exposed to CdTe QDs suspension: (A) Frequency of binucleations; (B) Frequency of micronucleus; (C) Frequency of apoptosis, where C is negative control. Asterisks indicate significant results compared to negative control *** $p < 0.001$.

3.5 Tests with MSA and SBS

In tests with MSA and SBS, results presented no significant difference either with embryos or adult mollusks when compared to the control. Embryos and adult mollusks showed no mortality when exposed to MSA and SBS. In relation to cytotoxicity, the amount of 800 μL showed a significant difference in AP frequency when compared to the negative control group, MSA ($p < 0.001$) and SBS ($p < 0.001$). BN and MN cells were not found. This evaluation suggested that the toxic effects, observed in the experiments exposing embryos and adult mollusks to CdTe QDs suspension, came from the Cd^{2+} presented in nanoparticles.

4. Conclusion

Malformations in embryonic development, adult mortality, and the presence of apoptotic cells in the immune system were observed after exposure to QDs suspensions. We conclude that adult embryos and adult mollusks of *Biomphalaria glabrata* have been shown to be sensitive species to evaluate the embryotoxicity and acute toxicity of QDs suspensions in aquatic environments. More studies are needed to evaluate the toxic mechanisms (developmental delay and death) induced by these nanoparticles in the mollusk organism.

References

- Ali, D., Yadav, P. G., Kumar, S., Ali, H., Alarifi, S., Harrath, A. H., 2014. Sensitivity of freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L., to silver nanoparticles. *Chemosphere*, 104, 134-140.
- Ambrosone, A., Mattera, L., Marchesano, V., Quarta, A., Susa, A. S., Tino, A., Rogach, A. L., Tortiglione, C., 2012. Mechanisms underlying toxicity induced by CdTe *quantum dots* determined in an invertebrate model organism. *Biomaterials*, 33, 1991-2000.
- Ansaldo, M., Nahabedian, D. E., Di Fonzo, C., Wider, E. A., 2009. Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of *Biomphalaria glabrata*. *Sci. Total. Environ.*, 407, 1923-1928.
- Baker, T. J., Tyler, C. R., Galloway, T. S., 2014. Impacts of metal and metal oxide nanoparticles on marine organisms. *Environ. Pollut.*, 186, 257-271.
- Barmo, C., Ciacchi, C., Canonico, B., Fabbri, R., Cortese, K., Balbi, T., Marcomini, A., Pojana, G., Gallo, G., Canesi, L., 2013. *In vivo* effects of n-TiO₂ on digestive gland and immune function of the marine bivalve *Mytilus galloprovincialis*. *Aquat. Toxicol.*, 132, 9-18.
- Bolognesi, C., Fenech, M., 2012. Mussel micronucleus cytome assay. *Nat. Protoc.*, 7, 1125-1137.
- Cabral Filho, P. E., Cardoso, A. L., Pereira, M. I., Ramos, A. P., Hallwas, F., Castro, M. M. C., Geraldes, C. F. G. C., Santos, B. S., Lima, M. C. P., Pereira, G. A. L., Fontes, A., 2016. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. *BBA-Gen. Subjects*, 1860, 28-35.
- Camey, T., Verdonk, N. H., 1969. The early development of the snail *Biomphalaria glabrata* (Say) and the origin of the head organs. *Neth. J. Zool.*, 20, 93-121.
- Cantinha, R. S., Borrelly, S. I., Nakano, E., Amaral, A., Silva, L. R., Melo, A. M. M. A., 2010. Effects of high dose rate gamma radiation on survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata*. *International Journal of Low Radiation*, 7, 245-252.
- Carmona, E. R., Creus, A., Marcos, R., 2011. Genotoxic effects of two nickel-compounds in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Mutat. Res-Gen. Tox. En.*, 718, 33-37.

- De Chavez, E. R. C., De Lara, A. V., 2003. Effects of zinc (Zn^{2+}) and lead (Pb^{2+}) on the early development of the freshwater snail, *Radix quadrasi*. J. Med. Appl. Malacol., 12, 59-68.
- Duncan, J., 1985. The toxicology of plant molluscicides. Pharmacol. Therapeut., 27, 243-264.
- Factor, C. J. B., Chavez, E. R. C., 2012. Toxicity of arsenic, aluminum, chromium and nickel to the embryos of the freshwater snail, *Radix quadrasi* von Möellendorf 1898. Philippine Journal of Science, 141, 207-216.
- Gomot, A., 1998. Toxic Effects of Cadmium on Reproduction, Development, and Hatching in the Freshwater Snail *Lymnaea stagnalis* for Water Quality Monitoring. Ecotox. Environ. Safe., 41, 288-297.
- Habib, M. R., Mohamed, A. H., Osman, G. Y., Mossalem, H. S., El-din, A. T. S., Croll, R. P., 2016. *Biomphalaria alexandrina* as a bioindicator of metal toxicity. Chemosphere, 157, 97-106.
- Jackson, B. P., Bugge, D., Ranville, J. F., Chen, C. Y., 2012. Bioavailability, toxicity, and bioaccumulation of quantum dot nanoparticles to the amphipod *Leptocheirus plumulosus*. Environ. Sci. Technol., 46, 5550-5556.
- Jensen, A., Forbes, V. E., Parker, E. D., 2001. Variation in cadmium uptake, feeding rate, and life-history effects in the gastropod *Potamopyrgus antipodarum*: Linking toxicant effects on individuals to the population level. Environ. Toxicol. Chem., 20, 2503-2513.
- Kawano T., Okazaki K., Ré L., 1992. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a practical guide to the main stages. Malacologia, 34, 25-32.
- Khangarot, B. S., Das, S., 2010. Effects of copper on the egg development and hatching of a freshwater pulmonate snail *Lymnaea luteola* L. J. Hazard. Mater., 179, 665-675.
- Kobayashi, H., Suzuki, T., Sato, I., Matsusaka, N., 1994. Neurotoxicological aspects of organotin and lead compounds on cellular and molecular mechanisms. Toxicol. Ecotoxicol. News., 1, 23-30.
- Kristoff, G., Guerrero, N. R. V., Cochón, A. C., 2010. Inhibition of cholinesterases and carboxylesterases of two invertebrate species, *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*, by the carbamate pesticide carbaryl. Aquat. Toxicol., 96, 115-123.

- Mebane, C. A., 2006. Cadmium risks to freshwater life: derivation and validation of low-effect criteria values using laboratory and field studies. Scientific investigations report 2006-5245. US Geological Survey.
- Miyasato, P. A., Kawano, T., Freitas, J. C., Berlinck, R. G. D. S., Nakano, E., Tallarico, L. F., 2012. Molluscicidal activity of some marine substances against the snail *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae). *Parasitol. Res.*, 110, 1873-1879.
- Pavlica, M., Klobučar, G. I., Vetma, N., Erben, R., Papeš, D., 2000. Detection of micronuclei in haemocytes of zebra mussel and great ramshorn snail exposed to pentachlorophenol. *Mutat. Res-Gen. Tox. En.*, 465, 145-150.
- Pereira, G., Leite, E. S., Pereira, G. A. L., Fontes, A., Santos, B. S., 2016. *Quantum Dots*. In: SANCHEZ-DOMINGUEZ, M.; RODRIGUEZ-ABREU, C. (Org.). *Nanocolloids - A Meeting Point for Scientists and Technologists*, 1, 131-158.
- Pila, E. A., Tarrabain, M., Kabore, A. L., Hanington, P. C., 2016. A novel Toll-like receptor (TLR) influences compatibility between the gastropod *Biomphalaria glabrata*, and the digenean trematode *Schistosoma mansoni*. *Plos Pathog.*, 12, e1005513.
- Rapado, L. N., Nakano, E., Ohlweiler, F. P., Kato, M. J., Yamaguchi, L. F., Pereira, C. A. B., Kawano, T., 2011. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *J. Helminthol.*, 85, 66-72.
- Rocha, T. L., Gomes, T., Cardoso, C., Letendre, J., Pinheiro, J. P., Sousa, V. S., Texeira, M. R., Bebianno, M. J., 2014. Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.*, 101, 29-37.
- Rocha, T. L., Gomes, T., Sousa, V. S., Mestre, N. C., Bebianno, M. J., 2015. Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: an overview. *Mar. Environ. Res.*, 111, 74-88.
- Rodilla, V., 1993. Origin and evolution of binucleated cells and binucleated cells with micronuclei in cisplatin-treated CHO cultures. *Mutat. Res-Genet. Tox.*, 300, 281-291.
- Salice, C. J., Roesijadi, G., 2002. Resistance to cadmium and parasite infection are inversely related in two strains of a freshwater gastropod. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21, 1398-1403.

- Santos, M. A. V., Brabo, E. S., Carneiro, B. S., Faial, K. F., Rodrigues, I. R. C., 2005. Estudo quantitativo de metais presentes na hemolinfa de *Biomphalaria glabrata* (Gastropoda), infectadas e não infectadas com *Schistosoma mansoni*. *Power*, 1, 157-160.
- Schaumburg, L. G., Poletta, G. L., Siroski, P. A., Mudry, M. D., 2012. Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). *Ecotox. Environ. Safe.*, 84, 99-103.
- Silva, L. R., Silva, E. B., Amaral, A. J., Amancio, F. F., Melo, A. M. M. A., 2013. Avaliação da radiosensibilidade de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos à radiação gama. *Scientia Plena*, 9, 1-9.
- Tallarico, L. F., Borrelly, S. I., Hamada, N., Grazeffe, V. S., Ohlweiler, F. P., Okazaki, K., Granatelli, A. T., Pereira, I. W., Pereira, C. A. B., Nakano, E., 2014. Developmental toxicity, acute toxicity and mutagenicity testing in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) exposed to chromium and water samples. *Ecotox. Environ. Safe.*, 110, 208-215.
- Yang, W., Yang, H., Ding, W., Zhang, B., Zhang, L., Wang, L., Zhang, Q., 2016. High quantum yield ZnO quantum dots synthesizing via an ultrasonication microreactor method. *Ultrason. Sonochem.*, 33, 106-117.
- Zapata, L. M., Bock, B. C., Orozco, L. Y., Palacio, J. A., 2016. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. *Ecotox. Environ. Safe.*, 127, 108-116.

5 CONCLUSÕES

- A suspensão de PQs induziu toxicidade sobre os embriões da espécie *Biomphalaria glabrata*, levando ao retardo do desenvolvimento e letalidade em todas as concentrações testadas;
- A toxicidade aguda induziu a uma letalidade dose-dependente dos caramujos adultos, a partir de 56% em 100 nM, chegando a 100% em 400 nM;
- Os hemócitos dos moluscos expostos apresentaram binucleações, micronúcleos e apoptose celular em todas as concentrações utilizadas. No entanto, as frequências de binucleações e micronúcleos não foi significativa em relação ao controle;
- Das concentrações analisadas a de 200 nM foi a que mais induziu alterações hemocitárias, principalmente a apoptose celular;
- Os ensaios com o agente estabilizante e com o sobrenadante da suspensão indicaram que a toxicidade observada está relacionada a presença dos nanocristais;
- A sensibilidade dos embriões e dos caramujos adultos de *Biomphalaria glabrata* atestam sua sensibilidade e classificação como um bioindicador ambiental frente a ação de agentes químicos.

6 PERSPECTIVAS

As perspectivas para o fechamento deste trabalho são:

- Quantificar o acúmulo do cádmio presente nos órgãos do caramujo (glândula digestiva, gônadas e resto do corpo), avaliando assim as vias preferenciais de acumulação dos elementos químicos pelo *Biomphalaria glabrata*, por meio do ICP-MS;
- Avaliar a genotoxicidade nas células dos moluscos adultos, por meio da técnica do Ensaio do Cometa.

REFERÊNCIAS

- ABD-ALLA, M. H.; NAFADY, N. A.; KHALAF, D. M. Assessment of silver nanoparticles contamination on faba bean-Rhizobium leguminosarum bv. viciae-Glomus aggregatum symbiosis: implications for induction of autophagy process in root nodule. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 218, p. 163-177, 2016.
- ABEL, P. D. Water pollution biology. **Ellis Horwood**, Ltda Publishers, CRC Press, p. 231, 1996.
- ALBUQUERQUE, L. P.; PONTUAL, E. V.; SANTANA, G. M. S.; SILVA, L. R. S.; AGUIAR, J. S.; COELHO, L. C. B. B.; RÊGO, M. J. B. M.; PITTA, M. G. R.; SILVA, T. G.; MELO, A. M. M. A.; NAPOLEÃO, T. H.; PAIVA, P. M. G. Toxic effects of *Microgramma vacciniifolia* rhizome lectin on *Artemia salina*, human cells, and the schistosomiasis vector *Biomphalaria glabrata*. **Acta tropica**, v. 138, p. 23-27, 2014.
- ALLEN, J. I.; MOORE, M. N. Environmental prognostics: is the current use of biomarkers appropriate for environmental risk evaluation? **Marine Environmental Research**, v. 58, p. 227-232, 2004.
- ALIVISATOS, A. P.; GU, W.; LARABELL, C. Quantum dots as cellular probes. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 7, p. 55-76, 2005.
- AMEN, R. I.; BAGGEN, J. M. C.; BEZEMER, P. D.; JONG-BRINK, M. D. Modulation of the activity of the internal defence system of the pond snail *Lymnaea stagnalis* by the avian schistosome *Trichobilharzia ocellata*. **Parasitology**, v. 104, p. 33-40, 1992.
- AMARAL, R. S.; THIENGO, S. C.; PIERI, O. S. Vigilância e Controle de Moluscos de Importância Epidemiológica: Diretrizes Técnicas. **Programa de Vigilância e Controle da Esquistossomose (PCE)**. Ministério da Saúde, Brasília – DF, 2008.
- ANSALDO, M.; NAHABEDIAN, D. E.; HOLMES-BROWN, E.; AGOTE, M.; ANSAY, C. V.; GUERRERO, N. R. V.; WIDER, E. A. Potential use of glycogen level as biomarker of chemical stress in *Biomphalaria glabrata*. **Toxicology**, v. 224, p. 119-127, 2006.
- ANSALDO, M.; NAHABEDIAN, D. E.; DI FONZO, C.; WIDER, E. A. Effect of cadmium, lead and arsenic on the oviposition, hatching and embryonic survival of *Biomphalaria glabrata*. **Science of the Total Environment**, v. 407, p. 1923-1928, 2009.

ARIAS, A. R. L.; BUSS, D. F.; ALBURQUERQUE, C. de; INÁCIO, A. F.; FREIRE, M.M.; EGLER, M.; MUGNAI, R.; BAPTISTA, D. F. Utilização de bioindicadores na avaliação de impacto e no monitoramento da contaminação de rios e córregos por agrotóxicos. **Ciência & Saúde**, v. 12, p. 61-72, 2007.

ARORA, S.; RAJWADE, J. M.; PAKNIKAR, K. M. Nanotoxicology and *in vitro* studies: the need of the hour. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 258, p. 151-165, 2012.

BAE, J. H.; LIM, S. Y. Heavy Metals and Biochemical Composition of Four Sea Bream Species (*Acanthopagrus schlegelii* Bleeker, *Pagrus major* Temminck & Schlegel, *Oplegnathus fasciatus* Krøyer and *Girella punctata* Gray). **The Philippine Agricultural Scientist**, v. 95, p. 185-191, 2012.

BANDOW, C.; WELTJE, L. Development of an embryo toxicity test with the pond snail *Lymnaea stagnalis* using the model substance tributyltin and common solvents. **Science of the total environment**, v. 435, p. 90-95, 2012.

BARRACCO, M. A.; STEIL, A. A.; GARGIONI, R. Morphological characterization of the hemocytes of the pulmonate snail *Biomphalaria tenagophila*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, p. 73-83, 1993.

BAUN, A.; HARTMANN, N. B.; GRIEGER, K.; KUSK, K. O. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 387-395, 2008.

BAYNE, C. J.; BUCKLEY, P. M.; DEWAN, P. C. *Schistosoma mansoni*: Cytotoxicity of hemocytes from susceptible snail hosts for sporocysts in plasma from resistant *Biomphalaria glabrata*. **Experimental Parasitology**, v. 50, p. 409-416, 1980.

BEARD, M. C.; MIDGETT, A. G.; LAW, M.; SEMONIN, O. E.; ELLINGSON, R. J.; NOZIK, A. J. Variations in the quantum efficiency of multiple exciton generation for a series of chemically treated PbSe nanocrystal films. **Nano letters**, v. 9, p. 836-845, 2009.

BICKHAM, J. W.; SANDHU, S.; HEBERT, P. D.; CHIKHI, L.; ATHWAL, R. Effects of chemical contaminants on genetic diversity in natural populations: implications for biomonitoring and ecotoxicology. **Mutation Research**, v. 463, p. 33-51, 2000.

BIRK, S.; BONNE, W.; BORJA, A.; BRUCET, S.; COURRAT, A.; POIKANE, S.; SOLIMINI, A.; BUND, W. V.; ZAMPOUKAS, N.; HERING, D. Three hundred ways to assess Europe's surface waters: an almost complete overview of biological methods to implement the Water Framework Directive. **Ecological Indicators**, v. 18, p. 31-41, 2012.

BLICKLEY, T. M.; MATSON, C. W.; VREELAND, W. N.; RITTSCHOF, D.; DI GIULIO, R. T.; MCCLELLAN-GREEN, P. D. Dietary CdSe/ZnS *quantum dots* exposure in estuarine fish: bioavailability, oxidative stress responses, reproduction, and maternal transfer. **Aquatic Toxicology**, v. 148, p. 27-39, 2014.

BOLOGNESI, C.; FENECH, M. Mussel micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 7, p. 1125-1137, 2012.

BOUR, A.; MOUCHET, F.; SILVESTRE, J.; GAUTHIER, L.; PINELLI, E. Environmentally relevant approaches to assess nanoparticles ecotoxicity: A review. **Journal of hazardous materials**, v. 283, p. 764-777, 2015.

BUGGE, J.; WEBER, R. Oxygen binding and its allosteric control in hemoglobin of the pulmonate snail, *Biomphalaria glabrata*. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 276, p. R347-R356, 1999.

CABALLERO-DÍAZ, E.; CASES, M. V. Analytical methodologies for nanotoxicity assessment. **TracTrends in Analytical Chemistry**, v. 84, p. 160-171, 2016.

CABRAL FILHO, P. E.; CARDOSO, A. L.; PEREIRA, M. I. A.; RAMOS, A. P. M.; HALLWAS, F.; CASTRO, M. M. C. A.; GERALDES, C. F. G. C.; SANTOS, B. S.; LIMA, M. C. P.; PEREIRA, G. A. L.; FONTES, A. CdTe quantum dots as fluorescent probes to study transferrin receptors in glioblastoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1860, p. 28-35, 2016.

CABRAL FILHO, P. E. Investigação de antígenos eritrocitários do sistema ABO utilizando Quantum Dots conjugados a anticorpos monoclonais e à lectina *Ulex europaeus*. 2013. 122f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco – PE, 2013.

CALABRESE, E. J.; IAVICOLI, I.; CALABRESE, V. Hormesis: why it is important to biogerontologists. **Biogerontology**, v. 13, p. 215-235, 2012.

CALLISTO, M.; GONÇALVES, J. A vida nas águas das montanhas. **Ciência Hoje**, v. 31, p. 68-71, 2002.

CALLISTO, M.; GONÇALVES JR, J. F.; MORENO, P. Invertebrados aquáticos como bioindicadores. **Navegando o Rio das Velhas das Minas aos Gerais.**, v. 1, p. 1-12, 2005.

CANTINHA, R. S. Estudo da resposta do caramujo *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) frente a estímulos ambientais estressores, com enfoque na proteína HSP70. 2012. 103f. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo - SP, 2012.

CANTINHA, R. S. Influência da radiação gama de alta taxa de dose na sobrevivência e na reprodução de *Biomphalaria glabrata*. 2008. 71f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco - PE, 2008.

CANTINHA, R. S.; BORRELY, S. I.; NAKANO, E.; AMARAL, A.; SILVA, L. R.; MELO, A. M. M. A. Effects of high dose rate gamma radiation on survival and reproduction of *Biomphalaria glabrata*. **International Journal of Low Radiation**, v. 7, p. 245-252, 2010.

CANTINHA, R. D. S.; BORRELY, S. I.; OGUIURA, N.; CAMPOS, A. P., PEREIRA, C. A. D. B.; NAKANO, E. Thermotolerance and induction of HSP70 in *Biomphalaria glabrata*. **Greener Journal of Cell and Animal Biology**, v. 1, p. 001-007, 2013.

CAREW, M. E.; PETTIGROVE, V.; COX, R. L.; HOFFMANN, A. A. The response of Chironomidae to sediment pollution and other environmental characteristics in urban wetlands. **Freshwater Biology**, v. 52, p. 2444-2462, 2007.

CAVALCANTI, M. G. S.; MENDONÇA, A. M. B.; DUARTE, G. R.; BARBOSA, C. C. G. S.; DE CASTRO, C. M. M. B.; ALVES, L. C.; BRAYNER, F. A. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Micron**, v. 43, p. 285-291, 2012.

CHAN, W. C.; NIE, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive non isotopic detection. **Science**, v. 281, p. 2016-2018, 1998.

CHEN, N.; HE, Y.; SU, Y.; LI, X.; HUANG, Q.; WANG, H.; ZHANG, X.; TAI, R.; FAN, C. The cytotoxicity of cadmium-based quantum dots. **Biomaterials**, v. 33, p. 1238-1244, 2012.

CHENG, T. C.; GARRABRANT, T. A. Acid phosphatase in granulocytic capsules formed in strains of *Biomphalaria glabrata* totally and partially resistant to *Schistosoma mansoni*. **International journal for parasitology**, v. 7, p. 467-472, 1977.

CHOI, H. S.; LIU, W.; MISRA, P.; TANAKA, E.; ZIMMER, J. P.; IPE, B. I.; BAWENDI, M. G.; FRANGIONI, J. V. Renal clearance of quantum dots. **Nature biotechnology**, v. 25, p. 1165-1170, 2007.

DUAN, J.; YU, Y.; LI, Y.; YU, Y.; LI, Y.; HUANG, P.; ZHOU, X.; PENG, S.; SUN, Z. Developmental toxicity of CdTe QDs in zebrafish embryos and larvae. **Journal of nanoparticle research**, v. 15, p. 1-11, 2013.

DUBERTRET, B.; SKOURIDES, P.; NORRIS, D. J.; NOIREAUX, V.; BRIVANLOU, A. H.; LIBCHABER, A. *In vivo* imaging of *quantum dots* encapsulated in phospholipid micelles. **Science**, v. 298, p. 1759-1762, 2002.

ESTEVAM, E. C.; NAKANO, E.; KAWANO, T.; PEREIRA, C. A. B.; AMANCIO, F. F.; MELO, A. M. M. A. Dominant lethal effects of 2, 4-D in *Biomphalaria glabrata*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 611, p. 83-88, 2006.

ESTÉVEZ-CALVAR, N.; ROMERO, A.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. Genes of the mitochondrial apoptotic pathway in *Mytilus galloprovincialis*. **PloS one**, v. 8, p. e61502, 2013.

ESTUPIÑÁN-LÓPEZ, C.; DOMINGUEZ, C. T.; CABRAL FILHO, P. E.; SANTOS, B. S.; FONTES, A.; DE ARAUJO, R. E. A pH dependence study of CdTe quantum dots fluorescence quantum yields using eclipsing thermal lens spectroscopy. **Journal of Luminescence**, v. 174, p. 17-21, 2016.

FARIAS, P. M. A.; SANTOS, B. S.; MENEZES, F. D.; BRASIL JR, A. G.; FERREIRA, R.; MOTTA, M. A.; CASTRO-NETO, A. G.; VIEIRA, A. A. S.; SILVA, D. C. N.; FONTES, A.; CESAR, C. L. Highly fluorescent semiconductor core-shell CdTe-CdS nanocrystals for monitoring living yeast cells activity. **Applied Physics A: Materials Science & Processing**, v. 89, p. 957-961, 2007.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FERREIRA, A. S.; TÓTOLA, M. R.; KASUYA, M. C. M.; ARAÚJO, E. F.; BORGES, A.C. Small heat shock proteins in the development of thermotolerance in *Pisolithus* sp. **Journal Thermal Biology**, v. 30, p. 595-602. 2005.

FESWICK, A.; GRIFFITT, R. J.; SIEBEIN, K.; BARBER, D. S. Uptake, retention and internalization of quantum dots in *Daphnia* is influenced by particle surface functionalization. **Aquatic toxicology**, v. 130, p. 210-218, 2013.

FIGUEIREDO, E. S. Efeitos tóxicos dos extratos aquosos e hidralcólicos de *Indigofera Suffruticosa* sobre *Biomphalaria glabrata*, cercarias de *Schistosoma mansoni* e larvas de *Artemia salina*. 2011. 88f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco – PE, 2011.

FILIMONOVA, V.; GONÇALVES, F.; MARQUES, J. C.; DE TROCH, M.; GONÇALVES, A. M. Fatty acid profiling as bioindicator of chemical stress in marine organisms: A review. **Ecological Indicators**, v. 67, p. 657-672, 2016.

FONTES, A.; SANTOS, B. S.; CHAVES, C. R.; FIGUEIREDO, R. C. II-VI Quantum dots as fluorescent probes for studying trypanosomatids. **Quantum Dots - A Variety of New Applications**, p. 241-260. 2012a.

FONTES, A.; DE LIRA, R. B.; SEABRA, M. A. B. L.; DA SILVA, T. G.; DE CASTRO NETO, A. G.; SANTOS, B. S. Quantum dots in biomedical research. **Biomedical Engineering – Technical Applications in Medicine**, p.1-22. 2012b.

FU, P. P.; XIA, Q.; HWANG, H. M.; RAY, P. C.; YU, H. Mechanisms of nanotoxicity: generation of reactive oxygen species. **Journal of food and drug analysis**, v. 22, p. 64-75, 2014.

GAGNÉ, F.; AUCLAIR, J.; TURCOTTE, P.; FOURNIER, M.; GAGNON, C.; SAUVÉ, S.; BLAISE, C. Ecotoxicity of CdTe quantum dots to freshwater mussels: impacts on immune system, oxidative stress and genotoxicity. **Aquatic toxicology**, v. 86, p. 333-340, 2008.

GALEONE, A.; VECCHIO, G.; MALVINDI, M. A.; BRUNETTI, V.; CINGOLANI, R.; POMPA, P. P. In vivo assessment of CdSe–ZnS *quantum dots*: coating dependent bioaccumulation and genotoxicity. **Nanoscale**, v. 4, p. 6401-6407, 2012.

GALLOWAY, T. S. Biomarkers in environmental and human health risk assessment. **Marine pollution bulletin**, v. 53, p. 606-613, 2006.

GEILENKIRCHEN, W. L. M. Cell division and morphogenesis of *Limnaea* eggs after treatment with heat pulses at successive stages in early division cycles. **Development**, v. 16, p. 321-337, 1966.

GENG, L.; DUAN, X.; WANG, Y.; ZHAO, Y.; GAO, G.; LIU, D.; CHANG, Y-Z.; YU, P. Quantum dots-hemin: Preparation and application in the absorption of heme iron. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, p. 1747-1755. 2016.

GEYS, J.; DE VOS, R.; NEMERY, B.; HOET, P. H. In vitro translocation of quantum dots and influence of oxidative stress. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 297, p. L903-L911, 2009.

GIRARDELLO, F., LEITE, C. C., BRANCO, C. S., ROESCH-ELY, M., FERNANDES, A. N., SALVADOR, M., & HENRIQUES, J. A. P. Antioxidant defences and haemocyte internalization in *Limnoperna fortunei* exposed to TiO₂ nanoparticles. **Aquatic Toxicology**, v. 176, p. 190-196, 2016.

GOMOT, A. Toxic Effects of Cadmium on Reproduction, Development, and Hatching in the Freshwater Snail *Lymnaea stagnalis* for Water Quality Monitoring. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 41, p. 288-297, 1998.

HANDY, R. D.; OWEN, R.; VALSAMI-JONES, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. **Ecotoxicology**, v. 17, p. 315-325, 2008.

HARDMAN, R. A toxicologic review of quantum dots: toxicity depends on physicochemical and environmental factors. **Environmental health perspectives**, p. 165-172, 2006.

HAUCK, T. S.; ANDERSON, R. E.; FISCHER, H. C.; NEWBIGGING, S.; CHAN, W. C. In vivo quantum-dot toxicity assessment. **Small**, v. 6, p. 138-144, 2010.

HEDDLE, J. A.; HITE, M.; KIRKHART, B.; MAVOURNIN, K.; MACGREGOR, J. T.; NEWELL, G. W.; SALAMONE, M. F. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 123, p. 61-118, 1983.

HOSHINO, A.; FUJIOKA, K.; OKU, T.; SUGA, M.; SASAKI, Y. F.; OHTA, T.; YASUHARA, M.; SUZUKI, K.; YAMAMOTO, K. Physicochemical properties and cellular

toxicity of nanocrystal *quantum dots* depend on their surface modification. **Nano Letters**, v. 4, p. 2163-2169, 2004.

IARC, Lyon. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Beryllium, Cadmium, Mercury, and Exposures in the Glass Manufacturing Industry. **Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans**, v. 58. 1993.

IWANAGA, S. The limulus clotting reaction. **Current opinion in Immunology**, v. 5, p. 74-82, 1993.

JACKSON, B. P.; BUGGE, D.; RANVILLE, J. F.; CHEN, C. Y. Bioavailability, toxicity, and bioaccumulation of quantum dot nanoparticles to the amphipod *Leptocheirus plumulosus*. **Environmental science & technology**, v. 46, p. 5550-5556, 2012.

JAISWAL, J. K.; MATTOUSSI, H.; MAURO, J. M.; SIMON, S. M. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. **Nature biotechnology**, v. 21, p. 47-51, 2003.

JOHNSON, K. A.; STEINMAN, A. D.; KEIPER, W. D.; RUETZ III, C. R. Biotic responses to low-concentration urban road runoff. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 30, p. 710-727, 2011.

JORDAN, A.; SCHOLZ, R.; WUST, P.; SCHIRRA, H.; SCHIESTEL, T.; SCHMIDT, H.; FELIX, R. Endocytosis of dextran and silan-coated magnetite nanoparticles and the effect of intracellular hyperthermia on human mammary carcinoma cells *in vitro*. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 194, p. 185-196, 1999.

KAWANO, T.; NAKANO, E.; WATANABE, L. C. Estudo do Desenvolvimento Embrionário de *Biomphalaria glabrata* (Mollusca, Planorbidae) e suas Aplicações. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**: 20. ed. Rio de Janeiro, Editora: FIOCRUZ, p. 347, 2008.

KAWANO T.; OKAZAKI K.; RÉ L. Embryonic development of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) (Mollusca, Gastropoda, Planorbidae): a practical guide to the main stages. **Malacologia**, v. 34, p. 25-32, 1992.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British Journal of Cancer**, v. 26, p. 239, 1972.

KIM, J.; PARK, Y.; YOON, T. H.; YOON, C. S.; CHOI, K. Phototoxicity of CdSe/ZnSe quantum dots with surface coatings of 3-mercaptopropionic acid or tri-n-octylphosphine oxide/gum arabic in *Daphnia magna* under environmentally relevant UV-B light. **Aquatic toxicology**, v. 97, p. 116-124, 2010.

KING-HEIDEN, T. C.; WIECINSKI, P. N.; MANGHAM, A. N.; METZ, K. M.; NESBIT, D.; PEDERSEN, J. A.; HAMERS, R. J.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Quantum dot nanotoxicity assessment using the zebrafish embryo. **Environmental science & technology**, v. 43, p. 1605-1611, 2009.

KIRCHNER C.; LIEDL T.; KUDERA S.; PELLEGRINO T.; JAVIER A. M.; GAUB H. E.; STOLZLE S.; FERTIG N.; PARAK W. J. Cytotoxicity of colloidal CdSe and CdSe/ZnS nanoparticles. **Nano letters**, v. 5, p. 331-338, 2005.

KNAAP, V. W. P. W.; LOKER, E. S. Immune mechanism in trematode-snail interaction. **Parasitology Today**, v. 6, p. 175-182, 1990.

KRISTOFF, G.; BARRIONUEVO, D. C.; CACCIATORE, L. C.; GUERRERO, N. R. V.; COCHÓN, A. C. In vivo studies on inhibition and recovery of B-esterase activities in *Biomphalaria glabrata* exposed to azinphos-methyl: analysis of enzyme, substrate and tissue dependence. **Aquatic toxicology**, v. 112, p. 19-26, 2012.

KRISTOFF, G.; GUERRERO, N. R. V.; COCHÓN, A. C. Inhibition of cholinesterases and carboxylesterases of two invertebrate species, *Biomphalaria glabrata* and *Lumbriculus variegatus*, by the carbamate pesticide carbaryl. **Aquatic toxicology**, v. 96, p. 115-123, 2010.

LAM, C. W.; JAMES, J. T.; MCCLUSKEY, R.; HUNTER, R. L. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. **Toxicological sciences**, v. 77, p. 126-134, 2004.

LEAD, J. R.; WILKINSON, K. J. Aquatic colloids and nanoparticles: current knowledge and future trends. **Environmental Chemistry**, v. 3, p. 159-171, 2006.

LEWINSKI, N. A.; ZHU, H.; JO, H. J.; PHAM, D.; KAMATH, R. R.; OUYANG, C. R.; VULPE, C. D.; COLVIN, V. L.; DREZEK, R. A. Quantification of water solubilized CdSe/ZnS quantum dots in *Daphnia magna*. **Environmental science & technology**, v. 44, p. 1841-1846, 2010.

LIE, K. J.; JEONG, K. H.; HEYNEMAN, D.; SOULSBY, E. J. L. Molluscan host reactions to helminthic infection. **Protozoa, arthropods, and invertebrates**, v. 4, p. 211-270, 1987.

LI, J.; CHANG, X.; CHEN, X.; GU, Z.; ZHAO, F.; CHAI, Z.; ZHAO, Y. Toxicity of inorganic nanomaterials in biomedical imaging. **Biotechnology advances**, v. 32, p. 727-743, 2014.

LI, J.; HONG, X.; LI, D.; ZHAO, K.; WANG, L.; WANG, H.; DU, Z.; LI, J.; BAI, Y.; LI, T. Mixed ligand system of cysteine and thioglycolic acid assisting in the synthesis of highly luminescent water-soluble CdTe nanorods. **Chemical communications**, p. 1740-1741, 2004.

LIU, T.; XING, R.; ZHOU, Y-F.; ZHANG, J.; SU, Y-Y.; ZHANG, K-Q.; HE, Y.; SIMA, Y-H.; XU, S-Q. Hematopoiesis toxicity induced by CdTe *quantum dots* determined in an invertebrate model organism. **Biomaterials**, v. 35, p. 2942-2951, 2014.

LLANOS-RIVERA, A.; CASTRO, L. R.; SILVA, J.; BAY-SCHMITH, E. A new developmental toxicity test for pelagic fish using Anchoveta (*Engraulis ringens* J.) **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 83, p. 23-28, 2009.

LOVE, S. A.; MAURER-JONES, M. A.; THOMPSON, J. W.; LIN, Y. S.; HAYNES, C. L. Assessing nanoparticle toxicity. **Annual review of analytical chemistry**, v. 5, p. 181-205, 2012.

LOVRIĆ, J.; BAZZI, H. S.; CUIE, Y.; FORTIN, G. R.; WINNIK, F. M.; MAYSINGER, D. Differences in subcellular distribution and toxicity of green and red emitting CdTe *quantum dots*. **Journal of Molecular Medicine**, v. 83, p. 377-385, 2005a.

LOVRIĆ, J.; CHO, S. J.; WINNIK, F. M.; MAYSINGER, D. Unmodified cadmium telluride *quantum dots* induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. **Chemistry & biology**, v. 12, p. 1227-1234, 2005b.

MA-HOCK, L.; BRILL, S.; WOHLLEBEN, W.; FARIAS, P. M. A.; CHAVES, C. R.; TENÓRIO, D. P. L. A.; FONTES, A.; SANTOS, B. S.; LANDSIEDEL, R.; STRAUSS, V.; TREUMANN, S.; RAVENZWAAY, B. V. Short term inhalation of a liquid aerosol of CdS/Cd(OH)₂ core shell *quantum dots* in male Wistar rats. **Toxicology letters**, v. 208, p. 115-124, 2012.

MA, S.; LIN, D. The biophysicochemical interactions at the interfaces between nanoparticles and aquatic organisms: adsorption and internalization. **Environmental Science: Processes & Impacts**, v. 15, p. 145-160, 2013.

MACREZ, N.; MIRONNEAU, J. Local Ca^{2+} signals in cellular signalling. **Current molecular medicine**, v. 4, p. 263-275, 2004.

MCCONKEY, D.J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology letters**, v. 99, p. 157-168, 1998.

MEHARI, A. K.; WONDIE, A.; MINGIST, M.; VIJVERBERG, J. Spatial and seasonal variation in the macro-invertebrates and physico-chemical parameters of the Enfranz River, Lake Tana sub-basin (Ethiopia). **Ecohydrology & Hydrobiology**, v. 14, p. 304-312, 2014.

MELO, P. S.; MARIA, S. S.; VIDAL, B. C.; HAUN, M.; DURÁN, N. Violacein cytotoxicity and induction of apoptosis in V79 cells. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 36, p. 539-543, 2000.

MERSCH, J.; BEAUVAIS, M-N.; NAGEL, P. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 371, p. 47-55, 1996.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Vigilância da esquistossomose mansoni: Diretrizes técnicas**. Secretaria de Vigilância em Saúde. 4ª ed. Brasília - DF, 2014.

MONA, M. H.; GAAFAR, R. M.; HELAL, I. B.; OMRAN, N. E.; SALAMA, W. M. Evaluation of cytotoxic effects of atrazine and glyphosate herbicides on *Biomphalaria glabrata* snails. **The Journal of Basic & Applied Zoology**, v. 66, p. 68-75, 2013.

MOORE, J. Uma introdução aos invertebrados. São Paulo, **Editora: Santos**, p. 356, 2003.

MORELLI, E.; CIONI, P.; POSARELLI, M.; GABELLIERI, E. Chemical stability of CdSe *quantum dots* in seawater and their effects on a marine microalga. **Aquatic toxicology**, v. 122, p. 153-162, 2012.

MORELLI, E.; SALVADORI, E.; BIZZARRI, R.; CIONI, P.; GABELLIERI, E. Interaction of CdSe/ZnS *quantum dots* with the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* and the green alga *Dunaliella tertiolecta*: a biophysical approach. **Biophysical chemistry**, v. 182, p. 4-10, 2013.

MÜNZINGER, A. *Biomphalaria glabrata* (Say), a suitable organism for a biotest. **Environmental Technology**, v. 8, p. 141-148, 1987.

NAKANO, E.; WATANABE, L. C.; OHLWEILER, F. P.; PEREIRA, C. A. B.; KAWANO, T. Establishment of the dominant lethal test in the freshwater mollusk *Biomphalaria glabrata*

(Say, 1818). **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 536, p. 145-154, 2003.

NEVES, D. P. Parasitologia humana. 11^a. ed. **Editora: Atheneu**, 2005.

PAN, C. T. Studies on the host-parasite relationship between *Schistosoma mansoni* and the snail *Australorbis glabratus*.. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 14, p. 931-976, 1965.

PAN, S. C. *Schistosoma mansoni*: the ultrastructure of larval morphogenesis in *Biomphalaria glabrata* and of associated host-parasite interactions. **Japanese journal of medical science & biology**, v. 49, p. 129-149, 1996.

PARAENSE, W. L. Estado atual da sistemática dos planorbídeos brasileiros. **Arquivos do Museu Nacional**, v. 55, p. 105-128, 1975.

PARAENSE, W. L. Histórico do Gênero *Biomphalaria*, Morfologia e Sistemática Morfológica. **Schistosoma mansoni & Esquistossomose: uma visão multidisciplinar**, 20^a ed. Rio de Janeiro, Editora: FIOCRUZ, p. 285, 2008.

PENG, X.; SCHLAMP, M. C.; KADAVANICH, A. V.; ALIVISATOS, A. P. Epitaxial growth of highly luminescent CdSe/CdS core/shell nanocrystals with photostability and electronic accessibility. **Journal of the American Chemical Society**, v. 119, p. 7019-7029, 1997.

PEREIRA, M. I. A. *Quantum dots* bioconjugados a proteínas para identificação de antígenos eritrocitários do sistema ABO por citometria de fluxo. 2014. 75f. **Monografia**. Universidade Federal de Pernambuco - PE, 2014.

PEREIRA, G.; LEITE, E. S.; PEREIRA, G. A. L.; FONTES, A.; SANTOS, B. S. *Quantum Dots*. In: SANCHEZ-DOMINGUEZ, M.; RODRIGUEZ-ABREU, C. **Nanocolloids - A Meeting Point for Scientists and Technologists**, v. 1, p. 131-158. 2016.

PESSÔA, S. B.; MARTINS, A. V. **Parasitologia médica**. 11^a ed. Rio de Janeiro. Editora: Guanabara Koogan S.A., 2011.

PILLA, V.; MUNIN, E.; DANTAS, N. O.; SILVA, A. C. A.; ANDRADE, A. A. Photothermal spectroscopic characterization in CdSe/ZnS and CdSe/CdS *quantum dots*: a review and new applications. **Quantum Dots-A Variety of New Applications**, p. 3-22, 2012.

PROBST, C. E.; ZRAZHEVSKIY, P.; BAGALKOT, V.; GAO, X. *Quantum dots* as a platform for nanoparticle drug delivery vehicle design. **Advanced drug delivery reviews**, v. 65, p. 703-718, 2013.

QUESADA-GONZÁLEZ, D.; MERKOÇI, A. Mobile phone-based biosensing: An emerging “diagnostic and communication” technology. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 92, p. 549-562, 2017.

RAPADO, L. N.; NAKANO, E.; OHLWEILER, F. P.; KATO, M. J.; YAMAGUCHI, L. F.; PEREIRA, C. A. B.; KAWANO, T. Molluscicidal and ovicidal activities of plant extracts of the Piperaceae on *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). **Journal of helminthology**, v. 85, p. 66-72, 2011.

RATCLIFFE, N. A.; ROWLEY, A. F.; FITZGERALD, S. W.; RHODES, C. P. Invertebrate immunity: basic concepts and recent advances. **International Review of Cytology**, v. 97, p. 350, 1985.

RESCH-GENGER, U.; GRABOLLE, M.; CAVALIERE-JARICOT, S.; NITSCHKE, R.; NANN, T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. **Nature methods**, v. 5, p. 763-775, 2008.

REY, L. *Schistosoma e esquistossomiase: epidemiologia e controle*. 3ª ed. Rio de Janeiro, Editora: Guanabara Koogan, 2001.

REY, L. *Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nos trópicos ocidentais*. Rio de Janeiro, Editora: Guanabara Koogan, 2008.

ROCHA, T. L.; GOMES, T.; MESTRE, N. C.; CARDOSO, C.; BEBIANNO, M. J. Tissue specific responses to cadmium-based *quantum dots* in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 169, p. 10-18, 2015a.

ROCHA, T. L.; GOMES, T.; PINHEIRO, J. P.; SOUSA, V. S.; NUNES, L. M.; TEIXEIRA, M. R.; BEBIANNO, M. J. Toxicokinetics and tissue distribution of cadmium-based *Quantum Dots* in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. **Environmental Pollution**, v. 204, p. 207-214, 2015b.

ROCHA, T. L.; GOMES, T.; SOUSA, V. S.; MESTRE, N. C.; BEBIANNO, M. J. Ecotoxicological impact of engineered nanomaterials in bivalve molluscs: an overview. **Marine environmental research**, v. 111, p. 74-88, 2015c.

ROCHA, T. L.; MESTRE, N. C.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; BEBIANNO, M. J. Environmental behaviour and ecotoxicity of *quantum dots* at various trophic levels: A review. **Environment International**, v. 98, p. 1-17, 2017.

RODILLA, V. Origin and evolution of binucleated cells and binucleated cells with micronuclei in cisplatin-treated CHO cultures. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 300, p. 281-291, 1993.

ROGACH, A. L.; FRANZL, T.; KLAR, T. A.; FELDMANN, J.; GAPONIK, N.; LESNYAK, V.; DONEGAN, J. F. Aqueous synthesis of thiol-capped CdTe nanocrystals: state-of-the-art. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, p. 14628-14637, 2007.

ROMERO, A.; ESTEVEZ-CALVAR, N.; DIOS, S.; FIGUERAS, A.; NOVOA, B. New insights into the apoptotic process in mollusks: characterization of caspase genes in *Mytilus galloprovincialis*. **PLoS One**, v. 6, p. 1-15, 2011.

ROSENBERG, D. M.; RESH, V. H. Freshwater biomonitoring and benthic macroinvertebrates. **Chapman & Hall**, p. 488, 1993.

RUPPERT, E. E.; FOX, R. S.; BARNES, R. D. Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva. In: **Zoologia dos invertebrados: uma abordagem funcional-evolutiva**. 7ª ed. São Paulo, Editora: Roca, p. 323-481, 2005.

SALAMAT, Z.; SULLIVAN, J. T. Involvement of protein kinase C signalling and mitogen-activated protein kinase in the amebocyte-producing organ of *Biomphalaria glabrata* (Mollusca). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, p. 725-727, 2009.

SANTOS, B. S.; FARIAS, P. M. A.; FONTES, A. Semiconductor quantum dots for biological applications. **Handbook of self assembled semiconductor nanostructures novel devices in photonics and electronics**, p. 773-798, 2008.

SCHAUMBURG, L. G.; POLETTA, G. L.; SIROSKI, P. A.; MUDRY, M. D. Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 84, p. 99-103, 2012.

SETA, L.; MAGALHÃES, L. A.; CARVALHO, J. F. D. Comportamento dos amebócitos circulantes de moluscos planorbídeos frente ao parasitismo por larvas de *Schistosoma mansoni*, inoculação de tinta nanquim e fratura da concha. **Revista de Saúde Pública**, v. 3, p. 332-340, 1996.

SINGH, M. P.; ATKINS, T. M.; MUTHUSWAMY, E.; KAMALI, S.; TU, C.; LOUIE, A. Y.; KAUZLARICH, S. M. Development of iron-doped silicon nanoparticles as bimodal imaging agents. **ACS nano**, v. 6, p. 5596-5604, 2012.

SHAVEL, A.; GAPONIK, N.; EYCHMÜLLER, A. Factors governing the quality of aqueous CdTe nanocrystals: calculations and experiment. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, p. 19280-19284, 2006.

SHEHAB, M.; EBRAHIM, S.; SOLIMAN, M. Graphene *quantum dots* prepared from glucose as optical sensor for glucose. **Journal of Luminescence**, v. 184, p. 110-116, 2016.

SILVA, A. C. Tratamento do percolado de aterro sanitário e avaliação da toxicidade do efluente bruto e tratado. 2002. 126f. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Rio de Janeiro – RJ, 2002.

SILVA, L. R. S. Detecção de micronúcleo em hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos a radiação gama de ^{60}Co . 2010. 59f. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Pernambuco - PE, 2010.

SILVA, L. R.; SILVA, E. B.; AMARAL, A. J.; AMANCIO, F. F.; MELO, A. M. M. A. Avaliação da radiosensibilidade de hemócitos de *Biomphalaria glabrata* expostos à radiação gama. **Scientia Plena**, v. 9, p. 1-6, 2013.

SILVA, R. C.; DA MOTTA, M. A.; AMÂNCIO, F. F.; MELO, A. M. M. A. Efeitos do oxifluorfen na fecundidade e no teor de proteínas do caramujo *Biomphalaria glabrata*. **Pesticidas: Revista de Ecotoxicologia e Meio Ambiente**, v. 18, p. 73-82, 2008.

SMINIA, T.; VAN DER KNAAP, W. P. W.; VAN ASSELT, L. A. Blood cell types and blood cell formation in gastropod molluscs. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 7, p. 665-668, 1983.

SMITH, A. M.; GAO, X.; NIE, S. Quantum dot nanocrystals for *in vivo* molecular and cellular imaging. **Photochemistry and photobiology**, v. 80, p. 377-385, 2004.

STEPHANSEN, D. A.; NIELSEN, A. H.; HVITVED-JACOBSEN, T.; PEDERSEN, M. L.; VOLLERTSEN, J. Invertebrates in stormwater wet detention ponds—Sediment accumulation and bioaccumulation of heavy metals have no effect on biodiversity and community structure. **Science of the Total Environment**, v. 566-567, p. 1579-1587, 2016.

TALLARICO, L. F.; BORRELY, S. I.; HAMADA, N.; GRAZEFTE, V. S.; OHLWEILER, F. P.; OKAZAKI, K.; GRANATELLI, A. T.; PEREIRA, I. W.; PEREIRA, C. A. B.; NAKANO, E. Developmental toxicity, acute toxicity and mutagenicity testing in freshwater snails *Biomphalaria glabrata* (Mollusca: Gastropoda) exposed to chromium and water samples. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 110, p. 208-215, 2014.

TALLARICO, L. F. Freshwater Gastropods as a Tool for Ecotoxicology Assessments in Latin America. **American Malacological Bulletin**, v. 33, p. 330-336, 2015.

TALLARICO, L. F.; OKAZAKI, K.; KAWANO, T.; PEREIRA, C. A. B.; NAKANO, E. Dominant lethal effect of ⁶⁰Co gamma radiation in *Biomphalaria glabrata* (SAY, 1818). **Mutation Research**, v. 561, p. 139-145, 2004.

TAN, S. J.; JANA, N. R.; GAO, S.; PATRA, P. K.; YING, J. Y. Surface-ligand-dependent cellular interaction, subcellular localization, and cytotoxicity of polymer-coated quantum dots. **Chemistry of Materials**, v. 22, p. 2239-2247, 2010.

TANG, S.; CAI, Q.; CHIBLI, H.; ALLAGADDA, V.; NADEAU, J. L.; MAYER, G. D. (2013). Cadmium sulfate and CdTe-quantum dots alter DNA repair in zebrafish (*Danio rerio*) liver cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 272, p. 443-452, 2013.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). Integrated Risk Information System (IRIS) on Cadmium. National Center for Environmental Assessment, Office of Research and Development, Washington. 1999.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). Draft Update of Ambient Water Quality Criteria for Copper. **U. S. Environmental Protection Agency**, Washington, DC, p. 83. 2003.

USEPA (U.S. Environmental Protection Agency). Summary of biological assessment programs and biocriteria development for states, tribes, territories, and interstate commissions: streams and wadeable rivers. **U. S. Environmental Protection Agency**, Washington, D.C. 2002.

VILLELA, I.V.; OLIVEIRA, I. M.; SILVA, J.; HENRIQUES, J. A. P. DNA damage and repair in haemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants. **Mutation Research**, v. 605, p. 78-86, 2006.

YAN, L.; GU, Z.; ZHAO, Y. Chemical mechanisms of the toxicological properties of nanomaterials: generation of intracellular reactive oxygen species. **Chemistry–An Asian Journal**, v. 8, p. 2342-2353, 2013.

YANG, W.; YANG, H.; DING, W.; ZHANG, B.; ZHANG, L.; WANG, L.; ZHANG, Q. High quantum yield ZnO quantum dots synthesizing via an ultrasonication microreactor method. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 33, p. 106-117, 2016.

YE, L.; YONG, K. T.; LIU, L.; ROY, I.; HU, R.; ZHU, J.; CAI, H.; LAW, W.-C.; LIU, J.; WANG, K.; LIU, J.; LIU, Y.; HU, Y.; ZHANG, X.; SWIHART, M. T.; PRASAD, P. N. A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. **Nature Nanotechnology**, v. 7, p. 453-458, 2012.

YONG, K. T.; LAW, W. C.; HU, R.; YE, L.; LIU, L.; SWIHART, M. T.; PRASAD, P. N. Nanotoxicity assessment of quantum dots: from cellular to primate studies. **Chemical Society Reviews**, v. 42, p. 1236-1250, 2013.

YONG, K. T.; ROY, I.; DING, H.; BERGEY, E. J.; PRASAD, P. N. Biocompatible Near-Infrared Quantum Dots as Ultrasensitive Probes for Long-Term in vivo Imaging Applications. **Small**, v. 5, p. 1997-2004, 2009.

YONG, K. T.; WANG, Y.; ROY, I.; RUI, H.; SWIHART, M. T.; LAW, W. C.; KWAK, S. K.; YE, L.; LIU, J.; MAHAJAN, S. D.; REYNOLDS, J. L. Preparation of quantum dot/drug nanoparticle formulations for traceable targeted delivery and therapy. **Theranostics**, v. 2, p. 681-694, 2012.

WANG, B.; HE, X.; ZHANG, Z.; ZHAO, Y.; FENG, W. Metabolism of nanomaterials in vivo: blood circulation and organ clearance. **Accounts of chemical research**, v. 46, p. 761-769, 2013.

WANG, H.; JOSEPH, J. A. Mechanisms of hydrogen peroxide-induced calcium dysregulation in PC12 cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 28, p. 1222-1231, 2000.

WANG, Z.; JIA, J.; ZHU, M.; LI, X.; LIU, J.; WANG, Y.; ZHONG, H. Double network hydrogel embedded with *quantum dots*: Enhanced visual performance for holographic 3D display. **Synthetic Metals**, v. 222, p. 132-136, 2016.

WELLS, S. M.; CHATFIELD, J. E. Threatened non-marine molluscs of Europe. Strasbourg, France: Council of Europe Press, 1992.

WILLARD, D. M.; VAN ORDEN, A. Quantum dots: resonant energy-transfer sensor. **Nature materials**, v. 2, p. 575-576, 2003.

WU, R. S.; SIU, W. H.; SHIN, P. K. Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring. **Marine Pollution Bulletin**, v. 51, p. 623-634, 2005.

WU, X.; LIU, H.; LIU, J.; HALEY, K. N.; TREADWAY, J. A.; LARSON, J. P.; GE, N.; PEALE, F.; BRUCHEZ, M. P. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor *quantum dots*. **Nature biotechnology**, v. 21, p. 41-46, 2003.

ZAPATA, L. M.; BOCK, B. C.; OROZCO, L. Y.; PALACIO, J. A. Application of the micronucleus test and comet assay in *Trachemys callirostris* erythrocytes as a model for in situ genotoxic monitoring. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 127, p. 108-116, 2016.

ZENG, Q.; SHAO, D.; JI, W.; LI, J.; CHEN, L.; SONG, J. The nanotoxicity investigation of optical nanoparticles to cultured cells in vitro. **Toxicology Reports**, v. 1, p. 137-144, 2014.

ZHANG, F.; SUN, T. T.; ZHANG, Y.; LI, Q.; CHAI, C.; LU, L.; SHEN, W.; YANG, J.; HE, X. W.; ZHANG, Y. K.; LI, W. Y. Facile synthesis of functional gadolinium-doped CdTe quantum dots for tumor-targeted fluorescence and magnetic resonance dual-modality imaging. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 2, p. 7201-7209, 2014.

ZHANG, W.; LIN, K.; MIAO, Y.; DONG, Q.; HUANG, C.; WANG, H.; GUO, M.; CUI, X. Toxicity assessment of zebrafish following exposure to CdTe QDs. **Journal of hazardous materials**, v. 213, p. 413-420, 2012.

ZHANG, W.; RITTMANN, B.; CHEN, Y. Size effects on adsorption of hematite nanoparticles on *E. coli* cells. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 2172-2178, 2011.

ANEXO A - Normas para submissão a *Ecotoxicology and Environmental Safety*

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or lay-out that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. Mendeley Data, v1. <http://dx.doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions.

If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections.

Please ensure your paper has consecutive line numbering - this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file.

REVISED SUBMISSIONS

Use double spacing. All pages must be numbered, beginning with the abstract. All lines must be numbered, preferably continuously throughout the entire manuscript.

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Materials and methods should be sufficiently detailed to enable the experiments to be reproduced. It is mandatory to give formal assurance that any study involving humans or experimental animals were conducted in accordance with national and institutional guidelines for the *protection of human subjects and animal welfare*. No manuscript will be considered unless this information is supplied.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results/Discussion

Results should be clear and concise. Discussion should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a

subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531×1328 pixels (h $\times$ w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5×13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site.

Authors can make use of Elsevier's Illustration and Enhancement service to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements: Illustration Service.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet

points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). You can view example Highlights on our information site.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Formatting of funding sources

List funding sources in this standard way to facilitate compliance to funder's requirements:

Funding: This work was supported by the National Institutes of Health [grant numbers xxxx, yyyy]; the Bill & Melinda Gates Foundation, Seattle, WA [grant number zzzz]; and the United States Institutes of Peace [grant number aaaa].

It is not necessary to include detailed descriptions on the program or type of grants and awards. When funding is from a block grant or other resources available to a university, college, or other research institution, submit the name of the institute or organization that provided the funding.

If no funding has been provided for the research, please include the following sentence:

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Specially please note, the values reported on research papers should be limited to 3 significant figures, unless required otherwise. ppm or ppb are not accepted and this should be presented as mg/kg or g/kg. Centrifugation speed should be presented in x g, not rpm.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y. In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by exp. Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.** Please indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Text graphics

Text graphics may be embedded in the text at the appropriate position. See further under Electronic artwork.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

All citations in the text should refer to:

Single author: the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication; *Two authors*: both authors' names and the year of publication; *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown'

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged.

A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. Journal of Geophysical Research,

<http://dx.doi.org/10.1029/2001JB000884i>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/ecotoxicology-and-environmental-safety>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plug-ins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281-304.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please

refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). More information and a full list of supported databases.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. Full instructions.