



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
LABORATÓRIO DE QUÍMICA AMBIENTAL**



TESE DE DOUTORADO

AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO E PRATA

GLAUCIENE PAULA DE SOUZA MARCONE

ORIENTADOR: PROF. DR. WILSON DE FIGUEIREDO JARDIM

CAMPINAS 2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE
QUÍMICA DA UNICAMP**

M333a Marcone, Glauciene Paula de Souza.
Avaliação da ecotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio e prata / Glauciene Paula de Souza Marcone. – Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim.

Doutorado - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Química.

1. Nanopartículas. 2. Ecotoxicidade. 3. Dióxido de titânio. 4. Prata. I. Jardim, Wilson de Figueiredo. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. III. Título.

Título em inglês: Assessment of ecotoxicity of nanoparticles of titanium dioxide and silver

Palavras-chaves em inglês: Ecotoxicity, Titanium dioxide, Nanosilver,

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Doutor em Ciências

Banca examinadora: Prof. Dr. Wilson de Figueiredo Jardim (orientador), Antonio Aparecido Mozeto (DQ-UFSCar), Fábio Kummrow (UNIFESP-Diadema), Profa. Dra. Susanne Rath (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Solange Cadore (IQ-UNICAMP)

Data de defesa: 02/09/2011

Programa de Pós-Graduação: Química

DEDICATÓRIA

*À minha mãe, Cássia pelo exemplo de
Coragem, Paciência, Amizade e Amor.
E principalmente, por me ensinar
que errar faz parte
do aprendizado.*

*“O dia mais belo: hoje
A coisa mais fácil: errar
O maior obstáculo: o medo
O maior erro: o abandono
A raiz de todos os males: o egoísmo
A distração mais bela: o trabalho
A pior derrota: o desânimo
Os melhores professores: as crianças
A primeira necessidade: comunicar-se
O que traz felicidade: ser útil aos demais
O pior defeito: o mau humor
A pessoa mais perigosa: a mentirosa
O pior sentimento: o rancor
O presente mais belo: o perdão
o mais imprescindível: o lar
A rota mais rápida: o caminho certo
A sensação mais agradável: a paz interior
A maior proteção efetiva: o sorriso
O maior remédio: o otimismo
A maior satisfação: o dever cumprido
A força mais potente do mundo: a fé
As pessoas mais necessárias: os pais
A mais bela de todas as coisas: O AMOR!!!”
Madre Tereza de Calcutá*

AGRADECIMENTOS

- ❖ Ao meu Deus maravilhoso que através dos meus pais, José e Cássia se mostrou amoroso, acolhedor e me proporcionou uma vida repleta de possibilidades.
- ❖ Ao meu pai, por ser o meu primeiro educador e à minha mãe que sempre esteve do meu lado, me apoiou em todas as horas e me ensinou a ser gente.
- ❖ Ao meu tio, Marcos e a Garibaldi, que sempre me apoiaram e me incentivaram.
- ❖ Aos meus irmãos, Leninha, Márcia, Siele, Yure e Netinho por me incentivarem e me apoiarem nesta caminhada.
- ❖ Ao meu noivo, companheiro e amigo, Tiago Felix, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo apoio e amor.
- ❖ Aos amigos da catequese da igreja N. S^a do Rosário pela amizade e companheirismo.
- ❖ Aos queridos amigos que fiz em Campinas, Luiz, Tatiana, Cinthia, Flavinha e Solânea e aos que eu trouxe desde João Pessoa e me acompanharam em Campinas, Edson, Alessandra, Kristerson, Zeine e Nicola. Obrigada pela paciência em me ouvir nos momentos difíceis e por me darem sempre sábios e ricos conselhos.
- ❖ Ao pessoal da “pensão dos ratões”, principalmente, Tiago cocó, Eric, Max, Raphael e Sabrina que me proporcionaram um convívio familiar e de muito companheirismo durante este tempo em Campinas.
- ❖ Aos amigos do GIA e do LQA, Livia Paulia, Laiane, Benedito, Francisco, Juliana, Klécia e Matheus, Paula, Igor, Thiago, Iolana, Manassés, Cassiana,

Marco, Cristiane, Matheus, Amanda, e Diego pelo agradável convívio diário e apoio nos momentos difíceis.

- ❖ Aos funcionários do IQ, Isabel, Miguel e Gabriela (CPG), Raquel (DRX), Daniel (MEV), Carlos (MET), Mirian e Eraldo (Ensino) pela cordialidade e atenção durante a realização da minha parte experimental.
- ❖ Ao LABSAM-FEC, pela colaboração no cultivo e armazenamento das culturas de bactérias utilizadas neste trabalho. Em especial ao Fernando, pela disponibilidade e cordialidade.
- ❖ À Graciete, pela amizade, além da disponibilidade, discussões científicas e apoio na parte experimental deste trabalho.
- ❖ À Ándrea Oliveira e ao professor Jarbas Rohwedder pela atenção e disponibilidade para me ajudar na parte experimental deste trabalho, bem como nas discussões científicas.
- ❖ Ao LEAL-FT pelo apoio e auxílio essencial na execução dos testes ecotoxicológicos. Agradeço especialmente à Ádria, Gilberto, Anjaína e Mariana pela disponibilidade, cordialidade, amizade e atenção.
- ❖ À professora Gisela A. Umbuzeiro, coordenadora do LEAL-FT pela colaboração científica, discussões, conselhos, paciência e pelo incentivo.
- ❖ Ao professor Wilson F. Jardim, pelos ensinamentos e por me dar a oportunidade de trabalhar no LQA.
- ❖ À UNICAMP por oferecer a oportunidade e dar as condições necessárias para o desenvolvimento do meu trabalho e por me proporcionar uma formação de qualidade.
- ❖ À CAPES e à FAPESP pelas bolsas concedidas e pelo suporte financeiro para a realização do trabalho.

CURRICULUM VITAE

Glauciene Paula de Souza Marccone

Formação Acadêmica (Técnico, Graduação e Pós-Graduação)

2007 -2011 – Doutorado em Ciências. Área de Química Analítica: Ambiental. Instituto de Química. UNICAMP. Título: Avaliação da ecotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio e prata. Orientação do Prof. Dr. Wilson F. Jardim. Bolsista CAPES (Maio a Junho 2007) e FAPESP (julho 2007 a junho 2011).

2002 – 2006 - Graduação em Química Licenciatura. UFPB.

2004 – 2006 - Mestrado em Química. CCEN/ UFPB. Título: Implementação de Ponderação Baseada em IQAs na Análise Exploratória (HCA e PCA) para Estudos de Qualidade de Água. Orientação do Prof. Dr. Mário C. U. Araújo. Co-orientação do Prof. Dr.: Wallace Duarte Fragoso. Bolsista CAPES (Março 2004 a Agosto 2006).

1999 – 2004 Graduação em Química Industrial. UFPB.

1995 - 1999 Ensino Profissional de Nível Técnico. Curso: Saneamento. CEFET/ PB.

Produção científica

Iniciação científica: Projetos

Determinação do Teor de Princípios Ativos em Comprimidos Farmacêuticos Usando Espectroscopia NIR, Seleção de Variáveis e Calibração Multivariada. PIBIC/ CNPq, UFPB. Agosto/ 2003 a agosto/ 2004.

Desenvolvimento de um Sistema Automático de Titulação em Fluxo em Configuração “Chase Zones” para Determinação de Acidez em Vinhos. PIBIC/ CNPq, UFPB Abril/ 2003 a junho/ 2003.

Projeto: 0081/ 0-1 CAPES-PROCAD/ INSTRUMENTAÇÃO E METODOLOGIAS ESPECTROANALÍTICAS. Local: Laboratório de Engenharia Ambiental e da Qualidade (DEQ)/ Departamento de Engenharia Química/ Centro de Tecnologia e Geociências/ UFPE. Período: 01/07/2006 a 30/08/2006.

Últimos trabalhos científicos apresentados em congressos:

Avaliação da ecotoxicidade de nanopartículas de prata de diferentes graus de aglomeração aos organismos teste *V. fischeri* e *D. similis*. **34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**, Florianópolis, 2011.

Influência da fotoatividade de nanopartículas de TiO₂ em testes de ecotoxicidade com *Daphnia similis*. **V Encontro Nacional de Química Ambiental**, Estância de São Pedro, 2010.

Synthesis, characterization and speciation of nanosilver: implications in ecotoxicological assays. **Nanosafe 2010**, Grenoble., 2010.

Toxicidade de nanopartículas de prata para as bactérias *Escherichia coli* e *Vibrio fischeri*. **V Encontro Nacional de Química Ambiental**, Estância de São Pedro, 2010.

Toxicidade aguda de nanopartículas de prata frente à *Daphnia similis*. **XI Congresso Brasileiro de Ecotoxicologia**, Bombinhas, 2010.

Determinação de DQO em Esgoto Doméstico Usando Espectrometria NIR e Quimiometria. **14ª ENQA - Encontro Nacional de Química Analítica**, João Pessoa, 2007.

Artigos publicados

Hardness screening of water using a flow-batch photometric system. Analytica Chimica Acta, Holanda, v.518, p. 25-30, 2004.

A method for determination of COD in a domestic wastewater treatment plant by using near-infrared reflectance spectrometry of seston. Analytica Chimica Acta, 2007. doi: 10.1016/j.aca.2007.02.022

Determination of chemical oxygen demand in domestic wastewater by near infrared spectrometry of seston and partial least squares calibration. NIR News, v. 19, p. 08-09, 2008.

Os nanomateriais e a questão ambiental. Química Nova (Online). , v.33, p.421 - 430, 2010.

Artigo submetido

Ecotoxicity of TiO₂ to Daphnia similis under irradiation. Submetido em julho de 2011 ao *Journal Hazardous Materials*.

Prêmio/ Capítulo de livro

Determinação do teor de princípios ativos em comprimidos farmacêuticos usando espectroscopia NIR, seleção de variáveis e calibração multivariada. Cap. 2, 67-78. Iniciados v.11, UFPB, João Pessoa, 2006.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO E PRATA

O principal objetivo deste trabalho foi estudar as interações de nanopartículas de Ag ou nanoprata (nAg ou AgNP) e nanopartículas do semicondutor TiO_2 (n TiO_2) com a matriz aquática, a fim de avaliar a sua toxicidade a representantes da biota aquática. Estes dois tipos de nanomateriais (NM) foram escolhidos, pois atualmente estão sendo comercializados em grande escala por apresentarem ampla aplicação industrial. Este trabalho envolveu as seguintes etapas: **a)** síntese de TiO_2 na forma de pó e de amostras de AgNP por rotas sintéticas estabelecidas pela literatura; **b)** caracterização dos NM sintetizados quanto ao tamanho e a morfologia, e no caso das suspensões de AgNP foi realizada a especiação da prata a fim de nortear uma avaliação mais criteriosa sobre ecotoxicidade destas suspensões; **c)** avaliação da atividade bactericida das amostras de AgNP e do TiO_2 sintetizados. Para isto, utilizou-se a bactéria *E. coli* e um sistema FIA/Condutimétrico para medir a inibição bacteriana através da produção de CO_2 . **d)** avaliação da ecotoxicidade das suspensões de AgNP e TiO_2 no meio aquático. Foram utilizados os organismos aquáticos: *V. fischeri* (bactéria marinha), *D. similis* (microcrustáceo de água doce) e *P. subcapitata* (alga de água doce). Devido à fotoatividade do TiO_2 , os testes com *D. similis* foram adaptados, incorporando a radiação UV-A durante o teste. As amostras de AgNP foram tóxicas aos organismos aquáticos testados nas seguintes faixas de concentração: *P. subcapitata* ($\text{IC}_{50} = 1\text{-}122 \mu\text{g L}^{-1}$), *D. similis* ($\text{CE}_{50} = 0,5\text{-}50 \mu\text{g L}^{-1}$) e *V. fischeri* ($\text{CE}_{50} = 5,2\text{-}32,2 \text{ mg L}^{-1}$). As amostras de TiO_2 se mostraram mais tóxicas para a *D. similis* ($\text{CE}_{50} = 8\text{-}57 \text{ mg L}^{-1}$) em relação ao *V. fischeri* ($\text{CE}_{50} > 100 \text{ mg L}^{-1}$). A caracterização das amostras de TiO_2 e AgNP sintetizadas indicou que fatores como fotoatividade do TiO_2 e a concentração de íons Ag^+ nas suspensões de AgNP foram determinantes para a ecotoxicidade apresentada por estas amostras.

ABSTRACT

ASSESSMENT OF ECOTOXICITY OF NANOPARTICLES OF TITANIUM DIOXIDE AND SILVER

The objective of this work was to evaluate the toxicity of silver nanoparticles or nanosilver (nAg or AgNP) and TiO₂ semiconductor nanoparticles to some biotic representative aquatic organisms. These two nanomaterials (NM) types were chosen because they are currently being market on a large scale due to their wide industrial application. The work was developed in accordance to the following steps: **a)** Synthesis of TiO₂ powder and AgNP samples by current synthetic routes. **b)** Shape, morphology and optical characterization of TiO₂ powder and AgNP synthesized samples. The Ag speciation was performed in the AgNP suspensions to improve the ecotoxicological assessment of this material; **c)** Bactericidal activity assessment of TiO₂ and AgNP samples using *E. coli*. The inhibition of the bacterial growth was followed by CO₂ produced using a FIA/Conductivity system; **d)** Ecotoxicity assessment of TiO₂ and AgNP suspensions to aquatic organisms. The aquatic organisms used were *V. fischeri* (marine bacterium), *D. similis* (microcrustace freshwater) and *P. subcapitata* (algae freshwater). Due to the TiO₂ photoactivity, the tests with *D. similis* were adapted by include to UV-A radiation during the whole test period. The results showed that AgNP samples were toxic to aquatic organisms in the following ranges: *P. subcapitata* (CI50 = 1-122 µg L⁻¹), *D. similis* (EC50 = 0.5-50 µg L⁻¹) and *V. fischeri* (EC50 = 5.2-32.2 mg L⁻¹). The TiO₂ samples were more toxic to the *D. similis* (EC50 = 8-57mg L⁻¹) compared to *V. fischeri* (CE50 > 100 mg L⁻¹). The characterization of TiO₂ and AgNP synthesized samples indicated that factors such as TiO₂ photoactivity and Ag⁺ ions concentration in AgNP suspensions were responsible to the ecotoxicity showed by this samples.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIações	xxi
LISTA DE TABELAS	xxiv
LISTA DE FIGURAS	xxvi
APRESENTAÇÃO	1
PARTE I – INTRODUÇÃO	5
CAPÍTULO 1	7
1 INTRODUÇÃO	7
1.1 Aspectos Gerais	7
1.2 Nanopartículas e nanomateriais no ambiente	9
1.2.1 Produção de nanomateriais e riscos potenciais da nanotecnologia à saúde humana e ao ambiente	13
1.2.2 Prata	16
1.2.2.1 Mecanismo de ação da nanoprata em organismos vivos e propriedade bactericida	17
1.2.2.2 Prata no ambiente	21
1.2.3 Dióxido de titânio	22
1.3 Regulamentação dos nanomateriais	25
2 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	26
3 OBJETIVOS	29
PARTE II - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TiO₂ E AgNP	
E AgNP	31
CAPÍTULO 2	33
2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TiO ₂ E AgNP	33
2.1 INTRODUÇÃO	33
2.2 OBJETIVOS	36
2.3 EXPERIMENTAL	37
2.3.1 Síntese das amostras de TiO ₂ e AgNP	37
2.3.1.1 Síntese das amostras de TiO ₂	39
2.3.1.2 Síntese das amostras de AgNP	40

2.3.2	Caracterização dos nanomateriais em estudo -----	44
2.3.2.1	Espectroscopia na região do infravermelho -----	44
2.3.2.2	Espectroscopia UV-Visível -----	44
2.3.2.3	Espectroscopia de reflectância difusa na região UV-visível	45
2.3.2.4	Microscopia eletrônica de varredura -----	45
2.3.2.5	Difração de raios-x -----	45
2.3.2.6	Área superficial -----	45
2.3.3	Especiação da prata nas amostras de AgNP -----	46
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	47
2.4.1	Caracterização das amostras de TiO ₂ comercial e sintetizado -	47
2.4.1.1	Estudo vibracional -----	47
2.4.1.2	Cristalinidade, tamanho, área superficial e morfologia -----	48
2.4.1.3	Propriedades ópticas -----	54
2.4.2	Caracterização das suspensões de AgNP -----	57
2.4.2.1	Estabilidade das amostras de AgNP com nanopartículas esféricas -----	59
2.4.2.2	Caracterização das suspensões de AgNP com diferentes graus de aglomeração -----	61
2.4.3	Especiação da prata nas amostras de AgNP -----	66
2.4.3.1	Quantificação da prata total -----	66
2.4.3.2	Quantificação dos íons Ag ⁺ -----	67
2.5	CONCLUSÕES -----	71
PARTE III AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DAS		
AMOSTRAS DE TiO₂ E AgNP -----		73
CAPÍTULO 3 -----		75
3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DAS AMOSTRAS DE		
TiO₂ E AgNP -----		75
3.1 INTRODUÇÃO -----		75
3.1.1 Testes utilizando <i>E. coli</i> -----		77
3.2 OBJETIVOS -----		79
3.3 EXPERIMENTAL -----		80

3.3.1 Teste empregado para avaliar a atividade bactericida das amostras de TiO ₂ e das suspensões de AgNP -----	80
3.3.1.1 Parâmetros medidos no teste -----	85
3.3.1.2 Quantificação da concentração de CO ₂ -----	85
3.3.1.3 Cálculo do tempo de duplicação (t _d) -----	85
3.3.1.4 Cálculo da concentração efetiva (CE) -----	86
3.3.2 Amostras de TiO ₂ e AgNP testadas -----	87
3.3.3 Adaptação no sistema FIA/Condutimétrico para explorar a fotoatividade das nanopartículas de TiO ₂ -----	87
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	89
3.4.1 Avaliação da capacidade bactericida das amostras de AgNP ---	89
3.4.2 Toxicidade dos componentes utilizados na síntese das amostras de AgNP -----	95
3.4.3 Avaliação da capacidade bactericida das amostras de TiO ₂ -----	96
3.5 CONCLUSÕES -----	103
PARTE IV ECOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS DE TiO₂ E AgNP -----	105
CAPÍTULO 4 -----	107
4. AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS DE TiO ₂ E AgNP -----	107
4.1 INTRODUÇÃO -----	107
4.1.1 - Testes de ecotoxicidade -----	108
4.2 OBJETIVOS -----	110
4.3 EXPERIMENTAL -----	111
4.3.1 Amostras de TiO ₂ e AgNP testadas -----	111
4.3.2 Estudo da influência do meio de cultivo dos organismos teste sobre as suspensões de AgNP -----	112
4.3.3 Toxicidade dos componentes utilizados na síntese das suspensões de AgNP -----	114
4.3.4 Ensaio utilizando com a bactéria marinha <i>V. fischeri</i> -----	114
4.3.4.1 Protocolo para os testes com o <i>V. fischeri</i> -----	116
4.3.5 Ensaio utilizando o microcrustáceo <i>D. similis</i> -----	118

4.3.5.1 Protocolo para os testes com <i>a D. similis</i> -----	119
4.4.5.2 Fotoatividade do TiO ₂ : teste com <i>D. similis</i> sob as radiações UV-A e visível -----	120
4.3.6 Ensaio utilizando a alga <i>P. subcapitata</i> -----	123
4.3.6.1 Protocolo para os testes com <i>a P. subcapitata</i> -----	124
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO -----	126
4.4.1 Ecotoxicidade das nanopartículas de TiO ₂ frente à <i>D. similis</i> e ao <i>V. fischeri</i> -----	126
4.4.1.1 Ecotoxicidade à <i>D. similis</i> -----	126
4.4.1.2 Ecotoxicidade ao <i>V. fischeri</i> -----	132
4.4.2 Ecotoxicidade das amostras de AgNP frente à <i>P. subcapitata</i> , <i>D. similis</i> e <i>V. fischeri</i> -----	132
4.4.2.1 Ecotoxicidade à <i>P. subcapitata</i> -----	133
4.4.2.2 Ecotoxicidade à <i>D. similis</i> -----	138
4.4.2.3 Ecotoxicidade ao <i>V. fischeri</i> -----	141
4.4.3 Ecotoxicidade dos estabilizantes utilizados na síntese das suspensões de AgNP -----	147
4.5 CONCLUSÕES -----	148
PARTE V CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS -----	151
CAPÍTULO 5 -----	153
5 CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS -----	153
PARTE VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	159
CAPÍTULO 6 -----	161
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	161

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ABDI Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial.

ABNT Associação Brasileira de Normas Técnicas

AgNP Nanopartículas de prata

Anatase-S Amostra sintetizada de TiO_2 na fase anatase

BC Banda de condução de um semicondutor

BV Banda de valência de um semicondutor

CE50 Concentração efetivamente tóxica para 50% da população teste

COV Compostos orgânicos voláteis

CST *Council for Science and Technology*

DDT Dicloro-difenil-tricloroetano

DNA *Deoxyribonucleic acid*

DRX Difração de raios-X

EIS Eletrodo íon seletivo

EPA *Enviromental Protection Agency*

ERD UV-Visível Espectroscopia de reflectância difusa na região UV-Visível

ETA Estação de tratamento de água

ETE Estação de tratamento de esgoto

eV eletron Volt

FIA Análise por Injeção em Fluxo

HPA Hidrocarbonetos poliaromáticos

ICP-AES Espectrometria de emissão em plasma acoplado indutivamente

ISO *International Organization for Standardization*

IV Infravermelho

MCE Meio de cultura estéril

MET Microscopia eletrônica de transmissão

MEV Microscopia eletrônica de varredura

M-S Mistura das amostras sintetizadas de TiO₂ na fase anatase e rutilo

nAg Nanopartículas de prata

nanoprata Nanopartículas de prata

NM Nanometariais manufaturados

NSCT *National Science and Technology Council*

nTiO₂ Nanopartículas de TiO₂

OECD *Organization for Economic Co-operation and Development*

P25 TiO₂ DEGUSSA

P25* TiO₂ P25 DEGUSSA na fase rutilo

PEN *The Project Emerging Nanotechnologies*

PM *Particulate material*

POA Processos Oxidativos Avançados

POP Produtos orgânicos persistentes

REACH CA *Registration, Evaluation, Authorisation & Retriction of CHemicals
Competent Authorities*

ROS Espécies reativas de oxigênio

RS/RAEng *Royal Society and Royal Academy of Engineers*

Rutilo-S Amostra sintetizada de TiO₂ na fase rutilo

S_{BET} Área superficial específica pelo método Brunauer-Emmet-Teller

UFC Unidade formadora de colônia

UV Ultravioleta

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Razões molares $[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3]$ utilizadas nas sínteses das amostras de AgNP. -----	42
Tabela 2.2 - Razões molares $[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3]$ utilizadas nas sínteses das amostras de AgNP. -----	43
Tabela 2.3 - Condições de operação do instrumento para a determinação do Ag total nas amostras de AgNP. -----	46
Tabela 2.4 - Valores de % da fase cristalina, tamanho do cristalito e S_{BET} nas amostras de TiO_2 . -----	51
Tabela 2.5 - Resultados da determinação da concentração de Ag total nas amostras de AgNP sintetizadas. -----	66
Tabela 2.6 - Resultados da determinação da concentração de nAg e Ag^+ nas amostras de AgNP sintetizadas. -----	69
Tabela 2.7 - Amostras de TiO_2 e AgNP utilizadas na avaliação da atividade bactericida e nos testes ecotoxicológicos. -----	71
Tabela 3.1 - Informações sobre as amostras utilizadas nos ensaios com <i>E. coli</i> e resultados das concentrações que causam ou não inibição da respiração bacteriana. -----	91
Tabela 3.2 - Valores de porcentagem de inibição na respiração da <i>E. coli</i> para o P25, sob Irradiação UV com potência 6 W e intensidade de radiação de $0,08 \text{ m W cm}^{-2}$. -----	99
Tabela 4.1 - Concentrações de suspensões de nAg utilizadas nos testes ecotoxicológicos. -----	112
Tabela 4.2 - Composições da água de cultivo da <i>P. subcapitata</i> (ABNT 2005) e da <i>D. similis</i> (CETESB L5.018/1994). -----	113
Tabela 4.3 - Resultados dos testes de toxicidade expressos como CE50 para as amostras P25, M-S, Anatase-S e Rutilo-S sob a radiação UV-A.---	130

Tabela 4.4 - Valores de CI50 obtidos e % Ag ⁺ para as amostras de AgNP e AgNO ₃ testadas. -----	134
Tabela 4.5 - Valores de CE50 e % Ag ⁺ obtidos para as amostras de AgNP e AgNO ₃ testadas no ensaio com <i>D. similis</i> . -----	139
Tabela 4.6 - Valores de CE50 e % Ag ⁺ obtidos para as amostras de AgNP e AgNO ₃ testadas no ensaio com <i>V. fischeri</i> . -----	142

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Comparação de tamanho entre estruturas na escala manométrica e micrométrica. -----	8
Figura 1.2 - Classificação dos nanomateriais de acordo com suas propriedades físico químicas. -----	10
Figura 1.3 - Principais fontes, rotas de exposição e processos de interação das nanopartículas com o ambiente e organismos vivos. -----	11
Figura 1.4 - Principais fenômenos de modificação das nanopartículas quando em contato com o ambiente ou organismos vivos. -----	12
Figura 1.5 - Número total de produtos contendo algum NM, listados no inventário elaborado pelo PEN (2010). -----	14
Figura 1.6 - Categorias e número aproximado de produtos que utilizam NM. -----	15
Figura 1.7 - Número de produtos associados a um NM específico, listados no inventário elaborado pelo PEN (2010). -----	16
Figura 1.8 - Imagens de MET dos embriões de <i>P. promelas</i> A) parte externa da superfície dos embriões sem tratamento com nAg (controle) B e C) controles da parte interna dos embriões D) nAg agregadas na parte de fora da membrana E e F) agregados nAg no interior do embrião G-I) Aglomerados isolados no interior do embrião. -----	18
Figura 1.9 - Imagens das células de <i>E. coli</i> a) sem tratamento com nAg e b) com tratamento com nAg. -----	19
Figura 1.10 - Imagens das células de <i>E. coli</i> A) sem tratamento com nAg ou Ag^+ B) tratadas com Ag^+ ($AgNO_3$) C) tratamento com nAg triangulares D) tratamento com nAg esféricas E) Detalhe amplificado da membrana tratada com nAg triangular onde ocorreu maior dano. -----	20
Figura 1.11 - Formas alotrópicas do TiO_2 : a) anatase, b) rutilo. -----	22
Figura 1.12 - Número de trabalhos publicados de 1990 a 2011 envolvendo nanomateriais. -----	27

Figura 2.1 - Mecanismo de formação de nAg a partir da redução química do AgNO ₃ . -----	34
Figura 2.2 - Suspensões de AgNP com diferentes graus de agregação. ----	34
Figura 2.3 - Estrutura dos agentes estabilizantes utilizados. -----	41
Figura 2.4 - Espectros na região do infravermelho das amostras de TiO ₂ , exceto para a amostra Rutilo-S. -----	48
Figura 2.5 - Difractogramas de Raios-X para as amostras de n TiO ₂ . Formas cristalinas (•) Anatase e (♦) Rutilo. -----	49
Figura 2.6 - Micrografias das amostras P25, P25*, Rutilo-S, Anatase-S ampliadas 30000x e M-S ampliada 50000x. -----	52
Figura. 2.7 - Micrografias de MET das amostras de TiO ₂ , exceto para a amostra P25*. -----	54
Figura 2.8 - Espectros ERD UV-Visível das amostras de TiO ₂ . -----	55
Figura 2.9 - Espectros de refletância transformados pelo método Kubelka-Munk para amostras de TiO ₂ . -----	56
Figura 2.10 - Espectros de absorção UV-Visível das amostras de TiO ₂ . --	57
Figura 2.11 - Amostras de AgNP após 60 dias de sua síntese (a) Ag-PVA (b) Ag-CMC; (c) Ag-citrato; (d) Ag2-PVA; (e) Ag2-CMC. -----	57
Figura 2.12 - Espectros UV-Vísível para as amostras Ag-PVA, Ag-CMC, Ag-citrato, Ag2-PVA e Ag2-CMC. -----	58
Figura 2.13 - Espectros de absorção UV-Visível das amostras de AgNP, AgPVA, Ag2PVA, AgCMC e Ag2CMC, sintetizadas em maio de 2008. ---	60
Figura 2.14 - Aspecto visual das amostras de AgNP sintetizadas. Na ordem da esquerda para a direita observa-se que o grau de aglomeração das nAg diminui.-----	61
Figure 2.15 - Espectros de absorção UV-Visível das amostras de AgNP, 1P, 2P, 3C, 4C e 5C e 6P que apresentaram diferentes graus de aglomeração. -----	62
Figura 2.16 - Micrografias me microscopia eletrônica de transmissão das amostras 5C e 6P e a distribuição de tamanho de partícula da amostra	

5C. -----	63
Figura 2.17 - Micrografias me microscopia eletrônica de transmissão da amostra 2P. -----	64
Figura 2.18 - Micrografias me microscopia eletrônica de transmissão da amostra 1P nas escalas de 200, 100 e 50 nm. -----	65
Figura 2.19 - Curva analítica para a determinação de Ag^+ utilizando potenciometria direta. Nesta curva foram considerados os valores médios das respostas em mV para cada padrão de Ag^+ utilizado. -----	67
Figura 2.20 - Curva analítica para a determinação de Ag^+ utilizando potenciometria direta. -----	68
Figura 2.21 - Especificação da prata nas amostras de nAg. * Valores das razões molares utilizadas na síntese das nAg. -----	70
Figura 3.1 - Fases de crescimento bacteriano. -----	76
Figura 3.2 - Ilustração da bactéria <i>E. coli</i> . -----	77
Figura 3.3 – Tubos de quartzo e a sua disposição dentro do banho termostatizado -----	83
Figura 3.4 - Banho termostatizado contendo A) tubos de quartzo e a sua disposição dentro do banho B) sistema de iluminação e a lâmpada UV-A introduzida no banho termostatizado. -----	89
Figura 3.5 - Detalhes dos tubos de quartzo (A) de parede única e (B) de parede dupla utilizados nos ensaios com iluminação. -----	89
Figura 3.6 - Micrografia de MET das partículas esféricas de Ag-citrato. (A) Dispersão das nanopartículas de prata e (B) distribuição de tamanho destas nanopartículas. -----	90
Figura 3.7 - Crescimento da <i>E. Coli</i> em suspensões contendo diferentes concentrações de nanopartículas de Ag-citrato. -----	90
Figura 3.8 - Crescimento da <i>E. coli</i> medido em função da sua respiração em 180 (± 20) minutos de ensaio. -----	92
Figura 3.9 - Crescimento da <i>E. coli</i> medido em função da sua respiração em 180 (± 20) minutos de ensaio. -----	93

Figura 3.10 - Espectros UV-Vísivel para as amostras A) Ag-PVA e Ag2-PVA B) Ag-CMC e Ag2-CMC registrados na época dos ensaios realizados com a <i>E.coli</i> . -----	94
Figura 3.11 - Crescimento da <i>E. coli</i> em função da concentração da amostra P25 (1 e 50 mg L ⁻¹). Onde: Ci= controle inicial e Cf= controle final. -----	97
Figura 3.12 - Crescimento da <i>E. coli</i> em função da concentração da amostra P25 (5000 e 1000 mg L ⁻¹). Onde: Ci= controle inicial e Cf= controle final. -----	98
Figura 3.13 - Valores de % Inibição da <i>E. coli</i> frente ao P25 nas concentrações de 500 e 1000 mg L ⁻¹ , sob intensidade de radiação UV-A 0,08 e 0,2 m W cm ⁻² . -----	99
Figura 3.14 - Valores de % Inibição da <i>E. coli</i> utilizando TiO ₂ anatase (P25) e rutilo (P25*) nas concentrações de 500 e 1000 mg L ⁻¹ , sob radiação UV-A de intensidade 0,2 m W cm ⁻² e no escuro. -----	100
Figura 3.15 - Espectro de emissão da lâmpada de vapor de mercúrio de 150 W de potência. -----	101
Figura 3.16 - Crescimento da <i>E. coli</i> em função da concentração de TiO ₂ e iluminação com a lâmpada de vapor de mercúrio. Onde: Ci = controle inicial e Cf = controle final. -----	102
Figura 4.1 - Ilustração da bactéria marinha <i>V. fischeri</i> . http://microbewiki.kenyon.edu/images/c/c9/Vibrio_fischeri_1145457864.jpg -----	115
Figura 4.2 - Ilustração do luminômetro BIOFIX® LUMI-10 utilizado nos testes com o <i>V. fischeri</i> . Fonte: www.hellotrader.com -----	116
Figura 4.3 - Ilustração do microcrustáceo <i>D. similis</i> . Imagem cedida pelo LEAL-FT-UNICAMP. -----	119
Figura 4.4 - Detalhe dos reatores construídos para os ensaios de ecotoxicidade com a <i>D. similis</i> e as amostras de TiO ₂ . -----	121
Figura 4.5 - Ilustração dos reatores utilizados nos ensaios com a <i>D. similis</i> e as amostras de TiO ₂ . -----	122

Figura 4.6 - Espectros de emissão lâmpadas fluorescentes UV-A e visível. -----	122
Figura 4.7 - Ilustração da alga <i>P. subcaptata</i> . Fonte: http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/images/strainsimage/nies-0035.jpg -----	124
Figura 4.8 - Ilustração de uma microplaca utilizada no ensaio com algas. -----	125
Figura 4.9 - Valores de % imobilidade da <i>D. similis</i> às amostras de TiO ₂ nas concentrações de 0 a 100 mg L ⁻¹ , cujos ensaios ocorreram (a) sem iluminação, (b) sob radiação UV-A e (c) sob radiação Visível. -----	128
Figura 4.10 - Espectros UV-Visível das amostras de TiO ₂ utilizadas nos ensaios com <i>D. similis</i> . -----	129
Figura 4.11 - Curvas dose-resposta para P25, M-S e Anatase-S obtidas em 48 h de exposição à <i>D. similis</i> . São apresentadas as barras de erro para cada concentração (n=4). -----	131
Figura 4.12 - Curvas-dose respostas para as amostras 6P, 2P, 1P, 3C e AgNO ₃ . -----	134
Figura 4.13 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para as amostras de AgNP. Escala: 200 nm. -----	135
Figura 4.14 - Espectros de absorção UV-Visível das amostras de AgNP em (A) água ultra pura e no (B) meio de cultivo da <i>P. subcapitata</i> . -----	137
Figura 4.15 - Relação entre o aumento da toxicidade para a <i>P. subcapitata</i> e a % de íons Ag ⁺ nas suspensões de AgNP. -----	138
Figura 4.16 - Espectros de absorção UV-Visível das amostras de AgNP em (A) água ultra pura e no (B) meio de cultivo da <i>D. similis</i> . -----	140
Figura 4.17 - Comportamento das amostras de AgNP ao adicionar NaCl 22% (m/v). -----	143
Figura 4.18 - Espectros de absorção UV-visível das amostras de AgNP em (A) água ultra pura e (B) ao adicionar NaCl 22% (m/v); utilizou-se NaCl como branco. -----	143
Figura 4.19 - Curvas dose-resposta das amostras 1P e 3C obtidas nos testes com <i>V. fischeri</i> . Os resultados mostram a média de 3 replicatas. ---	145
Figura 4.20 - Curva dose-resposta da amostra 4C obtida no teste com <i>V.</i>	

fischeri. Para cada concentração foram usados os valores médios de %
efeito para n = 3. ----- 146

Figura 4.21 - Curvas dose-resposta das amostras 6P, 5C e 2P obtidas
nos testes com *V. fischeri*. ----- 147

APRESENTAÇÃO

APRESENTAÇÃO

Esta tese é apresentada em quatro partes distribuídas em seis capítulos que relatam as etapas desenvolvidas neste trabalho, o qual explora vários aspectos sobre a avaliação da ecotoxicidade de amostras contendo nanopartículas de prata ou nanoprata (nAg ou AgNP) e de amostras de dióxido de titânio contendo nanopartículas de TiO_2 (n TiO_2).

A primeira parte (capítulo 1) aborda o contexto atual e a relevância da questão ecotoxicológica que envolve nanomateriais (NM), incluindo Ag e TiO_2 , justificando a realização deste trabalho. São apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos que se pretenderam atingir.

O segundo capítulo reporta a síntese e caracterização dos nanomateriais estudados. Na caracterização das suspensões de AgNP sintetizadas investigou-se a influência do estabilizante utilizado sobre a estabilidade das nanopartículas obtidas, além da especiação da prata, com o intuito de elucidar as respostas ecotoxicológicas obtidas.

O terceiro capítulo está centrado na avaliação da atividade bactericida da nAg e do n TiO_2 , sendo utilizada nos testes a bactéria *E. coli*. Nos ensaios envolvendo nanopartículas de TiO_2 foi incorporada a radiação UV-Visível durante o teste, a fim de avaliar sua característica fotocatalítica.

O quarto capítulo trata dos testes ecotoxicológicos aplicando os NM estudados aos seguintes organismos representantes da biota aquática: *Pseudokirchneriella subcapitata* (alga), *Daphnia similis* (microcrustáceo) e *Vibrio fischeri* (bactéria marinha). Neste capítulo é descrita a modificação do teste com a *Daphnia similis* e as amostras de TiO_2 realizada com o intuito de explorar a fotoatividade deste semicondutor. São apresentados os resultados obtidos nos ensaios de ecotoxicidade das amostras de TiO_2 à *Daphnia similis* e ao *Vibrio fischeri* e das suspensões de AgNP aos organismos *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia similis* e *Vibrio fischeri*. É avaliada a influência da água de cultivo de cada um destes organismos sobre as suspensões de AgNP, a fim de perceber mudanças na estabilidade das nAg, bem como identificar se ocorreu

aglomeração ou mudança em seu estado de oxidação. E desta forma, inferir sobre os mecanismos de toxicidade envolvidos.

O quinto capítulo traz as conclusões gerais e as perspectivas futuras a respeito do trabalho realizado. No capítulo 6 estão as referências que foram utilizadas como suporte bibliográfico para a elaboração deste trabalho.

PARTE I

INTRODUÇÃO

CAPÍTULO 1

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - ASPECTOS GERAIS

A busca da sociedade atual por um modo de vida mais confortável acarretou nos últimos 30 anos, um crescimento significativo das atividades industriais, na produção de alimentos, ocupação desordenada das cidades e no consumo de combustíveis fósseis. A combinação destes fatores originou o quadro atual de poluição dos compartimentos ambientais: a água, o solo e o ar. Perturbações constantes nos ciclos biogeoquímicos têm causado um desequilíbrio entre esses compartimentos. Isto gera danos ambientais significativos, dentre os quais, destacam-se o acúmulo de materiais persistentes e bioacumulativos no solo, nos sistemas aquáticos, incluindo o sedimento, além da grande quantidade de material particulado na atmosfera (Rocha *et al.* 2004).

Os compostos contendo metais (*e.g.* Hg, Cd, Al e Pb), dioxinas e produtos orgânicos persistentes (POP), como os agrotóxicos, têm se destacado como as substâncias químicas mais estudadas ambientalmente, no que se refere à sua quantificação, especiação e fracionamento em matrizes ambientais (Macedo 2002).

Estudos toxicológicos e ecotoxicológicos envolvendo a maioria dos poluentes químicos citados têm sido amplamente realizados. Os resultados têm mostrado que, em contato com o ambiente natural estes compostos podem causar sérios desequilíbrios e, dependendo da sua bioacumulação ou biopersistência, podem através da cadeia alimentar, atingir o homem.

Com o advento da nanotecnologia tem crescido nos últimos anos o interesse pela investigação dos efeitos deletérios ao ambiente e à saúde humana de uma nova classe de contaminantes emergentes, os nanomateriais manufacturados (NM).

A nanotecnologia e a nanociência envolvem o entendimento e o controle da matéria que apresenta pelo menos uma dimensão na escala de 1 a 100 nm e que tem possibilitado novas aplicações quando comparada ao material sólido massivo (do inglês *bulk*), devido às suas propriedades químicas e físicas (Federici *et al.* 2007; Nowack *et al.* 2007; Zarbin 2007).

O prefixo “nano” refere-se à escala de medida cuja grandeza é o nanômetro (nm), que corresponde a um bilionésimo do metro, 10^{-9} m. A Figura 1.1 mostra uma comparação típica de tamanho entre exemplares nas escalas manométrica e micrométrica, onde a largura da molécula de DNA corresponde a cerca de 10 átomos de H enfileirados (2 nm). Os NM como o fulereno (C_{60}), nanotubos de carbono, pontos quânticos e dendrímeros se enquadram na faixa de 1-100 nm, correspondendo à faixa de tamanho de proteínas e vírus. Por outro lado, os NM são cerca de 1000 a 10.000 vezes menores que micro organismos como a bactéria *E. coli* e as células vermelhas do sangue (ABDI 2010; Durán *et al.*; Toma 2004; Zarbin 2007).

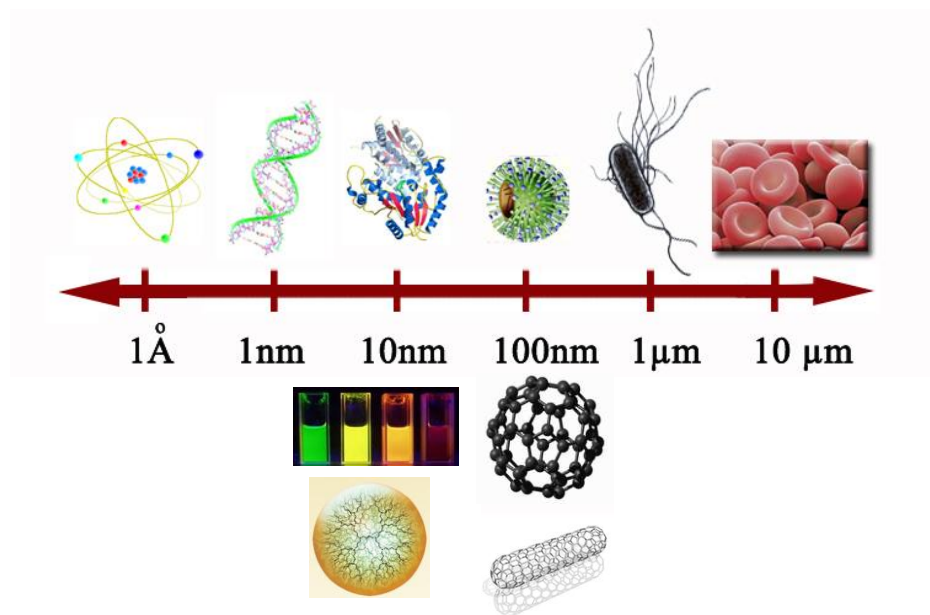


Figura 1.1 - Comparação de tamanho entre estruturas na escala manométrica e micrométrica. Fonte: <http://munlait.wordpress.com/category/biotecnologia/page/3/>.

Em decorrência do tamanho as propriedades ópticas, elétricas, de transporte, magnéticas, catalíticas e mecânicas dos NM, podem ser drasticamente diferentes quando compradas ao material sólido massivo. Desta forma, os NM estão sendo aplicados em vários setores, como o de energia, iluminação, automobilístico, de embalagens, cosméticos, tecidos, fármacos e esportivo. Por viabilizarem produtos finais mais leves, eficientes e principalmente de baixo custo, muitos produtos contendo NM encontram-se em fase de comercialização em cosméticos, eletrodomésticos, vestimentas, fármacos, dentre outros (ABDI 2010; Zarbin 2007).

Contudo, as mesmas propriedades que tornam os NM tão atrativos para diversas aplicações, tais como o pequeno tamanho de partícula e alta área superficial (Chen & Schluesener 2008; Song *et al.* 2005) podem também ser responsáveis por efeitos nocivos aos organismos vivos (Moore 2006). Indícios sobre estes efeitos têm sido reportados por estudos ecotoxicológicos e toxicológicos com microrganismos, algas, peixes, ratos e células humanas (Auffan *et al.* 2006; Bermudez *et al.* 2004; Hussain *et al.* 2005; Kahru & Dubourguier 2010; Magrez *et al.* 2006; Oberdörster *et al.* 2006; Tong *et al.* 2007; Wani *et al.* 2011).

1.2 - NANOPARTÍCULAS E NANOMATERAIS NO AMBIENTE

A presença de nanopartículas no ambiente ocorre devido a fontes naturais e antrópicas. Como exemplo de fonte natural há o sal marinho e a poeira vulcânica, além de algumas moléculas como a magnetita biogênica e a proteína ferritina, de aproximadamente 12 nm que podem ser encontradas em bactérias e eventualmente no cérebro humano (Oberdörster 2004a; Oberdörster *et al.* 2005).

As fontes antrópicas de nanopartículas estão relacionadas tanto às atividades que envolvem a queima de combustíveis fósseis, e que geram grande quantidade de material particulado, quanto aos processos industriais nos quais as **nanopartículas sintéticas** são manufaturadas para incorporação em NM em geral, assim como (Farré *et al.* 2009; Magrez *et al.* 2006; Nemmar & Inuwa 2008; Moore *et al.* 2006; Oberdörster *et al.* 2006).

Os NM constituídos de **nanopartículas sintéticas** são definidos como sendo materiais que possuem compostos com uma ou mais dimensões na escala nanométrica. Na Figura 1.2 encontram-se os tipos de nanomateriais, classificados de acordo com as suas propriedades físicas e químicas. Dentre os principais NM orgânicos destacam-se os nanotubos de carbono de parede simples e de parede dupla e o fulereno (C_{60}). Dentre os óxidos metálicos, o TiO_2 tem ampla aplicação, assim como os metais como as nanopartículas de prata e ouro, além dos pontos quânticos (*quantum dots*), utilizados como nanomarcadores biológicos (Farré *et al.* 2009; Ju-Nam & Lead 2008; Peralta-Videa *et al.* 2011).

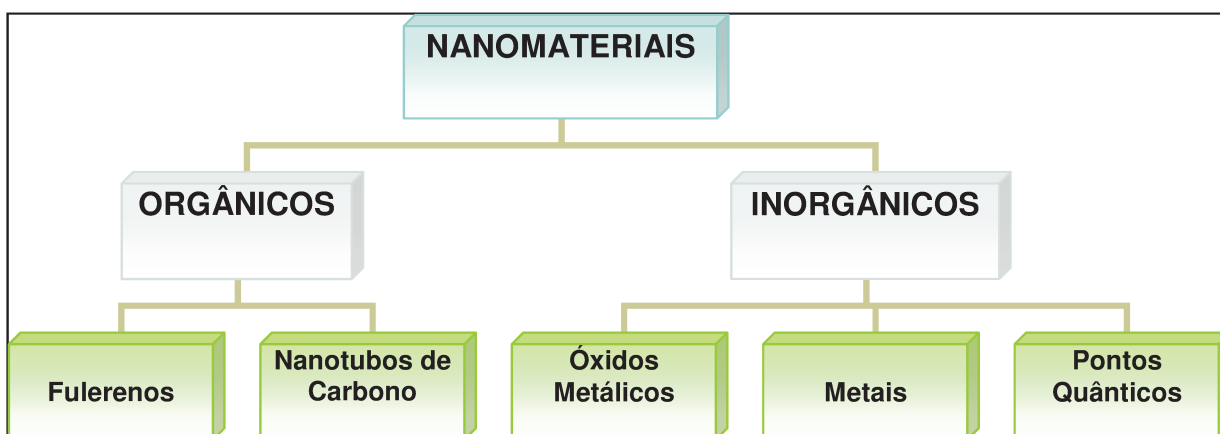


Figura 1.2 – Classificação dos nanomateriais de acordo com suas propriedades físico químicas. Figura adaptada de Peralta-Videa *et al.* (2011).

No ambiente, as nanopartículas provenientes de fontes naturais e da queima de combustíveis fósseis, bem como as **nanopartículas sintéticas**, provenientes de NM manufaturados, podem chegar ao homem ou aos organismos aquáticos através de processos diretos como a inalação ou ingestão, bem como indiretos, através da cadeia alimentar (Figura 1.3).

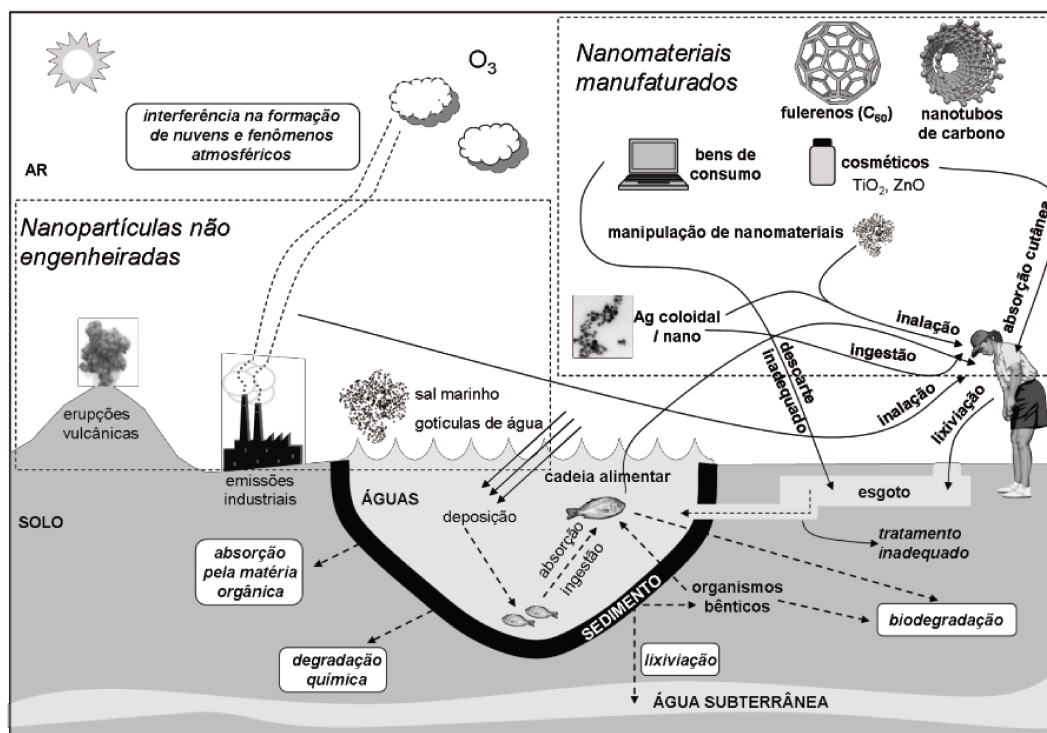


Figura 1.3 - Principais fontes, rotas de exposição e processos de interação das nanopartículas com o ambiente e organismos vivos. Fonte: Paschoalino *et al.* (2010).

Dependendo da mobilidade das nanopartículas no ambiente, são definidas as vias de acesso mais comuns para o ambiente e/ou para os seres humanos. Este acesso pode ser através da inalação (Bermudez *et al.* 2004), ingestão (Chen & Schluesener 2008), assimilação através de superfícies epiteliais externas (Nohynek *et al.* 2007; Tsuji *et al.* 2006) ou por absorção celular (Auffan *et al.* 2006; Yehia *et al.* 2007; Shin & Abraham 2001).

A observação dos fenômenos físicos e químicos envolvidos nos processos de interação de nanopartículas com o ambiente como a biodegradação, lixiviação, degradação e deposição são importantes para entender o seu comportamento através dos compartimentos, ar, água, solo e sedimento e assim relacioná-los com os possíveis efeitos aos organismos aquáticos e à saúde humana. Analisando o potencial de exposição aos NM, Oberdorster *et al.* (2005) afirmaram que os NM

podem ser persistentes em sistemas biológicos e ecológicos, principalmente devido ao tamanho e área superficial.

A interação de NM com o ambiente ou organismos vivos pode gerar modificações na sua morfologia, causar a funcionalização da superfície das nanopartículas ou a sua aglomeração (Figura 1.4). Essas modificações podem magnificar ou diminuir os efeitos deletérios de um determinado nanomaterial (Farré *et al.* 2009).

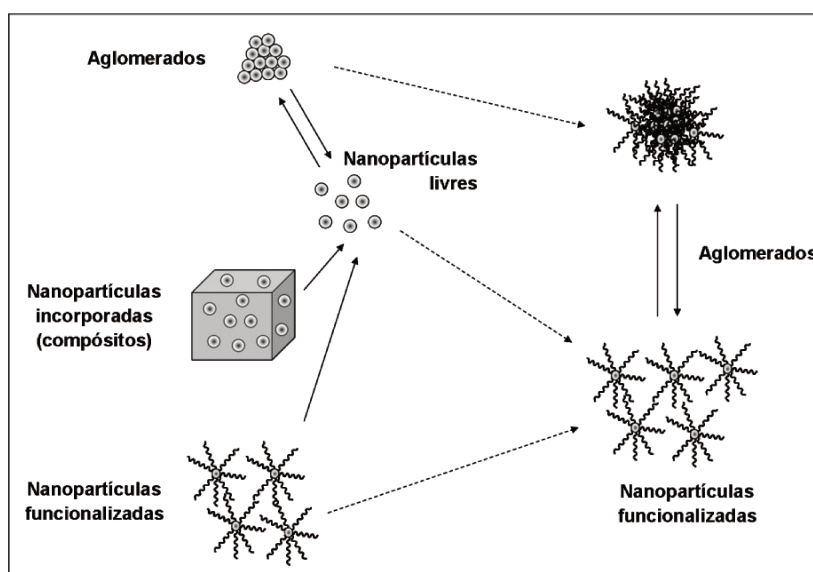


Figura 1.4 - Principais fenômenos de modificação das nanopartículas quando em contato com o ambiente ou organismos vivos. Fonte: Adaptado de Farré *et al.* (2009).

Por outro lado, a presença de matéria orgânica pode estabilizar suspensões contendo NM, evitando processos de degradação ou agregação. Neste contexto, Hyung *et al.* (2007) constaram recentemente que a matéria orgânica presente em uma suspensão contendo nanotubos de carbono promove a sua estabilização. Esta observação pode contribuir com a elucidação dos mecanismos de transporte que envolve este tipo de NM, quando presente no ambiente aquático.

Os riscos associados ao aporte de **nanopartículas sintéticas** no ambiente, estão associados à sua manufatura, consumo e descarte. Por esta razão, os estudos toxicológicos que levam em conta principalmente a exposição ocupacional (Hund-Rinke & Simon 2006) e o uso (Nohynek *et al.* 2007; Tsuji *et al.* 2006) de NM, têm sido realizados e constituem uma necessidade atual. Do mesmo modo, seguem a mesma tendência os estudos relacionados à temática ecotoxicológica relacionada à biota aquática (Chen e Schluesener 2008; Oberdörster 2004; Smith *et al.* 2007; Zhu *et al.* 2009).

1.2.1 - PRODUÇÃO DE NANOMATERIAIS E RISCOS POTENCIAIS DA NANOTECNOLOGIA À SAÚDE HUMANA E AO AMBIENTE

A preocupação com relação à toxicidade e ecotoxicidade de nanopartículas se deve principalmente, ao fato de que os NM nunca foram produzidos e utilizados em produtos comerciais em tão larga escala como atualmente. A produção anual estimada de materiais que contêm substâncias em nanoescala, saltou de 1.000 t em 2004 para mais de 5.000 atualmente, com a perspectiva de que a marca de 100.000 t seja atingida na próxima década (Chen & Schluesener 2008). Os nanomateriais com maior produção mundial são o TiO_2 , os nanotubos de carbono e a nanoprata, sendo produzidas anualmente cerca de 5000, 500 e 350 t, respectivamente (Mueller & Nowack 2008).

De acordo com um inventário elaborado pelo Projeto de Nanotecnologias Emergentes (do inglês *The Project Emerging Nanotechnologies*) PEN (2010), o mercado de produtos que utilizam NM tem crescido linearmente nos últimos anos. A Figura 1.5 mostra o crescimento linear do número de produtos contendo NM de 2005 a 2010, o que indica que em 5 anos, ocorreu um aumento de cerca de quatro vezes o número de produtos contendo algum tipo de NM.

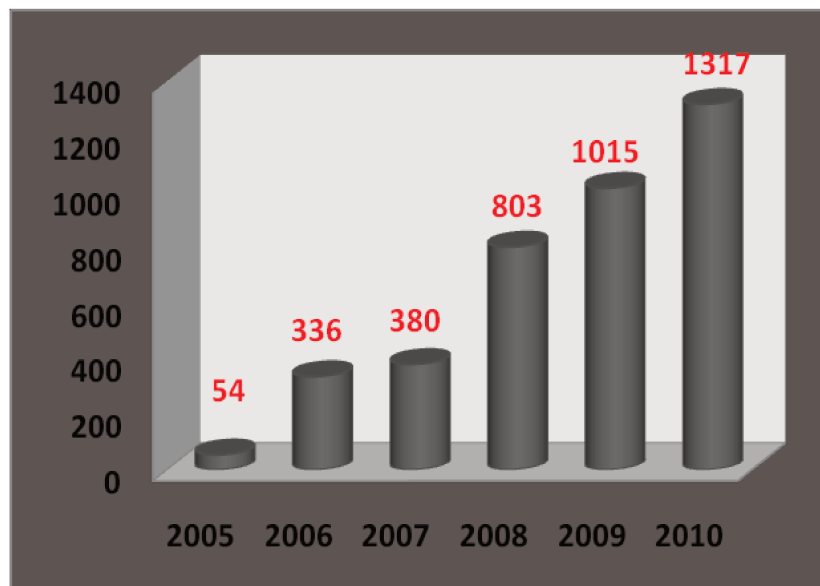


Figura 1.5 - Número total de produtos contendo algum NM, listados no inventário elaborado pelo PEN (2010). Figura adaptada de PEN (2010).

Desta forma, o risco destes NM alcançarem os compartimentos ambientais e tornarem-se disponíveis em concentrações nunca presenciadas é considerável (Lovern *et al.* 2007; Lyon *et al.* 2006). Neste sentido, Dreher *et al.* (2004) e Colvin *et al.* (2003) apontaram os efeitos toxicológicos devido à manufatura de nanomateriais, ou seja, a toxicidade devido à exposição ocupacional. Em 2004, Oberdörster *et al.* investigaram o transporte de partículas ultrafinas de óxido de manganês para o sistema nervoso central de ratos através de testes *in vivo* (Oberdörster *et al.* 2004b). Por meio do mesmo tipo de teste, Lam *et al.* (2004), observaram os efeitos de nanotubos de carbono nos pulmões de ratos e Hoet *et al.* (2004) mostraram vários estudos sobre os processos de absorção de nanomateriais pela pele, trato intestinal e pulmões de mamíferos e organismos aquáticos via testes *in vivo* e *in vitro*.

De acordo com o inventário do PEN (2010), dos produtos (contendo algum NM) fabricados pela Europa, Estados Unidos, Ásia e em outros países como Austrália, Israel e México, de 2006 aos dias atuais, ocorreu um crescimento considerável (Figura 1.6) na sua produção. Além disto, as áreas nas quais se

encontra maior aplicação estão ligadas à saúde e ao condicionamento físico (do inglês *fitness*), que engloba a incorporação de NM em roupas, cosméticos, sistemas de filtração e protetores solares.

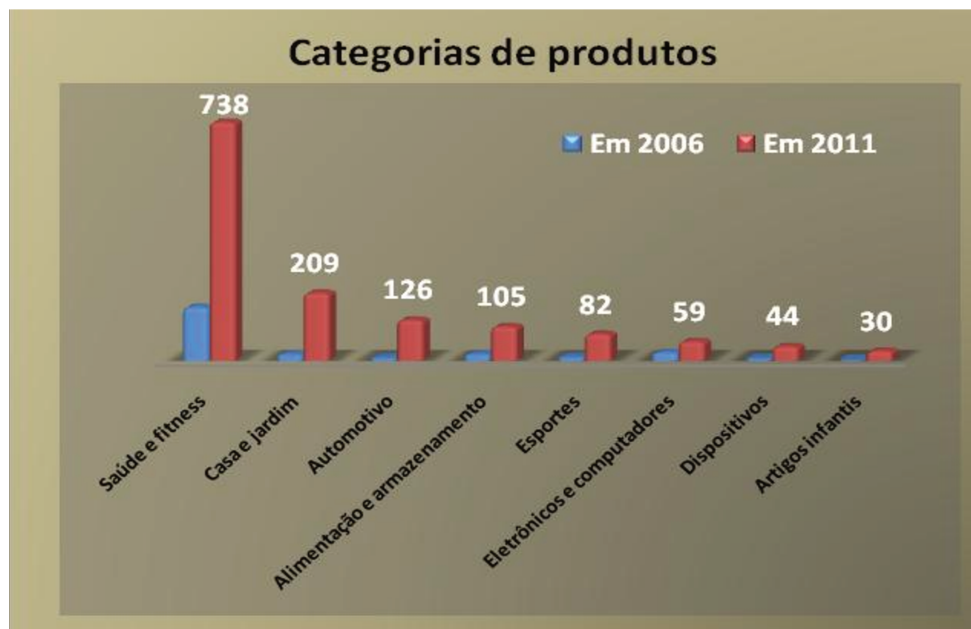


Figura 1.6 - Categorias e número aproximado de produtos que utilizam NM. Figura adaptada de PEN (2011)

Do mercado mundial de produtos contendo algum tipo de NM, a fabricação de produtos contendo nanoprata foi a que mais aumentou em relação aos principais NM produzidos. De acordo com a Figura 1.7, o número de produtos que em 2006 não passou de 30, aumentou para 313 em 2011. Já o TiO_2 é o terceiro maior NM utilizado em produtos, comparando com nAg e NM de carbono.

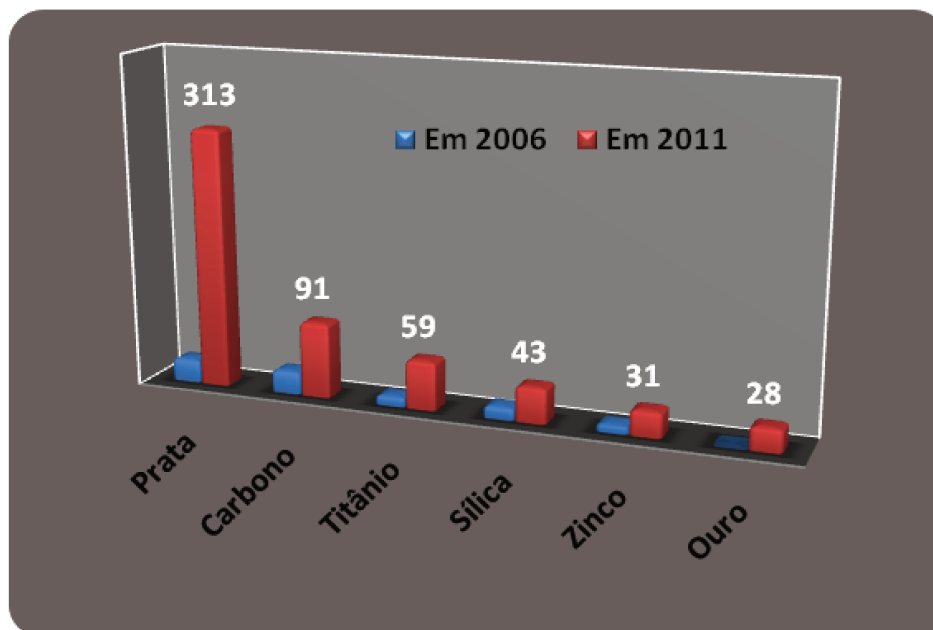


Figura 1.7 - Número de produtos associados a um NM específico, listados no inventário elaborado pelo PEN (2010). Figura adaptada de PEN (2010).

Levando em consideração a gama de produtos à base de NM disponíveis no mercado (*e.g.* 1393 produtos), estes podem ser considerados, na atualidade, como a principal fonte de aporte deste tipo de composto no ambiente (Chatterjee 2008). Por isso, a devida atenção deve ser dada ao processo de manufatura, transporte, armazenamento e descarte de NM. É importante destacar que os diferentes métodos de manufatura de NM podem gerar produtos variados, com diferentes tipos e quantidades de impurezas, o que poderá refletir numa extensa variedade de resíduos (Bullis 2005).

1.2.2 - PRATA

A prata pode estar presente no ambiente e nos organismos vivos nas seguintes formas: prata metálica (Ag^0) como material sólido massivo (do inglês *bulk*), sal de prata (mais comum são os íons Ag^+), complexos, prata coloidal e

nanoprata (nAg), que se refere à prata metálica elementar cujo tamanho está entre 1 e 100 nm (Nordberg *et al.* 2007; Panyala *et al.* 2008).

Desde as antigas civilizações, a prata metálica tem sido bastante aplicada na medicina, na confecção de moedas e utensílios domésticos, tais como pratos e copos, bem como no tratamento de doenças causadas por fungos, bactérias e vírus e na desinfecção da água (Panyala *et al.* 2008). Devido as suas propriedades elétricas, químicas e mecânicas, a prata pode ser utilizada na forma pura ou de ligas. Atualmente as aplicações mais comuns da prata são na fabricação de dispositivos eletrônicos, jóias e supercondutores, dentre outras.

Compostos de prata foram muito utilizados em fotografias e revestimentos de diversos metais, além de serem bastante explorados no tratamento de doenças infecciosas e mentais (Nordberg *et al.* 2007; Panyala *et al.* 2008). Outras aplicações são na área médica, na fabricação de espelhos, em cosméticos, como catalisador e em baterias, assim como bactericida e algicida (Wijhoven *et al.* 2009).

Atualmente percebe-se uma expansão quanto à síntese de nanopartículas de prata ou nanoprata (nAg), seja na forma de pó, incorporadas a outros materiais ou em suspensão. Este NM tem sido aplicado como agente antimicrobiano, podendo ser encontrado em aspiradores de pó, lavadoras de roupa, materiais médicos, filtros de ar, em embalagens para armazenar alimentos, em meias, e em outros produtos têxteis (Durán *et al.* 2010; Fortner *et al.* 2005; Wijhoven *et al.* 2009).

1.2.2.1 - MECANISMO DE AÇÃO DA NANOPRATA EM ORGANISMOS VIVOS E PROPRIEDADE BACTERICIDA

O mecanismo de ação de nAg em organismos vivos não é totalmente conhecido, embora haja muitas evidências desta ação, seja por meio da interação direta com a membrana celular de bactérias, ou de forma indireta, pela liberação de íons Ag^+ pelas nAg (Marambio-Jones & Hoek 2010; Miao *et al.* 2010).

Neste sentido, Laban *et al.* (2010) observaram a absorção de nAg por embriões de *Pimephales promelas*, como indicam as micrografias da Figura 1.8. Os autores confirmaram que o mecanismo que explica a toxicidade da nanop prata está associada à combinação da toxicidade devido às nAg internalizadas pelo organismo, bem como, pelos íons Ag^+ liberados pela nAg.

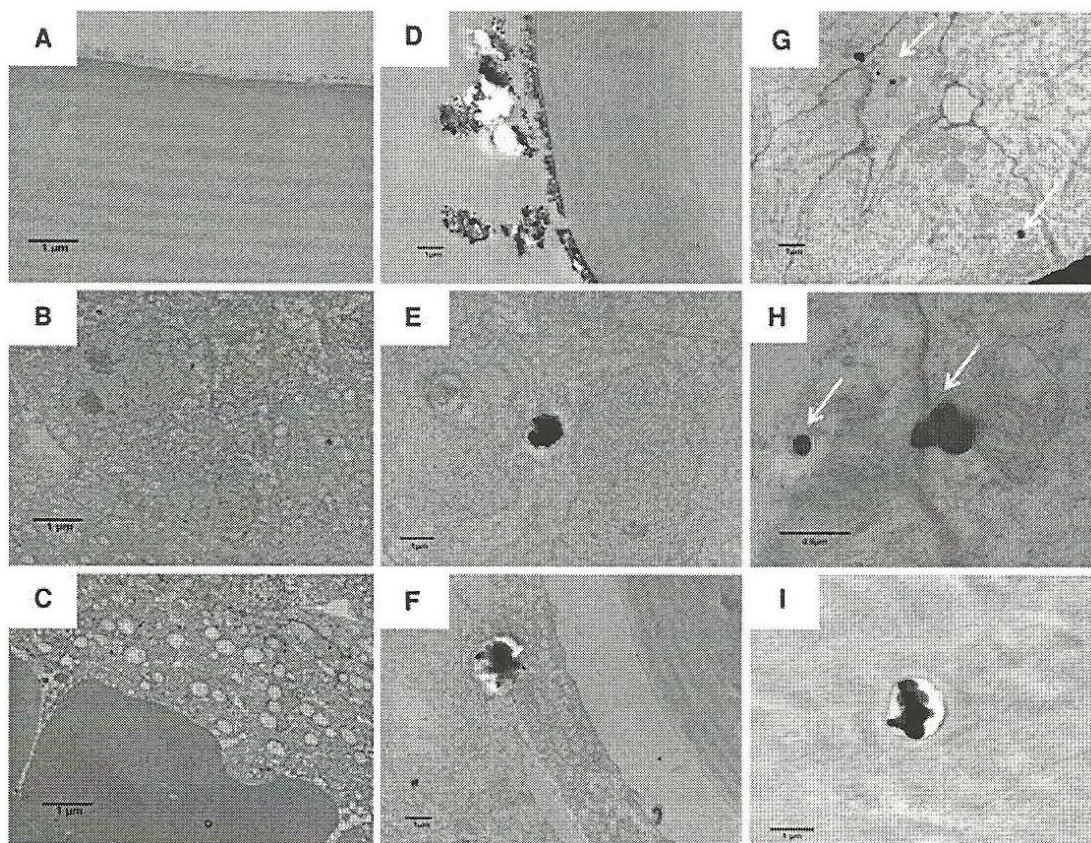


Figura 1.8 - Imagens de MET dos embriões de *P. promelas* **A)** parte externa da superfície dos embriões sem tratamento com nAg (controle) **B e C)** controles da parte interna dos embriões **D)** nAg agregadas na parte de fora da membrana **E e F)** agregados nAg no interior do embrião **G-I)** Aglomerados isolados no interior do embrião. Figura adaptada de Laban *et al.* (2010).

Pelo mecanismo de toxicidade dos íons Ag^+ a organismos aquáticos estabelecido na literatura, estes íons interferem de forma decisiva no transporte de Na^+ nestes organismos, o que leva a uma série de danos, causados

principalmente pela inibição da atividade da enzima K^+Na^+ ATPase. Comprovações deste mecanismo foram realizadas por Morgan *et al.* (1997) e Wood *et al.* (1999) que observaram que $10 \mu\text{g L}^{-1}$ de Ag^+ (AgNO_3) causavam interferências no transporte e absorção de Na^+ e Cl^- pelas guelras de peixes, levando à morte dos mesmos.

Além disto, muitos estudos, principalmente ligados à atividade bactericida de nAg, têm mostrado que o tamanho das nanopartículas e a sua forma contribuem para a sua toxicidade (Shrivastava *et al.* 2007; Sondi & Salopek-Sondi 2004).

Sondi & Salopek-Sondi (2004) observaram que nAg com tamanho médio de 1 a 15 nm podem penetrar a membrana celular de bactérias como a *E. coli*, como indicado pelos pontos cheios na Figura 1.9b.

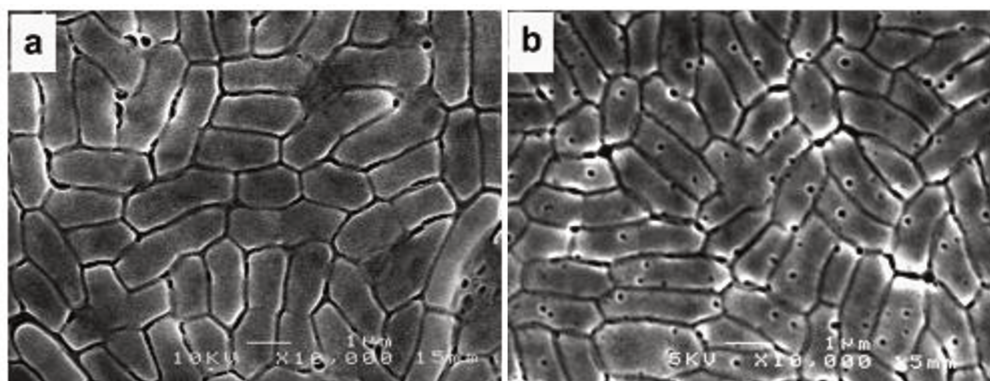


Figura 1.9 - Imagens das células de *E. coli* **a)** sem tratamento com nAg e **b)** com tratamento com nAg. Figura adaptada de Sondi & Salopek-Sondi (2004).

Devido a reações de oxidação da nAg dentro da membrana celular, Ag^+ é gerado continuamente, causando lesões ao DNA e a perda na habilidade de reprodução celular. Isto ocorre porque os íons Ag^+ se ligam aos grupos funcionais SH das proteínas, resultando na sua desnaturação. Além disto, pode ocorrer a inibição da atividade enzimática, levando à geração de espécies reativas de

oxigênio, o que causa a morte celular (Dúran *et al.* 2010; Fabrega *et al.* 2011; Marambio-Jones & Hoek 2010; Pal *et al.* 2007; Sondi & Salopek-Sondi 2004).

Além do tamanho, a forma das nanopartículas de prata também pode influenciar na sua ação bactericida. Neste sentido, Pal *et al.* (2007) compararam o efeito bactericida de nAg de formas distintas (esféricas e triangulares) e dos íons Ag^+ (AgNO_3) sobre o crescimento da *E. coli*. Os autores constataram que as nanoprata triangulares foram mais tóxicas à *E. coli* que as nanoprata esféricas e do que os íons Ag^+ , embora tenham sido observadas lesões na membrana e no citoplasma celular para ambas as espécies de Ag (Figura 1.10).

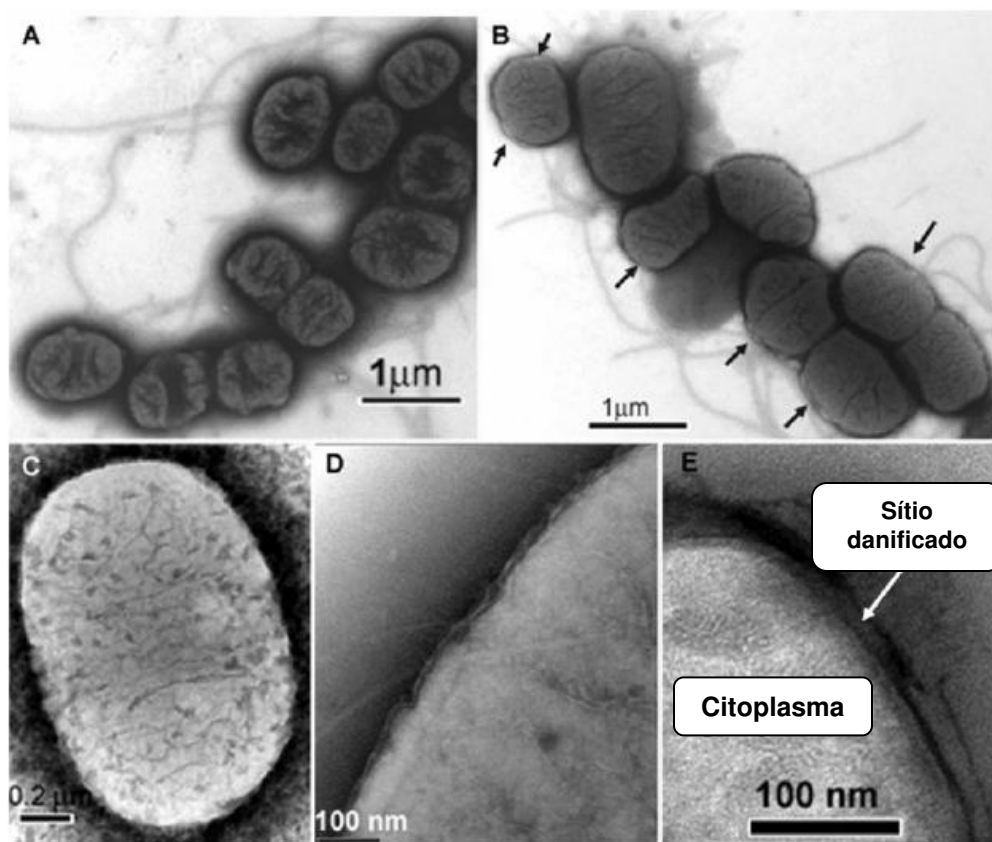


Figura 1.10 - Imagens das células de *E. coli* **A)** sem tratamento com nAg ou Ag^+ **B)** tratadas com Ag^+ (AgNO_3) **C)** tratamento com nAg triangulares **D)** tratamento com nAg esféricas **E)** Detalhe amplificado da membrana tratada com nAg triangular onde ocorreu maior dano. Figura adaptada de Pal *et al.* (2007).

Ao comparar as células de *E. coli* não expostas aos íons Ag^+ (AgNO_3) (Figura 1.10A), com as células na presença de íons Ag^+ , observou-se que estes íons causaram danos parciais à membrana celular, indicados pelas setas na Figura 1.10B. Quando a *E. coli* foi exposta às nAg triangulares, estas se acumularam na superfície da célula, causando mudanças na sua morfologia e estrutura, sendo observadas pela presença de pequenos “nódulos” escuros (Figura 1.10C) em volta da membrana celular e no citoplasma. As nAg esféricas não causaram danos drásticos à membrana celular (Figura 1.10D). Por outro lado, as nAg triangulares indicaram maior dano à membrana celular (Figura 1.10E).

Sondi & Salopek-Sondi (2004) estudaram a interação de nanopartículas de prata com a bactéria *E. coli* e constaram que esta bactéria Gram-negativa não oferece resistência a este nanomaterial, comprovando que é um material com excelente capacidade bactericida. Por outro lado, a nanop prata pode também oferecer riscos à saúde humana e alguns estudos observaram o efeito tóxico destas nanopartículas em células de mamíferos, e de fígado de ratos com ensaios *in vitro* (Berger, 2007; Auffan *et al.*, 2006). Segundo Senjen (2007), a nanop prata pode aumentar a resistência a antibióticos. Adicionalmente, o uso prolongado de compostos de prata pode ocasionar argiria, doença que consiste na pigmentação da pele e outros órgãos na coloração azul.

1.2.2.2 PRATA NO AMBIENTE

A prata metálica não é tóxica ao homem, embora a maioria dos seus sais apresente toxicidade. No ambiente, os íons Ag^+ são encontrados geralmente ligados a bicarbonatos, sulfato, cloreto, sulfato e à matéria orgânica, podendo formar complexos insolúveis (sulfetos) e se depositar no leito dos sistemas hídricos, agregando-se aos sedimentos (Choi *et al.* 2008; Wijnhoven *et al.* 2009).

Por apresentar ação bactericida, as nanopartículas de prata podem apresentar efeito tóxico às bactérias responsáveis pelo processo de desnitrificação o que pode levar à eutrofização de ecossistemas alagados, além de causar a

morte de vários micro organismos presentes (Throbäck *et al.* 2007). Deste modo, um exemplo de como a inserção de nanoprata ou de outros NM podem ser prejudiciais ao equilíbrio de um sistema, ocorre quando efluentes oriundos de estações de tratamento de esgoto (ETE), que não estão aptas a tratar tais resíduos, lançam seus efluentes diretamente nos sistemas aquáticos e no solo. Isto pode causar a sua persistência, aumentando a toxicidade (Tang *et al.* 2004) e biomagnificação (Yang & Watts 2005) ao longo da cadeia alimentar.

1.2.3 DIÓXIDO DE TITÂNIO

O TiO_2 é um óxido metálico, semicondutor, encontrado nas formas alotrópicas, brookita, anatase e rutilo. As formas cristalinas anatase e rutilo (Figura 1.11) são as mais utilizadas e comercializadas como pigmento branco para a aplicação em tintas, fibras sintéticas, plásticos, papel, vidro, esmaltes, cerâmica, etc.

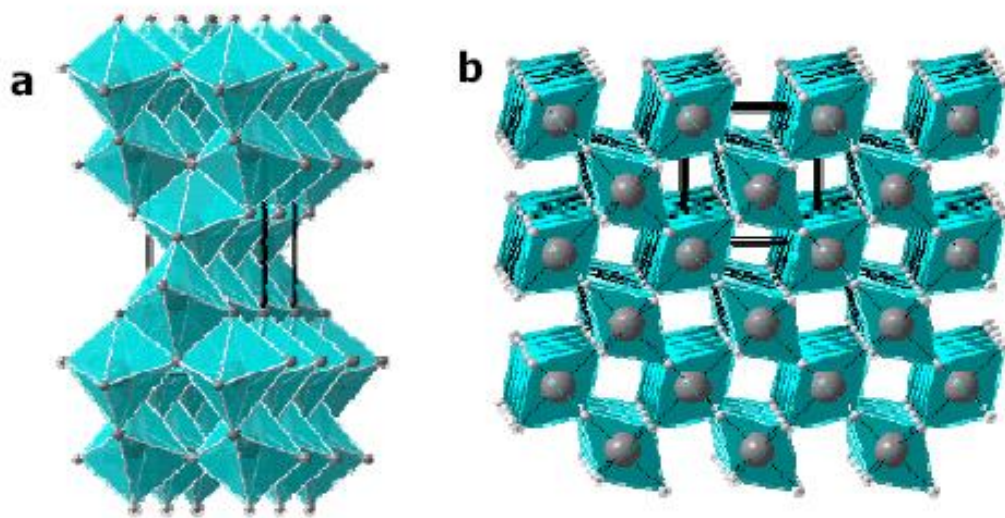


Figura 1.11 - Formas alotrópicas do TiO_2 : **a)** anatase, **b)** rutilo. Fonte: Candal *et al.* (2001).

O TiO_2 tem sido aplicado em diversas áreas como na produção de cosméticos, tintas, dispositivos eletrônicos, bem como na geração de energia, pela construção de células solares fotoeletroquímicas (Zaban *et al.* 1998) e na área ambiental.

Através dos processos oxidativos avançados (POA) (Teixeira & Jardim 2004) o TiO_2 é aplicado na descontaminação ambiental, principalmente no tratamento de água e na remediação, por degradação fotocatalítica de nutrientes e na purificação de ar. O TiO_2 modificado (dopado com outros elementos) ou não, e pode ainda ser utilizado na construção de sensores, LED (do inglês *Light Emitting Diodes*) (Elliott & Zhang 2001; Kamat *et al.* 2002; Toma 2004).

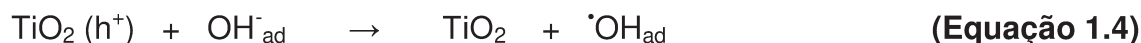
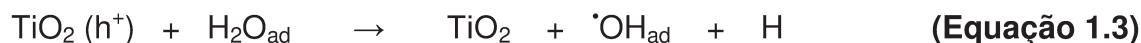
A aplicação do TiO_2 na área ambiental para a desinfecção de ar (Paschoalino 2006) ou de água (Elliott & Zhang 2001; Kamat *et al.* 2002), depende da geração de espécies reativas de oxigênio, no processo fotocatalítico, como os radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Dentre os radicais gerados no processo fotocatalítico do TiO_2 , os radicais $\cdot\text{OH}$ são os que apresentam maior poder oxidativo, devido ao seu alto potencial redox (2,80 V) (Teixeira & Jardim 2004). Este radical é o principal responsável pela dimerização do DNA das células de micro organismos, tais como, vírus e bactérias, inativando as suas funções vitais, podendo levar também à sua completa mineralização (Paschoalino 2006). Esta mineralização ocorre também nos processos de fotocatalise para a destruição de compostos orgânicos em água (Elliott & Zhang 2001; Kamat *et al.* 2002).

O processo fotocatalítico que ocorre na superfície do catalisador, TiO_2 , e que gera as espécies oxidativas, podem ser compreendidas segundo as Equações 2 a 9 (Rincón & Pulgarin 2003).

O TiO_2 utilizado na forma suspensa ou suportado, e irradiado pela luz UV (200-400 nm) com intensidade maior que o *band-gap* entre a banda de valência (BV) e a banda de condução (BC), causa a transferência eletrônica da banda BV a BC gerando o par elétron-lacuna ($e^-_{\text{BC}}/ h^+_{\text{BV}}$) (Equação 1.1). As lacunas, h^+_{BV} geradas na superfície do catalisador, promovem reações de oxidação com

compostos orgânicos adsorvidos (RX_{ad}) e com a água adsorvida nesta superfície, gerando respectivamente, radicais orgânicos, $\cdot RX_{ad}$ (Equação 1.2) e radicais $\cdot OH_{ad}$ (Equações 1.3 e 1.4).



Na banda de condução, são favorecidos os processos de redução, na qual, a presença do O_2 , gera as espécies, $\cdot O_2^-$ e H_2O_2 , como pode ser visto pelas Equações 1.5 a 1.8.



A Equação 1.5 mostra a redução do oxigênio molecular gerando o ânion superóxido, $\cdot O_2^-$. Este ânion pode reagir com o próton, H^+ e formar o radical $HO_2 \cdot$, que por sua vez reage com o $\cdot O_2^-$ e gera H_2O_2 (Equações 1.6 e 1.7). O radical $HO_2 \cdot$ também pode decompor-se e gerar H_2O_2 (Equação 1.8).

Compreender o mecanismo de geração de espécies reativas de oxigênio é de fundamental importância na compreensão das respostas dos estudos que

envolvem desinfecção fotocatalítica. Um exemplo disto são as conclusões obtidas no trabalho realizado por Cho *et al.* (2004), que correlacionou a inativação da bactéria *E. coli* com a concentração do radical $\cdot\text{OH}$, gerado pelo processo fotocatalítico. Desta mesma forma, para estudos ecotoxicológicos, a propriedade fotocatalítica do TiO_2 deve ser levada em conta uma vez que os efeitos ao ambiente aquático e à sua biota podem ser magnificados por esta propriedade.

O processo de fabricação de TiO_2 gera resíduos de minérios insolúveis ou águas residuais fortemente ácidas, além de poeiras que podem ter efeitos nocivos e em níveis inaceitáveis nos meios em que são lançados, gerando problemas ambientais graves.

Por ser amplamente utilizado na indústria de cosméticos, de semicondutores, de tintas, dentre outras, o TiO_2 tem grande possibilidade de chegar ao homem. Desta maneira, nos últimos anos vêm sendo bastante investigados os seus efeitos toxicológicos, envolvendo principalmente o trato respiratório (Grassian *et al.* 2007; Nemmar *et al.* 2008; Sayes & Warheit 2008), bem como estudos ecotoxicológicos utilizando organismos aquáticos (Wiench *et al.* 2009).

1.3 - REGULAMENTAÇÃO DOS NANOMATERIAIS

Como já foi dito, o número de produtos manufaturados utilizando nanotecnologia e aplicados em cosméticos, estocagem de alimentos e medicamentos tem crescido linearmente nos últimos anos (Figura 1.6) apesar de não serem bem conhecidos os efeitos que eles podem causar ao ambiente e à saúde humana (Chen & Schluesener 2008). Uma alternativa para a regulamentação seria adequar as normas já existentes para os produtos em escala nano, no entanto, esta seria uma decisão bastante crucial, uma vez que as propriedades de um determinado sistema condensado são diferentes quando comparadas a um sistema em escala nano. Um exemplo disto são materiais que

em macroescala possuíam propriedades condutoras ou semicondutoras, e que em escala nano podem se tornar isolantes (Toma 2005).

Com o intuito de reunir informações sobre as áreas onde a regulamentação deveria ser considerada, organizações norte americanas como o Subcomitê Nacional e Conselho de Tecnologia (*National Science and Technology Council*, NSCT) e a Agência de Proteção Ambiental americana (*U.S. Environmental Protection Agency*, USEPA), bem como a Real Sociedade e a Real Academia de Engenharia do Reino Unido (*Royal Society and Royal Academy of Engineers*, RS/RAEng), têm publicado estudos a respeito dos riscos ambientais, à saúde humana, à segurança e as implicações éticas e sociais associadas ao desenvolvimento da nanotecnologia e dos nanomateriais (CST 2007; EPA 2008).

Tendo em vista a regulamentação de produtos contendo NM, órgãos como a USEPA, a REACH CA (*Registration, Evaluation, Authorisation & Retriction of CHemicals Competent Authorities*) e a Organização Internacional para Padronização (*International Organization Standardization*, ISO) têm investido na elaboração de protocolos que padronizem a manufatura, comercialização e descarte de NM (Bullis 2005; EPA; ISO 2011). Desta forma, são necessários estudos que estabeleçam quais os riscos ao ambiente e à saúde humana decorrentes do uso de produtos manufaturados com base na nanotecnologia.

2 - JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

No Brasil e no mundo nota-se a falta de compreensão dos efeitos deletérios dos NM (Hoet *et al.* 2004) ao meio ambiente, pois os estudos ainda são escassos em relação ao desenvolvimento e aplicação acelerada da nanotecnologia (Kahru & Dubourguier 2010). Esta tendência foi observada por uma análise da produção científica nos últimos 20 anos, envolvendo NM. Os resultados (Figura 1.12) confirmaram que as pesquisas envolvendo a descoberta e aplicações de novos NM e de dispositivos nanotecnológicos cresceram exponencialmente nos últimos

20 anos e que os estudos de toxicidade e de ecotoxicidade não cresceram da mesma maneira.

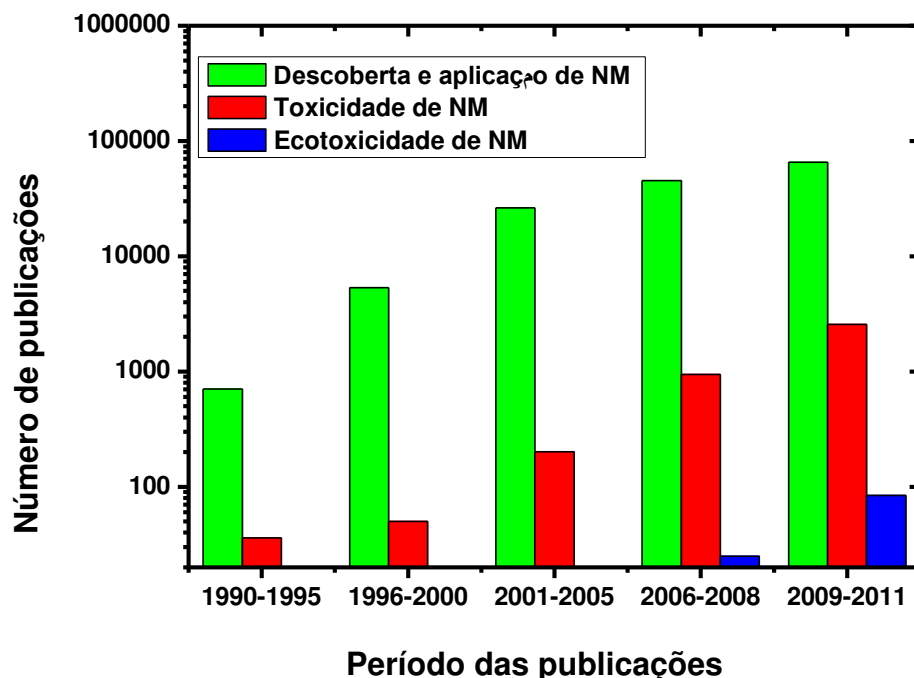


Figura 1.12 – Número de trabalhos publicados de 1990 a 2011 envolvendo nanomateriais. (ISI *Web of Science* 2011a-o)

De modo particular, os estudos ecotoxicológicos começaram a surgir apenas a partir de 2006 (Figura 1.12) e desta forma se faz necessária uma análise mais profunda e uma discussão mais ampla sobre a ecotoxicidade, epidemiologia, persistência e bioacumulação dos NM presentes no ambiente.

Ter conhecimento dos riscos potenciais que os NM causam aos sistemas aquáticos é de fundamental importância, visto o agravamento de problemas mundiais associados à questão da escassez de água potável (Rocha *et al.* 2004) e a poluição causada principalmente pela falta de tratamento de esgotos industriais e domésticos.

Como já foi comentado, o aporte de NM em sistemas de tratamento de esgotos convencionais sem o conhecimento do tratamento adequado para este tipo de resíduo, poderá causar perturbação do equilíbrio de todo o ecossistema aquático. Ao analisar o comportamento de NM em relação à biota aquática, será possível contribuir para a abertura de linhas de pesquisa que contemplem a regulamentação e protocolos de identificação do potencial tóxico, bem como de tratamento deste tipo de resíduo. O conhecimento dos riscos que os NM causam ao ambiente poderá ser decisivo para a sua comercialização, cuja autorização só possa ser realizada após o produto estar dentro dos padrões exigidos pela legislação quanto aos aspectos ambientais e de saúde pública.

Além disto, outro fator de destaque é o impacto social que a pesquisa sobre os potenciais efeitos de $n\text{TiO}_2$ e $n\text{Ag}$ no ambiente traz, pois geram dados que subsidiam ações para mitigar a poluição e gerar ambientes mais propícios às atividades industriais, afastando o risco de contaminação de áreas urbanas ou rurais, aliando desenvolvimento e preservação ambiental. Por fim, auxilia no processo de regulamentação dos NM, contribuindo para pesquisas mais aprofundadas sobre os riscos e uso de produtos contendo NM voltados para a agricultura, nutrição, saúde e energia.

Vale destacar que para prover uma boa avaliação ecotoxicológica de um determinado NM é importante estabelecer uma abordagem multidisciplinar, ou seja, integrar à ecotoxicologia áreas como a biologia e a química. Deste modo, a análise química quanto à quantificação e caracterização de NM são fundamentais neste tipo de estudo.

3 - OBJETIVOS

❖ GERAL

Avaliar a toxicidade de nanopartículas de Ag e TiO₂ (nAg e nTiO₂) utilizando organismos teste representantes da biota aquática (bactéria, microcrustáceo e alga), através de uma abordagem multidisciplinar.

❖ ESPECÍFICOS

- Sintetizar e caracterizar amostras de AgNP e nTiO₂ de formas alotrópicas distintas;
- Avaliar a atividade bactericida dos NM sintetizados utilizando *E. coli*;
- Avaliar a ecotoxicidade dos NM sintetizados frente aos organismos teste: *V. fischeri*, *D. similis* e à *P. subcapitata*;
- Avaliar possíveis mudanças nas características química, morfológicas e de tamanho das amostras de AgNP devido ao contato com os meios de cultivo dos organismos teste utilizados;
- Avaliar a relação entre a ecotoxicidade das suspensões de AgNP e o grau de aglomeração das mesmas.

PARTE II

SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TiO₂ E AgNP

CAPÍTULO 2

2 - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TiO_2 E AgNP

2.1 - INTRODUÇÃO

Dentre os vários métodos utilizados para sintetizar nanopartículas ou nanoestruturas de TiO_2 (nTiO_2) na forma esférica, de bastões, nanotubos ou fios, pode-se citar o método de eletrodeposição, da oxidação direta, hidrotermal e o sol-gel (Chen & Mao 2007).

O método sol-gel tem sido bastante aplicado para a síntese de nanopartículas de TiO_2 utilizadas nos processos de fotodegradação de contaminantes ambientais. Este método baseia-se na reação de hidrólise de um alcóxido de titânio (precursor), em meio ácido que na presença de água, sofre primeiramente a hidrólise, seguida de polimerização, nucleação e crescimento dos cristais. O crescimento e a aglomeração dos cristais de nTiO_2 são dependentes do tipo do alcóxido empregado, do pH do meio reacional, bem como da temperatura de hidrólise (Crişan *et al.* 2007). Assim, estes fatores devem ser levados em conta quando se emprega o método sol-gel para a síntese de TiO_2 , o qual, dependendo das condições de calcinação do gel, podem ser obtidas as formas alotrópicas anatase ou rutilo.

O método mais comum para sintetizar nanopartículas de prata ou nanoprata (nAg) baseia-se na reação de um precursor metálico, dissolvido em água, seguido da redução com um agente adequado na presença de um estabilizante dissolvido (Monge 2009; Santana *et al.* 2006; Zhang *et al.* 1996). A formação dos colóides de nanoprata envolve os mecanismos de nucleação e crescimento, como observado na Figura 2.1.

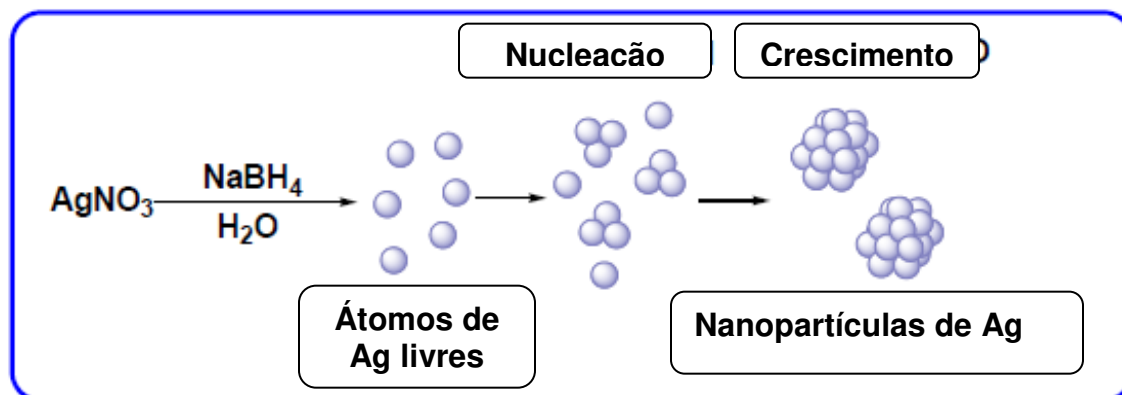


Figura 2.1 - Mecanismo de formação de nAg a partir da redução química do AgNO_3 . Figura adaptada de Monge (2009).

Esta rota sintética gera uma suspensão aquosa, chamada de AgNP, constituída por nAg, íons Ag^+ , o estabilizante aplicado, além dos outros produtos que dependem do redutor e do precursor utilizados. A função do agente estabilizante é evitar que as nanopartículas se agreguem e possam influenciar o tamanho e a estrutura das nanopartículas, e no caso de produtos na forma de pó, a solubilidade (Lee & Meisel 1982). Suspensões de AgNP contendo nAg com diferentes graus de aglomeração (Figura 2.2) podem ser obtidas controlando as quantidades de agente redutor e precursor utilizados na síntese.

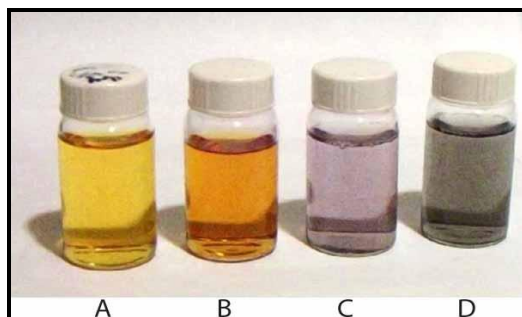


Figura 2.2 - Suspensões de AgNP com diferentes graus de agregação. Fonte: Solomon *et al.* (2007).

A mudança da coloração das suspensões de AgNP apresentadas na Figura 2.2 indica que a aglomeração das nAg aumenta na sequência da cor amarela (A) ao grafite (D).

Vale destacar que esta rota sintética é muito versátil, uma vez que diferentes tipos de agentes estabilizantes podem ser utilizados com o objetivo de obter as nanopartículas de tamanho e forma controlados. Estas nanopartículas podem apresentar morfologia esférica, em forma de bastão, prisma ou fios. Contudo, é necessária a otimização das razões estequiométricas entre as quantidades de solvente, estabilizante e precursor utilizado, bem como a ordem da adição dos reagentes no processo de síntese.

A caracterização físico-química quanto à composição química, tamanho, forma, área superficial, porosidade, morfologia, carga superficial e grau de aglomeração definem as propriedades mais importantes de um nanomaterial. Além disso, definem as suas possíveis aplicações, bem como as implicações ecotoxicológicas (Handy *et al.* 2008a; Handy *et al.* 2008b; Hassellöv *et al.* 2008; Wiesner *et al.* 2007).

Os NM podem interagir de formas diferentes em contato com fatores abióticos de matrizes ambientais (pH, força iônica, dureza da água, matéria orgânica), o que pode gerar processos de agregação, bem como de redução/oxidação, influenciando as respostas biológicas de vertebrados, invertebrados e plantas quando expostos a nanomateriais.

Desta maneira, a especiação química é uma etapa importante a ser considerada nos estudos de ecotoxicidade de nanomateriais (Handy *et al.* 2008a). Neste sentido, Miao *et al.* (2009) estudaram os efeitos diretos e indiretos de nAg para o fitoplâncton marinho *T. weissflogii* e observaram que a nanoprata só é tóxica quando há Ag^+ residual na faixa de 10^{-5} a 10^{-6} mol L⁻¹, devido ao processo de oxidação do metal. Por outro lado, a maioria dos estudos em ambientes de água doce mostra apenas a toxicidade da nanoprata e não leva em conta a presença de íons Ag^+ (Griffitt *et al.* 2008).

2.2 OBJETIVOS

❖ GERAL

Sintetizar e caracterizar amostras de TiO₂ e AgNP, de modo que possam ser utilizadas nos testes de avaliação da atividade bactericida e de ecotoxicidade.

❖ ESPECÍFICOS

- Sintetizar amostras de TiO₂ nas fases alotrópicas, rutilo e anatase, além da mistura de ambas;
- Promover tratamento térmico às amostras de TiO₂ comercial (TiO₂ P25 DEGUSSA) a fim de obter TiO₂ na fase rutilo;
- Sintetizar amostras de AgNP (suspensões contendo nanoprata) utilizando três estabilizantes distintos: carboximetil celulose (CMC), álcool polivinílico (PVA) e citrato de sódio;
- Caracterizar as amostras de TiO₂ e AgNP sintetizadas;
- Observar a estabilidade das suspensões de AgNP sintetizadas no decorrer de 20 meses após a sua síntese;
- Realizar a especiação da prata, ou seja, quantificar a concentrações de nAg e Ag⁺ nas suspensões de AgNP.

2.3 EXPERIMENTAL

2.3.1 SÍNTESE DAS AMOSTRAS DE TiO_2 E AgNP

Todas as soluções aquosas utilizadas neste trabalho foram preparadas utilizando água ultrapura com resistividade de 18,2 M Ω cm produzidas por um deionizador *Ultra-Pure Water System* Milli-Q Plus (MILLIPORE).

As pesagens foram realizadas em uma balança analítica AE200 (METTLER) e as pipetas de transferência e os balões volumétricos utilizados foram devidamente calibrados e aferidos (erro < 0,3%).

REAGENTES DE GRAU ANALÍTICO PARA A SÍNTESE DAS AMOSTRAS DE TiO_2

- Tetraisopropóxido de titânio, $\text{Ti}(\text{OC}_3\text{H}_7)_4$ (*Acro Organics*);
- 2-propanol, $\text{C}_3\text{H}_7\text{OH}$ (*J.T. Baker, SDS*);
- Ácido perclórico, HClO_4 (*Merck*).

SOLUÇÃO PARA A SÍNTESE DAS AMOSTRAS DE TiO_2

- Solução de ácido perclórico, pH = 1,5: foi preparada adicionando 340,0 mL de HClO_4 em 1 L de água ultrapura.

REAGENTES DE GRAU ANALÍTICO PARA A SÍNTESE DAS AMOSTRAS DE AgNP

- Nitrato de prata, AgNO_3 (CRQ);
- Citrato de sódio, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$ (SYNTH);
- Borohidreto de sódio, NaBH_4 , (ACROS ORGANICS);
- Alcool polivinílico (PVA), $(-\text{CH}_2\text{CHOH})_x$ (CRQ);
- Carboximetilcelulose sódica (CMC), $(-\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H})_x$ (SYNTH).

SOLUÇÕES PARA A SÍNTESE DAS AMOSTRAS DE AgNP

- Soluções de nitrato de prata $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ e $2,5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$: foram preparadas dissolvendo $4,3 \times 10^{-2} \text{ g}$ e $2,1 \times 10^{-2} \text{ g}$ de AgNO_3 , respectivamente, em 50 mL de água ultrapura e transferidas para recipientes envoltos com papel alumínio para proteger da luz.
- Solução de borohidreto de sódio $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$: foi preparada dissolvendo $1,1 \times 10^{-2} \text{ g}$ de NaBH_4 em 150 mL de água ultrapura. Esta solução foi utilizada imediatamente após o preparo.
- Solução de borohidreto de sódio $1,0 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$: foi preparada dissolvendo $3,8 \times 10^{-3} \text{ g}$ de NaBH_4 em 10 mL de água ultrapura.
- Solução de PVA 1% (m/v): foi preparada dissolvendo 1,0 g de PVA em 100 mL de água ultrapura.
- Solução de CMC 1% (m/v): foi preparada dissolvendo 1,0 g de CMC em 100 mL de água ultrapura.

DIVERSOS

- Brometo de potássio, KBr (*SYNTH*)
- Dióxido de titânio aeróxido P-25, TiO₂ (DEGUSSA)
- Padrão AA Ag, 1000 mg L⁻¹ (*SPECSOL*)
- Cloreto de sódio, NaCl (*SYNTH*)

2.3.1.1 - SÍNTESE DAS AMOSTRAS DE TiO₂

A síntese das amostras de TiO₂ obtidas neste trabalho baseou-se no procedimento descrito por Kormann *et. al.* (1988) e por Crişan *e. al.* (2007) , no qual ocorre a hidrólise de um alcóxido de titânio, como mostra a equação global deste processo:



O tetraisopropóxido de titânio foi misturado com o 2-propanol na proporção de 1: 21 (v/v). Em seguida, esta mistura foi adicionada lentamente a 340 mL de uma solução de ácido perclórico (pH=1,5) em banho de gelo e sob agitação numa chapa de aquecimento/agitação CORNING PC-620. A amostra obtida permaneceu sob agitação à temperatura ambiente por 3 dias, quando tornou-se límpida. Posteriormente, foi aquecida em chapa a 60°C para a evaporação do solvente em um recipiente refratário para a obtenção do sol-gel. A calcinação do pó obtido foi realizada em uma mufla FB QUÍMICA modelo F2-DMP/R à temperatura de 400 °C ou a 900 °C por 1 hora com taxa de aquecimento de 30°C por minuto.

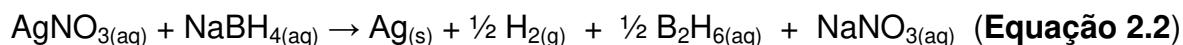
Para obter amostras nas formas cristalinas do TiO₂, anatase (**Anatase-S**) e rutilo (**Rutilo-S**) foram conduzidas calcinações a 400°C e a 900°C, respectivamente. Outra amostra (**M-S**) foi obtida pela mistura de **Anatase-S** e **Rutilo-S** na proporção de 80: 20 (m/m). As amostras obtidas foram maceradas e em seguida caracterizadas.

TRATAMENTO TÉRMICO DO TiO₂ COMERCIAL AEROXIDE P25 DEGUSSA

Com a finalidade de obter TiO₂ na fase rutilo uma massa definida de TiO₂ P25 DEGUSSA (chamado neste trabalho de **P25**), constituído de cerca de 80% da fase anatase e 20% rutilo foi calcinada (Thompson Jr & Yates 2006). Utilizou-se uma rampa de aquecimento de 30°C por minuto até obter uma temperatura de 900°C, que foi mantida por 1 hora. O material resultante foi chamado **P25***.

2.3.1.2 SÍNTESE DAS AMOSTRAS DE AgNP

A rota sintética utilizada para obtenção da suspensão de AgNP baseou-se no trabalho proposto por Lee & Meisel (1982), no qual a redução de AgNO₃ é feita com NaBH₄ na presença de um estabilizante. A reação global proposta para este processo é a seguinte:



Na síntese das amostras de AgNP tanto o estabilizante quanto a razão molar [NaBH₄]/[AgNO₃] podem influenciar ou contribuir para a estabilidade dos colóides formados, devido às forças eletrostáticas (Solomon *et al.* 2007). Entretanto, com a adição de um estabilizante, este forma uma camada na

superfície das partículas de nanop prata (nAg) estabilizando-as por efeito estérico (Handy *et al.* 2008b; Monge *et al.* 2009).

O tipo de estabilizante e a concentração do precursor utilizado na síntese de nanopartículas de prata podem influenciar na estabilidade dos colóides formados (Oliveira 2005; Monge 2009). A alta concentração do precursor (AgNO_3) pode desestabilizar o meio e ocasionar aglomeração das nanopartículas, além de gerar alta concentração de Ag^+ residual.

Desta maneira, a fim de verificar qual o efeito que a concentração do precursor tem na formação do produto desejado, procurou-se determinar a concentração ótima de AgNO_3 utilizada na síntese. Foram testados neste trabalho três estabilizantes diferentes, PVA, CMC e citrato de sódio, cujas fórmulas estruturais são mostradas na Figura 2.3.

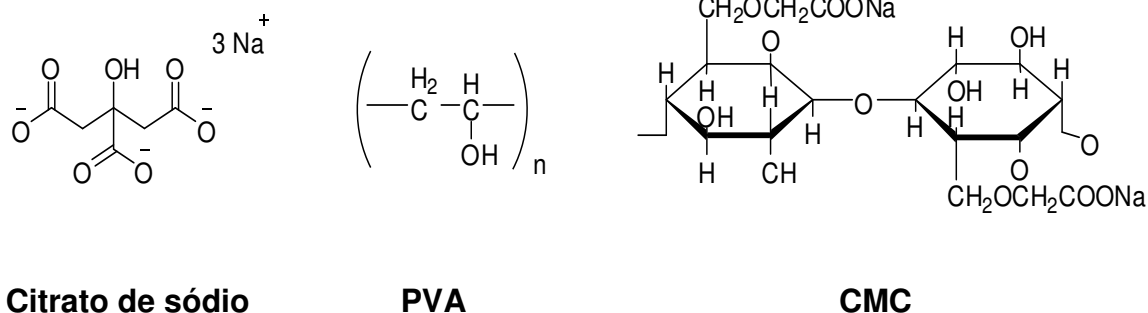


Figura 2.3 - Estrutura dos agentes estabilizantes utilizados.

Para obter amostras estáveis contendo nAg na forma esférica, utilizou-se o AgNO_3 como precursor, NaBH_4 como agente redutor e os estabilizantes apresentados na Figura 2.3.

Foram sintetizadas as amostras: **Ag-PVA**, **Ag-CMC**, **Ag2-PVA**, **Ag2-CMC** e **Ag-citrato** e na Tabela 2.1 estão as razões molares [NaBH₄]/[AgNO₃] utilizadas na síntese destas amostras e os estabilizantes testados.

Tabela 2.1 - Razões molares [NaBH₄]/[AgNO₃] utilizadas nas sínteses das amostras de AgNP.

Estabilizante	[NaBH ₄]/[AgNO ₃]	Nome da amostra
Citrato de sódio	1,0	Ag-citrato
PVA	1,2	Ag-PVA
	2,4	Ag2-PVA
CMC	1,2	Ag-CMC
	2,4	Ag2-CMC

A síntese das amostras **Ag-PVA** e **Ag-CMC**, foi realizada misturando-se 25 mL de uma solução $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de AgNO₃ a 12,5 mL de PVA 1% ou CMC 1% sob agitação e à temperatura ambiente. Em seguida, sob agitação constante e em banho de gelo, adicionou-se 75 mL de uma solução 2×10^{-3} mol L⁻¹ de NaBH₄. Depois de 20 minutos foi cessada a agitação e aguardou-se chegar à temperatura ambiente. O volume final foi completado a 125,0 mL com água ultrapura. Para a síntese das amostras **Ag2-PVA** e **Ag2-CMC**, foi seguido o mesmo procedimento, exceto pela substituição do uso da solução $5,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de AgNO₃ por uma de concentração $2,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹.

Na síntese da amostra **Ag-citrato**, dissolveu-se inicialmente $4,2 \times 10^{-3}$ g de AgNO₃ e $7,4 \times 10^{-3}$ g de citrato de sódio em 100 mL de água ultrapura. A esta solução adicionou-se sob vigorosa agitação 3 mL de uma solução $2,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de NaBH₄, sendo a agitação mantida por mais 30 segundos.

Após a sua síntese, as amostras **Ag-PVA**, **Ag-CMC**, **Ag2-PVA**, **Ag2-CMC** e **Ag-citrato** foram caracterizadas quanto à forma, tamanho e estabilidade das nanopartículas obtidas. Estas amostras foram utilizadas nos testes de avaliação da atividade bactericida das nanopartículas de prata.

SÍNTESE DE NANOPARTICULAS DE PRATA COM DIFERENTES GRAUS DE AGLOMERAÇÃO

Com o objetivo de obter amostras de AgNP com diferentes graus de aglomeração, foram realizadas sínteses utilizando razões molares $[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3]$ que variaram de 0,25 a 4,84. O procedimento de síntese consiste na adição de alíquotas de uma solução AgNO_3 $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a um volume fixo (150 mL) de uma solução de NaBH_4 $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ em banho de gelo e sob agitação constante. A quantidade de AgNO_3 adicionada dependerá da razão $[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3]$ utilizada. Em seguida, adicionou-se 10 mL de uma solução CMC 1% ou PVA 1%, utilizados como estabilizantes. As amostras obtidas, o estabilizante utilizado em cada uma delas e a razão molar $[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3]$ encontram-se na Tabela 2.2.

Tabela 2.2 - Razões molares $[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3]$ utilizadas nas sínteses das amostras de AgNP.

Estabilizante	$[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3]$	Identificação da amostra*
PVA	4,84	6P
CMC	4,84	5C
PVA	1,20	2P
CMC	1,20	4C
CMC	0,48	3C
PVA	0,25	1P

* Os números na identificação das amostras referem-se à numeração das mesmas e as letras (C) e (P) correspondem respectivamente aos estabilizantes, CMC e PVA utilizados na síntese das suspensões de AgNP.

As amostras **1P**, **2P**, **3C**, **4C**, **5C** e **6P** foram caracterizadas quanto à forma, tamanho, grau de agregação e estabilidade.

2.3.2 - CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS EM ESTUDO

As amostras de TiO₂ foram caracterizadas quanto ao tamanho, área superficial e morfologia e as amostras de AgNP foram caracterizadas quanto ao tamanho e morfologia. Dentre as técnicas de caracterização existentes, utilizou-se difração de raios-X (DRX), microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a microscopia eletrônica de transmissão (MET), área superficial específica pelo método Brunauer-Emmet-Teller (S_{BET}), espectroscopia no infravermelho (IV), espectroscopia UV-Vis e espectroscopia de reflectância difusa na região UV-Vis (ERD UV-Visível). As amostras sólidas de TiO₂ foram caracterizadas por IR, DRX, S_{BET} , ERD UV-Vis e MEV. As amostras de TiO₂ e AgNP foram caracterizadas por espectroscopia UV-Visível, MET e MEV.

2.3.2.1 - ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO

Os espectros na região do infravermelho médio foram obtidos a partir de pastilhas formadas da mistura do material a ser analisado com KBr numa proporção de 1:9 (m/m). O aparelho utilizado foi um espectrofotômetro FTIR MB Series MICHELSON e cada espectro foi registrado com 32 varreduras na resolução de 4 cm⁻¹.

2.3.2.2 - ESPECTROSCOPIA UV-VISÍVEL

Para a caracterização das dispersões coloidais sintetizadas, foi utilizado um espectrofotômetro PERKIN HELMER (HP) modelo 8453 que atua na região UV-Visível. Quando necessário, as amostras foram diluídas com água ultrapura numa proporção de 1:5 (v/v) ou 1:10 (v/v).

2.3.2.3 - ESPECTROSCOPIA DE REFLECTÂNCIA DIFUSA NA REGIÃO UV-VISÍVEL

A análise dos sólidos obtidos foi realizada em um espectrofotômetro VARIAN, modelo DMS-100, de duplo feixe, sendo utilizado BaSO_4 como referência. Os espectros de absorbância foram transformados pelo software do próprio instrumento na função F (R) utilizando o método Kubelka-Munk (Kortù 1969; Ali *et al.* 2010).

2.3.2.4 - MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Para a obtenção das imagens de microscopia eletrônica de varredura foi preparado primeiramente um suporte de latão, no qual se fixou uma fita de carbono condutora dupla face (3M^{TM}) onde foi feita a dispersão da amostra. Em seguida, metalizou-se esta superfície com Au a baixo vácuo em um metalizador Balzers modelo MED 20. O microscópio eletrônico usado foi um JEOL modelo JSM-6360LV para as amostras de AgNP e TiO_2 .

2.3.2.5 - DIFRAÇÃO DE RAIOS-X

Os difratogramas foram obtidos utilizando um difratômetro de raios-X SHIMADZU XDR 7000 utilizando uma radiação Cu ($K \pm 1,542 \text{ \AA}$) a uma voltagem de 40 kV/30 mA numa faixa de $5-80^\circ$.

2.3.2.6 - ÁREA SUPERFICIAL

As medidas de área superficial específica foram realizadas utilizando o método Brunauer-Emmet-Teller, S_{BET} (Iler 1979) de multipontos em um aparelho ASAP 2010 Micrometrics conectado a um controlador de fluxo. A adsorção foi feita

com N₂ na temperatura do N₂ líquido. Cerca de $4,0 \times 10^{-1}$ g do material foi tratado em estufa a 120°C por 24 horas e em seguida encaminhada para o processo de gaseificação a 250°C no instrumento ASAP.

2.3.3 - ESPECIAÇÃO DA PRATA NAS AMOSTRAS DE AgNP

A quantificação das concentrações de nAg e de íons Ag⁺ nas amostras de AgNP sintetizadas foi feita em duas etapas: primeiro a quantificação da prata total (prata elementar, Ag⁰) e em seguida a determinação dos íons Ag⁺.

A quantificação da prata total foi realizada por espectrometria de emissão em plasma acoplado indutivamente (ICP-AES), cujas condições de operação estão na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Condições de operação do instrumento para a determinação do Ag total nas amostras de AgNP.

Vazão da amostra (mL min ⁻¹)	1,00
Potência da radio frequência (W)	1300
Vazão do plasma de argônio (L min ⁻¹)	15
Vazão do argônio auxiliar (L min ⁻¹)	0,50
Vazão de nebulização (L min ⁻¹)	0,80
Leitura do <i>delay</i> (s)	30
Tempo de integração (s) (min. – max.)	1-5
Replicatas	3
Comprimento de onda (nm)	Ag I: 328,068
Correção do <i>background</i>	2 pontos

As medidas analíticas foram feitas em triplicata, e para minimizar o efeito de matriz das amostras (causado pela presença dos estabilizantes utilizados na

síntese das amostras de AgNP) utilizou-se a adição de padrão como método de calibração.

Para a construção da curva analítica, adicionou-se às amostras de AgNP, incrementos de Ag^+ (padrão AAS Ag) na faixa de 18,5 - 92,7 $\mu mol L^{-1}$.

A concentração dos íons Ag^+ em cada amostra foi determinada por potenciometria direta utilizando um pHmetro (Tecnal TEC-2 com sensibilidade $\pm 1,0$ mV) com um eletrodo íon seletivo (EIS) de CuS/ Ag_2S acoplado a um eletrodo de referência de dupla junção. Como o solvente utilizado na síntese das amostras de AgNP foi água ultrapura, não foi necessário ajustar a força iônica. As medidas foram realizadas em triplicata e a faixa de trabalho foi de 10^{-6} a 10^{-3} mol L^{-1} de $AgNO_3$.

Deste modo, além do cálculo da % de Ag^+ , foi possível obter por diferença a concentração de nAg presente em cada amostra de AgNP.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 - CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS DE TiO_2 COMERCIAL E SINTETIZADO

As amostras sólidas de TiO_2 sintetizadas (**Anatase-S**, **Rutilo-S** e **M-S**) e comerciais (**P25** e **P25***) foram caracterizadas quanto a sua composição química, fase cristalina, morfologia, tamanho de partícula, área superficial e propriedades ópticas.

2.4.1.1 - ESTUDO VIBRACIONAL

Usando a espectroscopia na região do infravermelho foi possível identificar os grupos funcionais presentes no material (Figura 2.4).

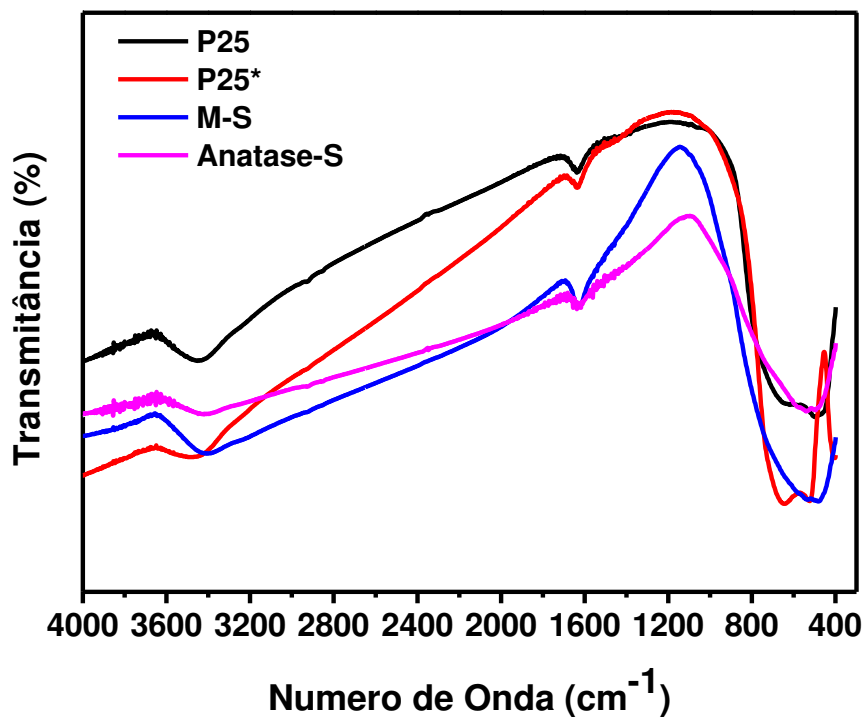


Figura 2.4 - Espectros na região do infravermelho das amostras de TiO_2 , exceto para a amostra **Rutilo-S**.

Os picos entre 400 e 600 cm^{-1} e entre 680 e 800 cm^{-1} indicados na Figura 2.4 são característicos do estiramento Ti-O-Ti e da presença da estrutura TiO_n ($n < 6$), respectivamente (Ivanova & Harizanova 2001). As absorções em torno de 3500 e 1600 cm^{-1} indicam a presença do estiramento O-H, devido à adsorção de água na superfície do material (Griffiths & Rochester 1977; Connor *et al.* 1999).

2.4.1.2 - CRISTALINIDADE, TAMANHO, ÁREA SUPERFICIAL E MORFOLOGIA

A cristalinidade das amostras de TiO_2 foi indicada pelos difratogramas de raios-X (Figura 2.5), os quais mostraram a predominância da fase anatase ou rutilo nas amostras **Rutilo-S**, **P25*** e **Anatase-S**.

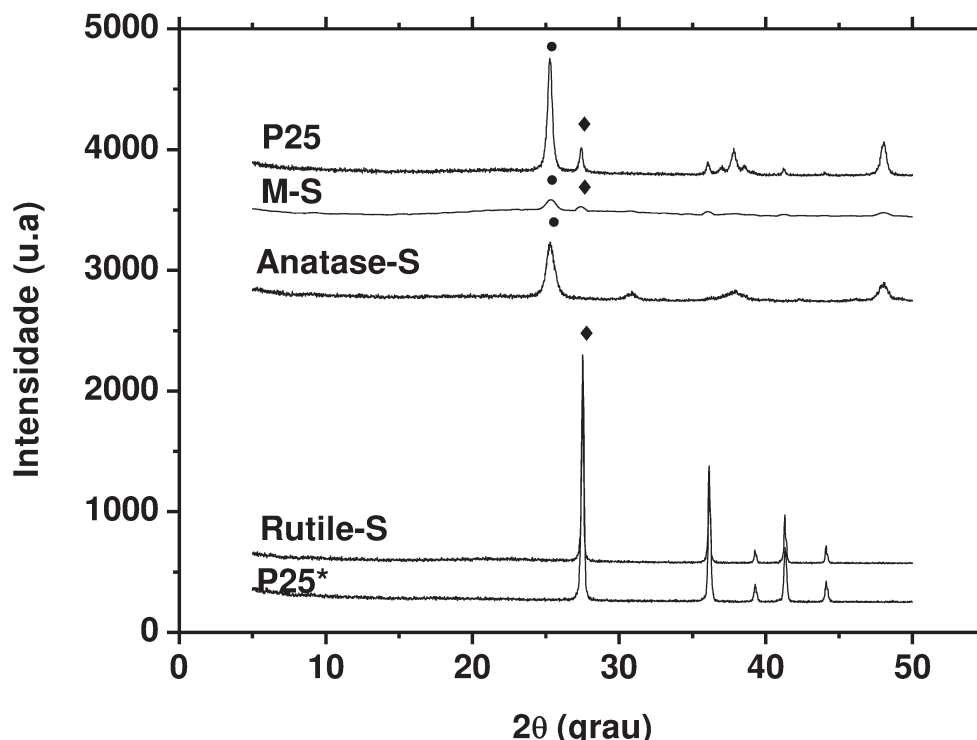


Figura 2.5 - Difratomogramas de Raios-X para as amostras de TiO_2 . Formas cristalinas (•) Anatase e (♦) Rutilo.

Na amostra **Anatase-S**, o plano (101) em $2\theta = 25^\circ$ é característico da estrutura tetragonal do TiO_2 da fase cristalina anatase (Costa *et al.* 2006; Crişan *et al.* 2007; Su *et al.* 2009; Wang *et al.* 2007). Em **Rutilo-S** e **P25*** predomina a fase cristalina rutilo, como pode ser visto pelo plano de difração (110) em $2\theta = 27^\circ$ (Jung & Kim 2010). A mistura de ambas as formas, anatase e rutilo foi encontrada nas amostras **P25** e **P25***, conforme indicam os dois planos encontrados.

A percentagem de anatase (f) presente em cada amostra foi calculada, pois esta fase é mais fotoativa que o rutilo e será importante para as discussões futuras. Logo, a partir dos dados de DRX foram utilizadas as intensidades dos picos referentes às difrações características de anatase (I_A) e rutilo (I_R), e aplicadas à Equação 2.3 (Jung & Kim 2010):

$$f = \left(1 + 1,26 \frac{I_R}{I_A} \right)^{-1} \quad \text{(Equação 2.3)}$$

Além disto, ao utilizar as informações dos difratogramas em conjunto com a equação de Debye-Scherrer foi possível estimar o tamanho médio dos cristalitos de TiO₂ (Equação 2.4) (Jung & Kim 2010):

$$L = \frac{k \cdot \lambda}{B \cdot \cos \theta} \quad \text{(Equação 2.4)}$$

Onde:

L = tamanho da partícula (cristalito);

K = constante cujo valor é 0,9, assumindo que as partículas têm forma esférica;

λ = comprimento de onda dos raios-X (1,5406 Å para a radiação K α do Cu);

B = largura do pico de difração (plano 101 para anatase e plano 110 para rutilo) determinado à meia altura de sua intensidade;

θ = ângulo de Bragg referente do pico de difração em graus.

A Tabela 2.4 mostra os tamanhos médios dos cristalitos, os valores de área superficial e a % de anatase e rutilo nas amostras de TiO₂. O tamanho dos cristalitos de cada amostra variou na faixa de 10-27 nm e a área superficial de 9 a 49 m² g⁻¹. As amostras contendo predominantemente a fase anatase (**Anatase-S**), mostraram menor tamanho e maior área superficial, comparadas às amostras com maior quantidade de rutilo na sua composição (**Rutilo-S** e **P25***). Isto ocorre devido à temperatura de síntese das amostras **Rutilo-S** e **P25***, uma vez que, ao elevar a temperatura de síntese de 400 para 900 °C causa a aglomeração das nanopartículas e com isso, aumento do tamanho do cristalito (Kumar 1995; Li *et al.* 2004).

Tabela 2.4 - Valores de % da fase cristalina, tamanho do cristalito e S_{BET} nas amostras de TiO_2 .

Amostras	% fase cristalina	Tamanho do cristalito (nm)	S_{BET} ($\text{m}^2 \text{g}^{-1}$)	Tamanho médio de partícula** (nm)	Tamanho médio dos aglomerados** (nm)
P25	~ 30% rutilo e 70% anatase	19	49	25	400
M-S	24 % rutilo e 76% anatase	12	49	20	450
Anatase-S	~ 100% anatase	10	44	19	330
Rutilo-S	~ 100% rutilo	27	17	33	400
P25*	~ 100% rutilo	22	9	-	-

** Determinados por MET.

As amostras **M-S** e **P25** apresentaram os menores tamanhos de cristalito (12-19 nm), e maiores valores de área superficial ($49 \text{ m}^2 \text{g}^{-1}$) em relação às amostras que contêm apenas anatase ou rutilo.

As nanopartículas de TiO_2 (11-27 nm) têm a tendência de formar aglomerados porosos com tamanhos médios de aproximadamente 3 a 10 μm , como pode ser observado nas micrografias na Figura 2.6.

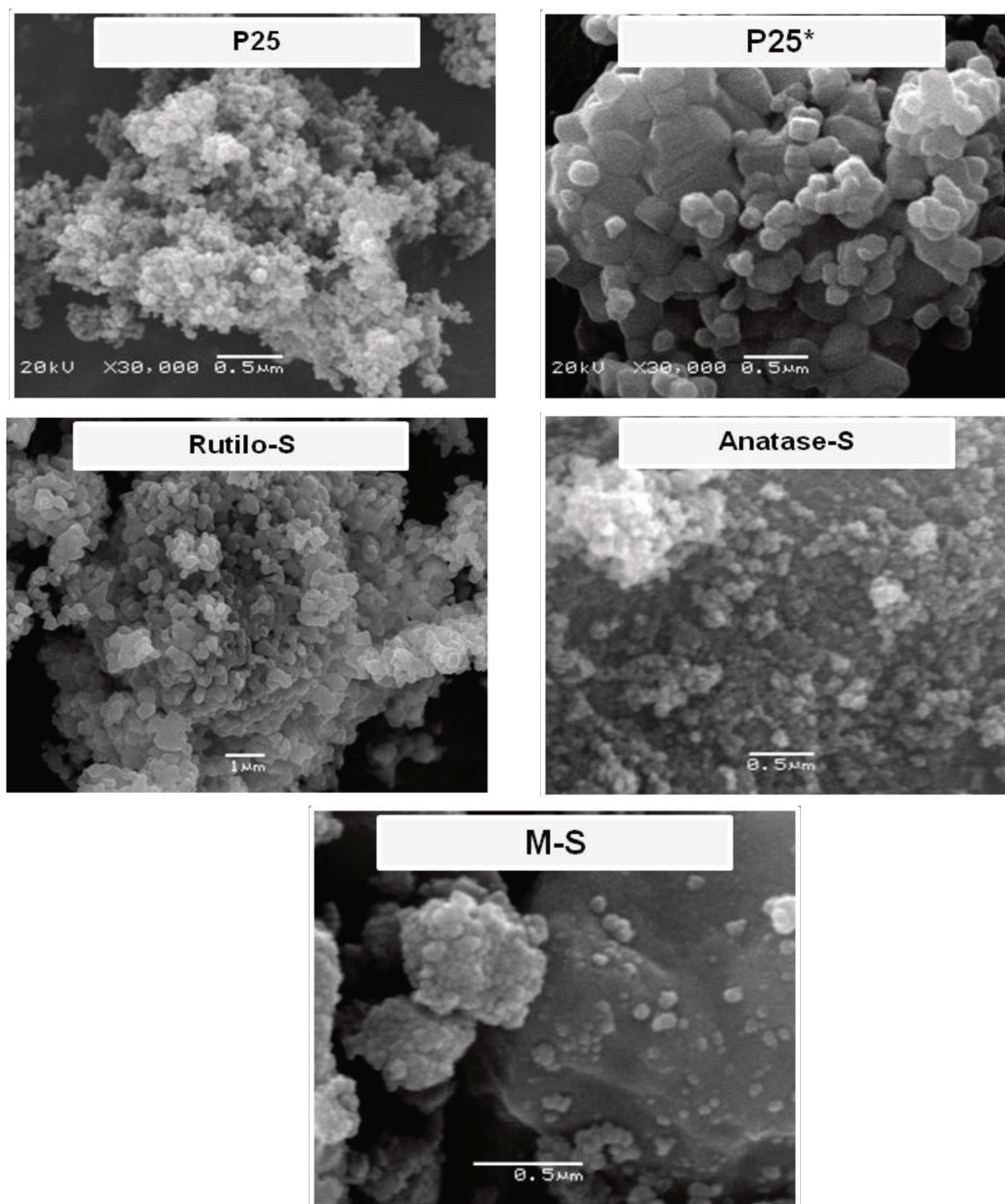
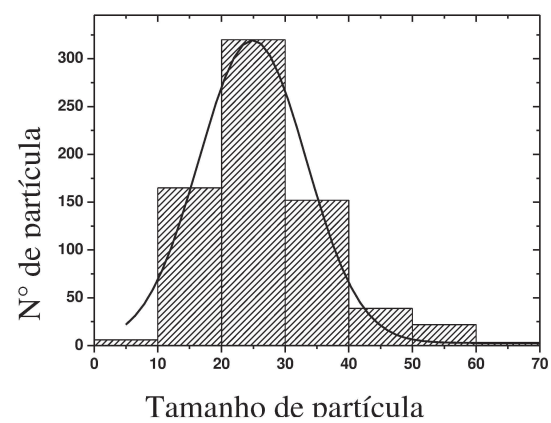
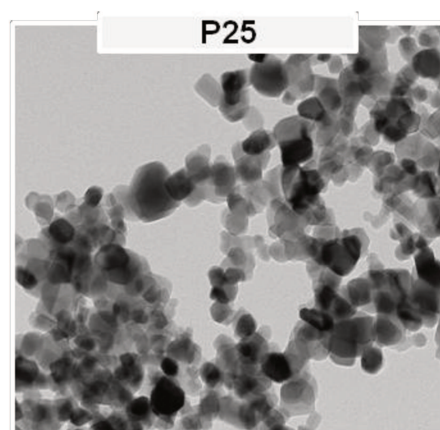
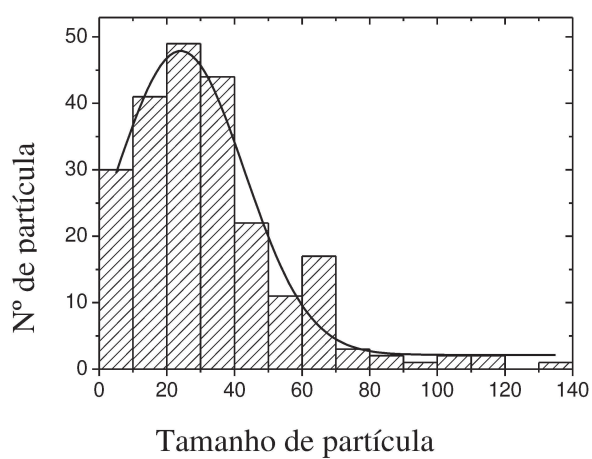
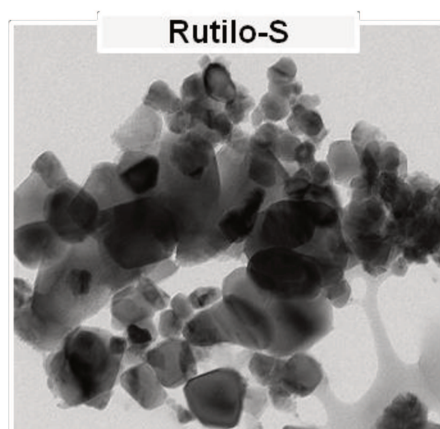
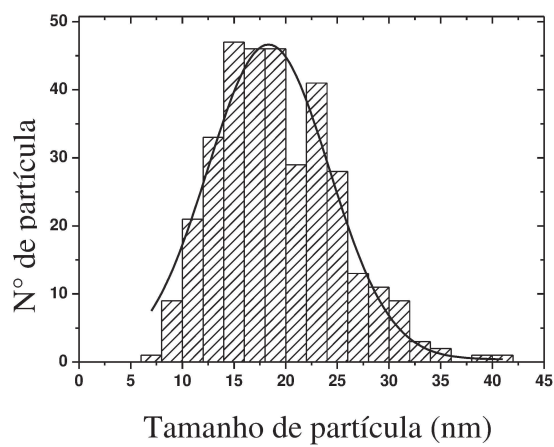
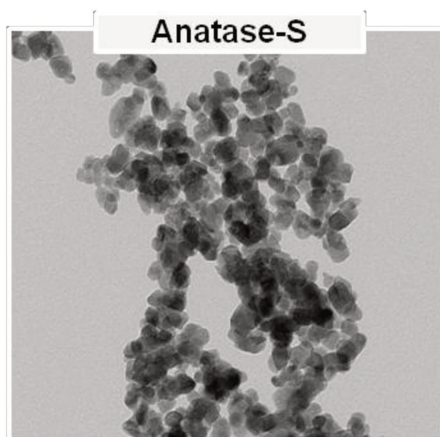


Figura 2.6 Micrografias das amostras **P25**, **P25***, **Rutilo-S**, **Anatase-S** ampliadas 30000x e **M-S** ampliada 50000x.

Contudo, em suspensões aquosas que tenham passado pelo processo de sonicação por 30 minutos, as nanopartículas de TiO_2 podem estar dispersas em aglomerados menores (Figura 2.7) em relação ao material sólido.



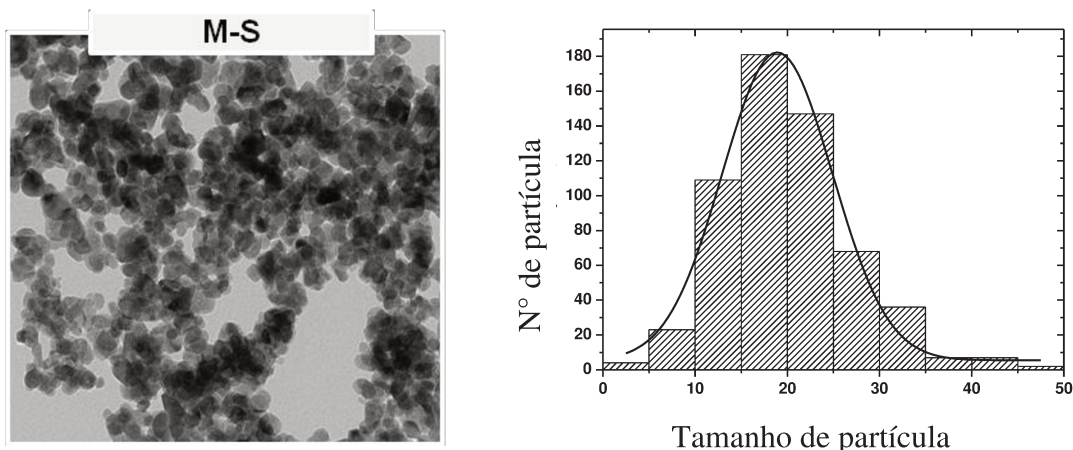


Figura. 2.7 Micrografias de MET das amostras de TiO_2 , exceto para a amostra **P25***.

Deste modo, as micrografias de MET na Figura 2.7 mostraram que **Anatase-S**, **M-S** e **P25** apresentaram partículas na faixa 19 a 25 nm, que formam aglomerados entre 330 e 450 nm (Tabela 2.4). **Rutilo-S** apresentou aglomerados na mesma faixa, embora com partículas de aproximadamente 35 nm.

2.4.1.3 - PROPRIEDADES ÓPTICAS

Os espectros ERD UV-Visível das amostras TiO_2 (Figura 2.8) mostraram que os comprimentos de onda de fotoativação destas amostras estiveram entre 376 e 410 nm. As amostras **Anatase-S**, **M-S** e **P25** apresentaram energia de *band gap* na região UV, sendo 390, 392 e 376 nm, respectivamente. As amostras rutilo (**Rutilo-S** e **P25***) apresentaram energia de *band gap* na região visível em torno de 405 nm. Estes valores estão de acordo com o do TiO_2 *bulk*, mas o deslocamento para maiores comprimentos de onda está associado a nanomateriais na faixa de 5-10 nm (Sasaki & Watanabe 1997; Carp *et al.* 2004).

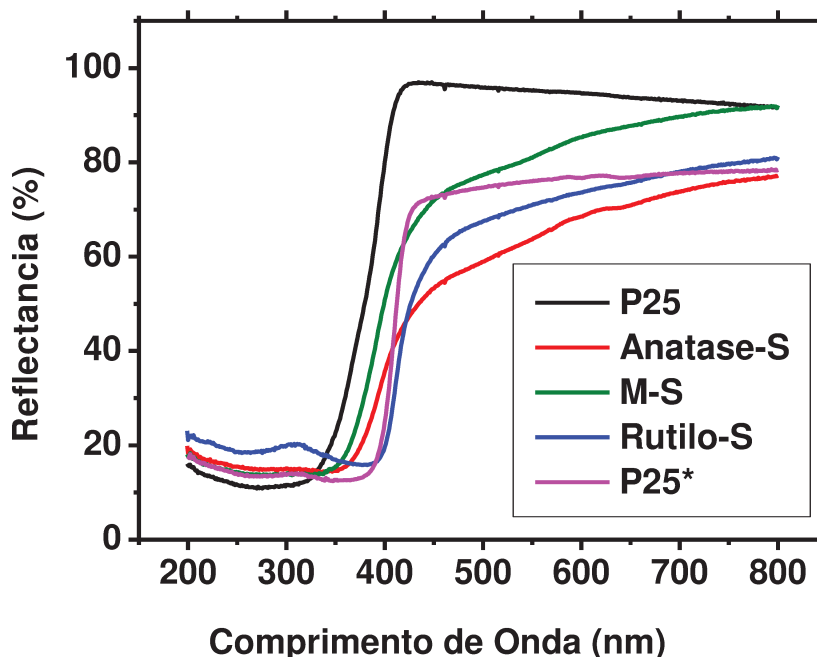


Figura 2.8 - Espectros ERD UV-Visível das amostras de TiO_2 .

Os valores de E_g das amostras de TiO_2 foram obtidas utilizando o método Kubelka-Munk. Assumindo uma transição óptica direta, a função $[F(R) h \nu]^2$ foi plotada contra $\nu = E_g$ (eV) (Figura 2.9), e os resultados foram obtidos pela extrapolação, $[F(R) h \nu]^2 = 0$ (Tunc *et al.* 2010).

De acordo com a Figura 2.9, a amostra de TiO_2 anatase (**Anatase-S**) mostrou valor de *band gap* (3,02 eV) próximo ao da amostra de rutilo comercial (**Rutilo-S**), que apresentou $E_g = 3,03$ eV. A amostra de rutilo sintetizada (**P25***) foi a que apresentou menor *band gap* (2,92 eV).

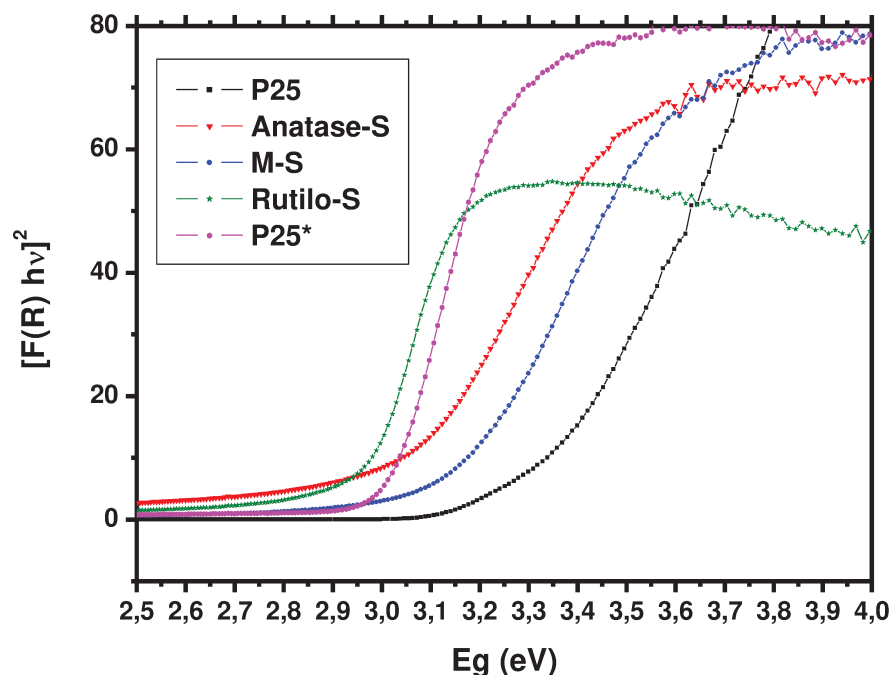


Figura 2.9 Espectros de refletância transformados pelo método Kubelka-Munk para amostras de TiO_2 .

No entanto, as amostras **M-S** e **P25**, mostraram os valores de E_g mais elevados, respectivamente, 3,14 eV e 3,37 eV. Isto pode ser explicado em termos da taxa de recombinação e^-/h^+ causada pela mistura das fases, anatase e rutilo (Bickley *et al.* 1991; Zhang *et al.* 2000; Ohno *et al.* 2001). Os espectros UV-Visível das amostras de TiO_2 têm sido utilizados para caracterizar e quantificar a concentração de TiO_2 utilizando a absorção em $\lambda = 329$ nm (Federici *et al.* 2007). No entanto, no presente trabalho, os mesmos são utilizados para identificar e determinar a região de fotoativação das amostras de TiO_2 .

Os espectros UV-Visível das amostras **P25** e **Anatase-S** (Figura 2.10) apresentam uma banda de absorção entre 250 e 450 nm, com absorção máxima em 329 nm. A amostra **M-S** mostrou baixa absorção nesta região e **P25*** apresentou maior tendência de absorção na região visível ($\lambda = > 400$ nm). **Rutilo-S** não apresentou absorção significativa.

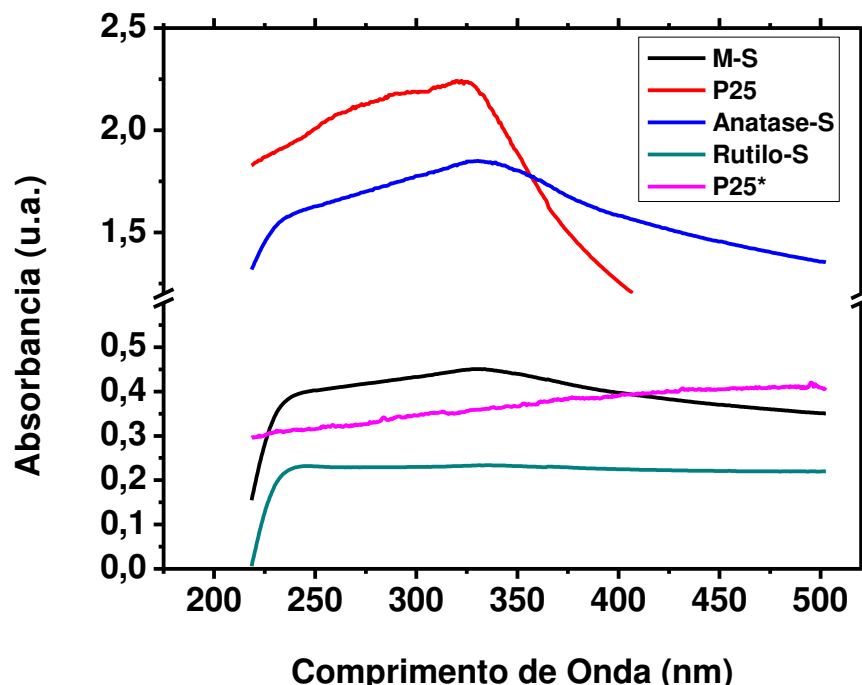


Figura 2.10 Espectros de absorção UV-Visível das amostras de TiO_2 .

2.4.2 - CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE AgNP

Todas as amostras de AgNP, **Ag-citrato**, **Ag-PVA**, **Ag-CMC**, **Ag2-PVA** e **Ag2-CMC** sintetizadas segundo os diferentes tipos de agentes estabilizantes utilizados apresentaram cor amarelada a castanho, como está ilustrado na Figura 2.11.

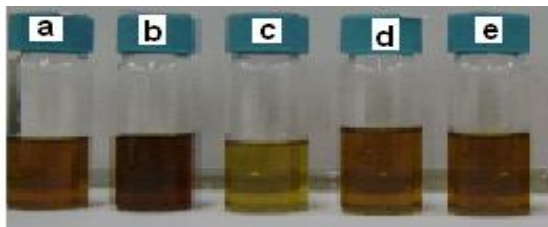


Figura 2.11. Amostras de AgNP após 60 dias de sua síntese (a) Ag-PVA (b) Ag-CMC (c) Ag-citrato (d) Ag2-PVA (e) Ag2-CMC.

Para caracterizar as suspensões de AgNP quanto a forma das nAg obtidas, utilizou-se a espectroscopia UV-Visível, que permite a observação do fenômeno de ressonância dos plasmon de absorção de nanopartículas metálicas (Noguez 2007). As suspensões de AgNP sintetizadas (**Ag-citrato**, **Ag-PVA**, **Ag-CMC**, **Ag2-PVA** e **Ag2-CMC**) foram diluídas (1:10) e em seguida resgistrados seus espectros (Figura 2.12).

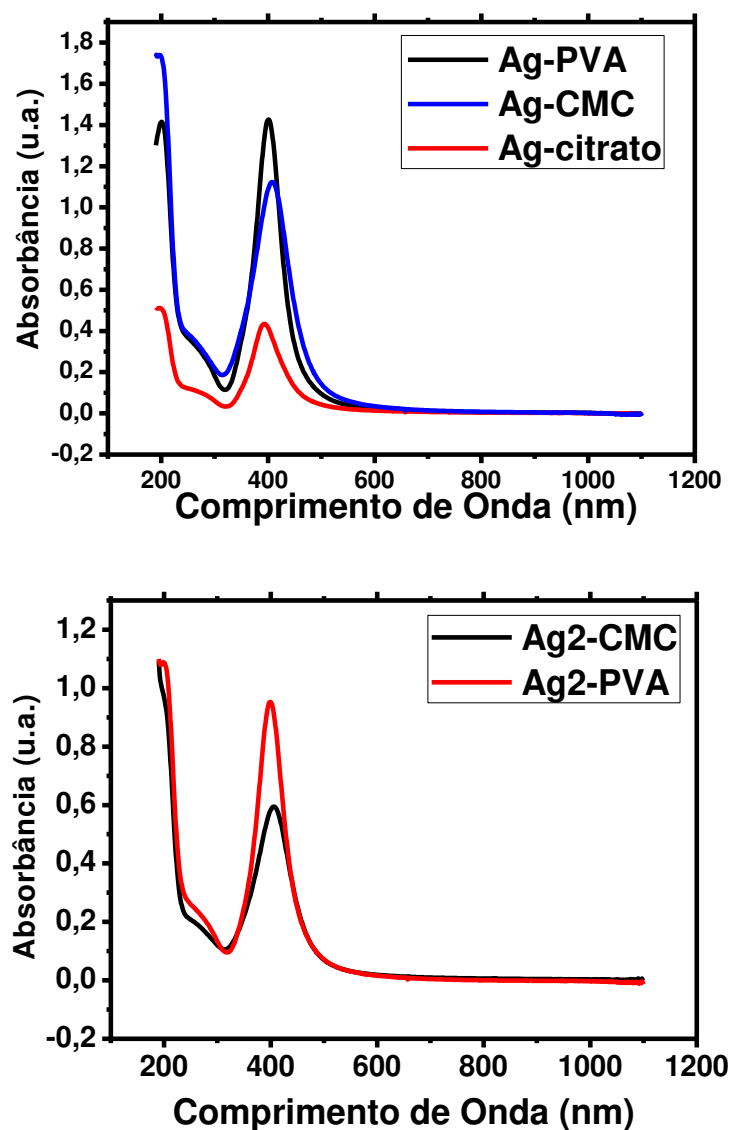


Figura 2.12 - Espectros UV-Visível para as amostras **Ag-PVA**, **Ag-CMC**, **Ag-citrato**, **Ag2-PVA** e **Ag2-CMC**.

A presença dos plasmon de absorção em torno de 400 nm para todas as amostras de AgNP (Figura 2.12) evidenciam a formação de Ag nanométrica na forma esférica nas amostras de AgNP (Noguez 2007; Solomon *et al.* 2007; Zhang & Noguez 2008).

2.4.2.1 ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS DE AgNP COM NANOPARTÍCULAS ESFÉRICAS

Com o intuito de avaliar a estabilidade das amostras de AgNP a serem utilizadas nas próximas etapas deste trabalho, foram realizados estudos contínuos envolvendo tais amostras. Em um estudo inicial foram avaliadas as amostras **AgPVA**, **Ag2PVA**, **AgCMC** e **Ag2CMC**, sintetizadas em maio de 2008. Para cada uma destas amostras foram registrados os espectros na região UV-visível após 5 dias e após 20 meses decorridos da síntese (Figura 2.13) e adicionalmente, para **Ag2PVA** e **Ag2CMC**, foram registrados também os espectros UV-visível após 8 meses da sua síntese.

Como observado nas Figuras 2.13A e 2.13D, as amostras **AgPVA** e **Ag2CMC** revelam-se estáveis até 20 meses após a sua síntese, visto que o deslocamento e a diferença na intensidade dos espectros após este período é mínimo. Este comportamento evidencia a predominância da mesma população de nanopartículas na forma esférica, visto que os picos possuem quase a mesma intensidade em torno de 400 nm e a tendência a não aglomeração.

A amostra **Ag2PVA** (Figura 2.13C) apresenta o mesmo comportamento até o oitavo mês após a sua síntese. Passados 20 meses, o espectro de menor intensidade revela que a população de nanopartículas diminuiu.

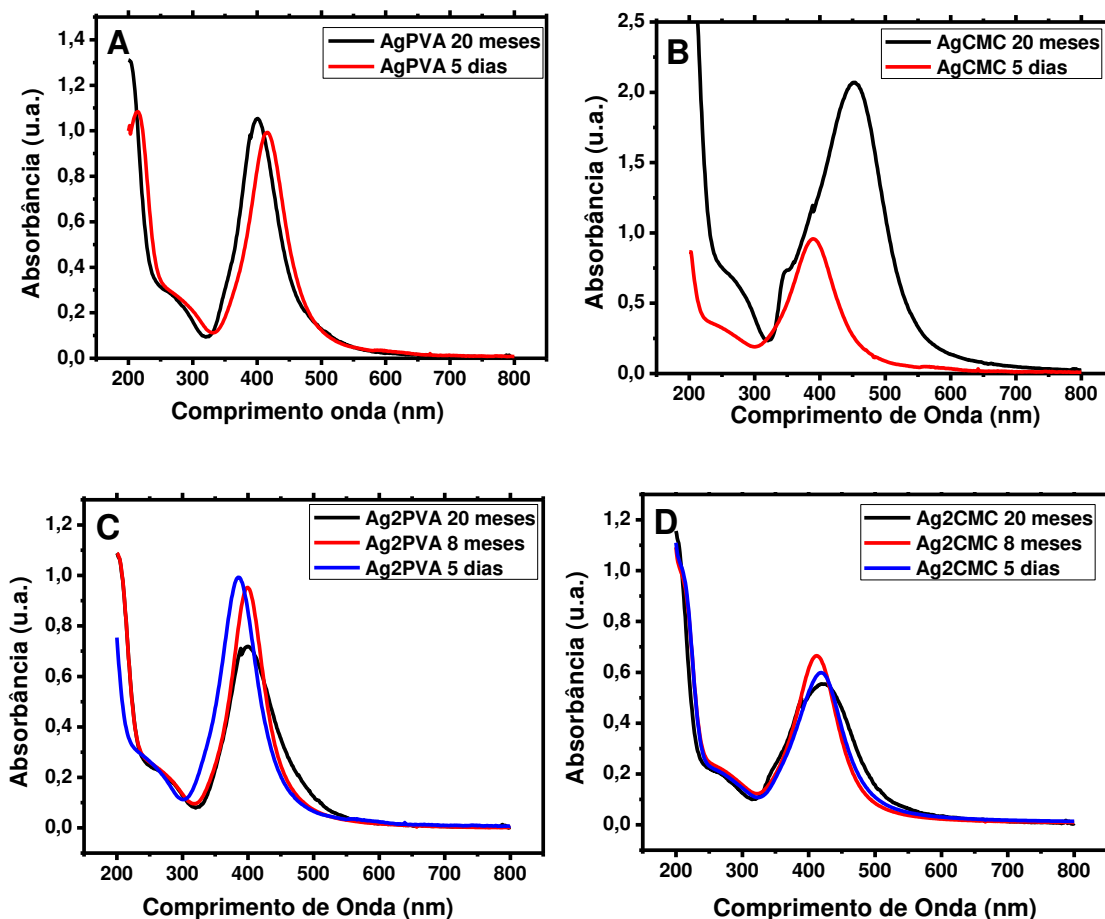


Figura 2.13 - Espectros de absorção UV-Visível das amostras de AgNP , **AgPVA**, **Ag2PVA**, **AgCMC** e **Ag2CMC**, sintetizadas em maio de 2008.

O comportamento da amostra **AgCMC** (Figura 2.13B) mostra que após 20 meses a população de nanopartículas de Ag aumentou consideravelmente. O deslocamento do máximo de absorbância de 390 nm para 455 nm indica que as nanopartículas podem não ser esferas perfeitas, dada possível tendência à aglomeração observada (Solomon *et al.* 2007; Oliveira 2005).

2.4.2.2 CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES DE AgNP COM DIFERENTES GRAUS DE AGLOMERAÇÃO

O aspecto visual das amostras de nanoprata sintetizadas, **1P**, **2P**, **3C**, **4C** e **6P** é ilustrado na Figura 2.14. A mudança de coloração é indício dos diferentes graus de aglomeração das nanopartículas de prata. A mudança de coloração das amostras de AgNP, do amarelo ao cinza indica que as nAg que estavam na forma esférica (**6P**) passam a formas mais alongadas (**1P**) (Solomon *et al.* 2007)

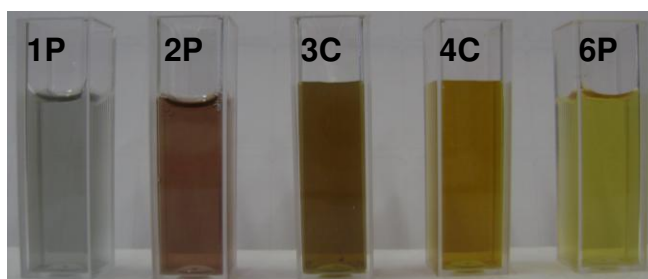


Figura 2.14 - Aspecto visual das amostras de AgNP sintetizadas. Na ordem da esquerda para a direita observa-se que o grau de aglomeração das nAg diminui.

Os espectros de absorção UV-Visível das amostras de AgNP (Figura 2.15) mostraram picos de absorção de ressonância plasmon em diferentes faixas espectrais. Este aspecto se deve à presença de nanoprata em diferentes graus de aglomeração. A presença de uma banda com absorção máxima entre 400 e 443 nm (Figura 2.15) é indício da presença de nanoprata na forma esférica, enquanto outra banda com absorção máxima entre 500 e 700 nm sugere a formação de nanoprata alongadas (Aslan *et al.* 2005).

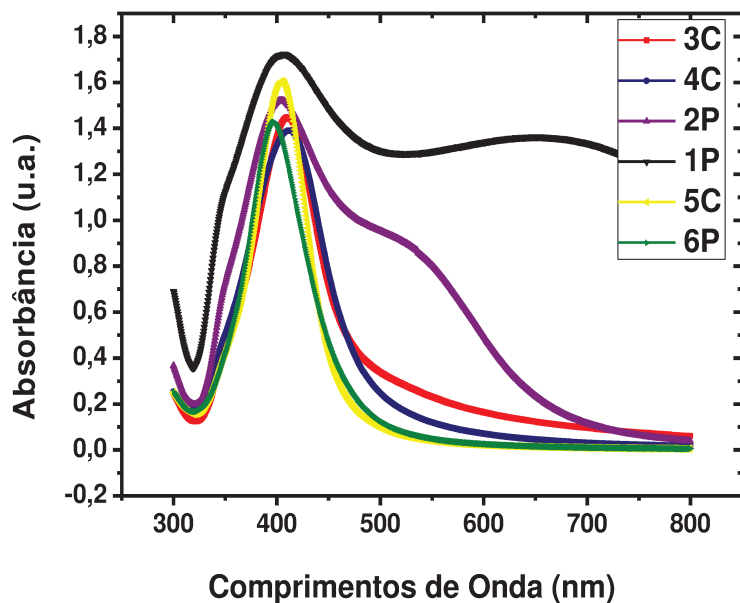


Figure 2.15 - Espectros de absorção UV-Visível das amostras de AgNP, **1P**, **2P**, **3C**, **4C** e **5C** e **6P** que apresentaram diferentes graus de aglomeração.

De acordo com Aslan *et al.* (2005), a presença de duas bandas de ressonância plasmon entre 400 e 550 nm sugere a formação de nanobastões. As bandas de ressonância com máximo em $\lambda \sim 400$ nm das amostras, **4C**, **5C** e **6P** indicam que nestas amostras há a predominância de nanoprata esférica. As micrografias das amostras **5C** e **6P** (Figura 2.16) evidenciam este comportamento e as nanoprata dispersas na suspensão aquosa têm tamanho entre 8-16 nm, como mostra a distribuição de tamanho das nanopartículas da amostra **5C**.

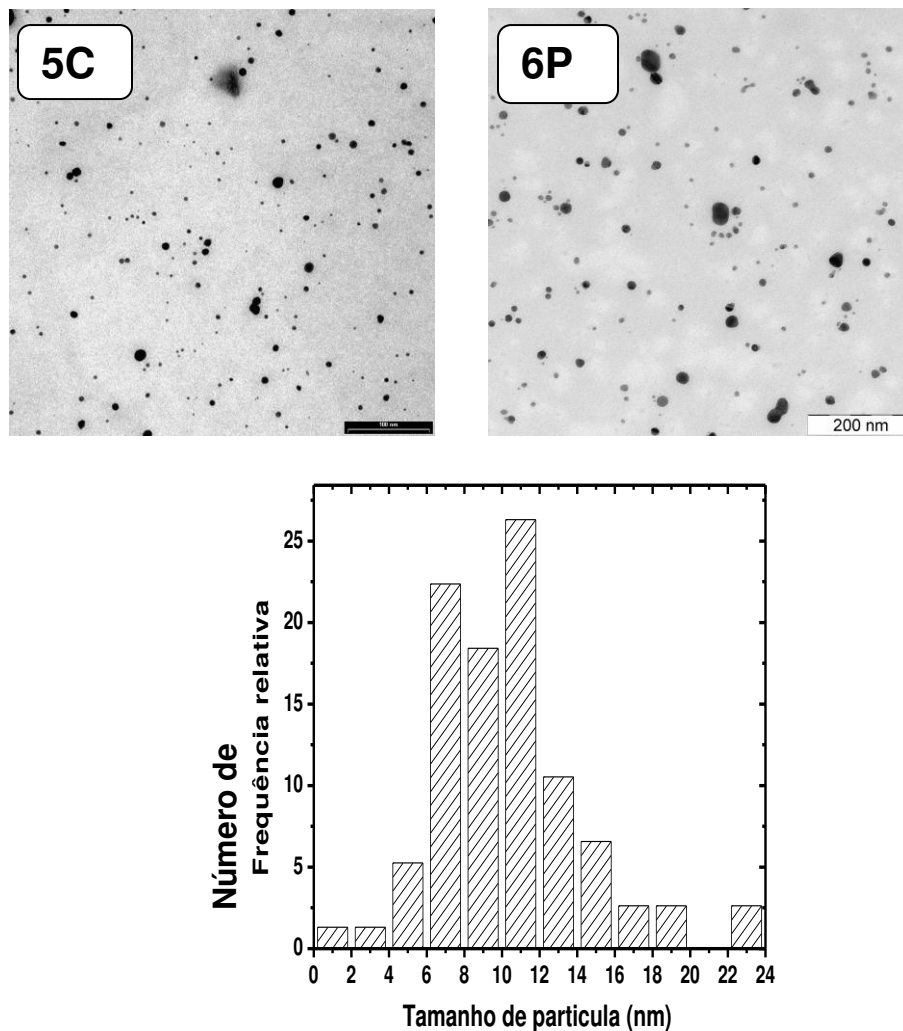


Figura 2.16 - Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão das amostras **5C** e **6P** e a distribuição de tamanho de partícula da amostra **5C**.

Por outro lado, as duas bandas de absorção plasmon em 400 e 535 nm da amostra **2P** (Figura 2.15), indicam que as nAg apresentam tendência à agregação e consequentemente à formação de formas alongadas destas nanopartículas, como indicado na Figura 2.17.

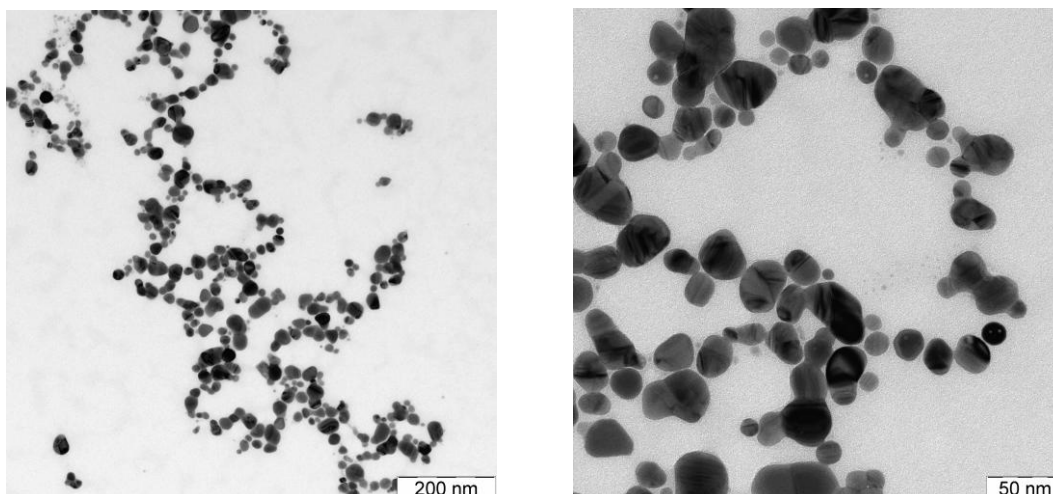


Figura 2.17 - Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão da amostra **2P** nas escalas de 200nm e 50 nm.

Dentre as amostras de AgNP sintetizadas com diferentes graus de aglomeração, a amostra **1P** tem maior tendência à aglomeração das nAg, por apresentar um pico de ressonância por volta de 400 nm e uma banda de absorção acima de 600 nm. Isto é confirmado através das imagens de transmissão eletrônica (Figura 2.18) da amostra, que apresenta nAg aglomeradas, nAg esféricas dispersas na suspensão (representadas pelos pontos mais claros), além de nAg que constituem pequenos agrupamentos isolados (Figura 2.18A). Estes pequenos agrupamentos, constituídos de nAg de tamanhos diferentes bem como os agregados maiores estão indicados nas Figura 2.18B e C, respectivamente.

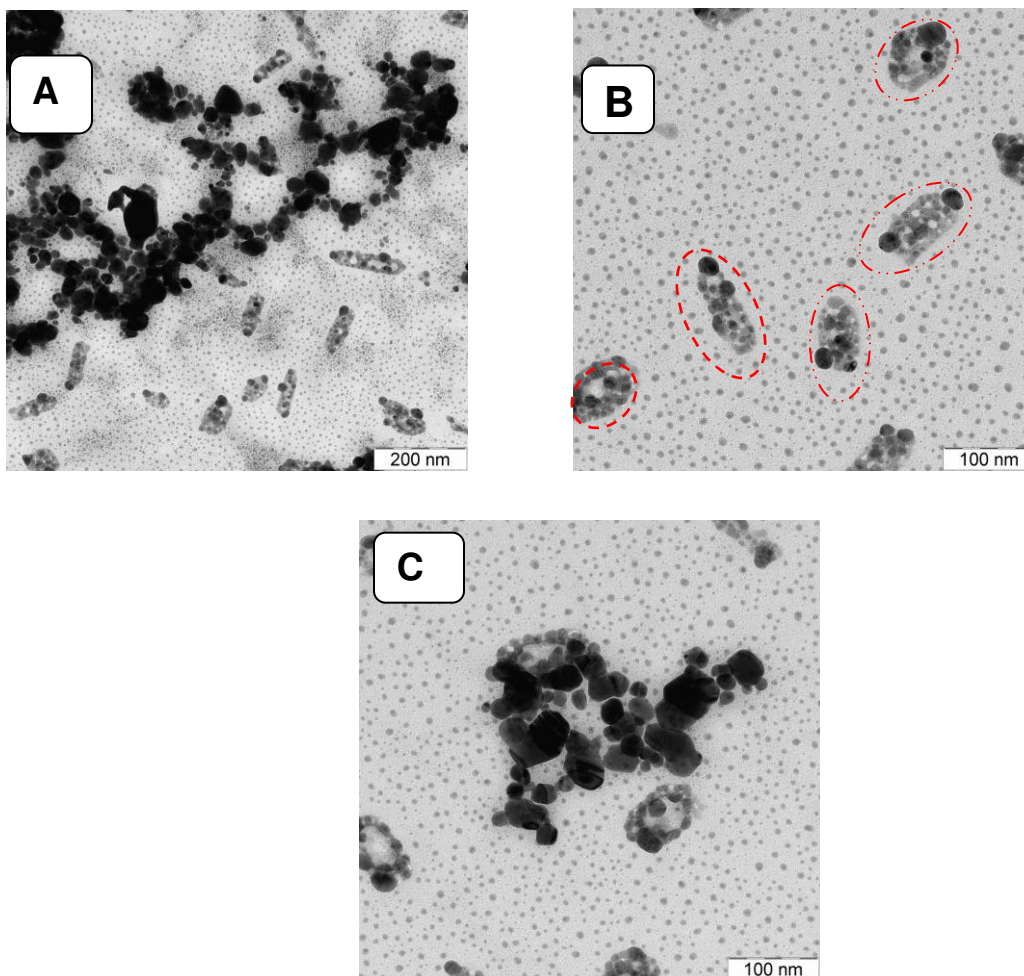


Figura 2.18 - Micrografias de microscopia eletrônica de transmissão da amostra **1P** nas escalas de 200, 100 e 50 nm.

A tendência à aglomeração observada nas amostras **1P** e **2P**, ocorreu devido à desestabilização do meio reacional, causado por dois fatores: o tipo de estabilizante utilizado e a mudança da carga superficial das nanopartículas. Neste caso, o excesso de precursor (AgNO_3) adicionado promoveu um excesso de cargas positivas (Ag^+) na superfície das nanopartículas e tanto os íons BH_4^- e o PVA não foram eficientes em promover a estabilização eletrostática e estérica, levando ao processo de aglomeração das nAg (Hand *et al.* 2008). Desta maneira, foi possível utilizar o agente precursor (AgNO_3) como reagente limitante para a produção de nAg de tamanho e formas diferentes.

2.4.3 - ESPECIAÇÃO DA PRATA NAS AMOSTRAS DE AgNP

2.4.3.1 - QUANTIFICAÇÃO DA PRATA TOTAL

As amostras de AgNP sintetizadas neste trabalho apresentaram concentração de prata total na faixa de 26,2 a 318,0 mg L⁻¹ e as determinações tiveram coeficiente de variação (CV) na faixa de 0,1 a 7,1 % (Tabela 2.5).

Tabela 2.5 - Resultados da determinação da concentração de Ag total nas amostras de AgNP sintetizadas.

Amostras	[Ag] _{Total} (mg L ⁻¹)	R ²	Desvio padrão	CV (%)
6P	30,5	0,97	± 0,04	0,1
5C	20,2	0,91	± 0,2	0,6
2P	114,3	0,98	± 1,0	0,9
4C	103,6	0,97	± 0,8	0,8
3C	228,3	0,95	± 1,1	0,5
1P	318,0	0,98	± 8,2	2,6
Ag-PVA	103,6	0,99	± 14,4	7,1
Ag2-PVA	45,3	0,97	± 0,5	1,0
Ag-CMC	112,4	0,99	± 3,0	2,4
Ag2-CMC	59,2	0,99	± 0,3	0,4

R² : Coeficiente de correlação; [Ag]_{Total}: Concentração de prata total nas amostras de AgNP; CV: Coeficiente de variação. Para cada amostra foram feitas três réplicas (n=3).

2.4.3.2 - QUANTIFICAÇÃO DOS ÍONS Ag^+

Para determinar a concentração dos íons Ag^+ nas amostras de AgNP foi necessário validar o método potenciométrico utilizado. Na Figura 2.19 encontra-se a curva analítica construída com os padrões de Ag^+ nas concentrações de 10^{-10} a $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ ($1,079 \times 10^{-5}$ - $1,079 \times 10^3 \text{ mg L}^{-1}$).

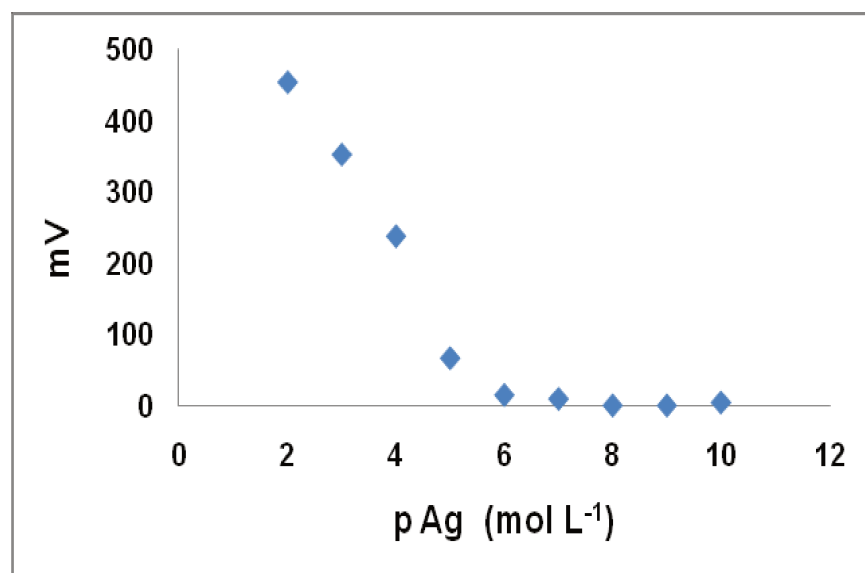


Figura 2.19 Curva analítica para a determinação de Ag^+ utilizando potenciometria direta. Nesta curva foram considerados os valores médios das respostas em mV para cada padrão de Ag^+ utilizado.

De acordo com as respostas potenciométricas (mV) para cada concentração de Ag^+ utilizada (Figura 2.17), foram calculados o limite de detecção (LD) e o limite de quantificação (LQ) do método (Skoog *et al.* 2006). Os valores de LD e LQ são respectivamente, 10^{-6} e $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (0,11 e 1,1 mg L^{-1}).

Deste modo, utilizou-se a curva analítica com faixa de concentração de 10^{-2} a $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ (1,1 a 1079 mg L^{-1}) como observado na Figura 2.20. Foi utilizada a

equação da reta, $y = -117,3 (\pm 1,0) x + 695,4 (\pm 9,9)$ com $R^2 = 0,9798 (\pm 0,0019)$, construída com os valores médios de potencial (mV).

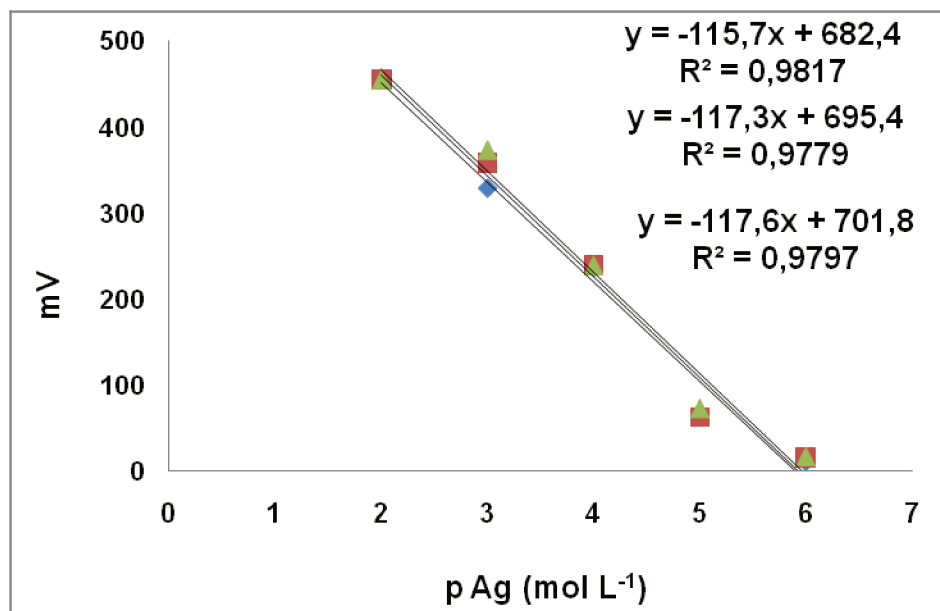


Figura 2.20 - Curva analítica para a determinação de Ag^+ utilizando potenciometria direta.

A concentração de Ag^+ nas amostras de AgNP variou entre 0,15 a 153,87 mg L^{-1} e o CV médio para estas determinações foi aproximadamente 6 %. Na Tabela 2.6 estão as concentrações e a % de Ag^+ , além da concentração de nanopartículas de prata determinada em cada amostra de AgNP.

De acordo com a Tabela 2.6, as amostras sintetizadas em maio de 2008 (**Ag-PVA**, **Ag2-PVA**, **Ag-CMC** e **Ag2-CMC**) apresentaram baixa concentração de Ag^+ remanescente da sua síntese ou proveniente da oxidação da amostra. Os baixos valores de Ag^+ encontrados nestas amostras indicam a alta estabilidade das mesmas, uma vez que a especiação foi realizada 20 meses após a realização de sua síntese.

Tabela 2.6 - Resultados da determinação da concentração de nAg e Ag⁺ nas amostras de AgNP sintetizadas.

Amostras	[Ag⁺] (mg L⁻¹)	[nAg] (mg L⁻¹)	% Ag⁺
6P	0,2	30,4	0,6
5C	0,2	26,0	0,7
2P	3,5	110,8	3,1
4C	11,9	91,7	11,5
3C	107,9	120,4	47,3
1P	153,9	164,2	48,4
Ag-PVA	0,2	77,3	0,2
Ag2-PVA	0,9	44,4	2,0
Ag-CMC	< LD	112,3	-
Ag2-CMC	< LD	80,2	-

Por outro lado, observando a concentração de Ag⁺ (Figura 2.21) nas amostras de AgNP nota-se que as amostras que apresentaram maior tendência à aglomeração, **1P** e **3C** são as que exibem maior porcentagem de íons Ag⁺, respectivamente, 47,3 e 48,4%.

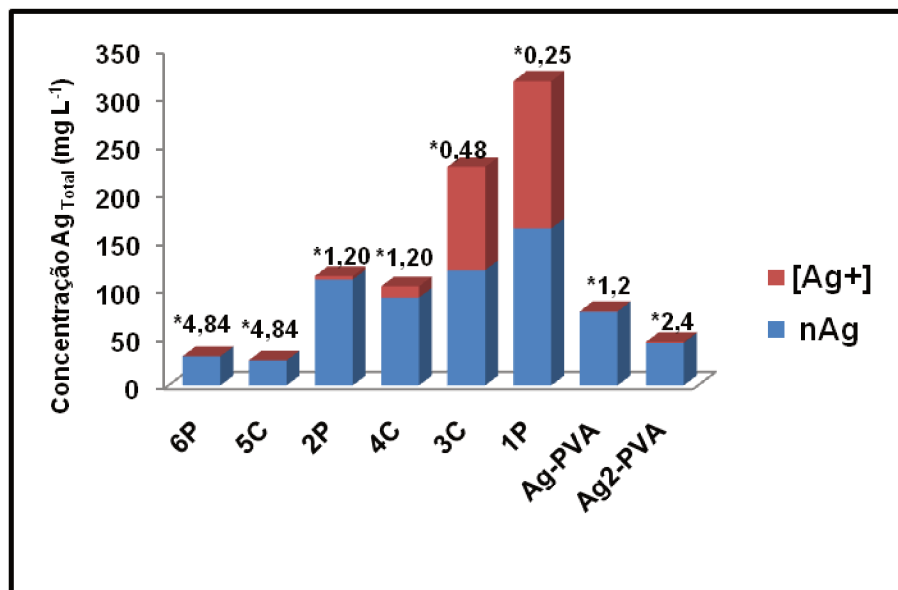


Figura 2.21 - Especificação da prata nas amostras de AgNP. * Valores das razões molares utilizadas na síntese das nAg.

Observando a distribuição de Ag^+ nas amostras de AgNP (Figura 2.19) e comparando com a razão molar $[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3]$, utilizada na síntese de cada amostra, nota-se que a concentração de Ag^+ remanescente foi dependente desta e não do estabilizante adotado. Desta forma, as amostras **6P** e **5C** sintetizadas com a maior razão $[\text{NaBH}_4]/[\text{AgNO}_3]$ (4,84), são constituídas de nanopartículas de prata esféricas. Este mesmo comportamento foi observado para Ag-PVA sintetizada com razão de 2,4 e para **Ag2-PVA**, **2P** e **4C** sintetizadas com a menor razão (1,20). No entanto, deste grupo de amostras, **4C** apresentou tendência à aglomeração, como mostra a porcentagem de íons Ag^+ na amostra.

Parte das amostras de TiO_2 e AgNP sintetizadas e caracterizadas nesta etapa do trabalho foram utilizadas na avaliação da atividade bactericida e nos testes ecotoxicológicos, conforme descrito na Tabela 2.7.

Tabela 2.7 Amostras de TiO_2 e AgNP utilizadas na avaliação da atividade bactericida e nos testes ecotoxicológicos.

Amostras e concentrações testadas	Organismo Teste			
	<i>V. fischeri</i>	<i>D. similis</i>	<i>P. subcapitata</i>	<i>E. coli</i>
AgNP	1P, 2P, 3C, 4C, 5C, 6P e AgNO_3 (0,21 a 82,1 mg L ⁻¹)	1P, 2P, 3C, 6P e AgNO_3 (1×10^{-5} a 1×10^{-1} mg L ⁻¹)	1P, 2P, 3C, 6P e AgNO_3 (1×10^{-6} a 1 mg L ⁻¹)	Ag-PVA, Ag2-PVA, Ag-CMC e Ag2-CMC (0,04 a 0,8 mg L ⁻¹) Ag-citrato (0,5 a 4,3 mg L ⁻¹)
TiO₂	P25, P25*, Anatase-S, Rutilo_S e M-S (1 a 100 mg L ⁻¹)		-	P25 e P25* (1 a 100 mg L ⁻¹)

2.5 - CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos nesta etapa do trabalho, foi possível sintetizar amostras de AgNP e TiO_2 contendo nanopartículas, segundo as rotas sintéticas adotadas. Foram sintetizadas amostras de TiO_2 nas formas anatase, rutilo, bem como, amostras compostas pela mistura de ambas. As amostras em pó de TiO_2 apresentaram o óxido com tamanho de cristalitos na faixa de 10-27 nm, que formaram agregados entre 3 e 10 μm . Todavia, as suspensões destas amostras, utilizadas nos estudos ecotoxicológicos, apresentaram TiO_2 com tamanho médio entre 19 e 25 nm, que formaram aglomerados de 330 a 450 nm.

Na síntese das amostras de nanoprta, observou-se que qualquer um dos três estabilizantes testados (PVA, CMC ou citrato de sódio) foram eficientes na estabilização (por um período de até 20 meses) das nAg presentes nas amostras. O tamanho das nanopartículas nas suspensões contendo apenas nanoprta esféricas não foi maior do que 20 nm. Também foram obtidas amostras com

diferentes graus de aglomeração, contendo uma mistura de nAg esféricas e de formas aglomeradas.

A quantificação das concentrações de prata total e Ag^+ nas amostras de AgNP foi realizada com sucesso utilizando potenciometria direta e ICP-AES.

PARTE III

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DAS AMOSTRAS DE TiO₂ E AgNP

CAPÍTULO 3

3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERICIDA DAS AMOSTRAS DE TiO₂ E AgNP

3.1 - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos vem sendo comum encontrar produtos que utilizam nanopartículas antibacterianas, tais como a nanoprata (Fortner *et al.* 2005) e o TiO₂. Neste contexto, vários estudos têm investigado a propriedade bactericida destes nanomateriais. O TiO₂ por sua vez, também tem sido bastante utilizado em processos de desinfecção, devido às suas propriedades fotocatalíticas (Baker *et al.* 2005; Monge 2009; Paschoalino 2006; Panacek *et al.* 2006; Morones *et al.* 2005; Shrivastava *et al.* 2007; Sondi & Salopek-Sondi 2004).

As bactérias são micro organismos procarióticos, ou seja, desprovidos de núcleo celular e com forma muito simples, esféricas, cilíndricas ou espirais. Seu diâmetro ou largura varia geralmente de 0,5 a 1 mm e por apresentarem alta relação área superficial/tamanho, possuem uma alta taxa metabólica e de crescimento. Para a *E. coli*, por exemplo, sob condições otimizadas, o tempo de divisão celular se dá em aproximadamente 20 minutos, enquanto que células de mamíferos manipuladas no laboratório levam de 13 a 24 horas para realizar este processo (Pelczar *et al.* 1997).

A reprodução bacteriana se dá por um processo chamado fissão binária, no qual a célula se divide em duas e após um determinado período de incubação no meio de cultura adequado, é gerada uma nova célula, e assim sucessivamente por progressão geométrica. Este processo depende das condições ambientais, como temperatura, agitação e pH (~7,0) do meio de cultivo, por isso é tão importante o

controle destas condições a fim de se obter um crescimento satisfatório. O crescimento bacteriano ocorre em quatro fases distintas: a fase lag, a fase logarítmica (log) ou exponencial, a fase estacionária e a fase de declínio ou morte, como ilustram a Figura 3.1.

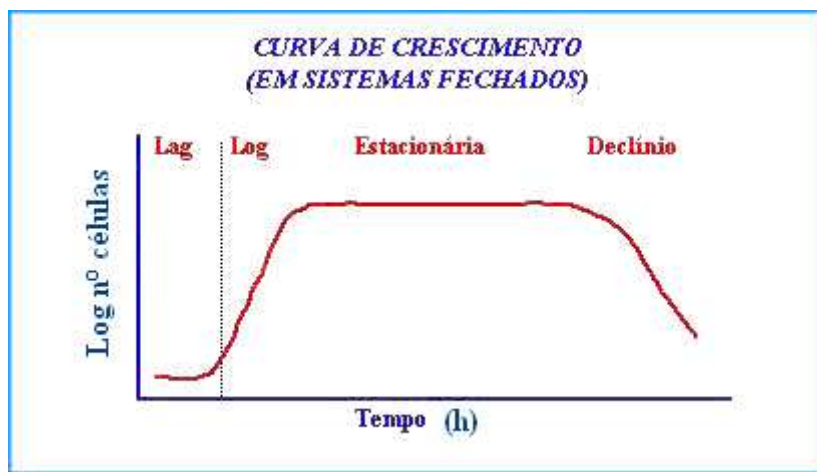


Figura 3.1 - Fases de crescimento bacteriano. Fonte: Pelczar *et al.* (1997).

Como observado na Figura 3.1, na fase lag não há um crescimento bacteriano expressivo no tempo, consistindo no seu período de adaptação no meio de cultivo, e há um aumento do tamanho celular, o que indica que a divisão está próxima. Na fase logarítmica ocorre o crescimento rápido e máximo das bactérias viáveis. A fase estacionária corresponde ao período de esgotamento de nutrientes, e a taxa de crescimento é equivalente à taxa de morte, devido à liberação de substâncias tóxicas intracelulares. Já na fase de declínio ou morte, o número de bactérias viáveis decresce exponencialmente, ou seja, é o inverso da fase log (Pelczar *et al.* 1997).

O crescimento bacteriano pode ser mensurado através de vários métodos, tais como a contagem em placas, contagem microscópica, contagem celular eletrônica, turbidez ou produtos metabólitos. Dependendo do gênero e espécie da

bactéria utilizada como bioindicador de toxicidade, pode-se monitorar a resposta em termos, por exemplo, da produção de trifosfato de adenosina (ATP), inibição da luminescência, bem como pela respiração bacteriana (Farah 2001).

3.1.1 - Testes utilizando *E. coli*

A bactéria *E. coli* é muito utilizada em ensaios toxicológicos porque constitui um organismo de fácil manipulação e reprodução, além de ser abundante em um ecossistema. Segundo Pelczar Jr. *et al.* (2005): “As bactérias, em particular a *E. coli*, são consideradas essenciais para a pesquisa biológica, porque elas fornecem indícios para as características metabólicas e genéticas em geral”.

A *E. coli* (Figura 3.2) é uma bactéria Gram-negativa (possuem parede celular externa mais fina (10 a 15 nm), o que facilita o transporte de nutrientes) anaeróbia facultativa, presentes no intestino do homem ou animais de sangue quente, que fermentam a lactose com produção de gás.

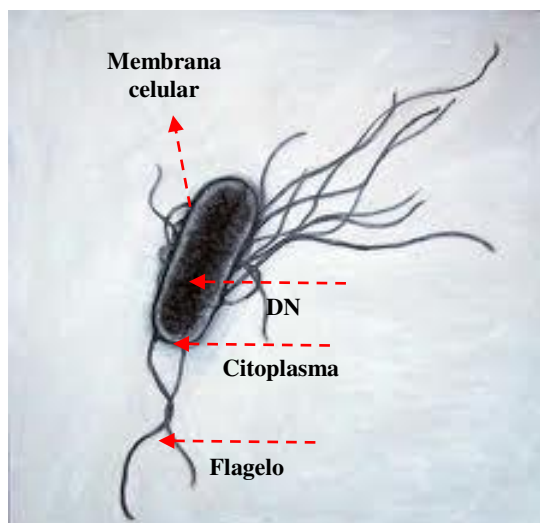


Figura 3.2 – Ilustração da bactéria *E. coli*. Fonte: <http://www.glogster.com/media/3/14/24/60/14246098.jpg>

O meio de cultivo (ou de cultura) no qual a *E. coli* se reproduz é simples e constituído basicamente de glicose como fonte de energia e de carbono, fosfato de amônio e potássio, como tampão e fontes de íons essenciais, tendo a água como solvente (Pelczar *et al.* 1997).

Dentre os ensaios de toxicidade que utilizam a bactéria *E. coli* encontra-se o ensaio respirométrico (Bitton & Dutka 1986), no qual monitora-se a concentração de CO₂ produzida pela bactéria. Desta forma, na presença de um agente estressor, é possível correlacionar a inibição do crescimento bacteriano com a diminuição da produção de CO₂. A concentração de CO₂ neste caso pode ser medida por potenciometria (Dorward & Barisas 1984; Farah 2001), bem como através de um sistema por análise de injeção em fluxo (FIA), FIA/Condutímetro, como fizeram Jardim *et al.* (1990), que correlacionaram o crescimento bacteriano no tempo com a concentração de CO₂. Desta forma, esses outros, puderam propor um sistema para a determinação da toxicidade aguda para inúmeras substâncias, como o antibiótico Bactrin, os metais, Cu, Cd, Ni e Hg, além de sedimentos de sistemas aquáticos poluídos (rio Tietê e lago da UNICAMP).

Desde então, o sistema FIA/Condutimétrico vem sendo utilizado para a determinação da toxicidade aguda de metais (Jardim *et al.* 1993), de combustíveis, de antibióticos e a avaliação dos produtos da degradação de compostos aromáticos clorados utilizando TiO₂ (Jardim *et al.* 1997).

No trabalho realizado em 1993 por Guimarães & Jardim, comparou-se a toxicidade aguda dos combustíveis, etanol, metanol e gasolina em separado e misturados, frente a *E. coli*, a fim de obter respostas sobre seus efeitos sinérgicos, os quais, se mostraram relevantes no contexto da toxicidade dos combustíveis investigados.

Este sistema FIA/ Condutimétrico mostra-se bastante versátil quanto ao tipo de bactéria utilizada. Um exemplo disto foi o trabalho realizador por Gimenez em (1994) que, além da *E. coli*, foram utilizaram outras bactérias, como *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Enterococcus faecalis* com a

finalidade de propor um protocolo que resultasse em respostas rápidas (máximo de 8 horas) na análise da sensibilidade de antibióticos, outros produtos farmacêuticos e o potencial tóxico de bactericidas de uso doméstico, hospitalar e industrial. Os resultados desta pesquisa indicaram que o método utilizando tal sistema, é rápido, seguro e de baixo custo para avaliar a sensibilidade de antibióticos, bem como determinar a atividade bactericida dos desinfetantes testados.

Farah, (2003) propôs um teste agudo de toxicidade utilizando as bactérias *Klebsiella oxytoca* e *E. coli* a fim de comparar as respectivas sensibilidades frente a diferentes agentes estressores, dentre esses, íons metálicos de Hg⁺², Cd⁺² e Cu⁺², bem como o antibiótico tetraciclina e detergentes hospitalares. Os resultados demonstraram maior resistência da *E. coli* em relação aos íons metálicos do que a *K. oxytoca*.

Até o momento, não há relatos na literatura da aplicação do sistema FIA/Condutimétrico para a avaliação da atividade bactericida de nanomaterias, embora haja muitos estudos utilizando *E. coli* como organismo teste, sendo a contagem em placas (Silva *et al.* 2005) o método mais comum para verificar o seu crescimento.

3.2 - OBJETIVOS

❖ GERAL

Avaliar a atividade bactericida das amostras de TiO₂ e AgNP e desta forma, verificar se as mesmas correspondem aos padrões descritos na literatura e que apresentam atividade bactericida.

❖ ESPECÍFICOS

- Utilizar o sistema FIA/Condutimétrico para observar o efeito bactericida dos NM testados;
- Avaliar a atividade bactericida das amostras de TiO₂ (**P25** e **P25***) e das amostras de AgNP, **Ag-citrato**, **Ag-PVA**, **Ag-CMC**, **Ag2-PVA** e **Ag2-CMC**, utilizando *E. coli* como organismo teste;
- Utilizar a radiação UV-A durante o teste com *E. coli* para avaliar o efeito bactericida do TiO₂ fotoativo.

3.3- EXPERIMENTAL

3.3.1 - TESTE EMPREGADO PARA AVALIAR A ATIVIDADE BACTERICIDA DAS AMOSTRAS DE TiO₂ E DAS SUSPENSÕES DE AgNP

A inibição do crescimento da *E.coli* foi observada pelo ensaio respirométrico que utiliza um sistema FIA/condutimétrico. O método baseado na análise de injeção em fluxo com a detecção condutimétrica de CO₂ tem sido bastante utilizado para a determinação da inibição da respiração da bactéria *E. coli* (Guimarães 1995; Jardim *et al.* 1993; Gimenez 1994), pois mede a concentração de CO₂ produzido e permite acompanhar o crescimento bacteriano no tempo. Este método caracteriza-se como um ensaio respirométrico para determinação da toxicidade de substâncias deletérias à bactérias.

O sistema FIA/Condutimétrico para a determinação de CO₂ foi inicialmente proposto por Jardim *et al.* (1990) e tem como princípio básico o equilíbrio químico entre as espécies carbônicas, HCO₃⁻(aq) e CO₃²⁻(aq) (Equação 3.1). O meio ácido será favorável à formação de CO₂ e H₂O e estando o CO₂ em meio aquoso, formará HCO₃⁻, e desta forma o aumento da condutância do fluxo monitorado será proporcional à concentração de CO₂ presente na amostra.



As etapas envolvidas na execução do ensaio respirométrico são:

- a) escolha do organismo teste;
- b) preparação do meio de cultura que é a fonte de nutrientes para bactéria;
- c) inoculação da *E. coli*;
- d) obtenção da população ideal para o início e execução do ensaio utilizando o sistema FIA/ Condutimétrico.

a) Escolha do organismo teste

Por apresentar alto rendimento de síntese, facilidade no cultivo, baixa patogenicidade, além de proporcionar alta produção de CO₂, a *E. coli* tem sido amplamente utilizada em testes de toxicidade (Bitton e Dutka 1986; Jardim *et al.* 1993; Jardim *et al.* 1990). Desta forma, a *E. coli* foi a bactéria escolhida para a realização dos ensaios de respirometria. Utilizou-se neste trabalho a *E. coli* fornecida pela Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia “André Tosello”, Campinas/SP, Cepa (ATCC25922/CCT1457). Para obter um rendimento maior da cepa adquirida, optou-se por trabalhar com a cultura de *E. coli* liofilizada, em meio Ágar nutriente.

b) Preparação do meio de cultura estéril

O meio de cultura para o crescimento das bactérias foi preparado pela mistura de duas soluções, denominadas aqui como solução A e solução B. A solução A foi preparada pela dissolução de 3,50 g de KH_2PO_4 , 1,50 g de K_2HPO_4 , 0,50 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,25 g de ácido cítrico e 0,05g de MgSO_4 , em 400 mL de água ultra pura, e o pH final desta solução foi ajustado para 7,2 com solução de NaOH 4 mol L^{-1} e levada à fervura em um micro-ondas ELETROLUX ME 185 para a sua esterilização. A solução B foi preparada dissolvendo 10,0 g de glicose em 100 mL de água desionizada e esterilizada da mesma forma que a solução A. Ainda a uma temperatura média de 90 °C, a solução B foi adicionada à solução A vagarosamente. Esta mistura foi chamada, meio de cultura estéril (MCE), sendo deixada em repouso até atingir a temperatura ambiente, para a futura inoculação da *E. coli*.

c) Inoculação da *E. coli*

Três inóculos da cultura de *E. coli* (ATCC25922) foram feitos com auxílio de uma haste de platina esterilizada em chama do bico de Bunsen, em aproximadamente 50 mL do MCE presente em frasco de vidro estéril. O inóculo foi mantido em banho termostatizado FANEM 100 a 37°C por 12 horas e a indicação de crescimento se deu pelo turvamento do meio (suspensão de bactéria).

d) Obtenção da população ideal de *E.coli* para início do ensaio

Depois de decorrido o tempo de incubação da *E. coli*, uma alíquota da suspensão bacteriana foi adicionada a cerca de 150,0 mL de MCE, sendo deixado no banho termostatizado, a 37 °C, e em intervalos de 5 minutos foi medida a absorbância no comprimento de onda igual a 550 nm, em um espectrofotômetro JENWAY 6405 UV/Visível. De acordo com a escala de McFarland (Murray *et al.*

1995), uma absorbância em torno de 0,05 u. a. significa uma população média bacteriana de 10^6 a 10^8 UFC mL^{-1} . Este valor em absorbância, corresponde a uma concentração média de 2 a 5 mg L^{-1} CO_2 , quando foi iniciado o ensaio respirométrico. Esta suspensão bacteriana foi então denominada de inóculo estoque.

e) Execução do ensaio utilizando o sistema FIA/Conduítmétrico

Para este ensaio, foram confeccionados frascos padronizados de quartzo com diâmetro interno de 2,30 cm e aproximadamente 13,50 cm de altura e capacidade volumétrica em torno de 30 mL. O número de amostras utilizadas no ensaio foi limitado pelo tamanho do banho termostaticado que comporta 8 frascos de quartzo (Figura 3.3), dos quais 4 frascos são destinados às amostras, 2 para os controles inicial (Ci) e final (Cf), 1 para a tetraciclina e outro para o branco.



Figura 3.3 - Tubos de quartzo e a sua disposição dentro do banho termostaticado.

No frasco de cada amostra foi inserido 25,0 mL da suspensão bacteriana com absorbância em torno de 0,05 U.A (10^6 a 10^8 UFC mL⁻¹) e as diferentes concentrações dos agentes estressores. Os controles Ci e Cf são constituídos apenas da suspensão bacteriana (10^6 a 10^8 UFC mL⁻¹). Como se estabeleceu leituras de CO₂ a cada 20 ou 30 minutos, a leitura do Ci foi realizada sempre no início de cada intervalo de tempo estabelecido e após terem sido lidos o branco, as amostras e a tetraciclina foi feita a leitura do Cf.

O uso dos dois controles (Ci e Cf) é necessário, pois, para cada tempo fixado para a leitura, entre a medida do primeiro e do último frasco de análise decorrem cerca de 10 minutos e dado o crescimento exponencial da *E. coli* no tempo é importante acompanhar o seu crescimento nas amostras entre estes dois controles. O antibiótico tetraciclina na concentração de 0,5 mg L⁻¹ foi utilizado com o intuito de observar a repetibilidade e a reprodutibilidade dos ensaios, uma vez que este medicamento é tóxico à *E. coli*. Desta maneira, apresentando uma porcentagem de inibição respirométrica alta para os ensaios realizados garante-se que a cultura bacteriana está respondendo adequadamente ao agente estressor aplicado. O branco é constituído apenas do MCE.

Todos os frascos foram mantidos no banho termostatizado a 37° C e o monitoramento dos sinais de condutividade foi realizado a cada 20 ou 30 minutos. O tempo total de análise se deu entre 120 e 180 minutos e dependeu da concentração máxima de CO₂ atingida pelos controles (Ci e Cf) dada pela curva de calibração utilizada. Neste caso a faixa de concentração variou de 3 a 72 mg L⁻¹. Vale destacar que foram feitas leituras dos padrões de CO₂ no início e no final do ensaio, a fim de se obter uma curva de calibração que refletisse as condições experimentais durante todo o período de ensaio.

3.3.1.1 - PARÂMETROS MEDIDOS NO TESTE

3.3.1.2 - QUANTIFICAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CO₂

Para a quantificação da concentração de CO₂ pelo sistema FIA foi construída uma curva analítica e, para cada padrão, a condutividade é proporcional à concentração de CO₂. Na construção da curva analítica foram utilizados padrões na faixa de concentração de 3 a 72 mg L⁻¹, preparados a partir de uma solução estoque de Na₂CO₃ 1000 mg L⁻¹. Utilizando os valores da condutividade de cada padrão, foi construído o gráfico da concentração de CO₂ em mg L⁻¹ em função do sinal de condutividade.

O modelo exponencial (Farah 2001; Guimarães1995) de calibração utilizada é expresso pela Equação 3.2:

$$Y = AX^B \quad \text{(Equação 3.2)}$$

Y é a intensidade do sinal de condutividade; X a concentração de CO₂; A e B são os parâmetros ajustáveis.

Quando este modelo é linearizado, é obtida a expressão matemática representada pela Equação 3.3:

$$\ln Y = \ln A + B \ln X \quad \text{(Equação 3.3)}$$

Como já dito anteriormente, a leitura dos padrões de CO₂ foi registrada no início e no final do ensaio, com medidas em duplicata.

3.3.1.3 - CÁLCULO DO TEMPO DE DUPLICAÇÃO (T_D)

O cálculo do tempo de duplicação (t_D) da população de bactérias foi determinado de acordo com a Equação 3.4 (Von Sperling 1996):

$$\ln [C_t] / [C_0] = kt \quad \text{(Equação 3.4)}$$

C_t é a concentração do CO₂ (mg L⁻¹) da amostra em um tempo qualquer; **C₀** é a concentração de CO₂ do MCE no início de cada teste; **k** (min⁻¹) é uma constante relacionada com o crescimento bacteriano; **t** é o tempo expresso em minutos.

O **t_D** será aquele no qual a concentração **C_t** for igual a duas vezes a concentração inicial **C₀**. Desta forma, a Equação 6.5 pode ser escrita como segue:

$$\ln(2) = kt_D \quad \text{(Equação 3.5)}$$

Desta forma, (ln2)/k fornece o tempo de duplicação da biomassa bacteriana (em minutos) nas condições experimentais utilizadas, e para o cálculo do **t_D** é necessária a identificação da fase log do crescimento no gráfico que representa a curva de crescimento bacteriano (Figura 3.1).

3.3.1.4 - CÁLCULO DA CONCENTRAÇÃO EFETIVA (CE)

A CE₅₀ é obtida do gráfico da porcentagem de inibição pela concentração do agente tóxico em um determinado tempo. A Equação 3.6 apresenta a expressão utilizada no cálculo da concentração efetiva:

$$CE = [(C - A) / C] \times 100 \% \quad \text{(Equação 3.6)}$$

Onde: **C** é a diferença da concentração final e inicial de CO₂ do controle; **A**, a diferença da concentração final e inicial do CO₂ da amostra.

Entretanto, para obter o valor da EC₅₀, é preciso que os pontos sobre o gráfico da CE pela concentração do composto avaliado se aproximem de uma curva ou reta, de forma que seja possível a realização de um ajuste matemático, semelhante ao processo de obtenção da concentração de CO₂.

3.3.2 - AMOSTRAS DE TiO₂ E AgNP TESTADAS

Foram utilizadas as amostras de TiO₂ **P25** (anatase) e **P25***(rutilo) nas concentrações de 1, 50, 500 e 1000 mg L⁻¹. Estas foram preparadas a partir de uma suspensão estoque de 2000 mg L⁻¹, que foi submetida a 30 minutos de sonicação em um ultrassom BRANSON 2210 para desagregação das partículas.

As amostras de AgNP, **Ag-PVA**, **Ag2-PVA**, **Ag-CMC** e **Ag2-CMC** foram testadas na faixa de concentração de 0,04 a 0,8 mg L⁻¹. Já a amostra **Ag-citrato** foi testada na faixa de concentração de 0,5 a 4,3 mg L⁻¹. Estas concentrações foram calculadas em termos da concentração de nAg e não em relação à prata total, uma vez que a concentração de íons Ag⁺ nas mesmas não foi significativa.

3.3.3 - ADAPTAÇÃO NO SISTEMA FIA/CONDUTIMÉTRICO PARA EXPLORAR A FOTOATIVIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE TiO₂

Para avaliar a atividade bactericida da **P25** frente à *E. coli* foram elaborados experimentos em três situações distintas: **(a)** sob radiação UV-A (λ varia entre 315-400 nm) emitida por uma lâmpada fluorescente de luz negra com potência de 8 W, cuja intensidade da radiação variou de 0,08 e 0,20 m W cm⁻²; **(b)** sob radiação UV-Visível (λ variam entre 200-800 nm) emitida por uma lâmpada de vapor de mercúrio com potência de 150 W e **(c)** sem irradiação (no escuro). As condições de irradiação foram aplicadas às amostras, ao MCE e à tetraciclina, presentes no banho termostatizado.

A Figura 3.4 ilustra o sistema montado no banho termostatizado para reproduzir as três situações (iluminação com radiação UV-Visível; com radiação UV-A e no escuro) e a disposição dos frascos, que foi organizada de modo que a radiação emitida fosse constante para todos. Foi montada primeiramente em uma caixa de madeira a instalação elétrica da lâmpada UV-A de 8W (Figura 3.4B). A lâmpada UV-A foi introduzida no banho termostatizado, o qual continha os tubos

de quartzo (Figura 3.4A). Para gerar a condição de escuro, colocou-se a caixa sem a lâmpada sobre o banho termostatizado, contendo as amostras.

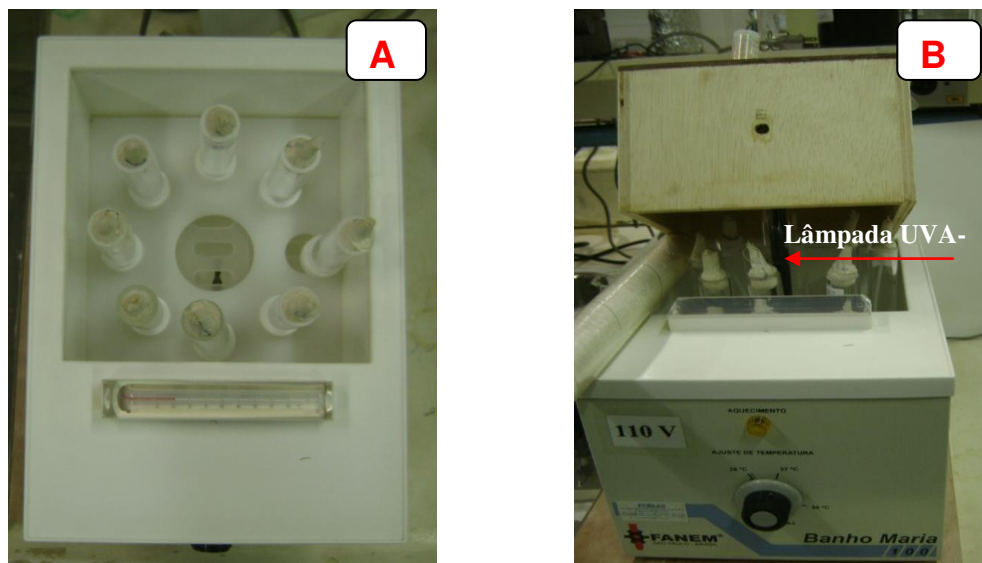


Figura 3.4 - Banho termostatizado contendo **A)** tubos de quartzo e a sua disposição dentro do banho **B)** sistema de iluminação e a lâmpada UV-A introduzida no banho termostatizado.

Dependendo da intensidade da radiação utilizada no ensaio, trocou-se o tubo de quartzo de parede única (Figura 3.5A) pelo de parede dupla que permitia resfriamento (Figura 3.5B). A fonte de radiação UV-Visível utilizada, a lâmpada de vapor de mercúrio 150 W, gera uma alta quantidade de calor, e por este motivo, preferiu-se utilizar o tubo de quartzo de parede dupla que permitia o resfriamento com água.



Figura 3.5 - Detalhes dos tubos de quartzo **(A)** de parede única e **(B)** de parede dupla utilizados nos ensaios com iluminação.

Ao término do ensaio, os materiais contaminados com os micro organismos utilizados foram deixados de molho com água sanitária e em seguida lavados com água e detergente, finalizando com água destilada.

3.4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.4.1- AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BACTERICIDA DAS AMOSTRAS DE AgNP

Testes preliminares foram realizados com a amostra **Ag-citrato** para avaliar o desempenho do sistema FIA/Condutimétrico. O mesmo foi otimizado quanto ao tempo de duração do teste e a sensibilidade da cepa de *E. coli* (ATCC 25922/CCT1457) às concentrações de nAg utilizadas.

A amostra **Ag-citrato** é composta por nano esferas de Ag e tem uma distribuição média de partículas em torno de 8nm (Figura 3.6).

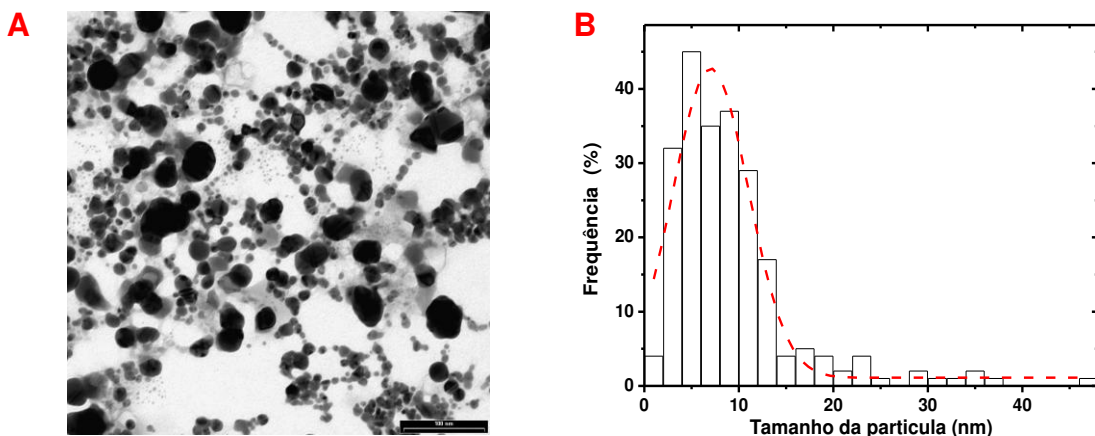


Figura 3.6 - Micrografia de MET das partículas esféricas de **Ag-citrato**. (A) Dispersão das nanopartículas de prata e (B) distribuição de tamanho destas nanopartículas.

No ensaio respirométrico de 120 minutos, foram utilizadas as concentrações de 0,5 a 4,3 mg L^{-1} de **Ag-citrato** no inóculo contendo *E. Coli*. Observou-se o comprometimento do seu crescimento independente da concentração aplicada, uma vez que a concentração de CO_2 manteve-se praticamente estável durante todo o ensaio (Figura 3.7).

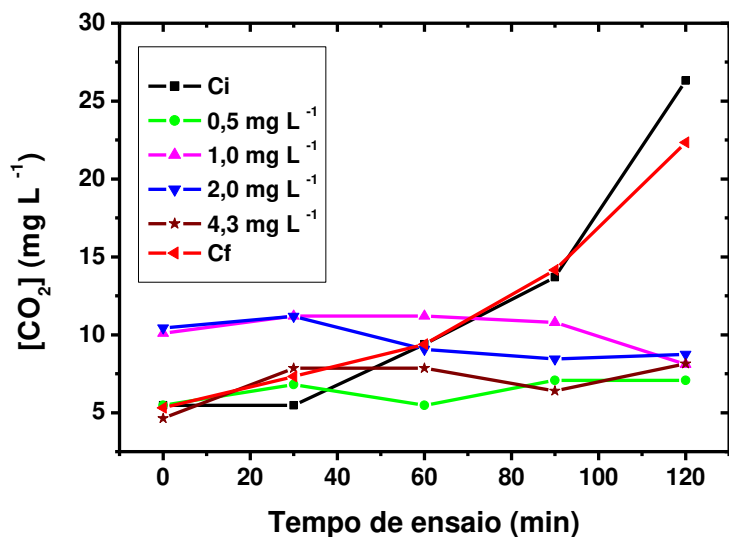


Figura 3.7 - Crescimento da *E. Coli* em suspensões contendo diferentes concentrações de nanopartículas de **Ag-citrato**.

Estes resultados estão de acordo com os obtidos por Pal *et al.* (2007), que comparou o efeito da forma da nanopartícula de prata sobre a *E. Coli*. Os autores observaram que concentrações por volta de 50 µg 100 mL⁻¹ (0,5 mg L⁻¹) de nanop prata sintetizada de modo semelhante à rota usada neste trabalho, inibiram completamente o crescimento da *E. Coli*.

Contudo, o estudo realizado por Shrivastava *et al.* (2007), mostrou que a inibição completa do crescimento da *E. Coli* por nanopartículas de prata sintetizada por outra rota se deu em uma concentração maior, de 25 µg mL⁻¹ (25 mg L⁻¹).

Após a otimização do sistema FIA/ condutimétrico, ensaios com a *E. coli* foram conduzidos com as amostras de nanop prata sintetizadas utilizando diferentes estabilizantes (PVA e CMC) e razões molares ([NaBH₄]/[AgNO₃]) : **Ag-PVA, Ag-CMC, Ag2-PVA e Ag2-CMC**. A faixa de concentração utilizada variou entre 0,04 e 0,8 mg L⁻¹.

Os resultados obtidos a cerca das concentrações nas quais não ocorreu inibição (ou inibição mínima), bem como, a máxima inibição da respiração bacteriana, encontram-se na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 - Informações sobre as amostras utilizadas nos ensaios com *E. coli* e resultados das concentrações que causam ou não inibição da respiração bacteriana.

Amostra	Concentração de nAg em que ocorre mínima e máxima inibição da respiração bacteriana (mg L ⁻¹)	
	% Mínima*	% Máxima**
Ag-PVA	0,04	0,2
Ag2-PVA	0,04	0,2
Ag-CMC	0,06	0,3
Ag2-CMC	0,08	0,8

* Concentração que inibe em média 8,7 % para todas as amostras.

** Concentração que inibe 97,8 ± 3,6 % para as amostras que usam PVA como estabilizante e 98,1 ± 1,6 % para as que utilizam CMC.

De acordo com a Tabela 3.1 e a Figura 3.8 indicam não ocorreu inibição significativa no crescimento da *E. coli* que na faixa de concentração de 0,04 a 0,08 mg L^{-1} para as amostras testadas.

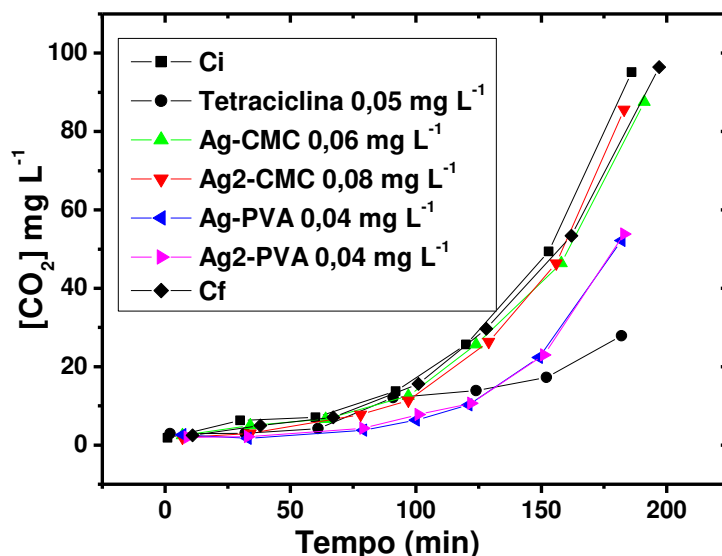


Figura 3.8 - Crescimento da *E. coli* medido em função da sua respiração em 180 (± 20) minutos de ensaio.

No entanto, utilizando concentrações cerca de 10 vezes maior (0,2 a 0,8 mg L^{-1}), observou-se uma inibição em torno de 100% da respiração bacteriana (Tabela 3.1 e Figura 3.9).

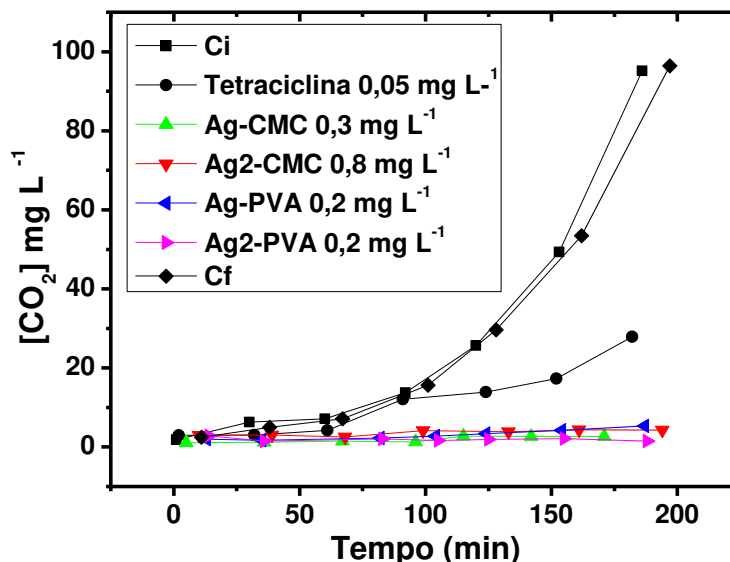


Figura 3.9 - Crescimento da *E. coli* medido em função da sua respiração em 180 (± 20) minutos de ensaio.

Estes valores de concentrações nas quais ocorre a máxima inibição da respiração bacteriana estão próximos àqueles encontrados por Pal *et al.* 2007, cujo trabalho mostrou que a toxicidade de nAg esféricas não ultrapassou $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ para a *E.coli* (ATCC 10536). Isto indica que o método utilizado (sistema FIA/Condutimétrico) para a observação da atividade bactericida de um NM como a nanop prata pode ser aplicado na determinação das concentrações tóxicas do mesmo, bem como no acompanhamento da cinética da respiração bacteriana.

Ao observar a inibição total da respiração bacteriana para as amostras sintetizadas com PVA (**Ag-PVA** e **Ag2-PVA**) comparadas com as sintetizadas com CMC (**Ag-CMC** e **Ag2-CMC**), nota-se que **Ag-PVA** e **Ag2-PVA** foram ligeiramente mais tóxicas do que **Ag-CMC** e **Ag2-CMC**. Este comportamento pode ser atribuído ao tamanho das nanopartículas presentes.

O tamanho das nanopartículas pode causar danos diretos à membrana celular bacteriana pela sua penetração. Por outro lado, o meio de cultura pode

gerar desestabilização das nAg e favorecer processos de agregação e aglomeração, bem como oxidação da mesma, liberando íons Ag⁺.

Os espectros da Figura 3.10A mostram que nas amostras **Ag-PVA** e **Ag2-PVA** há a presença majoritária de nanoprata esférica, indicada pelo máximo de absorbância em 400 nm. Já as amostras **Ag-CMC** e **Ag2-CMC** (Figura 3.10B) apresentaram deslocamento da banda de ressonância plasmon para maiores comprimentos de onda, respectivamente, 454 e 422nm, demonstrando a tendência à agregação das nAg esféricas.

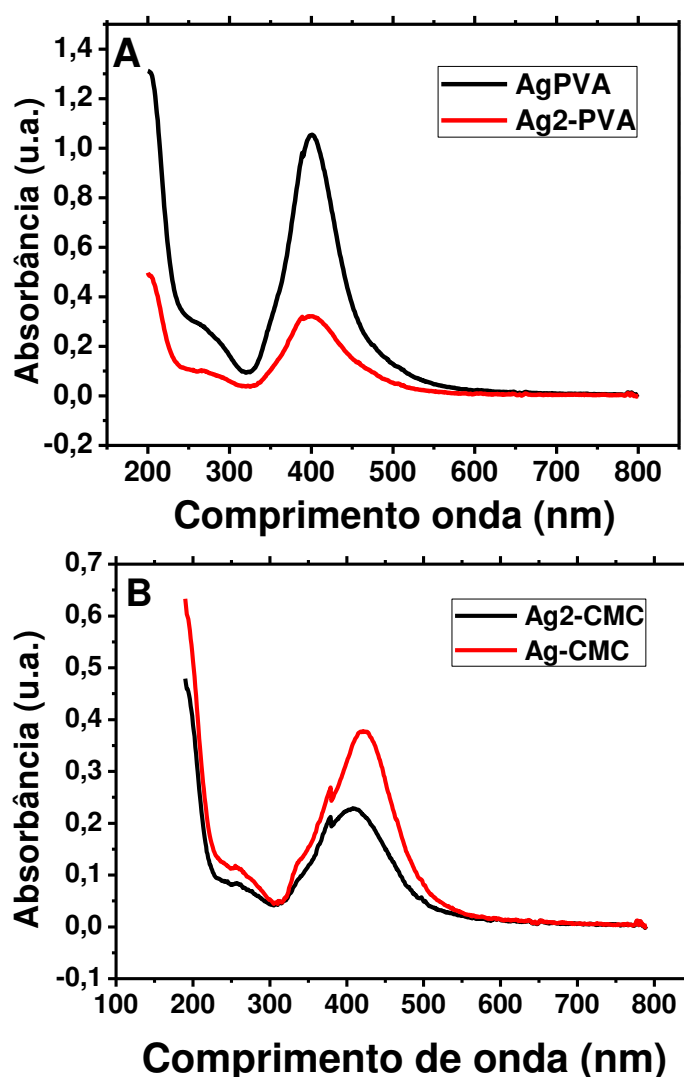


Figura 3.10 - Espectros UV-Visível para as amostras **A) Ag-PVA** e **Ag2-PVA** **B) Ag-CMC** e **Ag2-CMC** registrados na época dos ensaios realizados com a *E. coli*.

Desta forma, partículas de nanoprata potencialmente maiores seriam menos tóxicas. Esta tendência concorda com o resultado obtido por Martínez-Castañón *et al.* (2008), no qual nanopartículas de prata esferoidais de 7 nm e 89 nm apresentaram toxicidade à *E. coli* respectivamente a 6,25 e 13,02 mg L⁻¹.

Em todos os ensaios com *E. coli* realizados neste trabalho, a tetraciclina 0,05 mg L⁻¹ mostrou uma variação da inibição da respiração bacteriana em torno de 58,6 ± 5,8 %, indicando uma boa reprodutibilidade dos ensaios de toxicidade quanto às condições de execução.

Devido a dificuldades na execução dos testes relacionadas à utilização de concentrações dentro da faixa de trabalho (0,04 a 0,8 mg L⁻¹) não foi possível determinar o tempo de duplicação e o CE50 para as substâncias testadas. Desta forma, foram observadas apenas as concentrações de mínima e máxima inibição da *E. coli*.

3.4.2 TOXICIDADE DOS COMPONENTES UTILIZADOS NA SÍNTESE DAS AMOSTRAS DE AgNP

A fim de observar se os componentes das suspensões de AgNP são os responsáveis pela toxicidade apresentada à *E. coli*, investigou-se a matriz destas amostras. Nos ensaios de toxicidade utilizaram-se os estabilizantes empregados na síntese das nanoprata, CMC 1% e PVA 1% nas mesmas concentrações que foram conduzidos os ensaios com as suspensões de AgNP. Para nenhuma das concentrações estudadas, as substâncias PVA 1% e CMC 1% apresentaram inibição significativa (< 20%) da respiração bacteriana.

Além dos estabilizantes, estudou-se a toxicidade do precursor, AgNO₃ na faixa de concentração de 0,068 a 27 mg L⁻¹. A determinação da toxicidade do íon Ag⁺ é importante para avaliar se devido ao meio de cultura ocorre o processo de oxidação da nAg, e assim poder inferir sobre o mecanismo já conhecido de interação dos íons Ag⁺ com a *E. coli*. Neste mecanismo, os íons atravessam a

membrana celular causando lesões no DNA da célula, afetando o seu processo de replicação e inibindo seu crescimento (Liu & Hurt 2010; Badaway *et al.* 2010; Pelczar *et al.* 1997; Pal *et al.* 2007).

A *E. coli* utilizada neste trabalho apresentou inibição significativa da respiração ($99,4 \pm 0,5\%$) a uma concentração de $0,07 \text{ mg L}^{-1}$ de Ag⁺. É importante destacar que na avaliação da toxicidade do AgNO₃, também há variações na concentração deletéria ao utilizar uma mesma espécie bacteriana. Esta pode variar entre 8 e 80 mg L^{-1} , segundo Chopra *et al.* (2007), que avaliou a resposta da bactéria patogênica *Staphylococcus aureus*. Já para a *E.coli* a concentração tóxica do AgNO₃ pode ser bem menor, cerca de 1 mg L^{-1} , o que depende da cepa e do tipo de ensaio conduzido (Pal *et al.* 2007).

3.4.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE BACTERICIDA DAS AMOSTRAS DE TiO₂

Muitos trabalhos têm explorado a atividade fotocatalítica do TiO₂ pelo uso da radiação UV, com o objetivo de inativar ou exterminar a população bacteriana em um determinado meio. O óxido pode ser aplicado na forma de filmes, dopado com outros compostos, ou como suspensões de TiO₂, cujas concentrações variam geralmente em torno de 500 a 2000 mg L^{-1} (Rincón e Pulgarin 2003; Shrivastava *et al.* 2007; Pal *et al.* 2007).

Por este motivo, nos testes realizados neste trabalho que envolveu a inibição da *E. coli* e utilizando TiO₂ como catalisador, optou-se por trabalhar com concentrações de TiO₂ na faixa de 1 a 1000 mg L^{-1} . Foi utilizado o sistema FIA/Condutimétrico para acompanhar o crescimento da população bacteriana.

Inicialmente, comparou-se o efeito da concentração de **P25** (1 e 50 mg L^{-1}) sob radiação UV-A sobre o crescimento da *E. coli*. Como fonte de radiação UV-foi utilizada uma lâmpada de luz negra de 6 W de potência com intensidade de $0,08 \text{ mW cm}^{-2}$ em $\lambda = 365 \text{ nm}$

Observou-se que o crescimento da *E. coli* em 150 ± 30 minutos de ensaio na amostra **P25** nas concentrações de 1 e 50 mg L^{-1} se igualou ao crescimento que dos controles (Figura 3.11), indicando que não ocorreu uma inibição bacteriana significativa.

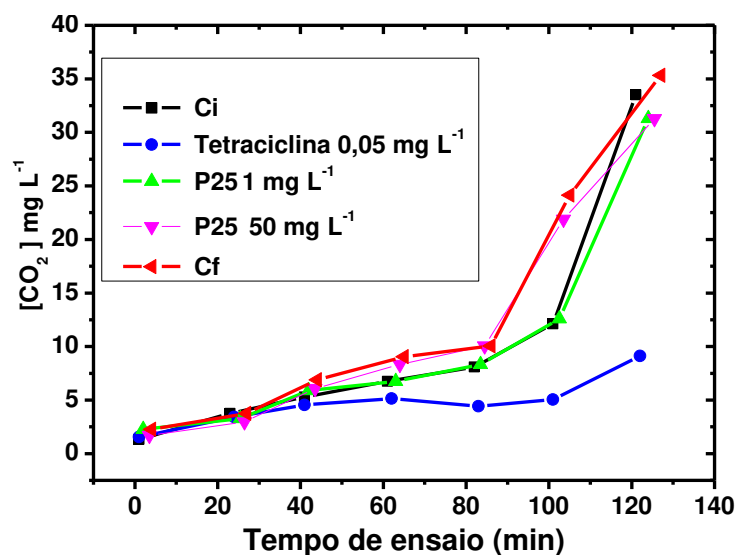


Figura 3.11 - Crescimento da *E. coli* em função da concentração da amostra **P25** (1 e 50 mg L^{-1}). Onde: **Ci**= controle inicial e **Cf**= controle final.

No entanto, mantendo a mesma condição de radiação e aumentando a concentração de TiO_2 (500 e 1000 mg L^{-1}), observou-se um crescimento menor da população bacteriana das amostras quando comparadas ao controle (Figura 3.12).

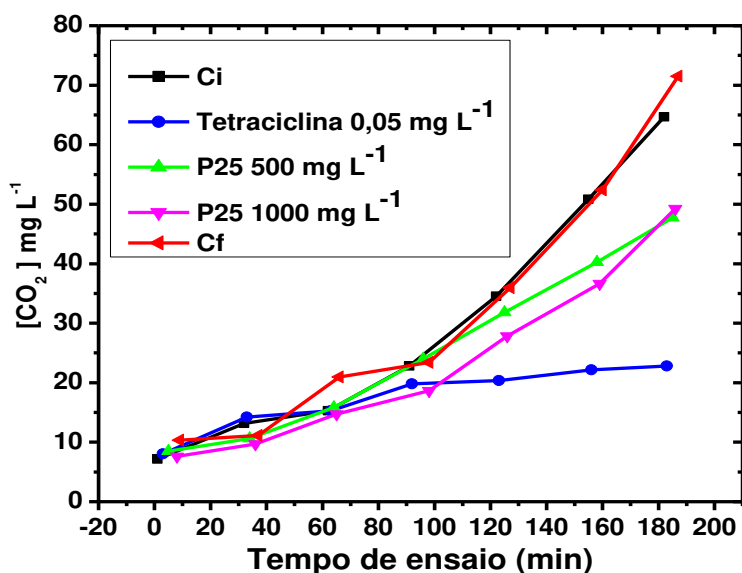


Figura 3.12 - Crescimento da *E. coli* em função da concentração da amostra **P25** (500 e 1000 mg L⁻¹). Onde: **Ci**= controle inicial e **Cf**= controle final.

Nota-se que, ao aumentar a concentração de **P25** de 50 até 1000 vezes a concentração inicial aplicada de 1 mg L⁻¹, cresce a porcentagem da inibição bacteriana (Tabela 3.2), embora de maneira não significativa.

Tabela 3.2 - Valores de porcentagem de inibição na respiração da *E. coli* para o **P25**, sob radiação UV-A de 6 W e intensidade de radiação de 0,08 mW cm⁻².

Concentração de P25 (mg L ⁻¹)	Porcentagem de inibição no crescimento da <i>E. coli</i> (%)
1	11
50	10
500	35
1000	31

Este aumento não obedeceu a uma correlação, uma vez que passando de uma concentração de 500 a 1000 mg L⁻¹ de **P25**, não ocorreu aumento

significativo na porcentagem de inibição da *E. coli*. Este fator pode estar relacionado ao maior espalhamento de luz maior, causado pela concentração do TiO_2 .

Para observar os principais efeitos na porcentagem de inibição no crescimento da *E. coli*, foram realizados dois ensaios, variando a intensidade da radiação UV-A utilizando **P25** nas concentrações de 500 e 1000 mg L^{-1} . Observou-se que, ao utilizar a radiação UV-A com menor intensidade ($0,08 \text{ m W cm}^{-2}$), a porcentagem de inibição da *E. coli* diminuiu com o aumento da concentração de **P25** (Figura 3.13). Esta mesma tendência foi observada para a intensidade maior ($0,2 \text{ mW cm}^{-2}$), embora desta vez mais pronunciado, pois o valor de inibição passou de 55% a 11% nos testes com 500 e 1000 mg L^{-1} , respectivamente.

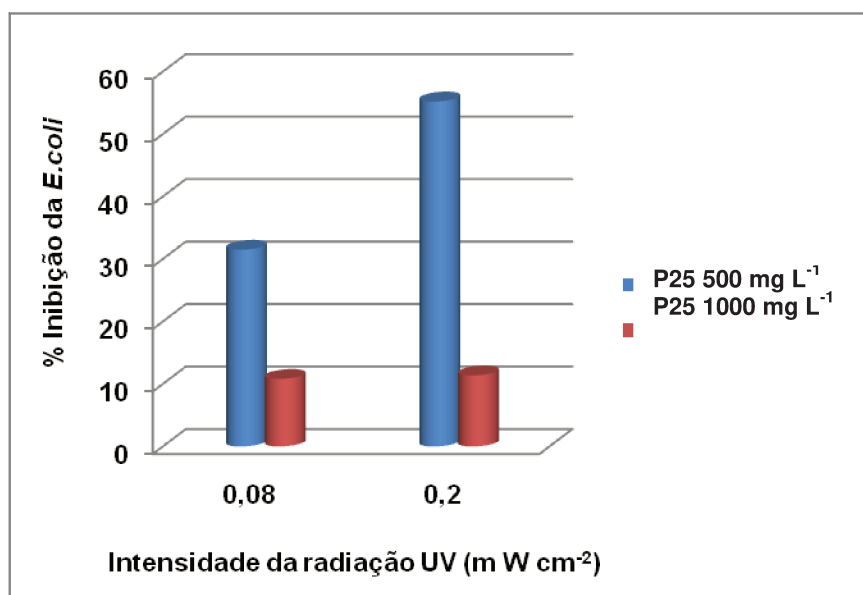


Figura 3.13 - Valores de % Inibição da respiração da *E. coli* frente ao **P25** nas concentrações de 500 e 1000 mg L^{-1} , sob intensidade da radiação UV-A de 0,08 e 0,2 mW cm^{-2} .

Uma explicação para estes resultados seria a sedimentação do TiO_2 na parte inferior dos frascos de análise. O fato de não estar em suspensão, dificultaria

o processo de fotoativação, de tal maneira que não afetou o crescimento bacteriano a alta concentração de TiO₂.

A fim de confirmar a relação entre o aumento da porcentagem de inibição da respiração e o crescimento da *E. coli* em relação à fotoatividade do TiO₂, comparou-se os resultados obtidos utilizando 500 e 1000 mg L⁻¹ de **P25** com radiação UV de intensidade 0,2 mW cm⁻² e na condição sem luz, ou seja, no escuro. Neste ensaio utilizou-se também a amostra de **P25***, além da **P25** nas mesmas concentrações e condições, a fim de comparar o efeito na inibição bacteriana devido à fase cristalina do TiO₂, uma vez que, espera-se que a **P25** seja mais fotoativa em relação à **P25***.

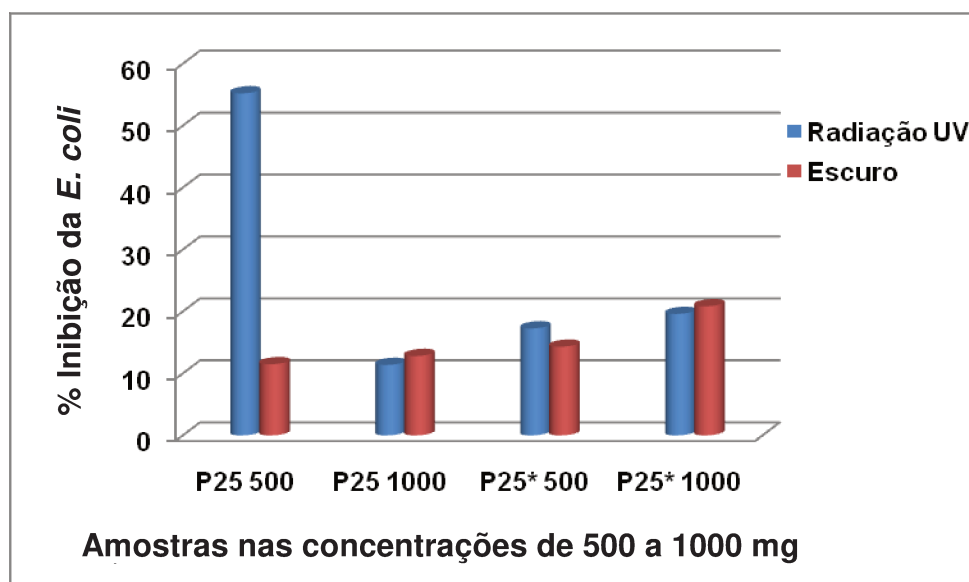


Figura 3.14 - Valores de % Inibição da *E. coli* utilizando as amostras **P25** e **P25*** nas concentrações de 500 e 1000 mg L⁻¹, sob radiação UV-A de intensidade 0,2 mW cm⁻² e no escuro.

Como esperado, os resultados da Figura 3.14 revelam que não ocorreu uma significativa inibição da respiração bacteriana da amostra de **P25*** independente da sua concentração, e da radiação incidida (UV-A) ou sem

radiação (no escuro). Comparando o comportamento da amostra **P25** sob a radiação UV-A e no escuro, nota-se que esta exposição na intensidade utilizada é crucial para o aumento da inibição da população bacteriana.

Com o objetivo de padronizar a concentração efetiva em que se tem a inativação de cerca de 50% da população bacteriana no tempo de ensaio foram realizados testes preliminares com radiação UV-Visível mais intensa do que a utilizada anteriormente nos testes com radiação UV-A.

Sabendo que a total inativação da *E. coli* é dependente da fotativação do TiO₂-anatase, e esta depende dentre outros fatores, da intensidade da radiação utilizada, utilizou-se uma lâmpada de vapor de mercúrio. Foram testadas amostras de **P25** nas concentrações de 1 e 50 mg L⁻¹ irradiadas com fótons UV-Visível ($\lambda = 250-800$ nm), cujo espectro da fonte encontra-se ilustrado na Figura 3.15.

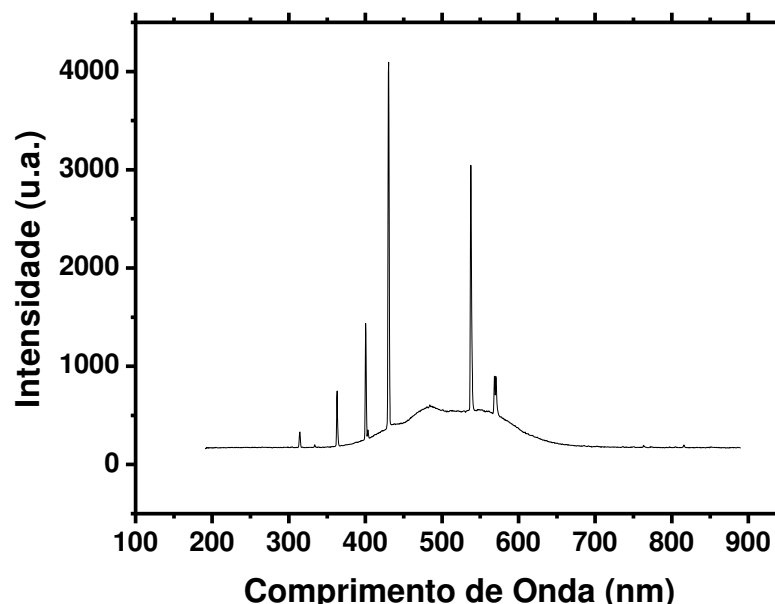


Figura 3.15 - Espectro de emissão da lâmpada de vapor de mercúrio de 150 W de potência.

Os resultados não foram satisfatórios devido à forte intensidade da lâmpada utilizada, o que afetou diretamente a execução do ensaio respirométrico. Desta

forma, não foi possível estabelecer uma cinética de crescimento entre os controles inicial e final. Como observado na Figura 3.16, as concentrações de CO_2 dos controles e das amostras, incluindo a tetraciclina, variaram praticamente da mesma forma durante o ensaio, o que impossibilitou a determinação da inibição do crescimento da *E. coli* em relação aos controles inicial e final.

Não foram testadas outras condições de radiação nos ensaios envolvendo TiO_2 e *E.coli*, pois os resultados de inibição com a radiação UV-A geraram informações relevantes sobre a atividade bactericida das amostras de TiO_2 , **P25** e **P25*** testadas nesta etapa do trabalho.

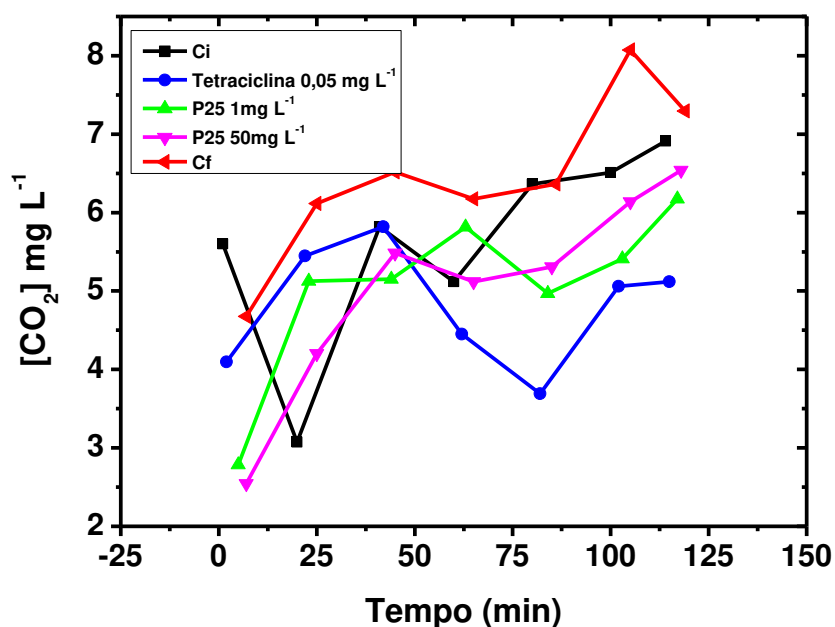


Figura 3.16 - Crescimento da *E. coli* em função da concentração de TiO_2 e iluminação com a lâmpada de vapor de mercúrio. Onde: **Ci** = controle inicial e **Cf** = controle final.

3.5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados de toxicidade obtidos, é possível afirmar que o sistema FIA/Condutimétrico foi utilizado com sucesso na avaliação da atividade bactericida dos NM estudados, TiO₂ e AgNP.

Os resultados encontrados para as amostras de TiO₂ e AgNP testadas correspondem a padrões aos padrões observados na literatura. A saber, as amostras **AgCMC** e **Ag2CMC**, foram tóxicas à *E. coli* nas concentrações de 0,3 e 0,8 mg L⁻¹, respectivamente. **AgPVA** e **Ag2PVA** foram tóxicas a 0,2 mg L⁻¹.

A diferença de toxicidade entre as amostras de **AgCMC** e **Ag2CMC** em relação às amostras **AgPVA** e **Ag2PVA** foi atribuída à tendência da formação de nanoprata com tamanho de partícula maior em **AgCMC** e **Ag2CMC**, o que foi indicado pelos espectros de absorção UV-Visível destas amostras.

Não foi observada a interferência dos estabilizantes, CMC e PVA na toxicidade. O AgNO₃, para apresentou inibição significativa da respiração bacteriana (99,4± 0,5%) a uma concentração de 0,07mg L⁻¹. Desta forma, o Ag⁺ foi mais tóxico à *E. coli* do que as amostras de AgNP testadas. Além disto, a baixa concentração de íons Ag⁺ nestas amostras apontou que o efeito causado à *E.coli* foi devido às nanopartículas de prata e não ao íon Ag⁺.

Na avaliação da atividade bactericida do TiO₂, apenas a amostra **P25** na concentração de 1000 mg L⁻¹ e sob radiação UV-A apresentou toxicidade moderada à *E. coli*, sendo a porcentagem de inibição da respiração bacteriana de 55%.

PARTE IV

ECOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS

DE TiO₂ E AgNP

CAPÍTULO 4

4. AVALIAÇÃO DA ECOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS DE TiO₂ E AgNP

4.1 - INTRODUÇÃO

A crescente produção e uso de produtos que utilizam nanomateriais manufaturados (NM) tem levado ao potencial aporte destes nos comportimentos ambientais, principalmente nos corpos aquáticos. Neste contexto, estudos ecotoxicológicos com o intuito de avaliar o potencial tóxico dos mais diversos NM tornam-se uma necessidade. Estes estudos irão dar suporte à elaboração de legislação adequada que regule os seus níveis aceitáveis nos corpos hídricos (água e sedimento), no solo e no ar, garantindo a proteção do ambiente e da saúde humana.

A análise das respostas ecotoxicológicas em conjunto com a observação das características físico-químicas do NM estudado auxilia na compreensão dos fenômenos de interação destes com micro e macro organismos dos ecossistemas terrestres e aquáticos. Este conjunto de informações tem como objetivo principal compreender a biodisponibilidade do NM ao longo da cadeia alimentar e assim auxiliar a formulação de estratégias que possibilitem seu uso seguro e sustentável (Velzeboer *et al.* 2008; Warheit *et al.* 2007; Handy *et al.* 2008a)

A avaliação da ecotoxicidade de um NM requer uma observação cuidadosa dos protocolos existentes, uma vez que há diferenças nas propriedades físicas e químicas entre um mesmo composto constituído de um material massivo (do inglês *bulk*) e este mesmo composto na escala nanométrica. Este cuidado é importante, pois evita conclusões equivocadas sobre o potencial tóxico de um determinado NM (Paschoalino *et al.* 2010). Além disto, a estabilidade das nanopartículas, decorrente dos constituintes do meio de cultivo do organismo teste

é relevantes no processos de agregação/aglomeração, bem como no estado redox que influencia diretamente a ecotoxicidade de um NM (Farré *et al.* 2009; Griffitt *et al.* 2008; Handy *et al.* 2008b).

4.1.1 - TESTES DE ECOTOXICIDADE

Os testes de ecotoxicidade têm como principal objetivo determinar o quando um agente estressor é responsável por efeitos deletérios a um determinado organismo teste. O potencial tóxico de uma substância depende principalmente das suas características físico-químicas tais como solubilidade e estabilidade, da dose aplicada, da sua biodisponibilidade, bem como, da sua capacidade bioacumulativa

Nos estudos de ecotoxicidade podem ser utilizados vários organismos de taxonomia e níveis tróficos distintos, como por exemplo, bactérias, algas, moluscos, crustáceos e peixes, os quais são expostos ao agente tóxico aplicado (Farah 2001). Os testes agudos têm curta duração e são mais simples, dando respostas rápidas. Já os ensaios crônicos são aplicados, na maioria das vezes, quando não se destaca a toxicidade aguda. Os mesmos são de longa duração e mais trabalhosos, pois requerem acompanhamento constante. A resposta de testes agudos é dada através de parâmetros biológicos, tais como, mortalidade e crescimento. Os testes crônicos avaliam muitas vezes a reprodução e mudança de comportamento dos organismos envolvidos nos ensaios. Através das respostas obtidas são determinados estatisticamente os valores que representam a ecotoxicidade de uma determinada substância.

Para testes agudos as respostas são geralmente expressas como DE50, DL 50, CE50 e CL50. A DE50 e DL50 correspondem, respectivamente, às doses efetiva e letal que afetam 50% da população exposta e a sua resposta varia entre espécies, dependendo das condições experimentais. Para a exposição a compostos inaláveis, de absorção dérmica ou que estejam no ambiente aquático

utilizam-se as concentrações efetiva e letal (CE 50 e CL50), respectivamente, que afetam 50% dos organismos envolvidos no estudo (Azevedo & Chasin 2003).

Para estudos crônicos, nos quais se observa o efeito subletal de uma substância tóxica, as respostas são expressas em termos do NOAEL (do inglês *No Observed Adverse Effect Level*) que corresponde à concentração máxima na qual nenhum efeito adverso é observado nos organismos. A menor concentração que provoca efeito observável no organismo é designada, LOAEL (do inglês *Low Observed Adverse Effect Level*) (Azevedo & Chasin 2003). Assim como os testes toxicológicos, os testes de ecotoxicidade são aplicados para avaliar a qualidade de efluentes industriais e águas superficiais e intersticiais de sedimentos e solos, de novos produtos lançados no mercado (Farah 2001), bem como, o efeito sinérgico ou antagônico de misturas de compostos.

A escolha de um organismo teste para ser utilizado em um ensaio ecotoxicológico baseia-se nas suas características fisiológicas e bioquímicas, facilidade de manutenção de sua cultura em laboratório e nas suas condições de sobrevivência (habitat). Neste sentido, recomenda-se que nos estudos de ecotoxicidade aquática sejam contemplados organismos de diferentes níveis tróficos: decompositores (bactérias), produtores (algas) e consumidores primários (microcrustáceos). Devido à reprodução rápida, simplicidade e sensibilidade, estes organismos são mais utilizados nos ensaios de ecotoxicidade quando comparados a organismos de nível trófico superior como consumidores secundários (peixes) (Farah 2001; Azevedo & Chasin 2003).

A ecotoxicidade de NM de carbono como fulereno e nanotubos, óxidos metálicos (CuO, ZnO e TiO₂) e metais (Ag e Fe), bem como, de pontos quânticos (CdS) tem sido avaliada em vários estudos que envolvem organismos aquáticos. Na avaliação dos seus efeitos tóxicos letais e subletais têm sido utilizados tanto organismos de água doce como o microcrustáceo *Daphnia magna*, a alga *P. subcapitata* e o anfípodo, *Hyalella azteca*, bem como, organismos marinhos como o cocópode *Amphiascus tenuiremis* e a bactéria *Vibrio fischeri*. Além destes, estão sendo empregadas várias espécies de peixes, tais como, *Pimephales promelas*,

Oryzias latipes e *Zebrafish* (Farré *et al.* 2009; Aruoja *et al.* 2009; Fabrega *et al.* 2011).

Neste contexto, Aruoja *et al.* (2009), observou que na avaliação da ecotoxicidade de óxidos metálicos em escala nano e utilizando *Pseudokirchneriella subcapitata*, o nZnO foi cerca de 18 vezes mais tóxico que o nCuO e cerca de 146 vezes mais tóxico que o nTiO₂. Por outro lado, no trabalho realizado por Heinlann *et al.* (2008) para a *Daphnia magna*, nZnO e nCuO apresentaram toxicidade similar e um LC50 igual a 3,2 mg L⁻¹. Para o *Thamnocephalus platyurus* e para o *V. fischeri* o nZnO foi mais tóxico que o nCuO. Já o nTiO₂ não foi tóxico para nenhum dos organismos testados a uma concentração de 20 g L⁻¹.

Os estudos realizados nesta área mostram que o tamanho e a forma dos NM, bem como, o seu grau de aglomeração podem influenciar nas respostas tóxicas observadas. Velzeboer *et al.* (2008) observaram que a toxicidade à alga, bactéria, crustáceo e enzimas do solo diminuía com o grau de agregação das nanopartículas de nZnO₂, nAl₂O₃, nTiO₂, nCeO₂ e nanotubos de carbono testadas. Griffitt *et al.* (2008) mostraram que os sais de prata, níquel, cobre, cobalto e alumínio são mais tóxicos que as respectivas nanopartículas para peixes, daphnias e algas. Além disto, o tipo de dispersão adotada para NM de carbono, insolúveis em água, também pode influenciar na sua resposta tóxica (Farré *et al.* 2009; Zhu *et al.* 2009; Zhu *et al.* 2010).

4.2 - OBJETIVOS

❖ GERAL

Avaliar a ecotoxicidade das suspensões contendo nanopartículas de Ag e das amostras de TiO₂ utilizando organismos teste representantes da biota aquática como bactéria, microcrustáceo e alga.

❖ ESPECÍFICOS

- Avaliar a ecotoxicidade das amostras de TiO₂ **P25**, **P25***, **M-S**, **Anatase-S** e **Rutilo-S** frente ao *Vibrio fischeri* e à *Daphnia similis*;
- Adaptar o protocolo estabelecido para testes de ecotoxicidade com *D. similis* incorporando as radiações UV-A e Visível durante o período do teste para avaliar a fotoatividade das amostras de TiO₂;
- Avaliar a ecotoxicidade das amostras de AgNP, **1P**, **2P**, **3C** e **6P** frente à *Pseudokirchneriella subcapitata* e à *D. similis*, bem como das amostras de AgNP, **1P**, **2P**, **3C**, **4C**, **5C**, e **6P** frente ao *V. fischeri*;
- Avaliar a influência da água de cultivo da *P. subcapitata* e da *D. similis* na estabilidade das suspensões de AgNP, bem como, sobre a toxicidade observada;
- Avaliar a influência da solução de NaCl 22% utilizada no teste com o *V. fischeri* na estabilidade das suspensões de AgNP, bem como sobre a toxicidade observada;
- Avaliar se os estabilizantes utilizados na síntese das suspensões de AgNP influenciam na toxicidade apresentada à *P. subcapitata* e à *D. similis* e ao *V. fischeri*;
- Avaliar se o grau de aglomeração das nAg influencia na toxicidade apresentada à *P. subcapitata* e à *D. similis* e ao *V. fischeri*.

4.3 - EXPERIMENTAL

4.3.1 - AMOSTRAS DE TiO₂ E AgNP TESTADAS

Nos testes com *D. similis* e *V. fischeri* foram utilizadas as amostras de TiO₂ **P25**, **P25***, **Anatase-S** e **Rutilo-S** nas concentrações de 1, 5, 10, 20, 50, 70 e 100 mg L⁻¹. Estas soluções foram preparadas a partir de uma solução estoque de 1000

mg L⁻¹ de cada uma das amostras de TiO₂, que foi submetida à sonificação em um ultrassom BRANSON 2210 durante 30 minutos.

Na avaliação da ecotoxicidade das suspensões de AgNP utilizando *V. fischeri* utilizou-se a suspensão bruta de cada amostra, ou seja, com a concentração de prata total referente à amostra sintetizada. Para os organismos teste *P. subcapitata* e *D. similis* foram preparadas soluções estoque a partir das amostras brutas e em seguida as soluções padrão. Em todas as diluições utilizou-se como solvente o próprio meio de cultivo do organismo teste.

As faixas de concentrações testadas, bem como as amostras utilizadas para cada organismo teste encontram-se na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Concentrações de suspensões de AgNP utilizadas nos testes ecotoxicológicos.

Amostras e concentrações testadas	Organismo Teste		
	<i>V. fischeri</i>	<i>D. similis</i>	<i>P. subcapitata</i>
AgNP	1P, 2P, 3C, 4C,	1P, 2P, 3C, 6P e	1P, 2P, 3C,
	5C ,6P e AgNO ₃	AgNO ₃	6P e AgNO ₃
	(0,21-82,1 mg L ⁻¹)	(1x10 ⁻⁵ -1x10 ⁻¹ mg L ⁻¹)	(1x10 ⁻⁶ - 1 mg L ⁻¹)

4.4.2 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO MEIO DE CULTIVO DOS ORGANISMOS TESTE SOBRE AS SUSPENSÕES DE AgNP

Nanopartículas de prata em suspensão podem sofrer processos de agregação ou oxidação devido a fatores como mudança da força iônica do meio e concentração de espécies oxigenadas (Handy *et al.* 2008a; 2008b). Além disto, os íons Ag⁺ presentes na superfície da nanopartículas, bem como, aqueles

provenientes do seu processo de oxidação, podem se ligar a espécies químicas presentes no ambiente aquático. Exemplos clássicos de ligações de Ag^+ com íons sulfeto, sulfato, cloreto e com a matéria orgânica dissolvida foram largamente estudados (Hogstrand & Wood 1998). Tais interações explicam muitas vezes os mecanismos de biodisponibilidade e bioacumulação dos íons Ag^+ em ambientes aquáticos, constituindo a base para estudos de ecotoxicidade de nanopartículas de prata.

Sob esta ótica, foi realizado neste trabalho um estudo sobre a influência dos componentes das águas de cultivo da *D. similis* e da *P.subcapitata* (Tabela 4.2) sobre as nanopartículas testadas.

Tabela 4.2 - Composições da água de cultivo da *P. subcapitata* (ABNT 2005) e da *D. similis* (CETESB L5.018/1994).

<i>P. subcapitata</i>			<i>D. similis</i>	
Solução	Composição	Concentração (mg L ⁻¹)	Composição	Concentração (mg L ⁻¹)
1	Ca(NO ₃).4H ₂ O	40	CaSO ₄ .2H ₂ O	1,5
2	KNO ₃	100	KCl	0,2
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	30	MgSO ₄ .7H ₂ O	12,2
4	K ₂ HPO ₄	40	NaHCO ₃	9,2
5	CuSO ₄ .5H ₂ O	15		
	(NH ₄) ₆ MO ₇ O ₂₄ .4H ₂ O	30		
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	30		
	COCL ₂ .6H ₂ O	30		
	Mn(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	30		
	H ₃ C ₆ H ₈ O ₇	30		
	H ₃ BO ₃	30		
	C ₆ H ₅ FeO ₇ .5H ₂ O	1,625		
6	FeSO ₄ .7H ₂ O	0,625		
	FeCl ₃ .6H ₂ O	0,625		
7	NaHCO ₃	15		

Foi montado um experimento simulando as condições dos testes de toxicidade, sem utilizar os organismos testes. Para cada amostra de AgNP foi preparada uma solução na maior concentração utilizada no teste de toxicidade, utilizando a água de cultivo do organismo teste como solvente. Foi esperado o tempo de incubação, 72 h para a *P.subcapitata* e 48 h para a *D. similis*.

Logo após foram registrados os espectros de absorção UV-Visível de cada amostra e as mudanças nas bandas de ressonância plasmon foram associadas a possíveis processos de desestabilização das nAg.

Este mesmo procedimento foi realizado para o *V. fischeri*, contudo, foi avaliado o efeito do NaCl 22% (para o ajuste osmótico em amostras de água doce) sobre a estabilidade das nanopartículas de prata.

4.3.3 TOXICIDADE DOS COMPONENTES UTILIZADOS NA SÍNTESE DAS SUSPENSÕES DE AgNP

Para verificar se os estabilizantes utilizados na síntese das suspensões de AgNP são tóxicos aos organismos teste utilizados neste trabalho, soluções de CMC 1% e PVA 1% foram testadas.

4.3.4 - ENSAIO UTILIZANDO A BACTÉRIA MARINHA *V. fischeri*

Este organismo é uma bactéria luminescente, anteriormente conhecida como *Photobacterium phosphoreum*, gram-negativa, anaeróbia facultativa que em condições ambientais favoráveis emitem luz naturalmente. A *V. fischeri* (Figura 4.1) ocupa vários nichos em seu habitat natural como as águas naturais salinas onde predominem o clima, temperado ou subtropical (Azevedo & Chasin 2003; Pelczar *et al.* 2007). Esta bactéria é predominante em órgãos internos de peixes, chegando a uma concentração de aproximadamente 10^{11} células mL⁻¹. Contudo,

livre no oceano encontra-se apenas em uma concentração de cerca de 10^2 células mL^{-1} (Harmel 2004).

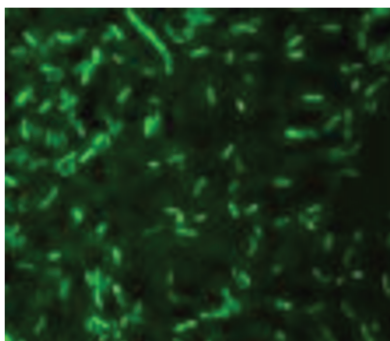
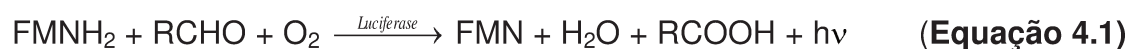


Figura 4.1 - Ilustração da bactéria marinha *V. fischeri*. Fonte: http://microbewiki.kenyon.edu/images/c/c9/Vibrio_fischeri_1145457864.jpg

O mecanismo da geração de luz por bactérias luminescentes envolve a oxidação simultânea da riboflavina 5 – fosfato ($FMNH_2$) e de um aldeído ($RCHO$) de cadeia longa. Esta reação (Equação 4.1) é catalisada por uma enzima do tipo flavina monooxigenase, chamada luciferase, que neste processo é excitada e apresenta fluorescência. Ao retornar ao estado fundamental esta enzima emite a luz na região do visível (Harmel 2004).



Desta forma, a presença de um agente estressor irá interferir neste processo, inibindo a luminescência observada. Logo, esta medida é monitorada nos ensaios que utilizam a bactéria *V. fischeri* como organismo teste.

O ensaio de ecotoxicidade aguda utilizando *V. fischeri* como organismo teste tem padronização internacional e por apresentar uma resposta rápida (em 30 minutos), o teste é bastante útil para verificar o efeito tóxico imediato de um determinado composto (Harmel 2004). Desta forma, encontram aplicação na avaliação da ecotoxicidade de águas intersticiais de sedimentos contaminadas, águas pluviais, dentre outras matrizes com os mais variados compostos estressores (Mozeto *et al.* 2006; Rodrigues 2010).

4.3.4.1 - PROTOCOLO PARA OS TESTES COM O *V. fischeri*

O teste com *V. fischeri* seguiu a norma ISO 11348-3 (ISO 2007). Para a reativação da biomassa liofilizada de *V. fischeri* (NRRLB-11177, BIOLUX) foram utilizados 1000 μ L de solução de reativação fornecida pelo fabricante.

O sistema portátil Biofix – Lumi 10 da Macherey–Nagel GmbH & Co. KG (Figura 4.2) foi utilizado para a realização das medidas de luminescência.



Figura 4.2 Ilustração do luminômetro BIOFIX® LUMI-10 utilizado nos testes com o *V. fischeri*. Fonte: www.hellotrade.com

Em cubetas vazias foram transferidos 500 μ L de solução salina, NaCl 22%, e 10 μ L da suspensão contendo o *V. fischeri*. Após 15 minutos de estabilização foram realizadas as leituras de emissão de luz no tempo zero ($t=0$). Após a adição de 500 μ L das amostras nas cubetas foram realizadas as leituras após 5, 15 e 30 minutos e a intensidade da luz produzida pelas bactérias na amostra foi comparada ao grupo de controle negativo.

Como parâmetro de avaliação do ensaio foi o decréscimo da luminescência medida após os períodos de contato (5, 15 e 30 minutos), foi considerado um fator de correção. Este fator corresponde à uma medida das alterações da luminescência do controle negativo durante o período de exposição e deve ser superior a 0,60. O fator de correção é calculado da seguinte forma:

$$f(t) = \frac{I(t)b}{I(0)b} \quad \text{(Equação 4.2)}$$

Onde:

= $f(t)$ fator de correção para um determinado tempo (t),

$I(0)b$ = leitura de luz inicial para a cubeta do branco (B1),

$I(t)b$ = leitura de luz final para a cubeta do branco (B1), correspondente ao tempo (t).

O $f(t)$ corrige os valores iniciais de $I(0)$ de todas as leituras do ensaio e para a posterior determinação da diminuição da porcentagem de inibição da luminescência provocada pela amostra.

A porcentagem de inibição (%) é calculada através da Equação 4.3:

$$\% = 100 - \frac{I(t) \times 100}{f(t) \times I(0)} \quad \text{(Equação 4.3)}$$

Onde:

$f(t)$ = fator de correção para um determinado tempo (t);

$I(0)$ = leitura de luz inicial para cada cubeta de ensaio;

$I(t)$ = leitura de luz remanescente para cada cubeta de ensaio, correspondente ao tempo (t).

O valor de CE50 para cada amostra analisada foi obtido pelo tratamento das respostas de luminescência utilizando o software Excel 2010.

4.3.5- ENSAIOS UTILIZANDO O MICROCRUSTÁCEO *D. similis*

O gênero do microcrustáceo *Daphnia* é um dos mais utilizados em testes ecotoxicológicos agudos e crônicos, visto a sua sensibilidade e posição central na cadeia alimentar de ambientes lênticos, principalmente em lagos e represas de águas continentais. Este organismo mede entre 0,5 e 5,0 mm de comprimento e a sua alimentação consiste basicamente de bactérias, algas, protozoários e compostos orgânicos, os quais são capturados pelo processo de filtração comum aos microcrustáceos (Silveira 2007).

A locomoção destes microcrustáceos no meio aquático se dá pela movimentação de suas longas antenas e a reprodução é assexuada, numa população composta basicamente por fêmeas, mas que em condições adversas, como mudança de temperatura, ou falta de alimento, surgem machos. Ocorre então a fecundação de óvulos, gerando os efípios que são liberados ao ambiente e são muito resistentes às condições adversas do sistema no qual se encontram. Quando estas condições voltam a ser favoráveis, os efípios eclodem, originando novas fêmeas e continuando o ciclo da *Daphnia* (Silveira 2007; Oliveira 2007).

É importante destacar que, dentre as várias espécies de *Daphnia* utilizadas em ensaios de ecotoxicidade, a *D. magna* e *D. pulex* são geralmente empregadas

em ensaios agudos, os quais têm as condições de cultivo do organismo e procedimento de execução normatizados (OECD 1998).

Dependendo das condições ambientais de cada região no que se refere às características físico-químicas da água de cultivo da *Daphnia*, a espécie utilizada nos ensaios agudos e crônicos pode diferir. Por exemplo, no Estado de São Paulo, as espécies de cladóceros mais utilizadas nos testes ecotoxicológicos são a *Ceriodaphnia silvestri* e a *D. simillis* (CETESB 1994) (Figura 4.3).



Figura 4.3 - Ilustração do microcrustáceo *D. simillis*. Imagem cedida pelo LEAL-FT-UNICAMP.

4.3.5.1 - PROTOCOLO PARA OS TESTES COM A *D. simillis*

O microcrustáceo de água doce, *Daphnia simillis* foi cultivado no Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia Ambiental (LEAL) da UNICAMP. Os organismos foram alimentados diariamente com alga (*Pseudokircheriella subcapitata*) e mantidos a 20 ± 2 °C, sob fotoperíodo (luz/escuro) de 18:8 h. A sensibilidade da cultura de *Daphnia* foi avaliada mensalmente usando NaCl.

O ensaio agudo com a *D. simillis* seguiu o procedimento descrito pela norma CETESB L5.018 (CETESB 1994). Cada concentração e o controle branco (apenas

água de diluição) que é o controle foram testados em triplicata. A água de diluição é constituída de água mineral enriquecida com os sais, KCl, NaHCO_3 , $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, segundo o protocolo ISO 1996.

Cinco neonatas (24 h de idade) foram adicionadas em cada recipiente contendo 10 mL da suspensão da amostra e as culturas foram incubadas a 20 ± 2 °C sob a condição de escuro por 48 h conforme os protocolos padrão (OECD 2004; ABNT 2004). Estes aceitam ambas as condições de incubação, completamente no escuro ou usando fotoperíodo (luz/escuro) de 18:8 h.

As características físico-químicas da água de cultivo da *D. similis* foram monitoradas e seguiram o padrão recomendado pela Norma CETESB L5.018 (CETESB 1994) . Os valores dos parâmetros, dureza total (40 e 48 mg.L^{-1} de CaCO_3), pH (7,2 a 7,6), a condutividade ($\sim 160 \mu\text{S.cm}^{-1}$) e a temperatura (20 ± 2 °C) não foram excedidos para os testes conduzidos.

A resposta observada do teste (do inglês *endpoint*) foi a imobilidade dos indivíduos após 48 horas de exposição ao agente estressor. O teste foi considerado válido quando a porcentagem de organismos imóveis no controle não foi maior que 10%. Os valores de CE50 (mg L^{-1}) considerando um intervalo de confiança de 95% foram estimados usando o programa estatístico Trimmed Spearman Karber (JSPEAR).

4.3.5.2 - FOTOATIVIDADE DO TiO_2 : TESTE COM *D. similis* SOB AS RADIAÇÕES UV-A E VISÍVEL

A fotoativação do TiO_2 sob a radiação UV cria um par redox elétron/ lacuna (e^-/h^+) que em contato com a água adsorvida em sua superfície gera espécies reativas de oxigênio (ROS), principalmente, $\bullet\text{OH}$, H_2O_2 e $^1\text{O}_2$ (Chen *et al.* 2007; Nowotny 2008; Rincón & Pulgarin 2003). Estas espécies podem causar danos à membrana celular e ao DNA levando à inativação de bactérias Gram negativas e Gram positivas e de vírus (Cho *et al.* 2004; Hajkova *et al.* 2007; Jiang *et al.* 2011;

Zan *et al.* 2007). Deste modo, a propriedade fotocatalítica do semicondutor TiO_2 , deve ser um parâmetro de controle a ser incluído nos testes ecotoxicológicos que envolvem este nanomaterial.

Neste contexto, com o intuito de explorar as características fotoativas do TiO_2 os testes com *D. similis* foram realizados simultaneamente sob três condições de incubação: sob a condição padrão, ou seja, no escuro (OECD 2004; ABNT 2004), sob a radiação UV-A e um teste utilizando radiação visível. Para acomodar as amostras durante o ensaio, três reatores foram construídos com a madeira do tipo MDF (do inglês *Medium-density fiberboard*) constituídos de caixas nas dimensões de 50 cm x 50 cm x 35 cm (Figura 4.4) e tampas nas dimensões de 50 cm x 50 cm x 5 cm.

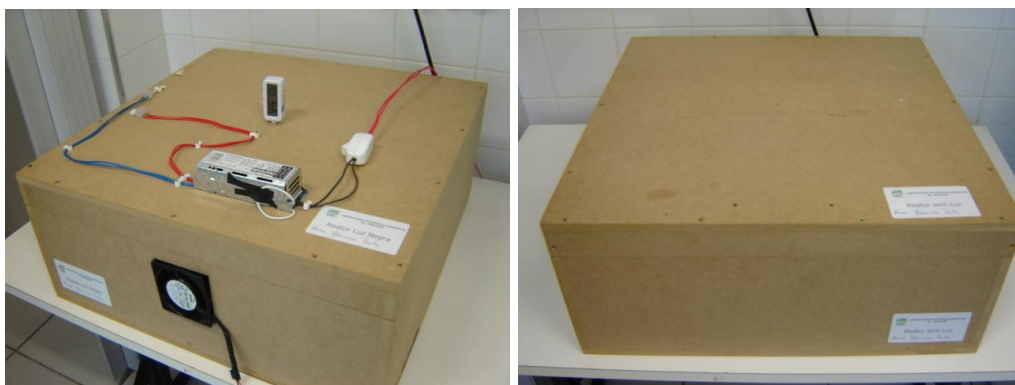


Figura 4.4 - Detalhe dos reatores construídos para os ensaios de ecotoxicidade com a *D. similis* e as amostras de TiO_2 .

A Figura 4.5 ilustra os testes realizados nas três condições: UV-A, visível e no escuro. Para conduzir os testes sob a radiação UV-A, em uma tampa foram fixadas duas lâmpadas fluorescentes de luz negra de 15 W de potência ($\lambda \sim 365$ nm), cada uma. Para os testes sob a radiação Visível, em outra tampa foi fixada uma lâmpada fluorescente de Xe de 15 W de potência ($\lambda = 400-800$ nm). Para o teste realizado no escuro, na terceira caixa não foi fixada nenhuma lâmpada.



Escuro

Com radiação UV-A

Com radiação Visível

Figura 4.5 Ilustração dos reatores utilizados nos ensaios com a *D. similis* e as amostras de TiO_2 .

As lâmpadas fluorescentes de luz negra e luz branca, utilizadas para promover a fotoativação do TiO_2 apresentaram espectros de emissão característicos (Figura 4.6), ou seja, emissão em 365 nm (lâmpada UV-A) e de 400 a 800 nm para a lâmpada Visível

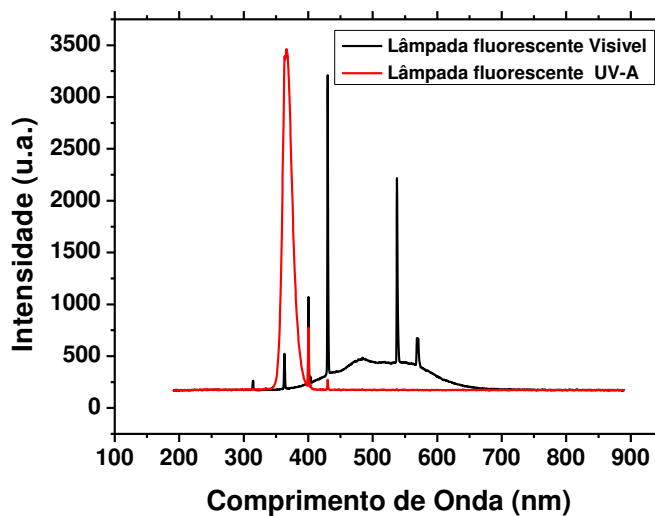


Figura 4.6 - Espectros de emissão das lâmpadas fluorescentes que emitem radiação UV-A e Visível.

O MDF foi escolhido para a construção dos reatores, pois é tóxico aos organismos testes. Para eliminar as interferências devido ao aquecimento causado pela lâmpada fluorescente Visível e manter a temperatura constante (20 ± 2 °C), foi inserido um sistema de ventilação nos reatores durante todo o teste, utilizando um *cooler*, MICROVENT 8CM.

4.3.6 - ENSAIOS UTILIZANDO A ALGA *P. subcapitata*

Algas ou microalgas são conhecidas como fitoplânctons, grupos taxonômicos capazes de realizar a fotossíntese, mas que possuem diferentes necessidades fisiológicas e respondem de modos distintos, a parâmetros físicos e químicos. A distribuição e a composição de espécies, bem como, os ciclos sazonais das florações algais, estão entre os fatores importantes que afetam o funcionamento dos ambientes aquáticos (Tavares & Rocha 2003).

As algas compõem a base da cadeia alimentar de muitos invertebrados aquáticos e desta forma, qualquer mudança na sua biodisponibilidade das algas poderia ser crucial na proteção da vida aquática (Vidotti & Rollemberg 2004). Por este motivo, juntamente com outros organismos, as algas vêm sendo utilizadas em testes de ecotoxicidade.

Dentre os testes ecotoxicológico que utilizam como organismos teste, algas de água doce, o mais empregado atualmente é a *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente denominada *Selenastrum capricornutum*) (Zagatto & Bertoletti 2006), cuja ilustração encontra-se na Figura 4.7.

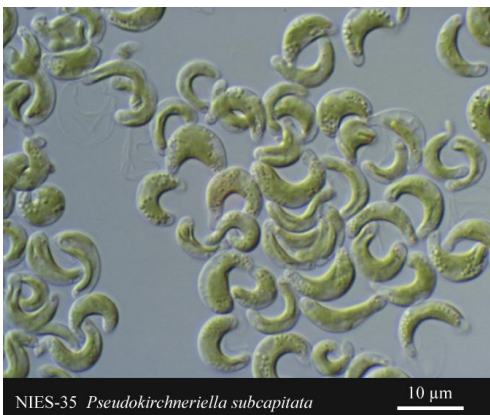


Figura 4.7 - Ilustração da alga *P. subcapitata*.

Fonte: <http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/images/strainsimage/nies-0035.jpg>

As algas têm sido aplicadas nos programas de monitoramento ambiental por contribuem para a produção primária e na maioria dos habitat aquáticos. Por indicarem os primeiros sinais de impactos nos ecossistemas, viabilizam ações corretivas na gestão de recursos hídricos a tempo de evitar a intensificação de efeitos indesejáveis. Desta forma, os testes de toxicidade crônica utilizando algas como organismos teste são geralmente sensíveis, rápidos e econômicos.

4.3.6.1 - PROTOCOLO PARA OS TESTES COM A ALGA *P. subcapitata*

No Brasil há um protocolo de teste padronizado pela ABNT (ABNT NBR 12648/2005) com algas utilizando como recipiente teste frascos erlenmeyers. Contudo, a agência ambiental canadense (*Environment Canada*) desenvolveu uma modificação do ensaio (EC 2007), substituindo os erlenmeyers por microplacas, seguindo a tendência mundial de miniaturização de testes e consequente diminuição da quantidade de amostras e geração de resíduos.

No Brasil não há nenhum protocolo padronizado que utilize a microplaca como recipiente teste para o teste com alga, bem como, estudos realizados que utilizem tal método. Desta forma, neste trabalho foi utilizado o método em microplaca implementado pelo Laboratório de Ecotoxicologia e Microbiologia

Ambiental (LEAL) que consiste em uma adaptação da norma canadense EPS 1/RM/25 (EC 2007).

O ensaio consiste basicamente na inserção de 200 μL de cada amostra em 10 μL de meio oligo, no qual a população algal é de aproximadamente 10^6 células mL^{-1} . Cada mistura foi feita em triplicata em uma microplaca (Figura 4.8), e esta foi submetida à agitação de 158 rpm em uma mesa agitadora orbital AÇÃO CIENTÍFICA AC 645 e iluminada com quatro lâmpadas de luz branca GE T8 de 32 W (cada) por 72 horas à temperatura média de 26,8 °C.

Em todos os testes realizados foi feito um controle negativo constituído apenas do meio oligo. Este controle é utilizado para avaliar o crescimento algal sem o agente estressor e desta maneira observar a repetibilidade dos ensaios em relação às condições ambiente.

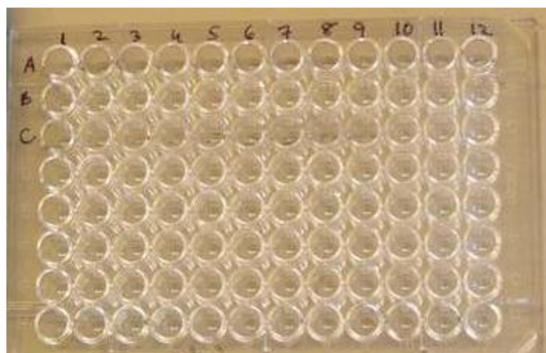


Figura 4.8 Ilustração de uma microplaca utilizada no ensaio com algas.

A contagem do número de células após 72 horas de exposição à iluminação e sob agitação foi realizada com o auxílio de uma câmara de Neubauer. O experimento chegou ao final quando o número de células mL^{-1} tornou-se estável, indicando que a cultura atingiu a fase estacionária de crescimento. Os resultados foram expressos em múltiplos de 10.000 células mL^{-1} .

A média das triplicatas mensuradas para cada amostra nas concentrações estudadas foi utilizada no cálculo de CE50.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 - ECOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ FRENTE À *D. similis* E AO *V. fischeri*

4.4.1.1- ECOTOXICIDADE À *D. similis*

Os testes preliminares expondo *D. similis* às amostras de TiO₂ **P25** e **P25*** sob as três condições já descritas (no escuro e sob as radiações UV-A e visível) mostraram que o controle não apresentou mais que 10 % de organismos imóveis, indicando que os resultados podem ser considerados. Os parâmetros, dureza, pH e condutividade das amostras monitorados antes e depois do teste mostraram dureza entre 40 e 48 mg L⁻¹ CaCO₃, o pH variou na faixa de 7,2 a 7,6 e a condutividade foi aproximadamente 160 µS cm⁻¹.

As amostras **P25** e **P25*** não apresentaram toxicidade no escuro para a máxima concentração testada (100 mg L⁻¹), o que está de acordo com a literatura. Warheit *et al.* (2007) e Zhu *et al.* (2010) observaram um CE50 > 100 mg L⁻¹ após 48 h de exposição de TiO₂ rutilo e TiO₂ P25 (100-140 nm) à *D. magna*. Wiench *et al.* (2009) encontraram CE50 > 100 mg L⁻¹ para nanopartículas de TiO₂ com a superfície coberta (do inglês *coated*) e sem cobertura (do inglês *uncoated*), bem como, para TiO₂ *bulk* sem cobertura.

No geral, nanopartículas menores em concentrações baixas são mais tóxicas para organismos aquáticos que nanopartículas maiores em altas concentrações. Isto pode ocorrer porque nanopartículas menores (<10 nm) penetram mais facilmente nas células, causando danos via geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) (Jiang *et al.* 2011; Reeves *et al.* 2008). Neste sentido, Lovern & Klaper (2006) reportaram que a

suspensão de TiO₂ sonicada na concentração de 50-500 mg L⁻¹ não causou toxicidade à *D. magna* após 48 h de exposição. Contudo, a solução filtrada em membrana 0,2 µm mostrou um CE50 de 5,5 mg L⁻¹. Bang *et al.* (2011) observaram que partículas de TiO₂ P25 de 21 nm não foram tóxicas à *D. magna* à concentração de 40 mg L⁻¹, enquanto nanopartículas de TiO₂ rutilo de 500 nm e TiO₂ P25 de 250 nm não foram tóxicas a *D. magna* a uma concentração maior (10 m mol L⁻¹ ou 638,96 mg L⁻¹).

Por outro lado, sabe-se que ao ser fotoativado por radiação UV, o TiO₂ gera espécies reativas de oxigênio que causam danos aos micro organismos. Desta forma, além do tamanho das partículas e da cobertura da superfície, outro fator importante na observação da toxicidade de substâncias semicondutoras, como o TiO₂, é o efeito da sua fotoatividade sobre os organismos teste.

O primeiro trabalho aplicando a fotoativação de amostras de TiO₂ como variável de controle em testes ecotoxicológicos foi realizado por Hund-Rinke *et al.* (2006). Os autores constataram que, após a pré-iluminação do TiO₂ observou-se maior toxicidade à *D. magna* quando comparada à condição de escuro. Suspensões de TiO₂ anatase (25 nm e 100 nm particles) de 1 a 3 mg L⁻¹ foram pré iluminadas utilizando uma lâmpada fluorescente de Xe (300-800 nm, 250 W) por 30 min.

Neste caso, o período de pré-iluminação não garante a produção e a presença de espécies reativas de oxigênio durante todo o teste (48 h), uma vez que a geração destas é concomitante à irradiação do semicondutor (Rincón & Pulgarín 2003). Adicionalmente, Marugán *et al.* (2010) observaram que a produção de •OH é proporcional ao tempo de fotoativação do TiO₂, causando danos irreversíveis à *E. coli*. Desta forma, testes de ecotoxicidade usando espécies de *Daphnia* e que exploram a fotoatividade do TiO₂ por meio de sua pré-iluminação são questionáveis.

Inicialmente foram realizados testes preliminares utilizando as amostras **P25** e **P25** na faixa de 0 a 100 mgL⁻¹ nas três condições: no escuro, sob radiação

Visível e sob radiação UV-A. Os resultados mostraram que apenas a amostra **P25** foi tóxica ($\text{CE}_{50} < 20 \text{ mg L}^{-1}$) sob radiação UV-A (Figura 4.9B).

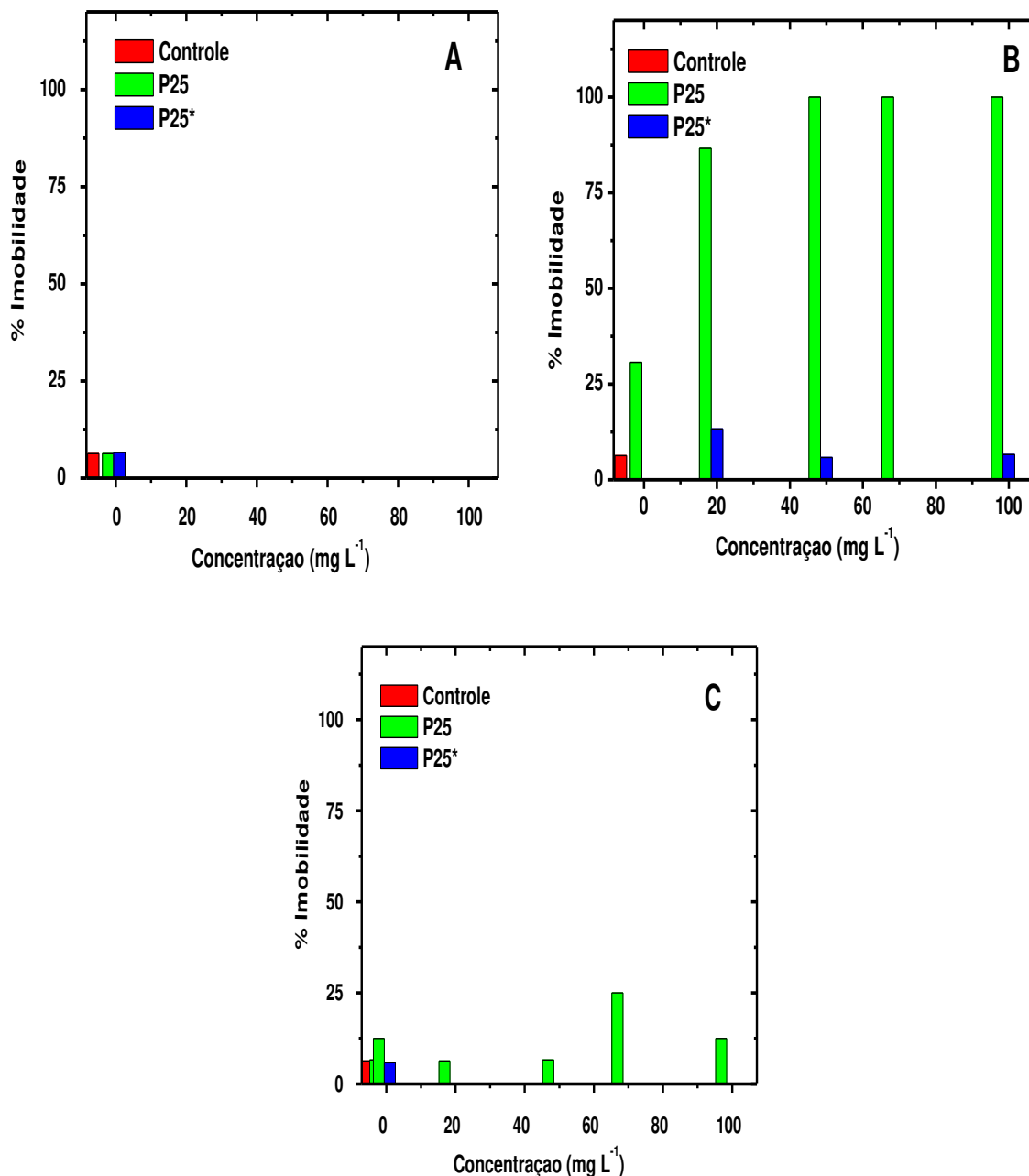


Figura 4.9. Valores de % imobilidade da *D. similis* às amostras de TiO_2 nas concentrações de 0 a 100 mg L^{-1} , cujos ensaios ocorreram **(a)** sem iluminação, **(b)** sob radiação UV-A e **(c)** sob radiação Visível.

A amostra **P25*** não foi tóxica à máxima concentração testada (100 mg L^{-1}), em nenhuma das condições de exposição e nesta concentração a amostra **P25** não foi tóxica nas condições de escuro e sob radiação UV-Visível (Figura 4.9).

Estes resultados podem ser explicados com base na energia de fotoativação (E_g) das amostras e no comprimento de onda adequado para promover esta fotoatividade. Deste modo, os resultados obtidos para a amostra **P25*** sob a radiação visível (não tóxicas a 100 mg L^{-1}) mostram que, embora o valor de E_g desta amostra ($3,92 \text{ eV}$) corresponda a um $\lambda \sim 408 \text{ nm}$, a baixa absorção desta amostra na faixa espectral $> 400 \text{ nm}$ (Figura 4.10) explica o fato desta amostra não ser fotoativa.

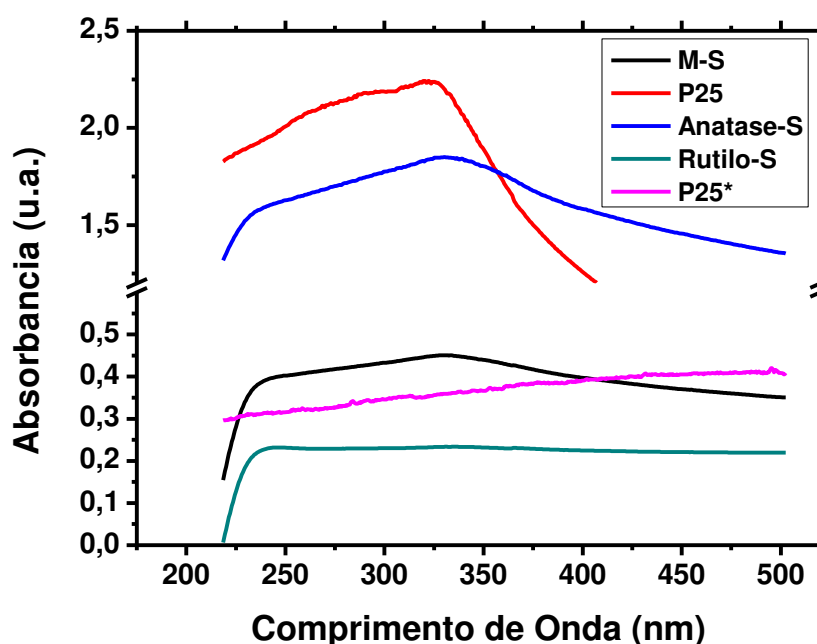


Figura 4.10 - Espectros UV-Visível das amostras de TiO_2 utilizadas nos ensaios com *D. similis*.

Desta forma, demais testes envolvendo as amostras de TiO_2 nas formas anatase (**Anatase-S**) e rutilo (**Rutilo-S**) e a mistura de ambas (**P25** e **M-S**) foram realizados sob a radiação UV-A para estimar o CE50. Os valores de CE50 e as

curvas de dose-resposta para **P25**, **M-S** e **Anatase-S** são apresentadas na Tabela 4.3 e na Figura 4.11, respectivamente.

Tabela 4.3 - Resultados dos testes de toxicidade expressos como CE50 para as amostras **P25**, **M-S**, **Anatase-S** e **Rutilo-S** sob a radiação UV-A.

Amostras	Concentrações testadas (mg L^{-1})	CE 50 (mg L^{-1})
P25	0, 5, 10, 15, 20, 25	8
M-S	0, 5, 10, 20, 40, 50	12
Anatase-S	0, 5, 20, 60, 80, 100	57
Rutilo-S	0, 5, 20, 60, 80, 100	Não tóxico

A ordem de toxicidade observada foi **P25** > **M-S** > **Anatase-S** > **Rutilo-S**. A amostra de TiO_2 na forma cristalina anatase (**Anatase-S**), sob a radiação UV-A apresentou comportamento tóxico oposto, quando comparada à fase rutilo (**Rutilo-S**) sob a mesma condição (Tabela 4.3). Como **Rutilo-S** e **Anatase-S** são constituídos de agregados em torno de 400 nm (Tabela 2.4) este comportamento não é atribuído ao tamanho das nanopartículas (Strigul *et al.* 2009), mas às propriedades fotoativas das amostras.

O fato de a 100 mg L^{-1} o **Rutilo-S** não ser tóxico à *D. similis* e o **Anatase-S** apresentar CE50 igual a 57 mg L^{-1} , indica que esta diferença na toxicidade pode ser atribuída à fotoativação do rutilo na região visível ($\sim 405 \text{ nm}$) que não corresponde à radiação UV-A aplicada no teste ($\lambda = 363 \text{ nm}$). Enquanto isso, a **Anatase-S** além de possuir E_g (3,02 eV) em $\sim 390 \text{ nm}$, apresenta alta absorção na região UV-A (Figura 4.10).

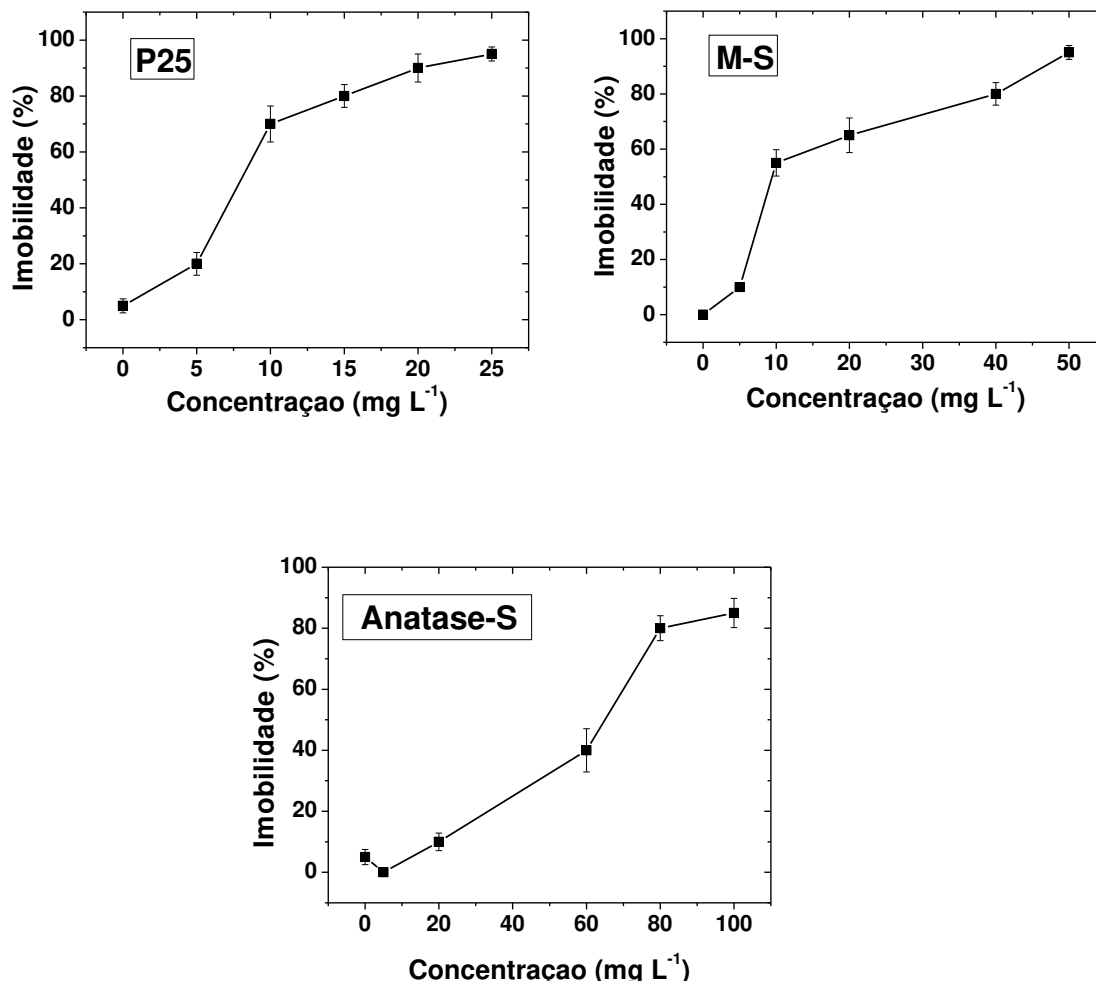


Figura 4.11 Curvas dose-resposta para **P25**, **M-S** e **Anatase-S** obtidas em 48 h de exposição à *D. similis*. São apresentadas as barras de erro para cada concentração (n=4).

Embora **P25**, **M-S** e **Anatase-S** tenham apresentado distribuição de tamanho de partícula e tamanho de aglomerados similares (Tabela 2.4), **P25** e **M-S** foram mais tóxicos à *D. similis* que **Anatase-S**. Este comportamento pode ser atribuído à alta taxa de recombinação e^-/h^+ de **P25** e **M-S** associado, respectivamente, aos *band gap*, 3,37 ($\lambda = 376$ nm) e 3,03 eV ($\lambda = 392$ nm), na faixa de comprimento de onda da radiação utilizada no teste (UV-A, 320-400 nm). Mesmo que **Anatase-S** tenha mostrado elevada absorção na região UV-Visível

(Figura 4.10), seu valor de *band gap* (3,02 eV) explica a redução da sua toxicidade quando comparada principalmente à amostra **P25**.

O mecanismo de toxicidade do TiO₂ para organismos aquáticos não é muito conhecido, embora, os efeitos tóxicos observados tenham sido atribuídos principalmente a geração de ROS (Carp *et al.* 2004; Warheit *et al.* 2007; Zhu *et al.* 2010), que podem causar mudanças na atividade de enzimas antioxidantes. Deste modo, os radicais •OH causam diferentes distúrbios celulares, incluindo citotoxicidade e danos ao DNA celular (Federici *et al.* 2007; Reeves *et al.* 2008; Kim *et al.* 2010) via reações diretas ou por peroxidação lipídica.

4.4.1.2 - ECOTOXICIDADE AO *V. fischeri*

Os resultados dos testes com as amostras de TiO₂ (**P25**, **P25***, **Anatase-S** e **Rutilo-S**) e o *V. fischeri* indicaram que não ocorreu inibição da luminescência gerada pela bactéria, independente da forma cristalina do TiO₂. Nenhuma das amostras testadas foram tóxicas na faixa de concentração de 1 a 100 mg L⁻¹. Este resultado também foi evidenciado por Blaise *et al.* (2008) que não observaram efeito tóxico do TiO₂ ao *V. fischeri* até 100 mg L⁻¹. Heinlann *et al.* (2008), utilizaram concentrações bastante elevadas de TiO₂ (20 g L⁻¹) nas escalas *bulk* e *nano* e não constatarem toxicidade ao *V. fischeri*. Este fato pode ser atribuído a não inclusão da fotoativação das amostras de TiO₂ como variável de controle do teste, uma vez que é aplicado no ensaio com a *D. similis*.

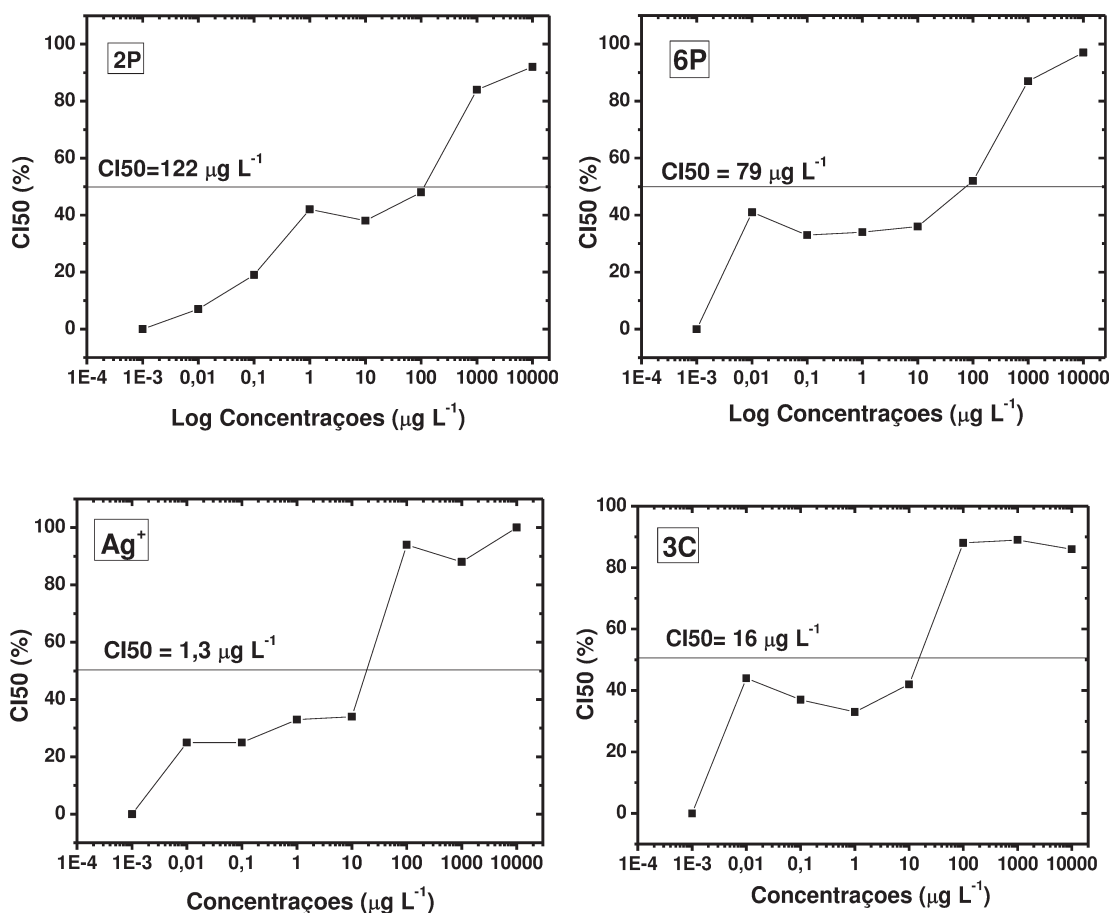
4.4.2- ECOTOXICIDADE DAS AMOSTRAS DE AgNP FRENTE À *P. subcapitata*, *D. similis* E *V. fischeri*

As suspensões de AgNP foram mais tóxicas para as algas *P. subcapitata* e para o microcrustáceo *D. similis* do que para a bactéria *V. fischeri*. Contudo, no estudo da ecotoxicidade das suspensões de AgNP sintetizadas, a especiação da

prata (Ag^+ e nAg) nestas amostras desempenhou um papel fundamental para a compreensão dos resultados obtidos.

4.4.2.1 - ECOTOXICIDADE À *P. subcapitata*

Para a *P. subcapitata*, observou-se que a toxicidade das amostras de AgNP e de Ag^+ (AgNO_3) variou de 1 a $122 \mu\text{g L}^{-1}$, conforme mostradas nas curvas-dose respostas obtidas (Figura 4.12). Os valores de CI_{50} encontrados estão de acordo com os observados na literatura para compostos de prata (Luoma 2008; Miao *et al.* 2009) testados.



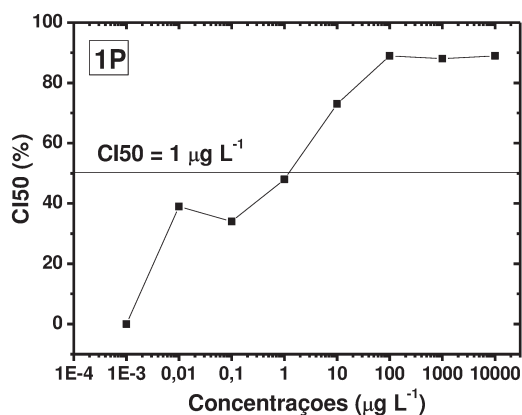


Figura 4.12 Curvas-dose respostas para as amostras **6P**, **2P**, **1P**, **3C** e AgNO_3 .

As amostras de AgNP contendo maior quantidade de íons Ag^+ (**1P** e **3C**) foram cerca de 5 a 100 vezes mais tóxicas à *P. subcapitata* que as amostras contendo mais de 96% de nanopartículas de prata (**2P** e **6P**) (Tabela 4.4).

Tabela 4.4 Valores de CI50 obtidos e % Ag^+ para as amostras de AgNP e AgNO_3 testadas.

Amostras	CI 50 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	% Ag^+
2P	122	0,6
6P	79	0,7
*Ag^+	19	100
3C	16	47,3
1P	1	48,4

* Como fonte de íons Ag^+ utilizou-se AgNO_3 .

De um modo geral o tamanho de partícula (Farré *et al.* 2008) é um dos fatores determinantes da toxicidade de nanomateriais, ou seja, quanto menor a

nanopartícula, maior o seu efeito tóxico. Desta forma, esperava-se que as suspensões **1P** e **3C**, constituídas de nanopartículas maiores exibissem menor toxicidade do que as amostras **2P** e **6P** constituídas apenas de nanopartículas menores (11-18 nm) e mais dispersas (Figura 4.13).

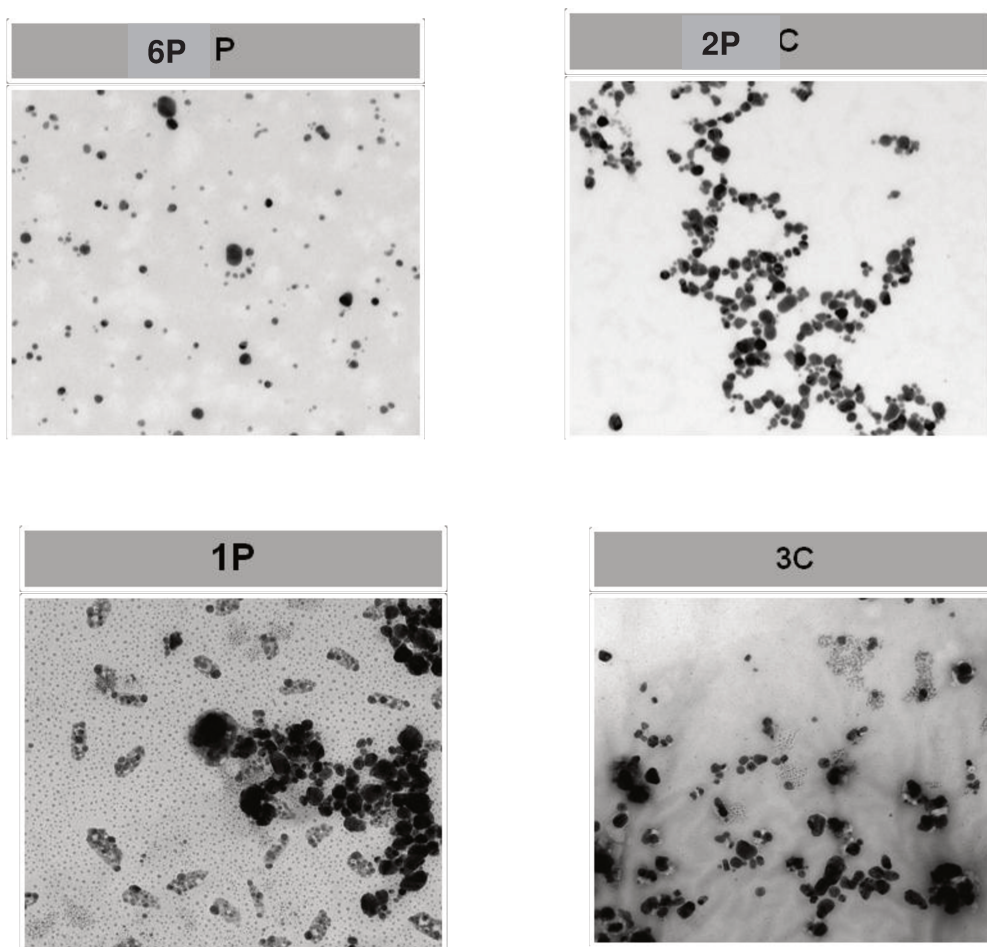


Figura 4.13 Imagens de microscopia eletrônica de transmissão para as amostras de AgNP. Escala: 200 nm.

No entanto, **1P** e **3C**, foram mais tóxicas à *P. subcapitata*, indicando que a espécie Ag^+ é quem define a toxicidade para estas amostras. Neste sentido, para a mesma espécie de alga, Griffitt *et al.* (2008), observaram também que os íons Ag^+ são mais tóxicos que nanoprata esféricas (20-30 nm) sintetizadas utilizando citrato de sódio como estabilizante, cujo CL50 para as nanoprata foi $190 \mu\text{g L}^{-1}$.

Adicionalmente, Yale (2010), observou que o aumento na concentração dos íons Ag^+ ($\text{CI50} = 26 \mu\text{g L}^{-1}$) foi o responsável pela alta inibição do crescimento da *P. subcapitata*, comparada à nanoprata comercial ($\text{CI50} = 500 \mu\text{g L}^{-1}$). Navarro *et al.* (2008) observaram esta mesma tendência, embora, tenham mostrando através de testes agudos com a alga de água doce, *C. reinhardtii*, que a toxicidade de nanopartículas de prata é mediada pela liberação de íons Ag^+ . Os autores assumiram que a toxicidade de nAg à *C. reinhardtii* é devido principalmente à reação do H_2O_2 (excretado pelas algas) com as nAg o que leva à sua oxidação e à geração de radicais hidroxila, uma das fontes de ROS.

Neste sentido, Roh *et al.* (2009) observaram um aumento na produção de estresse oxidativo e na redução na produção da alga *C. elegans* quando expostas às nanopartículas de prata de 14-20 nm para CL50 na faixa de 50-500 mg L^{-1} .

Pelo exposto, observa-se que um dos mecanismos de toxicidade de nanopartículas de prata à alga, é devido à sua oxidação (com liberação de íons Ag^+) quando em contato com o organismo teste ou com o meio de cultivo, no qual está presente o produto de excreção das mesmas. Além disto, os resultados mostraram que o excesso de íons Ag^+ é altamente tóxico à alga.

Além de observar o efeito do tamanho das nanopartículas de Ag e a influência da porcentagem de Ag^+ sobre a toxicidade das amostras de AgNP à *P. subcapitata*, o estudo da influência do meio de cultivo sobre a estabilidade (agregação ou oxidação) das nAg foi realizado. Não foi observada mudança apreciável na população ou na forma das nanopartículas, como indicado pelas bandas de ressonância de plasmon das amostras (Figura 4.14).

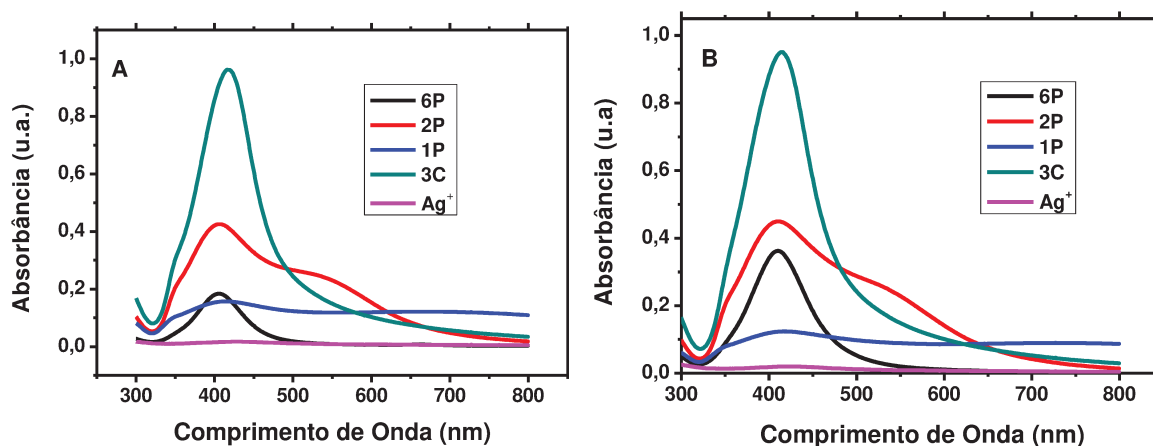


Figura 4.14 Espectros de absorção UV-Visível das amostras de AgNP em (A) água ultra pura e no (B) meio de cultivo da *P. subcapitata*.

Desta forma, possíveis efeitos sinérgicos e aditivos entre a quantidade de íons Ag^+ livres no meio e as nanopartículas de Ag podem explicar o comportamento tóxico observado nas amostras de AgNP testadas.

Como observado na Figura 4. 15 que a amostra **3C** ($\text{CI}_{50} = 16 \mu\text{g L}^{-1}$) apresenta toxicidade próxima ao Ag^+ ($\text{CI}_{50} = 19 \mu\text{g L}^{-1}$), mas cerca de cinco a sete vezes mais tóxica que a amostras **2P** ($\text{CI}_{50} = 122 \mu\text{g L}^{-1}$) e **6P** ($\text{CI}_{50} = 79 \mu\text{g L}^{-1}$). Isto indica que ocorre a ecotoxicidade depende destes dois fatores: concentração das nAg e dos íons Ag^+ , atuando de forma sinérgica e aditiva. Este efeito é mais pronunciado para a amostra **1P** ($\text{CI}_{50} = 1 \mu\text{g L}^{-1}$).

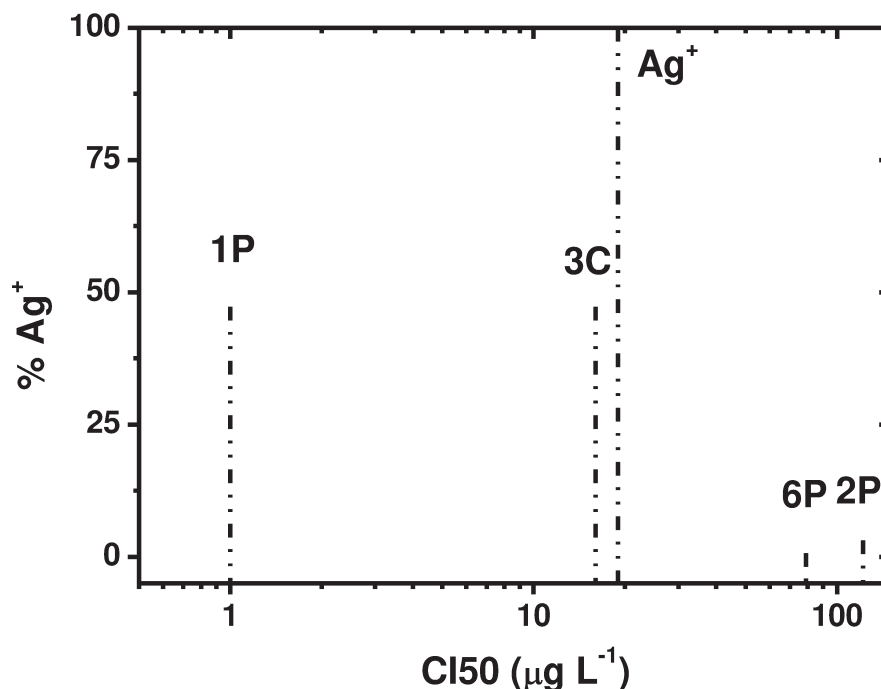


Figura 4.15 Relação entre o aumento da toxicidade para a *P. subcapitata* e a % de íons Ag^+ nas suspensões de AgNP.

4.4.2.2 - ECOTOXICIDADE À *D. similis*

Para os ensaios realizados com a *D. similis*, não foi possível calcular os valores de CE50 para as amostras testadas (**1P**, **3C**, AgNO_3 , **6P** e **2P**), mas faixas de concentrações, nas quais estas amostras apresentaram toxicidade. Isto ocorreu devido à configuração dos testes montados, nos quais foram observados efeitos tóxicos apenas faixas apresentadas (Tabela 4.5), não sendo possível a realização de demais testes em decorrência de limitações operacionais (tempo hábil). Contudo, testes complementares para a obtenção dos valores de CE50 serão realizados.

Foi observado que as amostras de AgNP seguiram a mesma tendência na toxicidade observada para a alga *P. subcapitata*, ou seja, **1P** > **3C** > Ag^+ > **6P** ≈ **2P**.

Tabela 4.5 Valores de CE50 e % Ag^+ obtidos para as amostras de AgNP e AgNO_3 testadas no ensaio com *D. similis*.

Amostras	CE 50 ($\mu\text{g L}^{-1}$)	*% Ag^+
6P	6,3-31,5	0,6
2P	10,0-50,0	3,1
*Ag^+	1,0-5,0	-
3C	1,2-2,3	47,3
1P	0,5-0,9	48,4

* Como fonte de íons Ag^+ utilizou-se AgNO_3 .

A faixa de toxicidade das amostras de AgNP para a *D. similis* variou de 0,5 a 50 $\mu\text{g L}^{-1}$. As amostras de AgNP constituídas apenas de nanopartículas esféricas (**6P** e **2P**) nas dimensões já mencionadas (Figura 4.13) foram menos tóxicas à *D. similis* do que íons Ag^+ . Esta observação também foi feita no trabalho realizado por Griffitt *et al.* (2008), no qual nanopartículas de prata de ~ 26 nm foram menos tóxicas (CE50 = 40 $\mu\text{g L}^{-1}$) à *D. pulex* do que os íons Ag^+ (CE50 = 8 $\mu\text{g L}^{-1}$). Contudo, para outra espécie de *Daphnia*, estes autores observaram que além da *C. dubia* ser mais resistente às nanopartículas de prata, estas são menos tóxicas (CE50 = 160 $\mu\text{g L}^{-1}$) que os íons Ag^+ (CE50 = 67 $\mu\text{g L}^{-1}$).

Por outro lado, observa-se que íons Ag^+ em excesso e as nAg presentes nas amostras **3C** e **1P** são responsáveis pela maior toxicidade destas em relação às amostras **6P** e **2P**.

De um modo geral, devido à tendência do íon Ag^+ se ligar ao íon S^{2-} , e à matéria orgânica presente na água, a toxicidade direta causada por estes íon ao organismo teste, pode diminuir devido à sua baixa biodisponibilidade. Sob esta perspectiva, Gao *et al.* 2009 observaram que a matéria orgânica influencia na

toxicidade de nanopartículas de prata de 20-30 nm. Em água de cultivo padrão foi obtido $\text{CE50} = 0,46 \mu\text{g L}^{-1}$, ao passo que, realizando o teste com água de cultivo com alta concentração de matéria orgânica, foi obtido um CE50 de $6,18 \mu\text{g L}^{-1}$.

A água de cultivo da *Daphnia* utilizada neste trabalho foi constituída de água mineral e uma mistura sais (Tabela 4.2). Por esta razão, os sais e a matéria orgânica presentes poderiam causar desestabilização e agregação das nanopartículas, bem como favorecer a formação de compostos insolúveis de prata (Hogstrand & Wood 1998). Os resultados sobre a interação das amostras de AgNP e AgNO_3 com a água de cultivo da *Daphnia* mostraram que as suspensões de AgNP não sofreram nenhum processo de desestabilização (Figura 4.16).

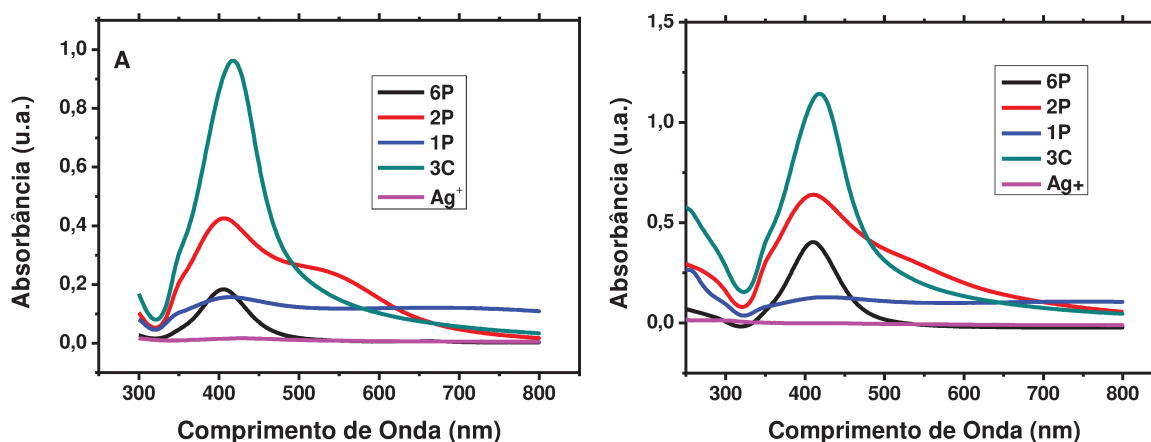


Figura 4.16 Espectros das suspensões de AgNP em (A) água ultra pura e no (B) meio de cultivo da *D. similis*.

Como observado pela espectroscopia de absorção no UV-visível, as suspensões de AgNP não mostraram diferenças significativas nas bandas de ressonância de plasmon para as amostras em água ultra pura (Figura 4.16A) e em água de cultivo de *Daphnia* (Figura 4.16B). Desta forma, apenas os íons Ag^+ em excesso nas amostras **3C** e **1P** podem ser os principais responsáveis pela

toxicidade destas amostras para a *Daphnia*. Além disto, devem ser levados em conta os efeitos sinérgicos e aditivos das nanopartículas de prata, como discutido nos testes com a *P. subcapitata*.

4.4.2.3 - ECOTOXICIDADE AO *V. fischeri*

Estudos comparativos têm indicado que materiais em nano escala são mais tóxicos ao *V. fischeri* quando comparados aos mesmos materiais *bulk*. Neste sentido, Blaise *et al.* (2008) e Velzeboer *et al.* (2008), mostraram que os óxidos metálicos TiO₂, ZnO e CuO em escala nanométrica foram mais tóxicos que o material *bulk* ao *V. fischeri*, exceto para o TiO₂ que não foi tóxico a uma concentração de 100 mg L⁻¹, seja *bulk* ou nano.

Por outro lado, Heinlann *et al.* (2008) observaram que independente do tamanho do ZnO (nano ou *bulk*), este apresentou a mesma toxicidade do sal de zinco (ZnSO₄. 7H₂O, CE50 na faixa de 1,1-1,8 mg L⁻¹). Os autores observaram entretanto, que o sal de cobre, CuSO₄ (CE50 = 1,6 mg L⁻¹) é cerca de 50 vezes mais tóxico que CuO na escala nano (CE50 = 79 mg L⁻¹) e este também é cerca de 50 vezes mais tóxico que CuO *bulk* (CE50 = 3811 mg L⁻¹).

Até o momento não há relatos na literatura sobre testes ecotoxicológicos envolvendo a temática do efeito de nanoprata sobre a bactéria luminescente *V. fischeri*. Deste modo, para entender melhor os resultados obtidos neste trabalho, foram investigados o efeito do tamanho de partícula, influência da força iônica sobre a estabilidade das suspensões de AgNP, bem como a diferença da toxicidade entre as suspensões de AgNP com diferentes graus de aglomeração.

As amostras de AgNP com diferentes graus de aglomeração (Figura 4.13.) e o AgNO₃ apresentaram toxicidade de 5,2 a 32,2 mg L⁻¹ (Tabela 4.6).

Tabela 4.6 Valores de CE50 e % Ag^+ obtidos para as amostras de AgNP e AgNO_3 testadas no ensaio com *V. fischeri*.

Amostras	CE 50 (mg L^{-1})	*% Ag^+
6P	5,2	0,6
5C	8,1	0,7
2P	18,6	3,1
4C	26,6**	11,5
* Ag^+	27,4	-
1P	32,0**	48,4
3C	32,2**	47,3

* Como fonte de íons Ag^+ utilizou-se AgNO_3 . ** Valores estimados, conforme mostrado nas curvas dose-resposta das Figuras 4.20, 4.21 e 4.22.

A forte influência da solução de NaCl 22% (m/v) utilizada no procedimento do teste causou dois efeitos nas suspensões de AgNP testadas: a desestabilização das nanopartículas, causada pela mudança da força iônica (*I*) e a formação de $\text{AgCl}_{(s)}$ devido à presença dos íons Ag^+ em excesso, presentes em algumas amostras.

Como o esperado, ao adicionar NaCl 22% nas suspensões de AgNP em concentrações iguais às utilizadas no teste ecotoxicológico, observou-se uma mudança pronunciada nos valores de condutividade (Figura 4.16) em relação às nanoprata em água ultra pura.

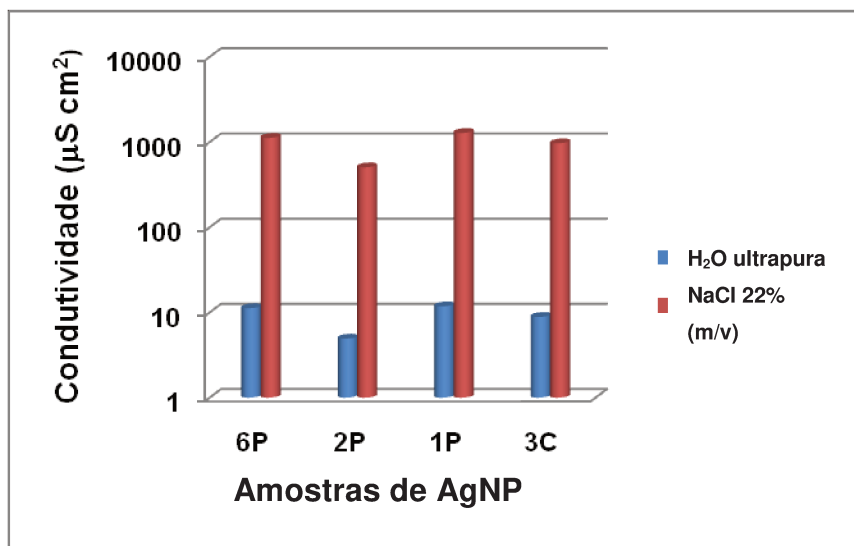


Figura 4.17 Comportamento das amostras de AgNP ao adicionar NaCl 22% (m/v).

O aumento da força iônica (condutividade) causou significativas mudanças no comportamento das suspensões de AgNP, como mostrado pelos espectros de absorção UV-visível das amostras (Figura 4.18).

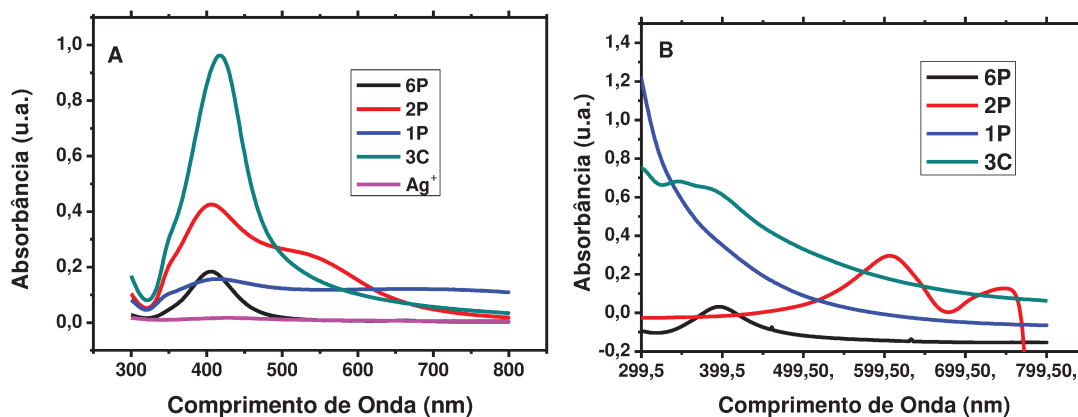


Figura 4.18 Espectros de absorção UV-visível das amostras de AgNP em (A) água ultra pura e (B) ao adicionar NaCl 22% (m/v); utilizou-se NaCl como branco.

Não foram observadas mudanças na forma e na estabilidade das nanopartículas de prata da amostra **6P**, uma vez que os espectros de absorção UV-visível desta amostra em H_2O e em solução de NaCl 22% (Figura 4.18) foram semelhantes. No entanto, as bandas de ressonância plasmon em 400 nm e em torno de 550 nm (Figura 4.18A) da amostra **2P** sofreram deslocamento para a região de maiores comprimentos de onda ao ser adicionado NaCl 22% (Figura 4.18B). Este comportamento indica uma maior tendência de aglomeração da amostra **2P**.

A mudança mais pronunciada foi para as amostras **1P** e **3C** que, além de apresentar uma alta porcentagem de íons Ag^+ em excesso, tiveram um aumento considerável da sua força iônica (Figura 4.17). A amostra **1P**, constituída de nanopartículas esféricas e formas mais alongadas de prata (Figura 4.13), na presença de NaCl 22%, ocorre a total desestabilização das nanopartículas de prata na suspensão, como indicado pela mudança no seu perfil espectral (Figura 4.18B).

Os íons Ag^+ em excesso, principalmente nas amostras **1P** e **3C** provavelmente se ligaram aos íons cloreto, Cl^- , gerando o sal insolúvel $AgCl(s)$ e por este motivo, o CE50 para estas amostras foi apenas estimado. Isto ocorreu devido ao possível espalhamento de luz causado pela formação de $AgCl(s)$ nestas suspensões, e a medida da luz emitida pelo *V. fischeri* não tenha sido realizada como em condições padrões. Como resultado, as curvas de dose-resposta para estas amostras não mostraram comportamento adequado (Figura 4.19).

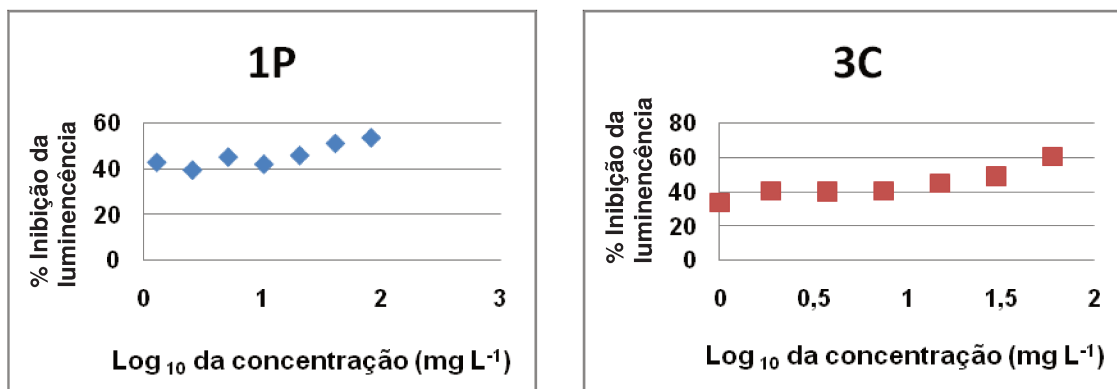


Figura 4.19 Curvas dose-resposta das amostras **1P** e **3C** obtidas nos testes com *V. fischeri*. Os resultados mostram a média de 3 replicatas.

Por outro lado, foi possível observar o comportamento tóxico das demais amostras, inclusive em termos da forma e tamanho das nanopartículas de prata.

Neste sentido, a ordem de toxicidade observada, **6P** > **5C** > **2P** > **4C** > Ag^+ indica que as suspensões contendo nanopartículas esféricas (**6P** e **5C**) são mais tóxicas que a amostra que apresentou formas alongadas, **2P** (Figura 4.13) e os íons Ag^+ .

No entanto, a amostra **4C**, constituída de nAg esféricas e 11% de Ag^+ , apresentou toxicidade intermediária, entre as amostras constituídas de nAg esféricas, com baixa % de Ag^+ e que continuaram estáveis após a adição do NaCl 22% (**6P** e **5C**) e as suspensões com alta % de Ag^+ e que sofreram desestabilização após a adição do eletrólito (**1P** e **3C**). Isto indica que no teste realizado para a suspensão **4C**, começa a ocorrer a interferência da formação do AgCl (_s) nas medidas de fluorescência do *V. fischeri*, comentado anteriormente. Esta observação pode ser explicada pelo comportamento não ideal da curva dose-resposta para esta amostra **4C** (Figura 4.20).

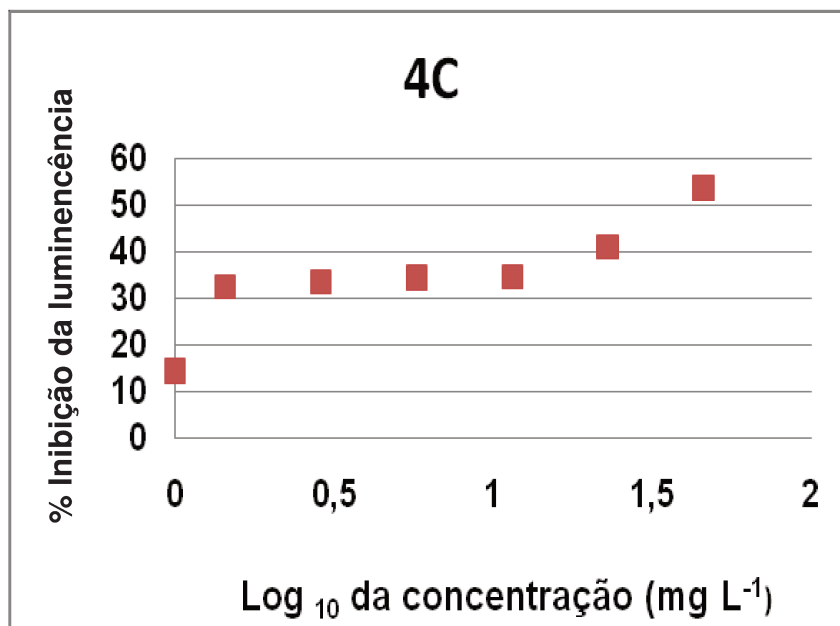
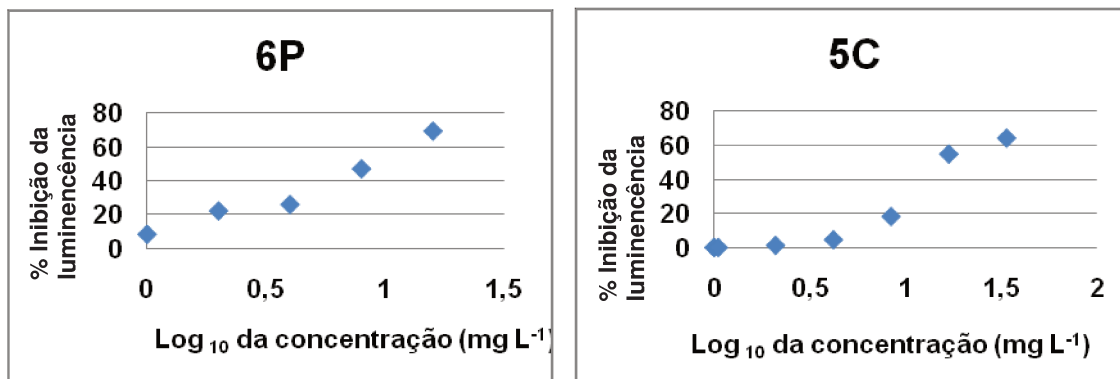


Figura 4.20 Curva dose-resposta da amostra **4C** obtida no teste com *V. fischeri*. Para cada concentração foram usados os valores médios de % efeito para $n = 3$.

As curvas dose-resposta das amostras **6P**, **5C** e **2P** (Figura 4.21) indicaram que foi possível realizar as medidas de luminiscência nas amostras que apresentaram % de Ag^+ entre 0,6 e 3,1 %, sem a interferência significativa do $\text{AgCl}_{(s)}$.



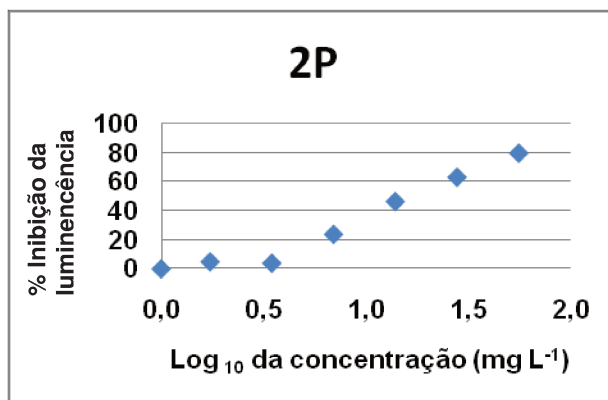


Figura 4.21 Curvas dose-resposta das amostras **6P**, **5C** e **2P** obtidas nos testes com *V. fischeri*.

Pelo exposto, observou-se que as suspensões de AgNP foram menos tóxicas ao *V. fischeri* em relação aos outros organismos aquáticos (*D. similis* e *P. subcapitata*). Isto pode ser explicado pela característica deste organismo, que pela produção da enzima catalase, inibe o estresse oxidativo causado pelos íons Ag^+ (ou oxidação de nAg) via ROS. Além disto, a formação de AgCl(s) não permitiu a alta disponibilidade de Ag^+ para o *V. fischeri*.

4.4.3 - ECOTOXICIDADE DOS ESTABILIZANTES UTILIZADOS NA SÍNTESE DAS SUSPENSÕES DE AgNP

As soluções PVA 1% e CMC 1% utilizadas nas mesmas concentrações das amostras de nAg utilizadas nos testes de toxicidade não apresentaram efeito tóxico significativo ($> 20\%$) a nenhum dos organismos teste utilizados nesta pesquisa.

4.5 - CONCLUSÕES

O panorama geral sobre da ecotoxicidade das amostras de AgNP mostrou que estas suspensões foram cerca de 100 a 1000 vezes mais tóxicas para a *P. subcapitata* e para a *D. similis* do que para o *V. fischeri*. As amostras de TiO₂ foram mais tóxicas para *D. similis* do que para o *V. fischeri*, ao considerar a fotoatividade das amostras de TiO₂ nos testes com *D. similis*.

De acordo com os dados encontrados na literatura sobre a classificação de perigo de nanomateriais (Kahru *et al.* 2010), as amostras de AgNP testadas neste trabalho, podem ser classificadas como “muito tóxicas” à *D. similis* e para a *P. subcapitata*, e como “pouco tóxicas” para o *V. fischeri*. Os testes de ecotoxicidade envolvendo a *D. similis* e as amostras de TiO₂, sob radiação UV-A, visível e no escuro, mostraram que estas amostras podem ser classificadas como “não tóxicas” e “tóxicas”.

O estudo incluindo as amostras de TiO₂ e a *D. similis* revelaram alguns aspectos importantes quando comparou-se uma das condições padrão de incubação (no escuro) com as radiações UV-A e Visível, a saber:

a) O uso da radiação UV-A permitiu explorar a fotoatividade das amostras de TiO₂ sem causar prejuízo às amostras controle.

b) A forma rutilo (amostras **Rutilo-S** e **P25***) à máxima concentração testada, 100 mg L⁻¹, não mostraram toxicidade à *D. similis* nas condições de escuro e sob radiação U-A e visível.

c) As amostras de TiO₂ na forma anatase (**Anatase-S**) e nas amostras constituídas da mistura de ambas as fases, anatase e rutilo (**P25** e **M-S**) mostraram que a toxicidade para a *D. similis* foi dependente da radiação UV-A. As amostras **P25** (CE50 = 8 mg L⁻¹) e **M-S** (CE50 = 12 mg L⁻¹) foram cerca de dez vezes mais tóxicas que a amostra **Anatase-S** (CE50 = 57 mg L⁻¹). Neste sentido, a radiação UV-A foi incorporada como novo parâmetro de controle do teste envolvendo *D. similis* e o semicondutor TiO₂.

Todas as amostras contendo TiO_2 não foram tóxicas ao *V. fisheri* na máxima concentração testada de 100 mg L^{-1} .

Na avaliação da ecotoxicidade das amostras de AgNP, **1P**, **2P**, **3C** e **6P** frente à *P. subcapitata* e à *D. similis* observou-se que a água de cultivo não causou desestabilização das nAg nas suspensões de AgNP.

As suspensões contendo apenas nanoprata esféricas foram mais tóxicas em relação às suspensões contendo a mistura de nanoprata esféricas e formas alongadas. Neste caso, não se pode afirmar que o fator determinante para o aumento da toxicidade tenha sido a forma das nAg, mas a concentração de íons Ag^+ em excesso nestas amostras. As amostras contendo maior porcentagem de íons Ag^+ , **1P** ($\text{CE50} = 16 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e **3C** ($\text{CE50} = 1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) foram cerca de 5 a 100 vezes mais tóxicas do que as amostras contendo apenas nAg esféricas, **2P** ($\text{CE50} = 122 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) e **6P** ($\text{CE50} = 79 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$) para a *P. subcapitata*. Para a *D. similis* não foi possível calcular os valores de CE50, contudo, as faixas de toxicidade variaram de 0,5 a $2,3 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para as amostras **1P** e **3C** e de $6,3$ a $50 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para **6P** e **2P**.

Os testes envolvendo as amostras de AgNP com diferentes graus de aglomeração, **1P**, **2P**, **3C**, **4C**, **5C**, e **6P** frente ao *V.fischeri*, mostraram que a toxicidade foi influenciada pelo NaCl 22% presente no teste. A ordem de toxicidade observada, **6P** > **5C** > **2P** > **4C** > Ag^+ > **1P** > **3C**, indica que as amostras contendo menor porcentagem de Ag^+ (**1P** e **3C**) são menos tóxicas em relação às demais amostras, embora os valores de CE50 obtidos tenham sido baseados na extrapolação dos efeitos. É possível que efeitos causados pela formação do precipitado $\text{AgCl}_{(\text{s})}$ tenham influenciado nas medidas de luminescência do teste. Por outro lado, o teste foi bem aplicado às amostras com porcentagem de Ag^+ menor que 3,1%, sendo possível calcular os valores de CE50 para as amostras de AgNP contendo apenas nanopartículas esféricas (**6P** e **5C**) e nAg esféricas e formas alongadas de Ag (**2P**).

Na avaliação da toxicidade das soluções dos estabilizantes CMC 1% e PVA 1%, utilizados na síntese das suspensões de AgNP, observou-se que estes não

influenciaram na toxicidade das amostras de AgNP à *P. subcapitata* e à *D. similis* e ao *V. fischeri*.

PARTE V

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

CAPÍTULO 5

5. CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Pesquisas envolvendo a descoberta e aplicações de novos NM têm tido a cada ano incentivos financeiros cada vez maiores, tanto por parte dos governos quanto do setor privado. Por outro lado, não se observa o mesmo incentivo à questão ambiental que envolve estes novos materiais, quando este deveria ser o fator crucial para a inserção de um novo produto no mercado.

A crescente produção de NM pode contribuir para o agravamento do atual cenário de grandes problemas ambientais, os quais envolvem a poluição de mananciais e sistemas estuarinos, assim como a inadequada disposição de resíduos sólidos e a poluição do ar.

Neste sentido, a comunidade científica das mais diversas áreas do conhecimento como a química, a biologia, a toxicologia e a ecotoxicologia têm demonstrado grande preocupação em diagnosticar os principais efeitos tóxicos de alguns NM ao homem e ao ambiente. Estudos ecotoxicológicos com organismos aquáticos, marinhos e terrestres contribuem na avaliação do risco envolvido no ciclo de vida dos produtos desenvolvidos com base na nanotecnologia.

Por outro lado, a grande variedade de NM e o rápido crescimento de novos produtos com as mais variadas aplicações, dificultam tanto a sua regulamentação, quanto a geração de protocolos que regulam os níveis aceitáveis no ar, no solo e nos corpos aquáticos. Além disto, a falta de protocolos para a identificação e quantificação de NM no ambiente é uma questão bastante relevante, devendo ser levada em consideração nos estudos de identificação de fontes emissoras de NM, e no monitoramento de áreas impactadas por resíduos provenientes deste tipo de material.

Os estudos envolvendo a construção de modelos para estimar a quantidade de alguns NM no ambiente mostram que a concentração predita de TiO_2 , em ambientes aquáticos varia de 0,002 a $16 \mu\text{g L}^{-1}$ (Mueller & Nowack 2008; Gottschalk *et al.* 2009). Por outro lado, as concentrações testadas neste trabalho foram superiores a esta, uma vez que se objetivou explorar inicialmente testes agudos. No atual cenário de grande produção de produtos contendo nanoprata, estima-se que uma concentração de $9 \mu\text{g L}^{-1}$ deste material seja encontrada em corpos aquáticos (Blaser *et al.* 2008). Esta estimativa é preocupante, uma vez que os dados mostrados neste trabalho indicaram que algumas amostras de AgNP, foram tóxicas a *D. similis* e à *P. subcapitata* a concentrações menores que $9 \mu\text{g L}^{-1}$.

Como consequência, a análise de risco voltada à presença de NM no ambiente é incipiente, uma vez que há poucos estudos relacionados a ecotoxicidade de NM. Uma alternativa para esta questão é a geração de alguns modelos estatísticos, os quais permitem observar, dentre outros aspectos, os compartimentos ambientais onde determinados NM se acumulam (Gottschalk *et al.* 2009). Estes modelos são relevantes no direcionamento de pesquisas tanto com foco na saúde do consumidor de produtos contendo NM, quanto na proteção ambiental.

Por este motivo, a presente tese permitiu, através de uma abordagem multidisciplinar que envolveu a síntese e caracterização dos NM atualmente mais utilizados (nAg e TiO_2), fazer um estudo sobre a sua aplicação quanto à atividade bactericida, bem como o seu efeito em organismos representantes da biota aquática.

A rota sintética adotada para a obtenção das suspensões de AgNP constituídas de nanoprata esféricas com alta estabilidade (cerca de 20 meses), e com diferentes graus de aglomeração, mostrou que a escolha dos estabilizantes CMC e PVA foi bem sucedida. Além disto, o CMC, um estabilizante raramente utilizado na estabilização de nAg, apresentou-se eficiente para esta função.

A maioria dos estudos relacionados com a avaliação da ecotoxicidade de NM utilizam padrões comerciais como fonte de nanopartículas, os quais, muitas vezes, apresentam apenas seu tamanho especificado. Desta forma, a síntese das suspensões de AgNP permitiu a realização do estudo da especiação da prata e a investigação dos efeitos ecotoxicológicos dos constituintes das amostras (estabilizantes e do AgNO_3). O mesmo estudo não seria possível com um padrão de nanoprata comercial.

A utilização de amostras sintetizadas e comerciais de TiO_2 , com diferentes formas cristalinas, permitiu traçar um paralelo entre a ecotoxicidade do TiO_2 P25 à *D. similis* (sob radiação UV-A) e às demais amostras sintetizadas. Por apresentar toxicidade cerca de sete vezes maior em relação às amostras sintetizadas de TiO_2 , o TiO_2 P25 disponível comercialmente mostrou que a sua fotoatividade, tão útil e aplicada na descontaminação ambiental, também apresenta alta toxicidade a um organismo aquático como a *D. similis*.

As etapas de caracterização das amostras de TiO_2 e de AgNP (forma, tamanho e propriedades ópticas) e especiação da prata foram muito importantes para observar com detalhes os fatores que influenciaram os resultados de ecotoxicidade obtidos.

Para a análise da atividade bactericida dos NM estudados, utilizando a bactéria *E. coli*, o sistema FIA/Condutimétrico mostrou-se uma ferramenta interessante, pois permitiu o estudo cinético dos efeitos das amostras de TiO_2 e AgNP a esse micro organismo. A incorporação da radiação UV-A nos testes com amostras de TiO_2 foi bem sucedida, embora a utilização de amostras concentradas (*i.e.* 500 e 1000 mgL^{-1}) tenham gerado dados inconclusivos. Isto indica que para a análise de suspensões concentradas este método não é uma boa opção. Por outro lado, para a análise de NM que formam soluções coloridas ou escuras, como no caso dos nanotubos de carbono, que dificultam a contagem de UFC em placas ou até por turbidimetria, o método FIA/Condutimétrico apresenta-se como uma boa alternativa na avaliação da atividade bactericida deste tipo de material.

A modificação do protocolo utilizado para avaliar a ecotoxicidade do TiO_2 à *D. similis* mostrou que a radiação UV-A pode ser incluída como novo parâmetro de controle em testes ecotoxicológicos. Isto facilita a compreensão dos mecanismos de toxicidade de compostos fotoativos sob a radiação UV-A. Tendo em vista que as nanopartículas de TiO_2 têm a tendência de se depositar no leito dos corpos aquáticos (Gottschalk *et al.* 2009), estudos futuros envolvendo este NM e organismos bentônicos trariam informações sobre a sua ecotoxicidade ao longo da cadeia trófica.

Sob esta ótica, testes de ecotoxicidade envolvendo a radiação UV-A podem ser aplicados a outros NM fotoativos, assim como ao TiO_2 dopado com metal (*e.g.* TiO_2/Ag). Este tipo de experimento mostra que pode ser viável a sua aplicação para outros organismos aquáticos e em testes de curta e longa duração.

Os dados obtidos neste trabalho, no que diz respeito à ecotoxicidade da nAg e do TiO_2 , poderão subsidiar pesquisas futuras que contemplem a ecotoxicidade de outros NM como os nanotubos de carbono, fulerenos e pontos quânticos. Adicionalmente, podem ser utilizados diferentes organismos aquáticos de níveis tróficos distintos. A partir destes estudos será possível gerar protocolos e valores guia essenciais para regular o aporte de NM no ambiente, estabelecidos por uma regulamentação adequada.

Sob este aspecto, os dados gerados nesta tese mostraram que concentrações na faixa de 1 a 122 $\mu\text{g L}^{-1}$ de nAg são tóxicas a *P. subcapitata* e que, possíveis emissões de nAg no ambiente nesta faixa podem causar sérios danos ambientais. Adicionalmente, o aporte de TiO_2 em concentrações superiores a 8 mgL^{-1} em corpos aquáticos podem agravar estes danos, uma vez que a esta concentração, observou-se toxicidade à *D. similis*.

Desta forma, tanto a *D. similis* quanto a *P. subcapitata* podem ser utilizadas como organismos teste para avaliar a toxicidade do TiO_2 e nAg, respectivamente, presentes em efluentes industriais ou águas superficiais. E os valores aqui

apresentados podem ser utilizados como valores restritivos para o aporte destes NM e desta forma, auxiliando no controle ambiental.

Como os estudos relacionados ao ciclo de vida de produtos contendo NM são escassos, cria-se na comunidade científica uma insegurança quanto à qualidade do tratamento de efluentes industriais e domésticos gerados por resíduos da indústria da nanotecnologia.

Os NM podem causar efeitos adversos em uma ETE (Estação de Tratamento de Esgoto), prejudicando principalmente o tratamento do esgoto doméstico. Tendo em vista que no Brasil 65,4% do esgoto gerado é despejado *in natura* (SNSA 2010), muitos NM podem ser lançados nos corpos aquáticos sem nenhum tratamento e, conseqüentemente, podem ser aportados nos mananciais de abastecimento público. Como consequência, a falta de protocolos para a detecção e quantificação destes NM nos laboratórios de monitoramento das agências ambientais pode acarretar sérios problemas de saúde pública. Neste sentido, estudos que contemplem esta temática também são necessários e indispensáveis no cenário atual, da elevada produção e consumo de produtos contendo NM.

PARTE VI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CAPÍTULO 6

6.1 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDI, Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. Cartilha sobre nanotecnologia, **2010**, disponível em: <http://www.abdi.com.br/Estudo/Cartilha%20nanotecnologia.pdf>, acesso em 08/08/2011.

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2004. Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Cladorera, Crustácea). ABNT NBR12713.

ABNT, Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2005, Ecotoxicologia Aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com algas (chlorophyceae). NBR 12648

Ali, H. M.; Abou-Mesalam, M. M.; El-Shorbagy, M. M. Structure and optical properties of chemically synthesized titanium oxide deposited by evaporation technique. *J. Phys. Chem. Solids*, **2010**, 71, 51-55.

Aruoja, V.; Dubourguier, H.; Kasemets, K.; Kahru, A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO₂ to microalgae *Pseudokircheriella subcapitata*. *Sci. Total Environ.*, **2009**, 407, 1461-1468.

Aslan, K.; Lakowicz, J. R; Geddes, C. D. Rapid deposition of triangular silver nanoplates on planar surfaces: application to metal-enhanced fluorescence. *Phys. Chem. B*. **2005**, 109, 6247-6251.

Auffan, M.; Decome, L.; Rose, J.; Orsiere, T.; Meo, M.; Briois, V.; Chaneac, C.; Olivi, L.; Berge-Lefranc, J.; Botta, A.; Wiesner, M.; Bottero, J. Interactions between maghemite nanoparticles and human fibroblasts: a physico-chemical and toxicological study. *Environ. Sci. Technol.*, **2006**, 40, 4367-4373.

Azevedo, F. A.; Chasin, A. A. M. *As bases toxicológicas da ecotoxicologia*, 1ª ed., Rima, São Carlos, 2003.

Badaway, A. M.; Luxton, T. P.; Silva, R. G.; Scheckel, K. G.; Suidan, M. T.; Tolaymat, T. M. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environ. Sci. Technol.*, **2010**, 44, 1260- 1266.

Baker, C.; Pradhan, A.; Pakstis, L.; Pochan, D. J.; Shah, S. I. Synthesis and

antibacterial properties of silver nanoparticles. *J. Nanosci. Technol.*, **2005**, 5, 244-249.

Bang, S. H.; Li, T.; Lee, S. K.; Kim, P.; Kim, J. S.; Min, J. Toxicity Assessment of titanium (IV) oxide nanoparticles using *Daphnia magna* (Water Flea). *Environ. Health Toxicol.*, **2011**, 26, 1-6.

Berger, M. Stabilizing antimicrobial nanosilver on a natural porous plant material. Nanowerk, **2007**, disponível em: <http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=1276.php>, acesso em 09/08/2011.

Bermudez, E.; Mangum, J. B.; Wong, B. A.; Asgharian, B.; Hext, P. M.; Warheit, D. B.; Everitt, J. I. Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol. Sci.*, **2004**, 77, 347-357.

Bickley, R. I.; Gonzales-Carreno, T.; Lees, J. L.; Palmisano, L.; Tilley, R. J. D. A structural investigation of titanium dioxide photocatalysts. *J. Solid State Chem.*, **1991**, 92, 178-190.

Bitton, G.; Dutka, B. J. *Toxicity testing using microorganisms*, v.1, CRC, Boca Raton, 1986.

Blaise, C.; Gagné, F.; Férard, J. F.; Eullaffroy, P. Ecotoxicity of selected nanomaterials to aquatic organisms. *Environ. Toxicol.*, **2008**, 23, 591-598.

Blaser, S.; Scheringer, M.; Macleod, M.; Hungerbühler, K. Exposure modeling of nano silver in the environment. *Technology*, **2008**, 390, 1-12.

Bullis, K. "Can EPA regulate nano?", **2005**, disponível em: <http://www.technologyreview.com/Nanotech/16068/page2/>, acesso em 08/08/2011.

Candal, R. J.; Bilmes, S. A.; Blesa, M. A. *Eliminación de contaminantes por fotocatalisis heterogênea*, Red CYTED VIII-G, Argentina, **2001**.

Carp, O.; Huisman, C. L.; Reller, A. Photoinduced reactivity of titanium dioxide. *Prog. Solid State Chem.*, **2004**, 32, 33-177.

CETESB, Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental,. L5.018. Água – teste de toxicidade aguda com *Daphnia similis* Claus, 1876 (Cladocera, Crustacea). São Paulo. 9 pp, 1994.

Chatterjee, R. The continuing uncertainty of nano risks and regulations. *Environ. Sci. Technol.*, **2008**, 42, 7733.

Chen, X.; Mao, S. S. Titanium dioxide nanomaterials: synthesis, properties, modifications, and applications. *Chem. Rev.*, **2007**, 107, 2891-2959.

- Chen, X.; Schluesener, H. J. Nanosilver: a nanoparticle in medical application. *Toxicol. Lett.*, **2008**, 176, 1-12.
- Cho, M.; Chung, H.; Choi, W.; Yoon, J. Linear correlation between inactivation of *E. coli* and OH radical concentration in TiO₂ photocatalytic disinfection. *Water Res.*, **2004**, 38, 1069-1077.
- Choi, O.; Deng, K.; Kim, N.; Ross, L.; Surampalli, R.; Hu, Z. The inhibitory effects of silver nanoparticles, silver ions, and silver chloride colloids on microbial growth. *Water Res.*, **2008**, 42, 3066–3074.
- Chopra, I. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern? *J. Antimicrob. Chemother.*, **2007**, 59, 587-590.
- Colvin, V. L. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. *Nature Biotechnol.*, **2003**, 1166-1170.
- Connor, P. A.; Dobson, K. D.; McQuillan, A. J. Infrared spectroscopy of the TiO₂/aqueous solution interface. *Langmuir*, **1999**, 15, 2402-2408.
- Costa, A. C. F. M.; Vilar, M. A.; Lira, H. L. Kiminami R. H. G. A. Síntese e caracterização de nanopartículas de TiO₂. *Cerâmica*, **2006**, 52, 255-259.
- Crişan, M.; Braileanu, A.; Crişan, D.; Teodorescu, V. U.; Bîrjega, R.; Marinescu, V. E.; Madarász, J.; Pokol, G. TiO₂-based nanopodders obtained from different Ti-alkoxides. *J. Thermal. Anal. Calorim.*, **2007**, 88, 171-176.
- CST, Council for Science and Technology-UK. Nanosciences and Nanotechnologies: A Review of Government's Progress on its Policy Commitments. **2007**, disponível em: http://www2.cst.gov.uk/cst/news/Files/nano_review.pdf, acesso em 08/08/2011.
- Dorward, E. J.; Barisas, B. J. Acute toxicity screening of water pollutants using a bacterial electrode. *Environ. Sci. Technol.*, **1984**, 18, 967-972.
- Dreher, K. L. Health and environmental impact of nanotechnology: toxicological assessment of manufactured nanoparticles. *Toxicol. Sci.*, **2004**, 77, 3-5.
- Durán, N.; Marcato, P. D.; De Conti, R.; Alves, O. L.; Costa, F. T. M.; Brocchi, M. Potential use of silver nanoparticles on pathogenic bacteria, their toxicity and possible mechanisms of action. *J. Braz. Chem. Soc.*, **2010**, 21, 949-959.
- Durán, N.; Marcato, P. D.; Teixeira, Z. Nanotecnologia e nanobiotecnologia: conceitos básicos. Disponível em: http://www.cienciaviva.org.br/arquivo/cdebate/012nano/Nanotecnologia_e_Nanobiotecnologia.pdf, acesso em 08/08/2011.

Elliott, D. W.; Zhang, W. Field assessment of nanoscale bimetallic particles for groundwater treatment. *Environ. Sci. Technol.* **2001**, 35, 4922-4926.

EC, Environmental Canada, 2007. Biological test method: Growth inhibition test using a freshwater alga. Environmental Protection Series. Report EPS 1/RM/25. Ottawa, Ontario, Canadá.

EPA, Environmental Protection Agency. Draft Nanomaterial Research Strategy (NRS), 2008, disponível em http://es.epa.gov/ncer/nano/publications/nano_strategy_012408.pdf, acesso em 09/08/2011.

EPA, Environmental Protection Agency. TSCA: Inventory Status of Nanoscale Substances - General Approach. Disponível em <http://www.epa.gov/oppt/nano/nmsp-inventorypaper.pdf>, acesso em 09/08/2011.

Fabrega, J.; Luoma, S. N.; Tyler, C. R.; Galloway, T. S.; Lead, J. R. Silver nanoparticles: behaviour and effects in the aquatic environment. *Environ Int.*, **2011**, 37, 517-531.

Farah, C. R. T. Teste de toxicidade aguda: monitoração da respiração da bactéria *klebsiellaoxytoca* usando um sistema FIA/Condutoométrico. *Dissertação de Mestrado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2001.

Farré, M.; Gajda-Schranz, K.; Kantiani, L.; Barceló, D.; Ecotoxicity and analysis of nanomaterials in the aquatic environment. *Anal. Bioanal. Chem.*, **2009**, 6, 393, 81–95.

Federici, G.; Shaw, B. J.; Handy, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.*, **2007**, 84, 415-430.

Fortner, J. D.; Lyon, D. Y.; Sayes, C. M.; Boyd, A. M.; Falkner, J. C.; Hotze, E. M.; Alemany, L. B.; Tao, Y. J.; Guo, W.; Ausman, K. D.; Colvin, V. L.; Hughes, J. B. C₆₀ in water nanocrystal formation and microbial response. *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39, 4307-4316.

Gao, J.; Youn, S.; Hovsepyan, A.; Llana, V. L.; Wang, Y.; Bitton, G.; Bonzongo, J. J. Dispersion and toxicity of selected manufactured nanomaterials in natural river water samples: effects of water chemical composition. *Environ. Sci. Technol.*, 2009, 43, 3322–3328.

Gimenez, S. M. N. Ensaios de toxicidade aguda usando *E. coli* como organismo-teste. *Tese de doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **1994**.

Gottschalk, F.; Sonderer, T.; Scholz, R. W.; Nowack, B. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for

different regions. *Environ. Sci. Technol.*, **2009**, 43, 9216–9222.

Grassian, V. H.; Adamcakova-Dodd, A.; Pettibone, J. M.; O'shaughnessy, P. T.; Thorne, P. S. Inflammatory response of mice to manufactured titanium dioxide nanoparticles: Comparison of size effects through different exposure routes. *Nanotoxicology*. **2007**, 1, 211-226.

Griffiths, D. M.; Rochester, C. H. Infrared study of the adsorption of water on to the surface of rutile. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **1977**, 173, 1510.

Griffitt, R. J.; Luo, J.; Gao, J.; Bonzongo, J.; Barber, D. S. Effects of particle composition and species on toxicity of metallic nanomaterials in aquatic organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, **2008**, 27, 1972-1978.

Guimarães, J.R. Determinação e especiação de carbono inorgânico em águas naturais e atmosfera por análise em fluxo. *Tese de doutorado*, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 1995.

Hajkova, P.; Spatenka, P.; Horsky, J.; Horska, I.; Kolouch, A. Photocatalytic effect of TiO₂ films on viruses and bacteria. *Plasma Process. Polym.*, **2007**, 4, S397-S401.

Handy, R. D.; Kammer, F.; Lead, J. R.; Hasselov, M.; Owen, R.; Crane, M. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. *Ecotoxicology*, **2008a**, 17, 287-314.

Handy, R. D.; Owen, R.; Valsami-Jones, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, **2008b**, 17, 315–325.

Harmel, V. C. Padronização de um teste de toxicidade crônica com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri* para análise de qualidade de águas superficiais. *Dissertação de mestrado*, Universidade Regional de Blumenau, Brasil, 2004.

Hassellöv, M.; Readman, J.; Ranville, J.; Tiede, K. Nanoparticle analysis and characterization methodology in environmental risk assessment of engineered nanoparticles. *Ecotoxicology*, **2008**, 17, 344-361.

Heinlaan, M.; Ivask, A.; Blinova, I.; Dubourguier, H.; Kahru, A. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, **2008**, 71, 1308-1316.

Hoet, P. M.; Bröske-Hohlfeld, I.; Salata, O. V. Nanoparticles – known and unknown health risks. *J. Nanobiotechnology*, **2004**, 2, 1-15.

Hogstrand C.; Wood, C. M. Toward a better understanding of the bioavailability, physiology and toxicity of silver in fish: implications for water quality criteria. *Environ.*

Toxicol. Chem., **1998**, 17, 547–561.

Hund-Rinke, K.; Simon, M. Ecotoxic effect of photocatalyticactive nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids (8 pp). *Environ. Sci. Pollut. Res.*, **2006**, 13, 225-232.

Hussain, S. M.; Hess, K. L.; Gearhart, J. M.; Geiss, K.T.; Schlager J. J. *In vitro* toxicity of nanoparticles in BRL 3A rat liver cells. *Toxicol. in vitro*, **2005**, 19, 975.

Hyung, H.; Fortner, J.; Hughes, J. B.; Hongkim, J. Natural organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase. *Environ. Sci. Technol.*, **2007**, 41, 179-184.

Iler, R. K. *The chemistry of silica*, Wiley international, New York, 1979.

Imagem do microorganismo *Vibrio fischeri*.
http://microbewiki.kenyon.edu/images/c/c9/Vibrio_fischeri_1145457864.jpg. Acesso em 08/08/2011.

Imagem do microorganismo *E. Coli*.
<http://www.glogster.com/media/3/14/24/60/14246098.jpg>. Acesso em 08/08/2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=((Nanomaterials Ecotoxicity*) OR (Nanoparticles Ecotoxicity *)) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=1990-1995, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=((Nanomaterials Ecotoxicity*) OR (Nanoparticles Ecotoxicity *)) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=1995-2000, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=((Nanomaterials Ecotoxicity*) OR (Nanoparticles Ecotoxicity *)) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=2001-2005, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=((Nanomaterials Ecotoxicity*) OR (Nanoparticles Ecotoxicity *)) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=2006-2008, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=((Nanomaterials Ecotoxicity*) OR (Nanoparticles Ecotoxicity *)) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=2009-2011, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=((Nanomaterials Toxicity*) OR (Nanoparticles Toxicity*)) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=1990-1995, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=((Nanomaterials Toxicity*) OR (Nanoparticles Toxicity*)) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=1995-2000, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=((Nanomaterials Toxicity*) OR (Nanoparticles Toxicity*)) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=2001-2005, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=((Nanomaterials Toxicity*) OR (Nanoparticles Toxicity*)) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=2006-2008, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=((Nanomaterials Toxicity*) OR (Nanoparticles Toxicity*)) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=2009-2011, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=(Nanomaterials OR Nanoparticles) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=1990-1995, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=(Nanomaterials OR Nanoparticles) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=1995-2000, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=(Nanomaterials OR Nanoparticles) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=2001-2005, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=(Nanomaterials OR Nanoparticles) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=2006-2008, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISI Web of Knowledge (SCI-EXPANDED) – TS=(Nanomaterials OR Nanoparticles) Doc Type=All document types; Language=All languages; Timespan=2009-2011, Web of Science results analysis, agosto de 2011.

ISO 11348-3:2007 Water quality -- Determination of the inhibitory effect of water samples on the light emission of *Vibrio fischeri* (luminescent bacteria test) - Part 3: Method using freeze-dried bacteria

ISO, International Organization for Standardization water quality: determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* straus (Cladocera, Crustacea). ISO 6341, **1996**, Geneva, Switzerland.

ISO, International Organization for Standardization. ISO/TC 229 Business Plan. **2011**, disponível em http://isotc.iso.org/livelink/livelink/fetch/2000/2122/687806/ISO_TC_229__Nanotechnologies_.pdf?nodeid=6507632&vernum=-2, acesso em 09/08/2011.

Ivanova, T.; Harizanova, A. Characterization of TiO₂ and TiO₂-MnO oxides prepared

by sol-gel method. *Solid. State Ionics*, **2001**, 138, 228-230.

Jardim, W. F.; Gimenez, S. M. N.; Canela, M. C.; Moraes, S. G. Acute toxicity of HgO and Hg²⁺ ions to *Escherichia coli*. *Chem. Spec. Bioavailab.*, **1993**, 5, 97-101.

Jardim, W. F.; Guimarães, J. R. Estudo comparativo da toxidez aguda de combustíveis automotivos utilizando *Escherichia coli*. *Quim. Nova*, **1993**, 16, 28-31.

Jardim, W. F.; Moraes, S. G.; Takiyama, M. M. K. Photocatalytic degradation of aromatic chlorinated compounds using TiO₂: toxicity of intermediates. *Water Res.*, **1997**, 31, 1728-1732.

Jardim, W. F.; Pasquini, C.; Guimarães, J. R.; Faria, L. C. Short-term toxicity test using *Escherichia Coli*: monitoring CO₂ production by Flow Injection Analysis. *Water Res.*, **1990**, 24, 351-354.

Jiang, G.; Shen, Z.; Niu, J.; Bao, Y.; Chen, J.; He, T. Toxicological assessment of TiO₂ nanoparticles by recombinant *Escherichia coli* bacteria. *J. Environ. Monit.*, **2011**, 13, 42-48.

Ju-Nam, Y.; Lead, J. R. Manufactured nanoparticles: an overview of their chemistry, interactions and potential environmental implications. *Sci. Total Environ.*, **2008**, 400, 396-414.

Jung S.; Kim J. H. Sintering characteristics of TiO₂ nanoparticles by microwave processing. *Korean J. Chem. Eng.*, **2010**, 27, 645-650.

Kahru, A.; Dubourguier. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, **2010**, 269, 105-119.

Kamat, P. V.; Huehn, R.; Nicolaescu, R. A. A "Sense and shoot" approach for photocatalytic degradation of organic contaminants in water. *J. Phys. Chem. B.*, **2002**, 106, 788-794.

Kim, K. T.; Klaine, S. J.; Cho, J.; Kim, S.; Kim, S. D. Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction. *Sci. Total Environ.*, **2010**, 408, 2268-2272.

Kormann, C.; Bahnemann, D. W.; Hoffmann, M. R. Photocatalytic production of H₂O₂ and organic peroxides in aqueous suspensions of TiO₂, ZnO, and desert sand. *Environ. Sci. Technol.*, **1988**, 22, 798-806.

Kumar, K. N. P. Growth of rutile crystallites during the initial-stage of anatase-to-rutile transformation in pure titania and in titania-alumina nanocomposites. *Scr. Metall. Mater.*, **1995**, 32, 873-877.

Laban, G.; Nies, L. F.; Turco, R. F.; Bickham, J. W.; Sepúlveda, M. S. The effects of

silver nanoparticles on fathead minnow (*Pimephales promelas*) embryos. *Ecotoxicology*, **2010**, 19, 185-195.

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 Toxicology intratracheal instillation. *Toxicol Sci.* **2004**, 77, 126–134.

Lee, M.; Meisel, D. Adsorption and surface-enhanced raman of dyes on silver and gold sols. *J. Phys. Chem.*, **1982**, 86, 3391-3395.

Li, W.; Ni, C.; Lin, H.; Huang, C. P.; Shah, S. I. Size dependence of thermal stability of TiO₂ nanoparticles. *J. Appl. Phys.* **2004**, 96, 6663-668.

Liu, J.; Hurt, R. H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids. *Environ. Sci. Technol.*, **2010**, 44, 2169-2175.

Lovern, S. B.; Klaper, R. *Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C₆₀) nanoparticles. *Environ. Toxicol. Chem.*, **2006**, 25, 1132-1137.

Lovern, S. B.; Strickler, J. R.; Klaper, R. Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C₆₀, and C₆₀HxC₇₀Hx). *Environ. Sci. Technol.*, **2007**, 41, 4465-4470.

Luoma, S. N. Silver Nanotechnologies and Problems or New Challenges? PEN 15. **2008**.

Lyon, D. Y.; Adams, L. K.; Falkner, J. C.; Alvarez, P. J. J. Antibacterial activity of fullerene water suspensions: effects of preparation method and particle size. *Environ. Sci. Technol.*, **2006**, 40, 4360-4366.

Macedo, J. A. B. *Introdução a Química Ambiental*, 1ª ed., Juiz de Fora, CRQ-MG, 2002.

Magrez, A.; Kasas, S.; Salicio, V.; Pasquier, N.; Seo, J. W.; Celio, M.; Catsicas, S.; Schwaller, B.; Forró, L. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. *Nano Lett.*, **2006**, 6, 1121-1125.

Marambio-Jones, C.; Hoek, E. M. V. A review of the antibacterial effects of silver nanomaterials and potential implications for human health and the environment. *J. Nanoparticle Res.*, **2010**, 12, 1531–1551.

Martínez-Castañón, G. A.; Nino-Martínez, N.; Martínez-Gutierrez, F.; Martinez-Mendoza, J. R.; Ruiz, F. Synthesis and antibacterial activity of silver nanoparticles with different sizes. *J. Nanopat. Res.*, **2008**, 10, 1343-1348.

Marugán, J.; Grieken, R.; Pablos, C.; Sordo, C. Analogies and differences between

photocatalytic oxidation of chemicals and photocatalytic inactivation of microorganisms. *Water Res.*, **2010**, 44, 789-796.

Miao A.; Luo. Z.; Chen, C. Santschi, P. H.; Quigg, A. Intracellular uptake: a possible mechanism for silver engineered nanoparticle toxicity to a freshwater alga *Ochromonas danica*. *Plos One*, **2010**, 5, 15196-15203.

Miao, A.; Schwehr, K. A.; Xu, C.; Zhang, S.; Luo, Z.; Quigg, A.; Santschi, P. H. The algal toxicity of silver engineered nanoparticles and detoxification by exopolymeric substances. *Environ. Pollut.*, **2009**, 157, 3034-3041.

Monge, M. Nanopartículas de plata: métodos de síntesis em disolución y propiedades bactericidas. *An. Quím.*, **2009**, 105, 33-41.

Morgan, I. J.; Henry, R. P.; Wood, C. M. The mechanism of acute silver nitrate toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is inhibition of Gill Na⁺ and Cl⁻ transport. *Aquat. Toxicol.*, **1997**, 38, 145-163.

Moore, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment?. *Environ. Int.*, **2006**, 32, 967-976.

Morones, J. R.; Elechiguerra, J. L.; Camacho, A.; Holt, K.; Kouri, J. B.; Ramirez, J. T.; Yacaman, M. J. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology*, **2005**, 16, 2346-2353.

Mozeto, A. A.; Umbuzeiro, G. A.; Jardim, W. F. *Métodos de Coleta, Análises Físico-Químicas, e Ensaios Biológicos e Ecotoxicológicos de Sedimentos de Água Doce*, 1ª ed., Cubo Multimidia, São Carlos, **2006**.

Mueller, N. C.; Nowack, B. Exposure modeling of engineered nanoparticles in the environment. *Environ. Sci. Technol.*, **2008**, 42, 4447-4453.

Murray, P. R.; Baron, E. J.; Pfaller, M. A.; Tenover, F. C.; Tenover, R. H. *Manual of Clinical Microbiology*, 6ª ed., American Society of Microbiology: Washington, 1995.

Navarro, E.; Piccapietra, F.; Wagner, B.; Marconi, F.; Kaegi, R. Toxicity of silver nanoparticles to *Chlamydomonas reinhardtii*. *Environ. Sci. Technol.*, **2008**, 42, 8959-8964.

Nemmar, A.; Inuwa, I. M. Diesel exhaust particles in blood trigger systemic and pulmonary morphological alterations. *Toxicol. Lett.*, **2008**, 176, 20-30.

Noguez, C. Surface plasmons on metal nanoparticles: the Influence of shape and physical environment. *J. Phys. Chem. C.*, **2007**, 111, 3806-3819.

Nohynek, G. J.; Lademann, J.; Ribaud, C.; Roberts, M. S. Grey Goo on the Skin? Nanotechnology, cosmetic and sunscreen safety. *Crit. Rev. Toxicol.*, **2007**, 37, 251-

277.

Nordberg, G. F.; Nordberg, B. A. F. M.; Friberg, L. *Handbook on the toxicology of metals*, 3ª ed., Elsevier, San Diego, **2007**.

Nowack, B.; Bucheli, T. D. Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment. *Environ. Pollut.*, **2007**, 150, 5-22.

Nowotny, J. Titanium dioxide-based semiconductors for solar-driven environmentally friendly applications: impact of point defects on performance. *Energy Environ. Sci.*, **2008**, 1, 565-572.

Oberdörster, E. Manufactured nanomaterials (fullerenes, C₆₀) induce oxidative stress in the brain of juvenile largemouth bass. *Environ. Health Perspect.*, **2004a**, 112, 1058-1062.

Oberdörster, G.; Oberdörster, E.; Oberdörster, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.*, **2005**, 113, 823-839.

Oberdörster, E.; Zhu, S.; Blickley, T. M.; McClellan-Green, P.; Haasch, M. L. Ecotoxicology of carbon-based engineered nanoparticles: effects of fullerene (C₆₀) on aquatic organisms. *Carbon*, **2006**, 44, 1112-1120.

Oberdörster, G.; Sharp, Z.; Atudorei, V.; Elder, A.; Gelein, R.; Kreyling, W.; Cox, C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicol.*, **2004b**, 16, 437-445.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. <http://browse.oecdbookshop.org/oecd/pdfs/free/9720201e.pdf>, 2004. Daphnia 5P. Acute immobilization test. OECD Guideline for testing of chemicals, N° 202 Adopted 13/04/2004. Acesso em 29/05/2011.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. OECD TG 211- *Daphnia magna* reproduction test. 1998.

Ohno, T.; Sarukawa, K.; Tokieda, K.; Matsumura, M. Morphology of a TiO₂ photocatalyst (Degussa, P-25) consisting of anatase and rutile crystalline phases. *J. Catal.*, **2001**, 203, 82-86.

Oliveira, A.C. Toxicidade de elementos-traço para consumidores primários na presença de exopolissacarídeos produzidos por organismos fitoplanctônicos (*chlorophyceae* e *cianophyceae*). Universidade de São Paulo, Brasil, **2007**.

Oliveira, M. M. Nanopartículas de prata e seus nanocompósitos com polianilina: síntese, caracterização e propriedades, Tese de Doutorado, Universidade Federal do

Paraná, Brasil, **2005**.

Pal, S.; Tak, Y. K.; Song, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **2007**, 73, 1712-1720.

Panacek, A.; Kvitek, L.; Pucek, R.; Kolar, M.; Vecerova, R.; Pizurova, N.; Sharma, V. K.; Nevecna, T.; Zboril, R. Silver colloid nanoparticles: synthesis, characterization, and their antibacterial activity. *J. Phys. Chem.B.*, **2006**, 110, 16248-1653.

Panyala, N. R.; Peña-Méndez, E.; Havel, J. Silver or silver nanoparticle: a hazardous threat to the environment and human health?. *J. Appl. Biomed.*, **2008**, 117-129.

Paschoalino, M. P. Utilização da fotocatalise na desinfecção de atmosferas confinadas. *Dissertação de mestrado*. Universidade Estadual de Campinas, Brasil, **2006**.

Paschoalino, M. P.; Marcone, G. P. S.; Jardim, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. *Quim. Nova*, **2010**, 33, 421-430.

Pelczar Jr. M.; Chan, E. C. S.; Krieg, N. R. *Microbiologia conceitos e aplicações*, 2ª ed., Pearson Makron Books, São Paulo, 1997.

PEN, The Project Emerging Nanotechnologies, **2010**, disponível em: http://www.nanotechproject.org/inventories/consumer/analysis_draft/, acesso em 17/07/2011.

Peralta-Videa, J. R.; Zhao, L.; Lopez-Moreno, M. L.; Rosa, G.; Hong, J.; Gardea-Torresdey, J. L. Nanomaterials and the environment: a review for the biennium 2008–2010. *J. Hazard. Mater.*, **2011**, 186, 1–15.

Reeves, J. F.; Davies, S. J.; Dodd, N. J. F.; Jha, A. N.; Hydroxyl radicals ($\cdot\text{OH}$) are associated with titanium dioxide (TiO_2) nanoparticle-induced cytotoxicity and oxidative DNA damage in fish cells. *Mutat. Res.*, **2008**, 640, 113-122.

Rincón, A. G.; Pulgarín, C. Photocatalytical inactivation of *E. coli*: effect of (continuous-intermittent) light intensity and of (suspended-fixed) TiO_2 concentration. *Appl. Catal. B.*, **2003**, 44, 263-284.

Rocha, J. C.; Rosa, A. H.; Cardoso, A. A. *Introdução à Química Ambiental*, 1ª ed., Bookman, Porto Alegre, **2004**.

Rodrigues, E. S. Gestão ambiental de terminais de armazenagem de produtos químicos líquidos a granel no Porto de Santos. *Tese de doutorado*. Universidade de São Paulo, Brasil, **2010**.

Roh, J. Y.; Sang, J. S.; Yi, J. Park, K.; Chung, K. H.; Ryu, D. Choi, J. Ecotoxicity of

silver nanoparticles on the soil nematode *Caenorhabditis elegans* using functional ecotoxicogenomics. *Environ. Sci. Technol.*, 2009, 43, 3933–3940.

Santana, H.; Zaia, D. A. M.; Corio, P.; Louarn, F. El H. Preparação e caracterização de substratos sers ativos: um estudo da adsorção do cristal de violeta sobre nanopartículas de prata. *Quim. Nova*, **2006**, 29, 194-199.

Sasaki, T.; Watanabe, M. Semiconductor nanosheet crystallites of quasi-TiO₂ and their optical properties. *J. Phys. Chem. B.*, **1997**, 101, 10159-10161.

Sayes, C. M.; Warheit, D. B. An *in vitro* investigation of the differential cytotoxic responses of human and rat lung epithelial cell lines using TiO₂ nanoparticles. *Int. J. Nanotechnol.* **2008**, 5, 15-29.

Senjen, Rye. “Nanosilver- a theart to soil, water and human health?”, 2007, Disponível em: <http://nano.foe.org.au/node/190>, acesso em 08/08/2011.

Shin, J.; Abraham, S. M. Caveolae--not just craters in the cellular landscape. *Science*, **2001**, 293, 1447-1448.

Shrivastava, S.; Bera, T.; Roy, A.; Singh, G.; Ramachandrarao, P.; Dash, D. Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles. *Nanotechnology*, **2007**, 18, 225103.

Silva, N.; Neto, R. C.; Junqueira, V. C. A.; Silveira, N. F. A. *Manual de métodos de análise microbiológica da água*, Varela, São Paulo, 2005.

Silveira, R. M.. Bioensaios de toxicidade e organismos bioindicadores como instrumento para a caracterização ambiental do rio Itajaí-Mirim, SC. *Dissertação de mestrado*. Universidade do Vale do Itajaí, Brasil, **2007**.

Skoog, D. A., West, D.M., Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Fundamentos da Química Analítica*, 8º ed., Thomson, São Paulo, 2006.

Smith, C. J.; Shaw, B. J.; Handy, R. D. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. *Aquat. Toxicol.*, **2007**, 82, 94-109.

SNSA, Sistema Nacional de Saneamento: Diagnóstico dos serviços de água e esgoto-2008. Ministério das Cidades, Brasília, 2010.

Solomon, S. D.; Bahadory, M.; Jeyarajasingam, A. V.; Rutkowsky, S. A.; Boritz, C. Synthesis and study of silver nanoparticles. *J. Chem. Educ.*, **2007**, 84, 322-325.

Sondi, I.; Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bactéria. *J. Colloids Interface Sci.*, **2004**, 275, 177-182.

Song, W.; Li, G.; Grassian, V. H.; Larsen, S. C. Development of improved materials for environmental applications: nanocrystalline NaY zeolites. *Environ. Sci. Technol.*, **2005**, 39, 1214-1220.

Strigul, N.; Vaccari, L.; Galdun, C.; Wazne, M.; Liu, X.; Christodoulatos, C.; Jasinkiewicz, K. Acute toxicity of boron, titanium dioxide, and aluminum nanoparticles to *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. *Desalination*, **2009**, 248, 771-782.

Su, W.; Wei, S. S.; Hu, S. Q.; Tang, J. X. Preparation of TiO₂/Ag colloids with ultraviolet resistance and antibacterial property using short chain polyethylene glycol. *J. Hazard. Mater.*, **2009**, 172, 716-720.

Tang, H.; Wang, D.; Ge, X. Environmental nano-pollutants (ENP) and micro-interfacial processes. *Water Sci. Technol.*, **2004**, 50, 103-109.

Tavares, L. H.; Rocha, O. *Produção de plâncton (Fitoplâncton e Zooplâncton) para alimentação de organismos aquáticos*, Rima, São Carlos, 2003.

Teixeira, C. P. A. B.; Jardim, W. F.; *Cadernos temáticos. Processos oxidativos avançados-conceitos teóricos*, **2004**.

Thompson, T.; Yates Jr., J. T. Surface science studies of the photoactivation of TiO₂-new photochemical process. *Chem. Rev.*, **2006**, 106, 4428-4453.

Throbäck, I. N.; Johansson, M.; Rosenquist, M.; Pell, M.; Hansson, M.; Hallin, S. Silver (Ag⁺) reduces denitrification and induces enrichment of novel nirK genotypes in soil. *FEMS Microbiol. Lett.*, **2007**, 270, 2, 189-194.

Toma, H. E. *Interfaces e organização da pesquisa no Brasil da química à nanotecnologia*. *Quim. Nova*, **2005**, 28, S48-S51.

Toma, H. E. *O mundo nanométrico: A dimensão do novo século*, Oficina de Textos, São Paulo, **2004**.

Tong, Z.; Bischoff, M.; Nies, L.; Applegate, B.; Turco, R. F. Impact of fullerene (C60) on a soil microbial community. *Environ. Sci. Technol.*, **2007**, 41, 2985-2991.

Tsuji, J. S.; Maynard, A. D.; Howard, P. C. ; James, J. T.; Lam, C.; Warheit, D. B.; Santamaria, A. B. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk Assessment of nanoparticles. *Toxicol. Sci.*, **2006**, 89, 42-50.

Tunc, I.; Bruns, M.; Gliemann, H.; Grunze, M.; Koelsch, P. Bandgap determination and charge separation in Ag@TiO₂ core shell nanoparticle films. *Surf. Interface Anal.*, **2010**, 42, 835-841.

Velzeboer, I.; Hendriks, A. J.; Ragas, A. M. J.; Meent,D.V. Nanomaterials in the environment aquatic ecotoxicity tests of some nanomaterials. *Environ. Sci. Chem.*, **2008**, 27, 1942-1947.

Vidotti, E. C.; Rollemberg, M. C. E. Algas: da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica. *Quim. Nova*, **2004**, 27,139-145.

Von Sperling, M.. Introdução à qualidade das águas e o tratamento de esgotos, 2ª ed, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental; Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, **1996**.

Wang, Y.Q.; Sun, D.Z. Synthesis, characterization, and photocatalytic activity of TiO₂-xNx nanocatalyst. *J. Hazard. Mater.*, **2007**, 144, 328–333.

Wani, M. Y.; Hashim, M. A.; Nabi, F. Nanotoxicity: dimensional and morphological concerns. *Adv. Phys. Chem.*, **2011**, 2011, 1-15.

Warheit, D. B.; Hoke, R. A.; Finlay, C.; Donner, E. M.; Reed, K. L.; Sayes, C. M.; Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management, *Toxicol. Lett.*, **2007**, 171, 99-110.

Wiench, K.; Wohlleben, W.; Hisgen, V.; Radke, K.; Salinas, E.; Zok, S.; Landsiedel, R. Acute and chronic effects of nano- and non-nano-scale TiO₂ and ZnO particles on mobility and reproduction of the freshwater invertebrate *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **2009**, 76, 1356-1365.

Wiesner, M. R.; Bottero, J. *Environmental Nanotechnology. Applications and Impacts of Nanomaterials*, Mc Graw Hill: New York, 2007.

Wijnhoven, S. W. P.; Herberts, C.; Hagens, W. I.; Oomen, A. G.; Heugens, E.; Roszek, B.; Bisschops, J.; Peijnenburg, W.; Gosens, I.; van de Meent, D.; Dekkers, S.; de Heer, C.; Sips, A. J. A. M.; de Jong, W. H.; van Zijverden, M.; Geertsma, R. E. Nano-silver: a review of available data and knowledge gaps in human and environmental risk assessment. *Nanotoxicology*, **2009**, 3, 1-30.

Wood, C. M; Hogstrand, C.; Galvez, F.; Munger, R. S. The physiology of waterborne silver toxicity in freshwater rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) 1. The effects of ionic Ag⁺. *Aquat. Toxicol.*, **1999**, 35, 93-109.

Yale, G. Toxicity and uptake of nanosilver by *Pseudokirchneriella subcapitata* and *Daphnia magna*. Dissertação de mestrado. Purdue University, Estados Unidos, **2010**.

Yang, L.; Watts, D. J. Particle surface characteristics may play an important role in phytotoxicity of alumina nanoparticles. *Toxicol. Lett.*, **2005**, 158,122-132.

Yehia, H. N.; Draper, R. K.; Mikoryak, C.; Walker, E. K.; Baja, P.; Musselman, I. H.; Daigrepont, M. C.; Dieckmann, G. R.; Pantano, P. Single-walled carbon nanotube interactions with HeLa cells. *J. Nanobiotechnology*, **2007**, 5, 8.

Zaban, A.; Mic'ic', O. I.; Gregg, B. A. and Nozik, A. J. Photosensitization of nanoporous TiO₂ electrodes with InP quantum dots. *Langmuir*, **1998**, 14, 3153-3156.

Zagatto, P. A.; Bertoletti, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. Rima, 2006.

Zan, L.; Fa, W.; Peng, T. P.; Gong, Z. K. Photocatalysis effect of nanometer TiO₂ and TiO₂-coated ceramic plate on hepatitis B virus. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.*, **2007**, 86, 165-169.

Zarbin, A. J. G. Química de (nano)materiais. *Quim. Nova*, **2007**, 30, 1469-1479.

Zhang, J. Z.; Noguez, C. Plasmonicoptical properties and applications of metal nanostructures. *Plasmonics*, **2008**, 3, 127150.

Zhang, Q.; Gao, L.; Guo, J. Effects of calcinationonthe photocatalyticproperties of nanosized TiO₂ powders prepared by TiCl₄ hydrolysis. *Appl. Catal. B: Environ.*, **2000**, 26, 207-215.

Zhang, Z.; Zhao, B.; Hu, Liming. PVP protective mechanism of ultrafine silver powder synthesized by chemical reduction process. *Journal solid state chem.*, **1996**, 121, 105-110.

Zhu, X.; Chang, Y.; Chen, Y. Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, **2010**, 78, 209-215.

Zhu, X.; Wang, J.; Zhang, X.; Chang, Y.; Chen, Y. The impact of ZnO nanoparticle aggregates on the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*). *Nanotechnology*, **2009**, 20, 195103-195112.