



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO TECNOLÓGICO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA CIVIL

Fernanda Facin

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SOB *Landoltia punctata* e *Daphnia magna* DE  
LIXIVIADOS DE REVESTIMENTOS ASFÁLTICOS E DE CONCRETO DE  
CIMENTO PORTLAND NANOMODIFICADOS**

Florianópolis  
2020



Fernanda Facin

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SOB *Landoltia punctata* e *Daphnia magna* DE  
LIXIVIADOS DE REVESTIMENTOS ASFÁLTICOS E DE CONCRETO DE  
CIMENTO PORTLAND NANOMODIFICADOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Engenharia Civil.

Orientador: Prof. João Victor Staub de Melo, Dr.

Coorientador: Prof. William Gerson Matias, Dr.

Florianópolis  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Facin, Fernanda

Avaliação da toxicidade sob *Landoltia punctata* e *Daphnia magna* de lixiviados de revestimentos asfálticos e de concreto de cimento Portland nanomodificados / Fernanda Facin ; orientador, João Victor Staub de Melo, coorientador, William Gerson Matias,, 2020.  
129 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia Civil. 2. Revestimentos nanomodificados. 3. Lixiviação. 4. Nanomateriais . 5. Nanotoxicologia.. I. Staub de Melo, João Victor . II. Matias,, William Gerson. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Civil. IV. Título.

Fernanda Facin

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE SOB *Landoltia punctata* e *Daphnia magna* DE  
LIXIVIADOS DE REVESTIMENTOS ASFÁLTICOS E DE CONCRETO DE  
CIMENTO PORTLAND NANOMODIFICADOS**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Joe Arnaldo Villena Del Carpio, Dr.  
Universidade Federal do Paraná

Prof. Wellington Longuini Repette, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Rodrigo Costa Puerari, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Engenharia Civil.

---

Prof<sup>a</sup>. Poliana Dias de Moraes, Dr<sup>a</sup>.  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof. João Victor Staub de Melo, Dr.  
Orientador

---

Prof. William Gerson Matias, Dr.  
Coorientador

Florianópolis, 2020.



Este trabalho é dedicado aos meus familiares, amigos e  
companheiro.



## AGRADECIMENTOS

Início esta seção agradecendo imensamente aos meus pais, Darci e Ivete, que sempre me deram liberdade e apoio para alçar meus voos, e um lugar seguro para retornar nos momentos de necessidade. Agradeço aos meus irmãos, Felipe e Mariana, que seguem compartilhando conversas e ideias mesmo depois que nossos caminhos seguiram para cidades diferentes. Ao Eduardo, meu companheiro, agradeço pelas conversas, paciência e pelo ombro amigo nos momentos mais difíceis.

Meu muito obrigada a Naiara pelo companheirismo e amizade cultivados nos finais de semana e noites que passamos trabalhando em nossas pesquisas nos laboratórios do LABTOX-UFSC. Agradeço pela presença constante e preocupação da Louis, a qual continua fazendo parte da minha vida após 10 anos de amizade. Minha gratidão especial a vocês duas, que marcaram de uma forma muito positiva todo este tempo em que estive envolvida com minha pesquisa e que me ajudaram a reconhecer as pequenas vitórias de cada dia. Este agradecimento se estende àqueles que estiveram presentes e de alguma forma me auxiliaram a chegar até aqui.

Agradeço também ao meu orientador, Professor João Victor Staub de Melo, que aceitou o desafio de guiar uma estudante de outra área pelos caminhos da Engenharia Civil. Obrigada por acreditar na minha ideia e investir seu tempo e esforço para construirmos juntos uma pesquisa com resultados importantes. Ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil da UFSC pela oportunidade e suporte concedido. Ao Laboratório de Pavimentação (LABPAV) e ao Grupo de Pesquisa Nanotecnologia Aplicada à Pavimentação pelo auxílio e infraestrutura ao desenvolvimento desse trabalho. Ao Laboratório de Materiais da Construção Civil (LMCC), por todo auxílio durante a pesquisa. Agradeço ao meu coorientador, Professor William Gerson Matias do Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da UFSC, pelo apoio e por ceder a estrutura laboratorial do LABTOX-UFSC para que este trabalho fosse realizado. Agradeço também ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME/UFSC) e a Central de Análises da Engenharia Química e de Alimentos-UFSC, em especial ao Leandro, pelo suporte na realização de ensaios e compreensão dos resultados.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela manutenção no financiamento de cursos de pós-graduação gratuitos e de qualidade.

Por fim, agradeço ainda àqueles que não citei, mas que também participaram da construção deste trabalho.



*"There's plenty of room at the bottom"*  
(FEYNMAN, 1959)



## RESUMO

Recentemente, a nanotecnologia tem sido aplicada em pesquisas na área de pavimentação, apesar do risco potencial de nanomateriais (NMs) atuarem como contaminantes através da liberação para o ambiente. Essa liberação pode ocorrer por meio do desgaste superficial dos revestimentos pela ação do tráfego, intempéries, entre outros fatores. Tendo em vista essa problemática, o objetivo deste trabalho foi simular um cenário crítico, onde há o desgaste avançado do revestimento e maior suscetibilidade de liberação de nanomateriais, através do ensaio descrito na NBR 10005:2004. Deste modo, este trabalho avaliou a toxicidade do lixiviado proveniente de revestimentos de concreto de cimento Portland (CCP) nanomodificados com  $TiO_2$  (dióxido de titânio),  $TiO_2/WO_3$  (dióxido de titânio dopado com óxido de tungstênio) e  $ZnO$  (óxido de zinco), e de revestimentos de concreto asfáltico (CA) (ligante CAP 50-70) nanomodificados com *NTC* (nanotubo de carbono) e *NA* (nano-argila montmorilonita). Após a obtenção do lixiviado, foram realizados ensaios de toxicidade aguda e crônica com o microcrustáceo *Daphnia magna* e toxicidade com a macrófita aquática *Landoltia punctata*, ambos de água doce. Os resultados demonstraram baixa toxicidade tanto no teste agudo quanto no teste crônico com a *D. magna*. Nos testes crônicos com *D. magna*, parâmetros como longevidade e idade da primeira postura, não foram afetados pelos lixiviados contendo NMs, já o parâmetro tamanho teve efeito significativo com o lixiviado do revestimento de referência CCP (sem NM), e a reprodução foi afetada pelos lixiviados de CCP nanomodificados com  $TiO_2/WO_3$  e  $ZnO$ . Tais resultados indicam a possibilidade de outros materiais presentes na mistura causarem efeitos negativos nos organismos. A *L. punctata* demonstrou menor sensibilidade aos lixiviados do que a *D. magna*, com todas as  $CE_{50} > 180$  mL/L, demonstrando que as amostras de lixiviado não são tóxicas para a *L. punctata* nas condições testadas. As causas dos efeitos toxicológicos não puderam ser verificadas, contudo há indícios de que os NMs não foram responsáveis pelos efeitos, uma vez que o ICP-MS e FTIR demonstraram que grande parte dos NMs incorporados nos revestimentos permaneceu aderida mesmo após o processo de lixiviação.

**Palavras-chave:** Revestimentos nanomodificados. Lixiviação. Nanomateriais. Nanotoxicologia.



## ABSTRACT

Recently, nanotechnology has been applied to paving research, despite the potential risk of nanomaterials (NMs) acting as contaminants through release to the environment. This release can occur through the superficial wear of the coatings by the action of traffic, weather, among other factors. In view of this problem, the the objective of this work was to simulate a critical scenario, where there is an advanced wear of the coating and greater susceptibility to release of NMs, through the test described in NBR 10005:2004. Thus, this work evaluated the toxicity of leachate from nanomodified Portland cement concrete (CCP) coatings with  $TiO_2$  (titanium dioxide),  $TiO_2/WO_3$  (titanium dioxide doped with tungsten oxide) and  $ZnO$  (zinc oxide), and asphalt concrete (CA) coatings (CAP 50-70 binder) nanomodified with  $NTC$  (carbon nanotube) and  $NA$  (nano-clay montmorillonite). After obtaining the leachate, acute and chronic toxicity tests were performed with the micro-crustacean *Daphnia magna* and toxicity with the aquatic macrophyte *Landoltia punctata*, both freshwater. The results showed low toxicity both in the acute test and in the chronic test with *D. magna*. In chronic tests with *D. magna*, parameters such as longevity and time until the first brood, were not affected by leachate containing NMs, whereas the size parameter had a significant effect with the leachate from the CCP reference coating (without NM), and reproduction was affected by the nanomodified CCP leachate. with  $TiO_2/WO_3$  and  $ZnO$ . Such results indicate the possibility of other materials present in the mixture causing negative effects on the organisms. A *L. punctata* showed less sensitivity to leachate than *D. magna*, with all  $CE_{50} > 180$  mL/L, demonstrating that the leachate samples are not toxic to *L. punctata* under the conditions tested. The causes of the toxicological effects could not be verified, however there is evidence that the NMs were not responsible for the effects, since the ICP-MS and FTIR demonstrated that a large part of the NMs incorporated in the coatings remained adhered even after the leaching process.

**Keywords:** Nanomodified coatings. Leaching. Nanomaterials. Nanotoxicology..



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura do pavimento rígido . . . . .	28
Figura 2 – Estrutura do pavimento flexível . . . . .	29
Figura 3 – Estrutura típica de um pavimento intertravado . . . . .	29
Figura 4 – Comparação da textura superficial de revestimento asfáltico antes e após o uso . . . . .	34
Figura 5 – Comparação da textura superficial da PPC fotocatalítica antes e após o uso	34
Figura 6 – Microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> adulta . . . . .	41
Figura 7 – Macrófita aquática <i>Landoltia punctata</i> - detalhe das frondes . . . . .	42
Figura 8 – Fluxograma geral do programa experimental. . . . .	47
Figura 9 – Desenho esquemático de uma CCP com duas camadas e dimensões em milímetros. . . . .	53
Figura 10 – Fluxograma da Etapa 2 para as PPC. . . . .	53
Figura 11 – Curva granulométrica teórica de máxima densificação da argamassa. . . . .	54
Figura 12 – Fluxograma da Etapa 2 para as amostras de CA. . . . .	55
Figura 13 – Misturador de Alto Cisalhamento. . . . .	55
Figura 14 – Composição granulométrica dos agregados para as placas de CA. . . . .	56
Figura 15 – Mistura asfáltica no estado solto e desagregada. . . . .	57
Figura 16 – Fluxograma da experimental da Etapa 3. . . . .	58
Figura 17 – Amostras de CCP saturadas com fenolftaleína. . . . .	59
Figura 18 – Aparato do procedimento de lixiviação antes do início - amostras de CA . .	60
Figura 19 – Aparato do procedimento de lixiviação findada a agitação - amostras de PPC	61
Figura 20 – Amostras de lixiviado de PPC após filtração. . . . .	61
Figura 21 – Comparação entre as amostras de CA e PPC antes e depois da lixiviação. .	62
Figura 22 – Fluxograma da Etapa 4. . . . .	64
Figura 23 – Representação do teste de toxicidade aguda. . . . .	66
Figura 24 – Medida do comprimento total de <i>D. magna</i> realizada após 21 dias de teste.	68
Figura 25 – Teste de toxicidade crônica com <i>D. magna</i> . . . . .	69
Figura 26 – Teste de toxicidade com <i>L. punctata</i> . . . . .	71
Figura 27 – Micrografias geradas na MET dos NMs a) $TiO_2$ , b) $TiO_2/WO_3$ , c) $ZnO$ , d) NA e e) NTC . . . . .	73
Figura 28 – Espectros de FT-IR do NTC puro e do lixiviado de revestimento contendo NTC. . . . .	77
Figura 29 – Espectro de FT-IR do NA e do lixiviado de revestimento CA contendo NA.	78
Figura 30 – Espectro de FT-IR do $TiO_2$ e do lixiviado de PPC contendo $TiO_2$ . . . . .	79
Figura 31 – Espectro de FT-IR do $TiO_2/WO_3$ e do lixiviado de PPC contendo $TiO_2/WO_3$	80
Figura 32 – Espectro de FT-IR do $ZnO$ e do lixiviado de PPC contendo $ZnO$ . . . . .	81
Figura 33 – <i>D. magna</i> do teste crônico com NTC. . . . .	86

Figura 34 – Gráficos do resultado do teste crônico com <i>D. magna</i> em NA . . . . .	113
Figura 35 – Gráficos do resultado do teste crônico com <i>D. magna</i> em NTC . . . . .	114
Figura 36 – Gráficos do resultado do teste crônico com <i>D. magna</i> em $TiO_2$ . . . . .	115
Figura 37 – Gráficos do resultado do teste crônico com <i>D. magna</i> em $TiO_2WO_3$ . . . . .	116
Figura 38 – Gráficos do resultado do teste crônico com <i>D. magna</i> em $ZnO$ . . . . .	117
Figura 39 – Gráficos do resultado do teste crônico com <i>D. magna</i> no lixiviado de REFCA120	
Figura 40 – Gráficos do resultado do teste crônico com <i>D. magna</i> no lixiviado de NA .	121
Figura 41 – Gráficos do resultado do teste crônico com <i>D. magna</i> no lixiviado de NTC .	122
Figura 42 – Gráficos do resultado do teste crônico com <i>D. magna</i> no lixiviado de REFPPC123	
Figura 43 – Gráficos do resultado do teste crônico com <i>D. magna</i> no lixiviado de $TiO_2$ .	124
Figura 44 – Gráficos do resultado do teste crônico com <i>D. magna</i> no lixiviado de $TiO_2WO_3$	125
Figura 45 – Gráficos do resultado do teste crônico com <i>D. magna</i> no lixiviado de $ZnO$ .	126

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades mecânicas do revestimento influenciadas pela adição de NMs.	31
Tabela 2 – Toxicidade dos NMs isoladamente.	37
Tabela 3 – Exemplos de organismos-teste utilizados para caracterizar a toxicidade de NMs	40
Tabela 4 – Caracterização do cimento Portland.	48
Tabela 5 – Características físicas do agregado mineral.	48
Tabela 6 – Características do ligante asfáltico conforme laudo do fornecedor.	49
Tabela 7 – Características dos NMs conforme informado pelos fornecedores.	50
Tabela 8 – Síntese dos métodos físico-químicos para caracterização dos NMs.	51
Tabela 9 – Composição granulométrica: porcentagem passante em cada peneira.	54
Tabela 10 – Composição granulométrica: porcentagem passante em cada peneira.	56
Tabela 11 – Concentrações utilizadas para cada NM no teste de toxicidade aguda com <i>D. magna</i> .	66
Tabela 12 – Concentrações utilizadas para cada NM e lixiviado no teste de toxicidade crônica com <i>D. magna</i> .	70
Tabela 13 – Concentrações utilizadas para cada NM no teste de toxicidade com <i>L. punctata</i> .	71
Tabela 14 – Resultados de PZ, DE, PDISP e pH em diferentes meios de diluição.	74
Tabela 15 – Resultado da quantificação de metais pela análise ICP-MS.	76
Tabela 16 – Resultados dos testes de toxicidade aguda com <i>D. magna</i> dos 5 NMs e dos 7 lixiviados em ordem de toxicidade.	82
Tabela 17 – Resultados dos testes de toxicidade crônica dos 5 NMs puros e dos 7 lixiviados.	85
Tabela 18 – Ranking da toxicidade das amostras para os parâmetros que apresentaram efeito no teste de toxicidade crônica.	85
Tabela 19 – Concentrações que causaram efeito significativo na taxa de crescimento da <i>L. punctata</i> para os 5 NMs e 7 lixiviados.	90
Tabela 20 – Síntese dos resultados dos testes de toxicidade aguda e crônica com <i>D. magna</i> dos 7 lixiviados.	91
Tabela 21 – Resultados dos testes de toxicidade crônica dos 5 NMs puros.	111
Tabela 22 – Resultados dos testes de toxicidade crônica dos lixiviados.	117
Tabela 23 – Taxa de crescimento ( $r$ ) da <i>L. punctata</i> em meio contendo NMs isoladamente	127
Tabela 24 – Concentrações utilizadas para cada NM no teste de toxicidade com <i>L. punctata</i> .	127
Tabela 25 – Taxa de crescimento $r$ <i>Landoltia punctata</i> dos lixiviados	127



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AASHTO	American Association of State Highway and Transportation Officials
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
AS	Área superficial
CA	Concreto asfáltico
CCP	Concreto de cimento Portland
CENO	Concentração de Efeito Não Observado
CEO	Concentração de Efeito Observado
$CE_{50}$	Concentração Efetiva
$CL_{50}$	Concentração Letal
CNT	Confederação Nacional do Transporte
DE	Diâmetro Efetivo
DRX	Difração de raios-x
FTIR	Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier
GEE	Gases de Efeito Estufa
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MPa	Mega Pascal
NA	Nano-argila
NMs	Nanomateriais
NP	Nanopartícula
NTC	Nanotubo de carbono
OECD	<i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i>
PDISP	Índice de Polidispersão
PPC	Peças pré-moldadas de concreto
PZ	Potencial Zeta

TCLP	<i>Toxicity Characteristic Leaching Procedure</i>
$TiO_2$	Dióxido de titânio
$TiO_2/WO_3$	Dióxido de titânio dopado com tungstênio
$ZnO$	Óxido de zinco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>23</b>
1.1	MOTIVAÇÃO	23
1.2	OBJETIVOS	24
<b>1.2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b>	<b>24</b>
<b>1.2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b>	<b>24</b>
1.3	ORGANIZAÇÃO DA PESQUISA	24
<b>2</b>	<b>PAVIMENTOS</b>	<b>27</b>
<b>3</b>	<b>NANOMATERIAIS E A NANOTECNOLOGIA</b>	<b>31</b>
3.1	NANOTECNOLOGIA APLICADA À PAVIMENTAÇÃO	31
3.2	PERDA DE NANOMATERIAIS PARA O AMBIENTE	33
3.3	PRINCIPAIS PONTOS DO CAPÍTULO	35
<b>4</b>	<b>NANOTOXICOLOGIA</b>	<b>37</b>
4.1	TESTES DE TOXICIDADE	38
<b>4.1.1</b>	<b>Organismos-teste</b>	<b>40</b>
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS ISOLADOS	42
<b>4.2.1</b>	<b>Morfologia e Tamanho</b>	<b>43</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Estabilidade em Suspensão</b>	<b>43</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Diâmetro Efetivo e Índice de Polidispersão</b>	<b>43</b>
<b>4.2.4</b>	<b>Identificação de Grupos Funcionais</b>	<b>44</b>
4.3	TESTES DE LIXIVIAÇÃO	44
4.4	PRINCIPAIS PONTOS DO CAPÍTULO	45
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b>	<b>47</b>
5.1	ETAPA 1 - CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DOS MATERIAIS	47
<b>5.1.1</b>	<b>Cimento Portland</b>	<b>47</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Agregados Minerai</b> s	<b>48</b>
<b>5.1.3</b>	<b>Ligante Asfáltico</b>	<b>49</b>
<b>5.1.4</b>	<b>Caracterização dos Nanomateriais</b>	<b>50</b>
5.1.4.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	51
5.1.4.2	Potencial Zeta (PZ), Diâmetro Efetivo (DE) e Índice de Polidispersão (PDISP)	52
5.2	ETAPA 2 - PRODUÇÃO DAS AMOSTRAS DE PPC E CA	52
<b>5.2.1</b>	<b>Formulação e Moldagem das PPCs</b>	<b>52</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Formulação dos Revestimentos Asfálticos</b>	<b>55</b>
5.3	ETAPA 3 - PROCEDIMENTO DE LIXIVIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LIXIVIADO	57
<b>5.3.1</b>	<b>Caracterização dos Extratos Lixiviados</b>	<b>62</b>
5.3.1.1	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)	62
5.3.1.2	Espectroscopia na região Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	63

5.4	ETAPA 4 - TESTES TOXICOLÓGICOS . . . . .	63
5.4.1	Metodologia de Cultivo para <i>Daphnia magna</i> . . . . .	65
5.4.2	Teste de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia magna</i> . . . . .	65
5.4.3	Teste de toxicidade crônica com <i>Daphnia magna</i> . . . . .	67
5.4.4	Metodologia de Cultivo para <i>Landoltia punctata</i> . . . . .	70
5.4.5	Teste de Toxicidade com <i>Landoltia punctata</i> . . . . .	70
5.4.5.1	Cálculo da Taxa de Crescimento . . . . .	72
6	<b>APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS . . . . .</b>	<b>73</b>
6.1	CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DOS MATERIAIS . . . . .	73
6.1.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) . . . . .	73
6.1.2	Potencial Zeta (PZ), Diâmetro Efetivo (DE) e Índice de Polidispersão (PDISP) . . . . .	74
6.2	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS LIXIVIADOS . . . . .	76
6.2.1	Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) . . . . .	76
6.2.2	Espectroscopia na Região Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) . . . . .	77
6.3	TESTES TOXICOLÓGICOS . . . . .	81
6.3.1	Teste de Toxicidade Aguda com <i>Daphnia magna</i> . . . . .	81
6.3.2	Teste de Toxicidade Crônica com <i>Daphnia magna</i> . . . . .	84
6.3.3	Teste de Toxicidade com <i>Landoltia punctata</i> . . . . .	90
6.3.4	Síntese dos Resultados de Toxicidade para os Lixiviados . . . . .	91
7	<b>CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES . . . . .</b>	<b>93</b>
7.1	CONCLUSÕES . . . . .	93
7.2	RECOMENDAÇÕES . . . . .	93
	<b>REFERÊNCIAS . . . . .</b>	<b>95</b>
	<b>APÊNDICE A – APÊNDICE . . . . .</b>	<b>111</b>
A.1	RESULTADO DOS TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA COM <i>D. MAGNA</i> NOS 5 NMS . . . . .	111
A.2	RESULTADOS DOS TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA COM <i>D. MAGNA</i> NAS 7 AMOSTRAS DE LIXIVIADO . . . . .	117
A.3	RESULTADOS DOS TESTES DE TOXICIDADE COM <i>L. PUNCTATA</i> . . . . .	127

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 MOTIVAÇÃO

A nanotecnologia foi concebida visando desenvolver a compreensão e o controle de materiais em nanoescala, afim de beneficiar a economia, a segurança e a melhoria da qualidade de vida da população (1). Os materiais em nanoescala têm pelo menos uma das suas dimensões entre 1 e 100 nm (2, 3). Ainda, são diferenciados devido à sua alta reatividade e propriedades físico-químicas emergentes quando comparadas às suas formas bulk correspondentes (4). Tais características permitem a aplicação de nanomateriais (NMs) em diversos produtos como eletrônicos, óticos, têxteis, dispositivos médicos, cosméticos, embalagens de alimentos, tecnologia de tratamento de água, células de combustível, catalisadores, biossensores e agentes para remediação ambiental (5, 6). Além disso, NM com propriedades como alta reatividade química, resistência à corrosão, rigidez e durabilidade são de alta relevância na área da construção civil, pois tem influência direta na seleção de materiais, métodos e técnicas de construção (7). Elevando as propriedades das matérias-primas, os custos incorridos durante o ciclo de vida dos NMs podem ser reduzidos, visto que a durabilidade e eficiência do produto será aprimorada a níveis mais altos (8, 6).

Atualmente, a nanotecnologia tem sido amplamente aplicada em pesquisas na área de pavimentação com o intuito de melhorar as propriedades dos materiais usualmente empregados (9). Segundo Balbo (2007), o pavimento é uma estrutura não perene, composta por camadas sobrepostas de diferentes materiais compactados a partir do subleito do corpo estradal, adequada para atender estrutural e operacionalmente ao tráfego, de maneira durável e ao mínimo custo possível, considerados diferentes horizontes para serviços de manutenção preventiva, corretiva e de reabilitação, obrigatórios. Diversos autores Melo e Trichês (2017), Rech et al. (2018), Bica (2019), Melo et al. (2012) comprovaram que o uso da nanotecnologia em pavimentos e revestimentos tem mostrado resultados positivos quanto ao desempenho mecânico e durabilidade - através da adição de nanotubo de carbono (*NTC*) e nano-argila (*NA*) - e até mesmo na despoluição do ar - principalmente decorrente da adição de dióxidos de titânio ( $TiO_2$  ou  $TiO_2/WO_3$ ) e óxido de zinco (*ZnO*) (15, 16, 17). Apesar dos benefícios, pouco se sabe sobre o potencial risco de atuar como contaminantes ambientais (18).

Mohajerani et al. (2019) afirma que existe a preocupação que as implicações ambientais do uso de NMs não sejam totalmente compreendidas. Os efeitos incertos resultantes das novas propriedades exibidas pelos nanomateriais impulsionaram novas pesquisas relacionadas à saúde e segurança ambiental, com o objetivo de avaliar os potenciais prejuízos ao meio ambiente e à saúde humana (19). Tais preocupações devem ser abordadas especialmente na área da pavimentação, uma vez que os revestimentos estão expostos a condições climáticas adversas (vento, chuva, gelo, sol intenso), além da deterioração por microrganismos e constante solicitação do tráfego de veículos. Como consequência destes fatores, ocorre o desgaste e deterioração superficial da camada de revestimento observado através da liberação de materiais particulados,

que pode conter ou não NMs. Estes materiais particulados, por sua vez, estão sujeitos ao transporte e deposição no solo e em águas superficiais através do vento e do escoamento superficial da água da chuva sobre o revestimento (20, 21), alterando as características do habitat natural.

Apesar de existirem inúmeras pesquisas visando entender quais as vantagens do uso de NMs na pavimentação quanto ao comportamento mecânico e reológico, são escassas aquelas que buscam compreender o comportamento de lixiviação desses revestimentos em serviço. Contudo, diversos autores recomendam que sejam realizados testes para avaliar a viabilidade do uso de NMs com relação aos efeitos destes aos humanos e ao ambiente (18, 22, 19, 17, 23). Sendo assim, tendo em mente os efeitos positivos dos NMs e a escassez de resultados quanto aos seus efeitos toxicológicos, este trabalho busca encontrar respostas que auxiliem na tomada de decisão quanto à segurança da implementação de revestimentos nano-modificados como produtos comercializáveis.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade de lixiviados de revestimentos asfálticos e de concreto de cimento Portland nos organismos *Landoltia punctata* e *Daphnia magna*.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Apurar a ocorrência ou não da liberação de NMs presentes nos revestimentos nanomodificados após processo de lixiviação;
- Avaliar os efeitos da exposição de diferentes organismos-teste a extratos lixiviados de revestimentos.

## 1.3 ORGANIZAÇÃO DA PESQUISA

Com o objetivo de expor de maneira clara e ordenada todos os passos desta pesquisa, o estudo foi estruturado nos seguintes capítulos:

- Capítulo 1: Introdução - Introduz o tema estudado, circunscreve o assunto da pesquisa, fixa o objetivo geral do estudo e o modo de alcançá-lo através dos objetivos específicos delimitados. Neste capítulo ainda é abordado a relevância, o escopo global do trabalho e a organização da pesquisa.
- Capítulo 2: Pavimentos - Neste capítulo são apresentadas definições sobre tipos de pavimentos e suas características principais.

- Capítulo 3: Nanomateriais e a Nanotecnologia - Neste capítulo são apresentadas definições sobre nanomateriais, bem como possíveis aplicações na área de pavimentação. Além disso, é introduzida a problemática da liberação de nanomateriais para o ambiente.
- Capítulo 4: Nanotoxicologia - Este capítulo busca descrever o que é nanotoxicologia e qual sua relação com os nanomateriais atualmente estudados. Aborda o que são testes de toxicidade, quais os organismos usualmente utilizados e qual a finalidade destas análises.
- Capítulo 5: Metodologia - Este capítulo define e descreve o método utilizado para atingir os objetivos propostos pelo trabalho, estruturando todo o programa experimental que foi desenvolvido.
- Capítulo 6: Apresentação e Discussão dos Resultados - Nesta etapa, são apresentados e interpretados os resultados do programa experimental, além de algumas conclusões com ênfase nos objetivos da pesquisa.
- Capítulo 7: Conclusões e Recomendações - Por fim, este capítulo traz a exposição das conclusões e a perspectivas para trabalhos futuros.



## 2 PAVIMENTOS

A concepção dos pavimentos tem como principal objetivo a melhoria operacional para o tráfego de veículos através da criação de uma superfície: regular (garantindo conforto no deslocamento); aderente (proporcionando maior segurança em condições de pista úmida ou molhada); e menos ruidosa diante da ação dinâmica dos pneus (10). Deste modo, a pavimentação tem como meta propiciar um tráfego confortável e seguro, com estruturas e materiais capazes de suportar os esforços decorrentes da ação do tráfego combinados com ações climáticas, buscando garantir um bom desempenho em termos de custos operacionais e de manutenção ao longo dos anos de serviço desta infraestrutura (24).

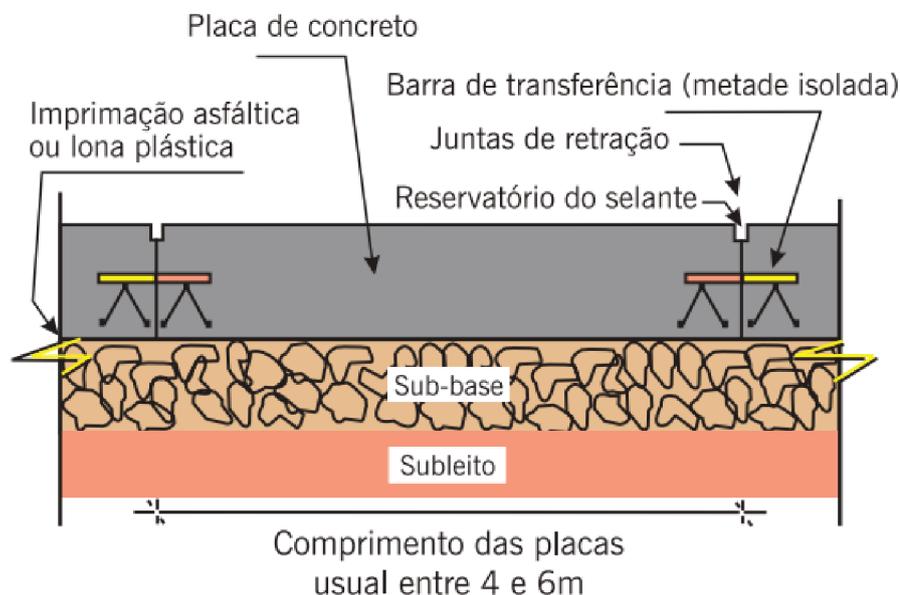
Para atender a esses requisitos, a estrutura do pavimento é particularmente importante. Ela deve ser constituída por camadas que distribuam as solicitações de carga, limitando as tensões e as deformações de maneira a garantir um desempenho adequado da via durante o horizonte de projeto. Nesse sentido, os pavimentos são constituídos de múltiplas camadas, para minimizar os esforços verticais produzidos pela ação do tráfego e, conseqüentemente, oferecer proteção ao subleito (25). As camadas dos pavimentos são divididas em:

- **Subleito:** é o terreno de fundação onde será apoiado todo o pavimento (26).
- **Reforço do subleito:** é uma camada de espessura constante, posta por circunstâncias técnico-econômicas acima da regularização do subleito, cuja função é evitar espessuras elevadas da camada de sub-base devido à baixa capacidade de suporte do subleito.
- **Sub-base:** é a camada complementar à base, quando por circunstâncias técnico-econômicas não for aconselhável construir a base diretamente sobre regularização do subleito.
- **Base:** é a camada destinada a resistir e distribuir os esforços oriundos do tráfego e sobre a qual se constrói o revestimento.
- **Revestimentos:** O revestimento é a camada do pavimento visível aos usuários da via – é a superfície sobre a qual trafegam os veículos e a responsável por prover conforto e segurança no rolamento (27). Eles podem ser classificados como revestimentos flexíveis ou rígidos.
  - *Revestimentos flexíveis:* os revestimentos flexíveis podem ser betuminosos, os quais são constituídos por associação de agregados e materiais betuminosos; ou podem ser flexíveis por calçamento de alvenaria poliédrica (pedras irregulares) ou paralelepípedos (blocos regulares)(28).
  - *Revestimentos rígidos:* de acordo com DNIT (2006), estes revestimentos são constituídos por uma mistura relativamente rica de cimento Portland, areia, agregado graúdo e água, distribuído numa camada e devidamente adensado.

A combinação destas camadas resultará na classificação do pavimento. Tradicionalmente, eles são classificados como rígidos ou flexíveis (24). Contudo, tem-se empregado a terminologia de pavimentos semi-rígidos para aqueles com revestimentos asfálticos que possuam em sua base ou sub-base materiais cimentado.

O pavimento rígido é aquele composto por uma camada superficial de concreto de cimento Portland (em geral placas, armadas ou não), apoiada geralmente sobre uma camada de material granular ou de material estabilizado com cimento (chamada sub-base), assentada sobre o subleito ou sobre um reforço do subleito quando necessário (24), conforme a Figura 1(a).

Figura 1 – Estrutura do pavimento rígido

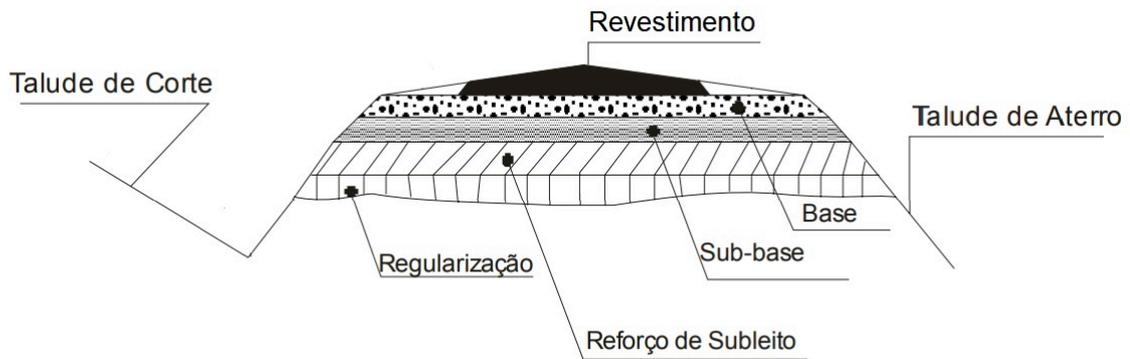


(a) Concreto-cimento (corte longitudinal)

Fonte: Bernucci *et al.* (2008).

Os pavimentos flexíveis ou asfálticos, são estruturas compostas por camada superficial asfáltica (revestimento), apoiada sobre camadas de base, de sub-base e de reforço do subleito, constituídas por materiais granulares, solos ou misturas de solos, sem adição de agentes cimentantes, conforme a Figura 2. A presença ou não de algumas das camadas depende do volume de tráfego, da capacidade de suporte do subleito e dos materiais disponíveis (26). A função primária do asfalto no pavimento é promover aderência entre os agregados da mistura e entre ela e a superfície onde será aplicada – por isso, constitui a parte denominada de “ligante”. Além disso, é ele o responsável por proporcionar uma flexibilidade adequada à superfície da via para que ela resista ao tráfego e às condições climáticas sem apresentar deformações ou trincas precoces, o que compromete a durabilidade da infraestrutura (27).

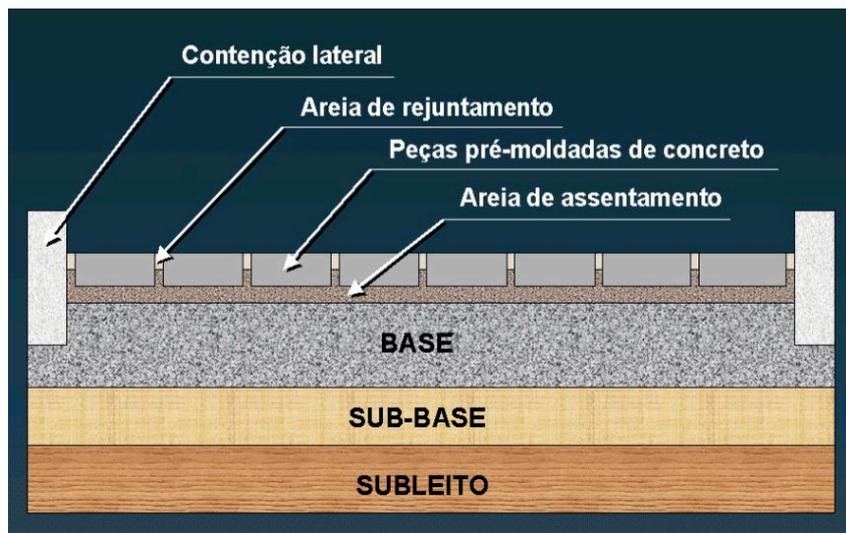
Figura 2 – Estrutura do pavimento flexível



Fonte: DNIT (2006).

De acordo com o Manual de Pavimentação do DNIT (2006), os pavimentos flexíveis podem também ser constituídos por revestimento de peças pré-moldadas de concreto (PPC) assentadas sobre um colchão de regularização, conhecido como pavimento intertravado. No caso deste tipo de pavimento, sua estrutura é composta por uma camada base (ou base e sub-base), seguida por camada de revestimento constituída por peças de concreto justapostas em uma camada de assentamento e cujas juntas entre as peças são preenchidas por material de rejuntamento e o intertravamento do sistema é proporcionado pela contenção (Figura 3).

Figura 3 – Estrutura típica de um pavimento intertravado



Fonte: Godinho (2009).

As PPCs têm adquirido novas propriedades de grande interesse para locais com altos níveis de impermeabilização do solo e elevada de concentração de poluentes no ar, como os centros urbanos (30). Dentre estas propriedades estão os pavimentos drenantes, que colaboram

para o escoamento da água em dias chuvosos, e os pavimentos fotocatalíticos, que colaboram na degradação de contaminantes orgânicos e inorgânicos tóxicos presentes na atmosfera, emitidos pela queima de combustíveis fósseis e determinadas atividades industriais (13) .

### 3 NANOMATERIAIS E A NANOTECNOLOGIA

Os NMs são estruturas com pelo menos uma dimensão menor que 100 nm, além de serem diferenciados devido a sua alta reatividade e propriedades físico-químicas emergentes (3, 2), podendo ser divididos em três categorias de acordo com sua estrutura: (i) materiais com apenas uma dimensão em nanoescala são nano-filmes e nano-camadas; (ii) materiais com duas dimensões nanométricas incluem nanofios e nanotubos; (iii) materiais com três dimensões em escala nanométrica são nanopartículas, por exemplo, coloides e pontos quânticos (31). Sua origem também varia, podendo ser natural ou antropogênica (32).

Diversos avanços na ciência culminaram no desenvolvimento de instrumentos especializados que tornaram possível o surgimento da nanotecnologia, o que por sua vez facilitou a observação e manipulação de nanoestruturas em escala atômica e molecular, bem como as descobertas de novos materiais como fulerenos e nanotubos de carbono (33, 31). Desta forma, embora os principais desenvolvimentos da nanotecnologia tenham sido inicialmente nas áreas de eletrônica, física e química, aplicações mais recentes tem surgido em áreas como a engenharia civil (34).

Na área da infraestrutura, a introdução da nanotecnologia permite a concepção de concretos com propriedades superiores, proporcionando a otimização do comportamento e desempenho do material (35), além de adequar os produtos para que atendam necessidades específicas da indústria civil (7). Em diferentes estudos, Melo (2014) encontrou resultados muito promissores quanto à adição de NM no Concreto Asfáltico (CA) e no Concreto de Cimento Portland (CCP) (36). Em decorrência disto, diversas pesquisas vêm sendo desenvolvidas no âmbito da pavimentação com diferentes NMs.

#### 3.1 NANOTECNOLOGIA APLICADA À PAVIMENTAÇÃO

Recentemente, diversas pesquisas tem abordado a utilização da nanotecnologia na pavimentação (36, 12). Sua aplicação tem se mostrado eficiente tanto na incorporação de nanopartículas (NPs) no ligante asfáltico (16), quanto no concreto de cimento Portland (12). Diversos estudos já realizados indicaram que o uso de NMs pode potencializar a resistência e durabilidade dos pavimentos, além de conferir funcionalidades como propriedades fotocatalíticas (autolimpeza, redução da poluição do ar e capacidade antimicrobiana) (37). Na Tabela 1 é possível observar as principais características melhoradas através da adição de diferentes NMs ao revestimento de PPC e CA.

Tabela 1 – Propriedades mecânicas do revestimento influenciadas pela adição de NMs.

NM	Reves- timento	Características melhoradas	Tamanho(nm) / Teor(%)	Referên- cias
ZnO	PPC	Resistência à flexão	30 / 0,2-1,0	38

*Continua na próxima página*

Tabela 1 – Continuação da página anterior

NM	Revestimento	Características melhoradas	Tamanho (nm) / Teor (%)	Referências
ZnO	PPC	Propriedades termoeletricas	20 ±5 / 0,2-1,0	39
		Resistência à compressão	100 / 1-5	40
		Propriedade autolimpante e antimicrobiana	100 / 5-15	40, 41
		Atividade fotocatalítica	100 / 3, 6, 9	13
TiO <sub>2</sub>	PPC	Resistência à compressão e flexão	25, 20 / 1-5	42, 36
		Resistência à abrasão	15 / 1, 3, 5	43
		Propriedade autolimpante	25 / 1-5	22
		Atividade fotocatalítica	20-25 / 0-2,5	30, 44, 45
		Resiliência em elevadas temperaturas	30 / 0,5	12
TiO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub>	PPC	Atividade fotocatalítica	530, 20 / 0-10	46, 47
NTC	CA	Módulo de elasticidade	60-150 / 1-2	17
		Resistência à deformação permanente e fadiga	10-15 / 1-3	16, 48
		Módulo complexo	10-15 / 1-3	16, 49
		Módulo de resiliência	5-10 / 0-1	50
NA	CA	Propriedades reológicas	até 1 / 1-3	36
		Resistência à compressão e cisalhamento	20-30 / 2, 4	17
		Aumento da vida útil	- / 4	51
		Resistência à fadiga	10-15 / 1-3	16, 36
		Módulo complexo	- / 2-4	52

Fonte: a autora.

RV: revestimento

PPC: peça pré-moldada de cimento

CA: concreto asfáltico

Tamanho (nm): diâmetro dos NMs usados

REF: referência bibliográfica

Para NMs em pó, como é o caso daqueles utilizados nesta pesquisa, eles são incorporados ao cimento Portland antes da adição dos agregados minerais e da água. Utiliza-se este método pois a moldagem das PPCs exige que o concreto mantenha sua forma ao ser moldado (concreto seco), e com isso sua trabalhabilidade não favorece a mistura materiais após a adição da água.

Deste modo, todo o NM adicionado ao pavimento ficará suspenso na pasta de cimento que envolve os agregados minerais.

Para o concreto asfáltico, os NMs em pó são adicionados ao ligante asfáltico com o auxílio de um misturador de alto cisalhamento, visto que o ligante asfáltico é um material viscoelástico, o que impossibilita a incorporação através do método utilizado para as PPCs. Após a nanomodificação do ligante asfáltico, os agregados minerais são revolvidos e todo o NM adicionado ficará disponível no ligante, conferindo as alterações mecânicas listadas na Tabela acima. Sabe-se, então, que os NMs ficam contidos na parte adesiva do revestimento, a qual é mais suscetível às ações do clima e do tráfego, podendo se desprender com o passar do tempo.

### 3.2 PERDA DE NANOMATERIAIS PARA O AMBIENTE

A lixiviação é o processo de transferência de uma substância (composto orgânico ou inorgânico) presente em uma fase sólida para uma líquida por meio de dissolução no meio extrator (53). É um fenômeno complexo e ocorre na natureza como resultado de processos físicos e químicos de intemperismo (54).

Embora se argumente que os NMs incorporados em compósitos não serão significativamente liberados ou reativos no ambiente, a lixiviação de materiais perigosos de vários produtos comerciais foi relatada anteriormente, incluindo o chumbo de tintas, amianto de telhas, bisfenol-A de recipientes para alimentos e ftalatos de plásticos (18). Além da liberação potencial durante a manipulação, os produtos contendo NM podem estar sujeitos a estresse físico e químico, como abrasão mecânica, irradiação UV e lixiviação (chuva, lavagem) durante seu ciclo de vida, o que pode levar à liberação de materiais com propriedades novas ou dos NMs adicionados (55).

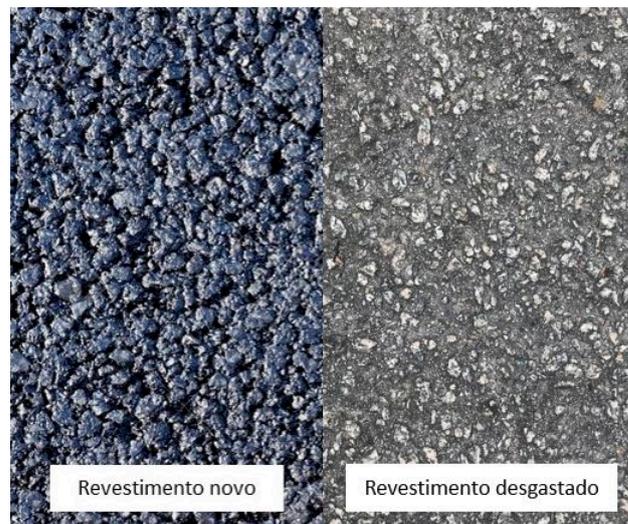
No caso da pavimentação, a lixiviação de materiais pode ocorrer por diversos fatores. Um exemplo claro ocorre logo após a abertura de vias com revestimento novo. Durante este período, há um desgaste da película de ligante asfáltico (para os revestimentos flexíveis) ou da pasta de cimento (para os pavimentos rígidos ou intertravados) que recobre os agregados presentes na interface pneu-pavimento, sendo este fenômeno comprovado através do aumento no coeficiente de atrito nas idades iniciais do revestimento (56).

A Figura 4 mostra uma comparação visual entre o revestimento asfáltico novo e após certo tempo em serviço. É possível observar, na imagem do lado esquerdo, que o ligante asfáltico está recobrendo totalmente os agregados presentes no revestimento. Já na imagem do lado direito, é possível notar pontos mais claros na superfície, os quais representam os agregados minerais que sofreram desgaste, resultando na perda da camada superficial de ligante asfáltico que os recobria anteriormente.

Na Figura 5 é nítida a diferença da PPC fotocatalítica nova para a PPC fotocatalítica que permaneceu em serviço por 1 ano. Observa-se que a PPC nova possui uma superfície homogênea e sem a presença aparente de agregados, os quais estão totalmente recobertos pela

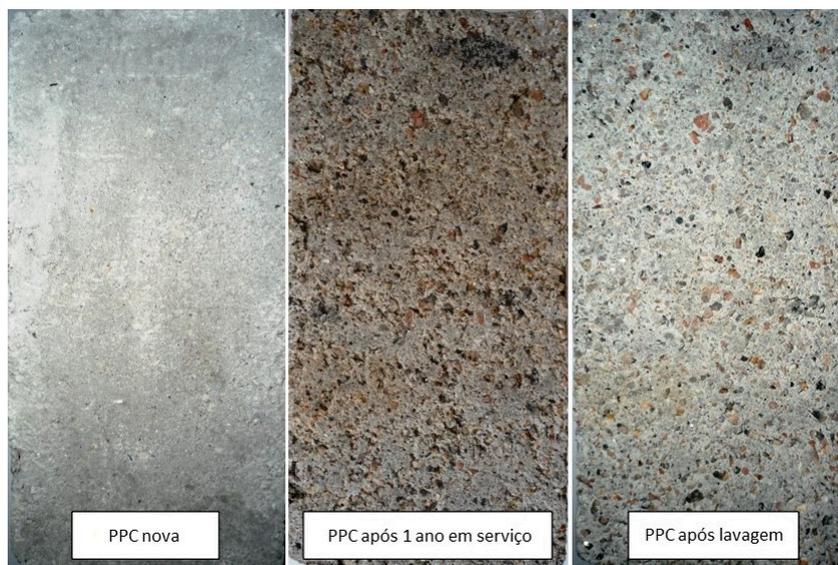
pasta de cimento Portland. A imagem da PPC fotocatalítica após 1 ano em serviço apresenta uma coloração mais escura proveniente de materiais particulados presentes no ambiente, como poeira, fuligem, entre outros. Nela, é possível notar o aparecimento dos agregados na superfície, os quais ficam muito nítidos na terceira imagem, após a lavagem da PPC. Observa-se uma grande diferença na textura superficial entre a PPC nova e a PPC após 1 ano em serviço. Tal diferença decorre do desgaste superficial causado por fatores como intempéries, tráfego de veículos, entre outros (14).

Figura 4 – Comparação da textura superficial de revestimento asfáltico antes e após o uso



Fonte: a autora.

Figura 5 – Comparação da textura superficial da PPC fotocatalítica antes e após o uso



Fonte: Melo *et al.* (2012).

Melo *et al.* (2012) verificaram também que a redução na perda de eficiência fotocatalítica dos pavimentos que pode ocorrer devido a vários fatores, dois dos quais são de maior importância: o primeiro, parcialmente reversível, está relacionado à impregnação de sujeira na superfície dos blocos; e o segundo, totalmente irreversível, é caracterizado pelo desgaste da pasta fotocatalítica, expondo agregados na superfície do bloco. Este fato reforça a possível liberação de NMs para o ambiente a longo prazo, através de danos como desgaste superficial e abrasão das infraestruturas (57), causados pelo tráfego, intemperismos e outros fatores.

Uma vez que os NMs são liberados no meio ambiente, é necessário de entender seu destino e transporte, a fim de determinar em quais ambientes tais materiais têm maior probabilidade de ocorrer ou mesmo de se acumular e, portanto, quais organismos estão mais propensos a serem expostos (58). Ainda existem muitas incógnitas relacionadas aos NMs, particularmente no que diz respeito a seus potenciais impactos ambientais e à saúde humana se forem liberados no meio ambiente (59). Estas lacunas dizem respeito às possíveis transformações físicas, químicas e biológicas que podem alterar as propriedades dos NMs, dificultando o entendimento de quais impactos pode causar e qual seu destino no ambiente (19, 60).

Uma compreensão abrangente do potencial de tais liberações ao longo de todo o ciclo de vida e seus possíveis efeitos é crucial para garantir o uso seguro e sustentável desses novos materiais (59). Portanto, o principal objetivo dos testes toxicológicos a serem realizados neste estudo, é buscar avaliar o fenômeno da lixiviação dos NMs presentes nos pavimentos e descobrir se este processo pode causar impactos negativos ao ambiente.

### 3.3 PRINCIPAIS PONTOS DO CAPÍTULO

- A nanotecnologia e os nanomateriais surgem como uma ferramenta com novas propriedades de grande interesse para diversas áreas do conhecimento. Na área da infraestrutura, vislumbra a redução de problemas mecânicos e reológicos muito comuns em pavimentos flexíveis, além de poder contribuir na degradação dos NO<sub>x</sub> através da fotocatalise proporcionada pela adição de  $TiO_2$ , por exemplo, no revestimento de cimento Portland;
- Apesar das variadas melhorias proporcionadas pelos NMs, existe a possibilidade da liberação destes no ambiente e o risco de causarem impactos negativos significativos. É fato conhecido que, tanto no pavimento flexível, quanto no pavimento de cimento Portland (rígido ou intertravado), a ação do tráfego e intemperismos causa o desgaste da superfície do revestimento, podendo provocar a lixiviação destes NMs que serão carregados até o ambiente;
- É primordial o entendimento do comportamento de materiais nanomodificados antes da sua exposição ao ambiente para que novos produtos não coloquem em risco a saúde humana e do ambiente.



## 4 NANOTOXICOLOGIA

Apesar das boas perspectivas para o futuro da nanotecnologia, existe uma preocupação crescente de que a exposição humana e ambiental aos nanomateriais (NMs) possa resultar em efeitos adversos significativos (58). Devido ao seu tamanho, os NMs tem facilidade em se depositar no trato respiratório, penetrar na pele ou passar diretamente para dentro ou através das células e, finalmente, translocar-se para outras partes do corpo (61). Além disso, materiais inertes em sua forma *bulk*, isto é, em escala macrométrica, podem se tornar tóxicos em sua versão nanométrica, como é o caso do ouro (62).

O uso responsável de NMs manufaturados exige uma melhor compreensão de sua mobilidade, biodisponibilidade e impactos em uma ampla variedade de organismos (63). Para isto, utiliza-se uma abordagem multidisciplinar entre toxicologistas e especialistas em ciência de materiais, química, física, biotecnologia, engenharia e outras disciplinas convenientes (61). O progresso desta nova classe de materiais depende fortemente da nanotoxicologia, a qual se encarrega dos perfis toxicológicos de NMs e busca esclarecer como eles afetam os sistemas vivos (64, 65). O desenvolvimento de metodologias para caracterizar NMs em amostras biológicas, quantificá-los em sistemas vivos, estudar sua absorção, translocação, biodistribuição, acumulação e estado químico *in vitro* e *in vivo* permitem compreender possíveis consequências tanto em curto quanto longo prazo (66). Além disso, para alcançar a nanotecnologia ambientalmente responsável na construção civil, é importante considerar os impactos do ciclo de vida dos NMs na saúde dos trabalhadores e moradores, bem como os efeitos ambientais não intencionais em todas as fases de fabricação (18).

Diversos estudos relataram os efeitos toxicológicos da exposição de organismos à diferentes NMs isolados. A Tabela 2 apresenta alguns destes efeitos encontrados na literatura para os NMs estudados nesta pesquisa em seu estado puro e isoladamente. Alguns dos efeitos encontrados podem ser altamente danosos, como é o caso do dano ao DNA mitocondrial, o qual pode causar um acúmulo de mutações resultando numa disfunção mitocondrial que está associada ao surgimento de câncer (67).

Tabela 2 – Toxicidade dos NMs isoladamente.

Nanomaterial	Efeitos observados	Referências
<i>ZnO</i>	Antibacteriano (água e solo)	68
	Redução na germinação e crescimento de raízes	69
	Efeitos pulmonares em animais	70
	Dano ao DNA mitocondrial	71, 72
	Inflamação no pâncreas	73, 74
<i>TiO<sub>2</sub></i>	Antibacteriano (água e solo)	68
	Inflamação pulmonar em roedores	72, 70
	Inibição de crescimento em <i>E. fetida</i>	73

*Continua na próxima página*

Tabela 2 – Continuação da página anterior

<b>Nanomaterial</b>	<b>Efeitos observados</b>	<b>Referências</b>
	Dano ao DNA mitocondrial	75, 76
	Estresse oxidativo pela produção de ROS	77, 78
<b>NTC</b>	Antibacteriano	79
	Dano na membrana celular, necrose	80, 81
	Dano ao DNA mitocondrial	82, 83
	Indução de granulomas e fibroses	76, 84
	Inflamação pulmonar e estresse oxidativo	85
<b>NA</b>	Baixa toxicidade em protozoários	86
	Baixa citotoxicidade	87, 86
	Baixa toxicidade aguda em ratos	87
	Dano na membrana celular	88
	Potencial inflamação pulmonar	89

Fonte: a autora.

Recentemente, Chen *et al.* (2018) analisou o comportamento de lixiviação de amostras de argamassa e concreto contendo cinzas da co-combustão de lodo proveniente de estações de tratamento de esgoto e cinzas de casca de arroz, quantificando e qualificando os metais pesados liberados no procedimento de lixiviação. Gwenzi e Mupatsi (2016) avaliaram a lixiviação de metais pesados provenientes de cinza de carvão e de detritos de concretos convencionais com o objetivo de atestar a segurança na incorporação desses materiais no concreto sem impactos adversos ao público e ao meio ambiente. Apesar do elevado número de pesquisas que relatam a toxicidade de diferentes NMs de forma isolada, são inexistentes as que abordam os NMs inseridos em revestimentos de CA e PPC. Em contrapartida, no âmbito da pesquisa em construção civil, observa-se um grande quantidade de estudos que realizam ensaios de lixiviação buscando entender o comportamento de resíduos considerados passivos ambientais inseridos em materiais de construção. Contudo, são raros os estudos que realizam testes toxicológicos com o lixiviado, aparecendo prioritariamente a identificação e quantificação de metais pesados presentes no lixiviado.

#### 4.1 TESTES DE TOXICIDADE

A toxicidade de NMs em organismos tem sido amplamente estudada visando o desenvolvimento seguro desses materiais para utilização no ambiente, na indústria e na medicina (58). A ação de substâncias tóxicas nos organismos pode causar efeitos letais e sub-letais, como a mudança na taxa de crescimento, na reprodução e no desenvolvimento, provocadas por alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais. Essas respostas podem culminar em patologias e/ou formação de tumores (92), o que justifica a necessidade de intensas avaliações dos produtos contendo NMs antes da liberação comercial.

Testes de toxicidade são meios eficazes de avaliar a qualidade das águas e a carga poluidora de efluentes, uma vez que as análises físico-químicas tradicionais, cujos limites encontram-se legalmente estabelecidos, não são capazes de distinguir entre as substâncias que afetam os sistemas biológicos e as que são inertes no ambiente, tornando-se insuficientes para avaliar o potencial risco ambiental dos contaminantes (93). Desta forma, os testes toxicológicos são utilizados para avaliar quais concentrações e tempo de exposição a agentes xenobióticos são suficientes para produzir efeito adverso no organismo-teste, ou seja, um teste toxicológico é desenvolvido para mensurar o grau da resposta produzida por um nível específico de estímulo - concentração do composto em estudo (94). Os testes de toxicidade podem ser realizados no local (*in situ*) ou em laboratório e podem avaliar, entre outros, os efeitos agudos ou crônicos da exposição aos xenobióticos.

Os testes de toxicidade aguda são experimentos laboratoriais realizados sob condições específicas e controladas, que visam avaliar a toxicidade de um agente nocivo através da exposição de uma espécie-teste em um curto período de tempo (95). Restrepo (2013) afirma que o efeito toxicológico agudo é uma resposta rápida, e muitas vezes abrupta, dos organismos aquáticos a um determinado estímulo, o qual se manifesta, em geral, num intervalo de 0 a 96 horas. Os efeitos observados neste tipo de teste são a letalidade ou a inibição do movimento em organismos aquáticos. A toxicidade depende da concentração, das propriedades da substância química à qual o organismo é exposto, e do tempo de exposição (97). Desta forma, os resultados da avaliação dos efeitos agudos de substâncias potencialmente tóxicas são geralmente fornecidos através do cálculo da Concentração Letal (CL) ou a Concentração Efetiva (CE) (95, 93). A CL e CE expressam a dose e/ou a concentração da substância que provoca morte ou imobilidade de 50% dos organismos expostos por um tempo determinado que varia conforme o organismo-teste utilizado.

Os testes de toxicidade crônica são ensaios de longa duração, que possibilitam avaliar os possíveis efeitos adversos de uma amostra sob condições de exposição contínua a concentrações sub-letais (95, 98). Este ensaio expõe o organismo-teste ao agente potencialmente tóxico durante um período significativo do seu ciclo de vida, incluindo estágios sensíveis como juventude, crescimento, maturidade sexual e reprodução (99). Os principais parâmetros observados neste tipo de teste são os efeitos crônicos sub-letais, como alterações nas atividades respiratórias, cardíacas, bioquímicas, no desenvolvimento morfológico, nas funções biológicas, na reprodução e no crescimento, que não causam necessariamente a morte do organismo (100, 101). Os resultados do teste de toxicidade crônica são expressos na forma de CENO (Concentração de Efeito Não Observado) e CEO (Concentração de Efeito Observado). A CENO é definida como a maior concentração da amostra que não causa efeito significativo aos organismos quando comparado ao controle realizado para o teste. A CEO é definida como a menor concentração da amostra que causa efeito significativo nos organismos testados quando comparado ao controle realizado para o teste (102).

### 4.1.1 Organismos-teste

Os organismos-teste são espécies cultivadas em laboratório que podem ser utilizadas como indicadores da toxicidade dos efluentes. A respeito da escolha do organismo, Rand (1995) destaca: a disponibilidade e abundância do organismo desejado, a uniformidade e estabilidade genética nas populações, a representatividade de seu nível trófico, a ampla distribuição e importância comercial e a facilidade de cultivo e de adaptação às condições de laboratório. Além disso, certos organismos-teste exercem um papel importante no ambiente, pois são a base de ecossistemas e fornecem serviços ambientais essenciais que vão da produtividade primária à ciclagem de nutrientes e decomposição de resíduos (103). Deste modo, organismos que interagem diretamente com seu ambiente imediato, como algas, plantas, fungos e invertebrados, tendem a ser afetados pela exposição à NMs (104). Na Tabela 3 podem ser observados alguns organismos-teste utilizados para caracterizar a toxicidades de NMs puros em diferentes pesquisas científicas.

Tabela 3 – Exemplos de organismos-teste utilizados para caracterizar a toxicidade de NMs

NM	Organismos-teste	Família	Referências
ZnO	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Selenastraceae	105
	<i>Aliivibrio fischeri</i>	Vibrionaceae	106, 107
	<i>Daphnia magna</i>	Daphniidae	106
	<i>Lemna minor</i>	Araceae	108
	<i>Danio rerio</i>	Cyprinidae	109
	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	110, 111
TiO <sub>2</sub>	<i>Vibrio fischeri</i>	Vibrionaceae	68
	<i>Daphnia magna</i>	Daphniidae	72, 70
	<i>Lemna minor</i>	Araceae	112
	<i>Danio rerio</i>	Cyprinidae	109
	<i>Escherichia coli</i>	Enterobacteriaceae	110
	<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Selenastraceae	105
NTC	<i>Daphnia magna</i>	Daphniidae	79
	<i>Ceriodaphnia dubia</i>	Daphniidae	80, 81
	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Rhabditidae	113
NA	<i>Paramecium caudatum</i>	Parameciidae	86
	<i>Rattus norvegicus</i>	Muridae	114
	Células epiteliais brônquicas humanas	-	115

Fonte: elaborado pela autora.

Dentre as vantagens dos testes toxicológicos com algas, micro-crustáceos e peixes, observa-se: a padronização do cultivo e ensaios, os quais são definidos em normas técnicas consolidadas que garantem a reprodutibilidade dos resultados (116, 117, 103), a possibilidade de avaliar os efeitos toxicológicos em diferentes níveis tróficos com sensibilidades diferenciadas (118, 93), e a manifestação de pontos toxicológicos extremos relevantes como mortalidade,

imobilidade, além de alteração no comportamento e reprodução (117, 119). A seguir, serão descritos os organismos-teste *Daphnia magna* e *Landoltia punctata*, os quais foram utilizados nesta pesquisa para avaliar a toxicidade dos lixiviados de revestimentos asfáltico e de concreto de cimento Portland.

- ***Daphnia magna***

A *Daphnia magna* STRAUS, 1820 (Cladocera, Crustacea) (Figura 6) é um micro crustáceo planctônico de água doce, com tamanho médio de 5 a 6 mm, o qual atua na cadeia alimentar aquática como consumidor primário, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado presente no meio (120, 103). Em condições ambientais favoráveis reproduz-se assexuadamente por partenogênese, originando apenas fêmeas idênticas aos originais (121). De acordo com Fuzinatto (2009), o tempo de vida médio de cada indivíduo varia entre 40 e 50 dias, podendo mudar dependendo das condições ambientais.

Figura 6 – Microcrustáceo *Daphnia magna* adulta



Fonte: Kato *et al.* (2011).

- ***Landoltia punctata***

A espécie *Landoltia punctata* (Figura 7) é caracterizada por possuir frondes flutuantes na superfície, ovaladas e lanceoladas, levemente assimétricas, 1,5 a 2 vezes mais longas que largas, algumas vezes com bordos avermelhados; 2 a 5 raízes por fronde com 15 mm de comprimento (123). Originalmente, essa macrófita aquática ocorria apenas no Hemisfério Sul e Leste asiático; introduzida atualmente em todos os continentes com inverno suave. Distribuiu-se do Sudeste do Brasil até o leste do Paraná (124). Porém, recentemente, esta espécie tem sido encontrada com abundância também em Santa Catarina (125).

Figura 7 – Macrófita aquática *Landoltia punctata* - detalhe das frondes

Fonte: Otto e Verloove (2016).

Essas macrófitas são uma espécie atrativa para teste de toxicidade, não somente por causa das suas importantes funções ecológicas, mas também por serem de fácil manuseio e cultivo, por ter elevada taxa de crescimento em condições de laboratório e serem sensíveis a diferentes poluentes (127).

#### 4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS ISOLADOS

A caracterização de NMs para o estudo toxicológico é complexa, com uma variedade de atributos a serem considerados (128). De acordo com Kunzmann *et al.* (2011), as propriedades físico-químicas dos NMs, tais como carga e tamanho, podem alterar interações celulares por exemplo, causando efeitos adversos inesperados. Navarro *et al.* destaca que propriedades de superfície dos NMs são de fundamental importância para o seu comportamento de agregação, influenciando na mobilidade em meios aquáticos e terrestres e nas interações com algas, plantas e fungos. Por isso, é importante entender como as diferentes características físico-químicas dos nanomateriais afetam sua distribuição e comportamento *in vivo* (130).

A caracterização de NMs é realizada em diferentes níveis. Alguns métodos de caracterização são usados para estudar os tamanhos, perfis e morfologia das nanoestruturas, enquanto outros são usados para obter informações estruturais detalhadas. As estruturas dos materiais podem ser estudadas em vários níveis de sofisticação, incluindo estrutura cristalina, microestrutura, em nível de átomo e eletrônica (131). Lin *et al.* cita como parâmetros a serem determinados para NMs, dimensão, porosidade, área superficial, forma, potencial zeta, isoterma de adsorção, agregação e impurezas.

Muitos métodos têm sido usados para avaliar NMs manufacturados, incluindo técnicas em espectroscopia óptica, microscopia eletrônica, varredura de superfície, espalhamento de luz, dicroísmo circular, ressonância magnética, espectrometria de massa, espalhamento de raios-X, e medidas de zeta-potencial, bem como técnicas para caracterização de propriedades térmicas,

centrifugação, cromatografia e eletroforese (132, 133). Os métodos descritos a seguir foram utilizados na caracterização dos NMs em pó, de modo a compreender o comportamento de cada um deles isoladamente.

#### 4.2.1 Morfologia e Tamanho

A microscopia é uma importante técnica de caracterização de NMs, uma vez que fornece informações sobre tamanho e morfologia dos materiais. A Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) consiste de um feixe de elétrons e um conjunto de lentes eletromagnéticas encerrados numa coluna em vácuo, viabilizando uma faixa de magnificação entre 50 a 600.000 vezes (98).

O equipamento de MET consegue exibir imagens a uma resolução significativamente maior em comparação aos microscópios óticos. Isto se deve ao pequeno comprimento de onda dos elétrons presentes no topo da coluna do microscópio (95).

#### 4.2.2 Estabilidade em Suspensão

O Potencial Zeta (PZ) é o parâmetro que controla as interações eletrostáticas das partículas em dispersão exercendo papel importante na compreensão da estabilidade das dispersões (134). O PZ reflete a diferença de potencial entre a dupla camada elétrica de partículas eletroforicamente móveis e a camada de dispersante ao redor deles no plano hidrodinâmico de cisalhamento. A maioria das dispersões coloidais em meio aquoso carrega uma carga elétrica e o desenvolvimento dessa carga na superfície da partícula afeta a distribuição de íons na região interfacial circundante (134, 135). O PZ depende não somente da superfície da partícula, mas também do pH ou força iônica do meio dispersante.

NM com potencial zeta entre -10 e +10 mV são consideradas aproximadamente neutras, enquanto NMs com potencial zeta maior que +30 mV ou menor que -30 mV são consideradas fortemente catiônicas e fortemente aniônicas, respectivamente, conferindo uma maior estabilidade da suspensão, ou seja, maior resistência a agregação. Como a maioria das membranas celulares é carregada negativamente, o potencial zeta pode afetar a tendência de um NM em permear membranas, com partículas catiônicas geralmente exibindo mais toxicidade associada à ruptura da parede celular (136). Quando o PZ é baixo, a atração supera a repulsão e as partículas tendem a aproximar-se mais, aumentando a probabilidade de uma colisão, ocorrendo a aglomeração e floculação (98).

#### 4.2.3 Diâmetro Efetivo e Índice de Polidispersão

O Diâmetro Efetivo (DE) é considerado como sendo o diâmetro de uma esfera que tem o mesmo coeficiente de difusão translacional da partícula medida, assumindo uma camada de hidratação envolvendo-a. A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS), empregada na determinação do DE, emite um feixe de luz monocromático sobre a amostra e capta o

espalhamento da luz através de um detector, gerando gráficos de flutuação de intensidade e distribuição de frequência (95).

O Índice de Polidispersão é usado para descrever o grau de não uniformidade da distribuição do tamanho de partículas. Esse índice é adimensional e classifica os valores na faixa de 0,05 a 0,7, de modo que valores menores que 0,05 são vistos principalmente com padrões altamente monodispersos e valores maiores que 0,7 indicam que a amostra possui uma distribuição de tamanho de partícula muito ampla e provavelmente não é adequada para ser analisada pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) (137).

#### 4.2.4 Identificação de Grupos Funcionais

A espectroscopia no infravermelho se baseia no fato de que as ligações químicas das substâncias possuem frequências de vibração específicas, as quais correspondem a níveis de energia da molécula, ditos níveis vibracionais. Os níveis de vibração das moléculas dependem de diversos fatores, como geometria molecular, massas dos átomos, e acoplamento de vibrações. Se a molécula receber radiação eletromagnética com a mesma energia de uma dessas vibrações, a luz será absorvida somente se a molécula sofrer uma variação no seu momento dipolar durante essa vibração (138).

A Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) é uma técnica de análise onde a luz infravermelha é guiada através de um interferômetro que medirá o sinal que passou pela amostra, resultando no interferograma. Ao efetuar uma transformada de Fourier no sinal, é obtido um espectro idêntico ao da espectroscopia infravermelha convencional (138).

### 4.3 TESTES DE LIXIVIAÇÃO

Os testes de lixiviação são utilizados para determinar a capacidade de transferência dos constituintes de um sólido para uma solução aquosa (meio extrator) (53). Deste modo, estes testes permitem gerar dados que poderão ser utilizados para modelar a migração de contaminantes em condições reais, prevendo os riscos relacionados à destinação final destes materiais. Contudo, existem diversos fatores que afetam a lixiviabilidade dos materiais, dentre os principais estão: a alcalinidade do produto estabilizado; a proporção entre a superfície e o volume do resíduo; e as rotas de difusão (139). Deste modo, algumas condições dos testes de lixiviação podem ser modificadas com o objetivo de avaliar parâmetros que afetarão o comportamento dos materiais no ambiente (140).

Os testes de lixiviação podem ser classificados em duas grandes categorias com base no fato do lixiviante ser ou não renovado: 1) testes de lixiviação de extração e 2) testes de lixiviação com troca do lixiviante (testes dinâmicos).

Nos testes de lixiviação de extração, o lixiviante não é renovado. Durante o teste, a solução lixiviante está em contato com o material por um período de tempo específico (141). O lixiviado é separado do sólido, podendo ser analisado em vários momentos durante o teste,

ou na maioria dos testes de extração, no final do teste (142).

Nos testes de lixiviação com troca do lixiviante, a solução lixiviante é continuamente ou intermitentemente renovada para manter o processo de lixiviação. Este tipo de teste pode também ocorrer com períodos secos para verificar o efeito da desidratação no processo de lixiviação. São utilizados para avaliar mecanismos mais complexos a respeito da cinética e mobilidade de contaminantes (141).

No Brasil, o teste reconhecido oficialmente por organismos fiscais para a avaliação de materiais é aquele regulamentado pela NBR 10005, o qual é baseado no TCLP (*Total Characteristics Leaching Procedure - EPA*) (141). Este tipo de teste é utilizado com caráter regulatório, possibilitando verificar se os componentes do lixiviado estão de acordo com os limites estipulados em norma. Contudo, não é possível gerar previsões para modelar a migração de contaminantes em condições reais somente com este tipo de teste (139).

O TCLP é amplamente utilizado para avaliar a eficácia da estabilização de passivos ambientais em matrizes sólidas, contudo ele é criticado pelo fato de exigir o rompimento da massa monolítica estabilizada para a execução do ensaio, o que pode aumentar a lixiviabilidade do material. Deste modo, os resultados obtidos são conservadores e podem não condizer com a realidade (139, 141). Por isso, este teste é tido como regulamentar, apresentando resultados de concentrações que podem ser comparados com padrões normatizados (142).

Apesar de criticado, o TCLP tem sido amplamente utilizado para avaliar o comportamento de materiais nocivos estabilizados em matrizes sólidas. Chen *et al.* (2018) avaliaram o comportamento da lixiviação e propriedades cimentícias da adição de cinzas de co-combustão de casca de arroz e lodo de esgoto em argamassa utilizando TCLP. Nath (2020) utilizou esta metodologia para verificar a imobilização de materiais perigosos (cinzas colantes e escória de zinco) em blocos de pavimentação. (144) realizou a avaliação da lixiviação de metais pesados de produtos de incineração de agregados reciclados e de solidificação/estabilização para reutilização da construção utilizando TCLP.

#### 4.4 PRINCIPAIS PONTOS DO CAPÍTULO

- A nanotoxicologia possibilita descrever o perfil toxicológico de diversos nanomateriais com grande potencial de utilização e entender quais os principais efeitos observados para cada um deles;
- Os testes de toxicidade tem sido amplamente utilizados por serem muito eficazes em avaliar quais concentrações e tempo de exposição a agentes xenobióticos podem produzir efeitos adversos no organismo-teste;
- Existem diferentes tipos de testes toxicológicos normatizados, os quais podem variar de acordo com o tipo de organismo utilizado, tipo de efeito que se busca observar e tipo de material a ser testado. Nesta pesquisa serão utilizados testes de toxicidade aguda

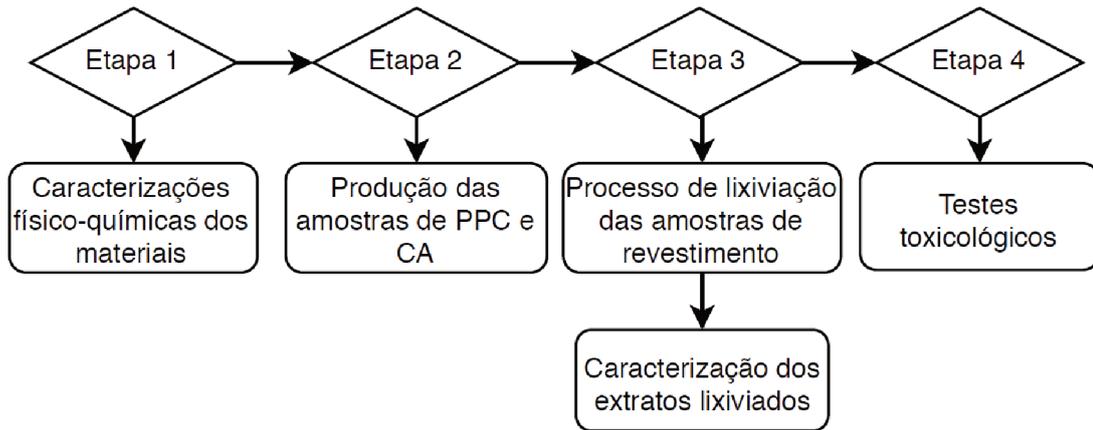
(curta duração) com o micro-crustáceo *D. magna* e com a macrófita *L. punctata*, além de teste de toxicidade crônica (longa duração) com *D. magna*;

- A caracterização dos NM exerce importância fundamental no entendimento do comportamento de agregação, mobilidade e acumulação. Os resultados da caracterização auxiliam na compreensão dos mecanismos de toxicidade dos materiais e de como eles se comportarão no ambiente.

## 5 METODOLOGIA

Esta dissertação é um trabalho colaborativo e interdisciplinar entre os Programas de Pós-Graduação em Engenharia Civil e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina. A pesquisa foi organizada em quatro etapas, conforme a Figura 8.

Figura 8 – Fluxograma geral do programa experimental.



Fonte: elaboração própria.

A **Etapa 1** compreende a caracterização físico-química dos materiais em escala nanométrica, bem como dos demais materiais utilizados na produção das amostras de revestimento de referência e modificados com os 5 diferentes NMs; A **Etapa 2** conta com a formulação e obtenção das amostras de revestimento nano-modificadas com *ZnO*, *TiO<sub>2</sub>*, *TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub>*, *NTC* e *NA*, efetuada no Laboratório de Pavimentação (Engenharia Civil - UFSC); A **Etapa 3** engloba os procedimentos de lixiviação e, por fim, a **Etapa 4** na qual foram realizados testes toxicológicos com o extrato lixiviado dos 7 revestimentos e com os 5 nanomateriais em pó, além da avaliação dos efeitos quali-quantitativos nos organismos, ambas executadas no Laboratório de Toxicologia Ambiental - LABTOX (Engenharia Sanitária e Ambiental - UFSC).

### 5.1 ETAPA 1 - CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DOS MATERIAIS

#### 5.1.1 Cimento Portland

Para a produção das PPCs foi utilizado o Cimento Portland Composto com Pozolana - CP II Z 40, cujo produto é normalizado pela NBR 11578 (1991) Versão Corrigida 1997: Cimento Portland Composto. As características físicas e químicas do cimento utilizado nesta pesquisa foram obtidas junto a Votorantim Cimentos e estão dispostas na Tabela 4.

Tabela 4 – Caracterização do cimento Portland.

<b>Características químicas</b>	<b>Resultado</b>
Perda ao fogo	5,43%
Óxido de magnésio - $MgO$	5,76%
Anidrido sulfúrico - $SO_3$	2,79%
Resíduos insolúveis	11,2%
Equivalente Alcalino em $Na_2O$	0,72%
<b>Características físicas e mecânicas</b>	<b>Resultado</b>
Finura - resíduo na peneira de 0,075 mm	2,3%
Finura - resíduo na peneira de 0,044 mm	11,3%
Área específica Blaine	372 $m^2/kg$
Massa específica	2,97 $g/cm^3$
Expansibilidade de Le Chatelier - a quente	0,73 mm
Água da pasta de consistência normal	27,9%
Início de pega	257 min
Fim de pega	335 min
Resistência à compressão (3 dias de idade)	33,9 MPa
Resistência à compressão (7 dias de idade)	39,2 MPa
Resistência à compressão (28 dias de idade)	47,4 MPa

Fonte: Votorantim Cimentos(2017).

O cimento escolhido para a confecção das PPCs deste estudo foi utilizado por Melo (2011), Bica (2019) e Rosso (2019) em suas pesquisas, o qual é amplamente utilizado para a confecção comercial deste tipo de revestimento na região de Florianópolis - SC.

### 5.1.2 Agregados Minerais

Os agregados utilizados na pesquisa são britados, com origem mineralógica granítica (granito cinza) e foram fornecidos pela empresa SBM (Sul Brasil Mineração), localizada na cidade Paulo Lopes-SC. As características físicas do material são apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Características físicas do agregado mineral.

<b>Característica</b>	<b>Método</b>	<b>Resultado</b>
Massa Esp. Real do Agregado Graúdo	ASTM C127	2,648 $g/cm^3$
Massa Esp. Aparente do Agregado Graúdo	ASTM C127	2,592 $g/cm^3$
Massa Esp. Real do Agregado Miúdo	DNER ME 084	2,674 $g/cm^3$
Massa Esp. Real do Material Pulverulento	DNER ME 085	2,803 $g/cm^3$
Material Pulverulento	ASTM C117	8,02%
Angularidade do Agregado Graúdo	ASTM D 5821	100%

Continua na próxima página

Tabela 5 – Continuação da página anterior

Característica	Método	Resultado
Angularidade do Agregado Miúdo	ASTM C 1252	52,36%
Abrasão Los Angeles	ASTM C 131	18,64%
Sanidade	ASTM C 88	1,59%
Equivalente de Areia	AASHTO T 176	71,95%
Materiais Deletérios	AASHTO T 112	0,00%
Índice de Forma	ABNT NBR 6954	CÚBICA
Absorção do Agregado Graúdo	ASTM C127	1,43%
Diâmetro Máximo	ASTM C136/C136M	19,1 mm

### 5.1.3 Ligante Asfáltico

Os ligantes asfálticos nano-modificados foram preparados a partir do CAP 50-70 proveniente da refinaria REPAR localizada na Rodovia do Xisto, km 16 da BR-476, no município de Araucária-PR. A Tabela 6 apresenta os resultados da caracterização do ligante CAP 50-70 e os métodos utilizados em cada ensaio, conforme laudo técnico do fornecedor (REPAR, 2017).

Tabela 6 – Características do ligante asfáltico conforme laudo do fornecedor.

Propriedade CAP 50-70	Norma ASTM	Resultado	Limite
Densidade	D 70	1,004	-
Ponto de Amolecimento (°C)	D 36	48,2	-
Penetração 100g, 5s, 25°C ( $10^{-1}$ mm)	D 5	58	50-70
Viscosidade aparente (Brookfield)			
a 135°C, SP 21, 20 rpm, mín (cP)	D 4402	293	274
a 150°C, SP 21, mín (cP)	D 4402	151	112
a 177°C, SP 21 (cP)	D 4402	59	57-285
Viscosidade Saybolt Furol			
Viscosidade Brookfield 170GC-SP21	D 4402	64	cP
a 135°C, mín (s)	E 102	152,5	141
a 150°C, mín (s)	E 102	80,5	50
a 177°C, mín (s)	E 102	32,3	30-150
Índice de Suscetibilidade Térmica	X 018	-1,3	-1,5 a 0,7
RTFOT			
Penetração retida, mín (%)	D 5	63	55
Aumento do ponto de amolecimento, máx (°C)	D 36	3,6	8
Ductibilidade a 25°C, mín (cm)	D 113	> 100	20

*Continua na próxima página*

Tabela 6 – Continuação da página anterior

Propriedade CAP 50-70	Norma ASTM	Resultado	Limite
Varição em porcentagem de massa (%)	D 2872	-0,257	-0,5 a 0,5
Ponto de fulgor, mín (°C)	D 92	280	235
Ductibilidade a 25°C, mín (cm)	D 113	> 100	60
Solubilidade no Tricloroetileno, mín (% massa)	D 2042	99,9	99,5
Aquecimento a 177°C	X 215	NESP	NESP

Fonte: refinaria REPAR.

Nesta pesquisa, foi utilizado o ligante CAP 50-70, o qual foi objeto da pesquisa de doutorado de Melo (2014), o qual estudou nanocompósitos asfálticos no Departamento de Pós-graduação da Engenharia Civil - UFSC. Além disso, o CAP 50-70 é um dos mais utilizados e de grande produção no país (146).

#### 5.1.4 Caracterização dos Nanomateriais

Nesta pesquisa, foram avaliados cinco tipos de NMs comerciais, são eles: *NA*, *NTC*, *TiO<sub>2</sub>*, *TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub>* e *ZnO*, os quais foram estudados por Melo (2011), Melo (2014), Rosso (2019) e Bica (2019), no Departamento de Pós-graduação da Engenharia Civil - UFSC. Com isso, foram utilizados nesta pesquisa os percentuais de incorporação de NMs que obtiveram melhores resultados nos trabalhos citados anteriormente, tanto com relação às características de desempenho mecânico no caso das misturas asfálticas, quanto à eficiência fotocatalítica no caso das PPCs. Além disso, as amostras de revestimento foram elaboradas conforme descrito na metodologia dos trabalhos supracitados, de modo a garantir a reprodutibilidade das propriedades dos revestimentos.

Os NMs (*ZnO*, *TiO<sub>2</sub>*, *TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub>* e *NTC*) utilizados neste estudo, foram adquiridos na *Nanostructured & Amorphous Materials, Inc* - Houston, USA. A *NA* montmorilonita modificada com sais quaternários de amônio foi adquirida da *Laviosa Chimica Mineraria S.p.A.* comercializada pelo nome Dellite 67G. Na Tabela 7 estão apresentadas as características físico-químicas dos materiais disponibilizados pelas empresas.

Tabela 7 – Características dos NMs conforme informado pelos fornecedores.

NM	<i>TiO<sub>2</sub></i>	<i>TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub></i>	<i>ZnO</i>	<i>NTC</i>	<i>NA</i>
Pureza	>99%	>94% <i>TiO<sub>2</sub></i> >6% <i>WO<sub>3</sub></i>	>99,5%	>95%	>95%
Tamanho das partículas	10 nm	10 nm	20 nm	*De: 50-80 nm *Di: 5-15 nm *L: 10-20 um	1x500 nm

Continua na próxima página

Tabela 7 – Continuação da página anterior

NM	TiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub>	ZnO	NTC	NA
Morfologia	Elipsoidal e esférica	Esférica	Esférica	Tubular e paredes múltiplas	Camadas
Área Superficial Específica	60 m <sup>2</sup> /g	60 m <sup>2</sup> /g	40 m <sup>2</sup> /g	>40 m <sup>2</sup> /g	
Estrutura Cristalina	Anatase	Anatase revestida com óxido de tungstênio	Wurtzite	Grafeno hexagonal com hibridização sp <sup>2</sup>	Tetraedros de sílica e octaedros de alumínio (montmorilonita)
Densidade	3,9	3,9	5,6	2,1	1,7
pH em água ultra pura	5,5-7,0	5,5-7,0	6,5-7,5	6,5-7,5	7,0-8,0

\*De: diâmetro externo; \*Di: diâmetro interno; \*L: comprimento. Fonte: a autora.

Além das características apresentadas pelas empresas fabricantes dos NMs, foram realizadas outras análises com o objetivo de verificar os dados fornecidos e entender o comportamento dos NMs em meio líquido. Na Tabela 8, encontram-se dispostos os diferentes tipos de caracterização, além do método, equipamento e laboratório em que foram realizadas as análises.

Tabela 8 – Síntese dos métodos físico-químicos para caracterização dos NMs.

NMs	Caracterização	Método	Equipamento	Laboratório
TiO <sub>2</sub> , TiO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub> , NA, NTC, ZnO	Estabilidade em suspensão	Potencial Zeta (PZ)	Nanobrook 90Plus Brookhaven	LABTOX
	Diâmetro Efetivo (DE)	<i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS)	Nanobrook 90Plus Brookhaven	LABTOX
	Morfologia e Diâmetro	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	TEM JEM 1011 (JEOL Ltd., Tokio, Japan)	LCME

Fonte: a autora.

Na sequência serão descritos os ensaios apresentados na Tabela 8, os quais foram realizados com os NMs isoladamente.

#### 5.1.4.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A caracterização das suspensões na escala nanométrica e micrométrica foi realizada através do equipamento JEM-1011 MET – 100KV, no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica - LCME da UFSC. As imagens resultantes permitiram classificar a morfologia e as

dimensões médias dos NMs. A metodologia utilizada para esta análise foi seguida conforme norma do LCME - UFSC.

Para a análise através da MET, os NMs foram suspensos em água de osmose reversa na concentração de 1 g/L e submetidos ao ultrassom por 2 minutos a 23% - 115 W de potência (marca QSonica, Sonicator-Q500, 500 W, Newtown, CT06470, USA), em seguida as amostras foram gotejadas sobre uma grade de carbono-Cu (300 meshes) e armazenadas em um dessecador à vácuo por 24 h para a secagem, de acordo com a metodologia padrão do LCME. A microscopia permitiu verificar a morfologia e tamanho médio das partículas dos NMs estudados.

#### 5.1.4.2 Potencial Zeta (PZ), Diâmetro Efetivo (DE) e Índice de Polidispersão (PDISP)

Para a verificação da estabilidade da solução dos NMs em suspensão isolados, foram realizadas as leituras do DE, PDISP e PZ das suspensões nos diferentes meios de teste. As medições foram realizadas no aparelho Nanobrook modelo 90Plus PALS (Brookhaven, New York - USA), localizado no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) da UFSC.

As suspensões foram preparadas na concentração de 0,1 g/L para cada NM em água ultrapura e nos meios de cultura e diluição definidos por norma para a realização de cada um dos testes de toxicidade. São eles: meio de cultura M4 utilizado no teste de toxicidade crônica com *D. magna* (147), meio de diluição ISO para o teste agudo com *D. magna* (148) e meio de cultivo para o teste de toxicidade com *L. punctata* (149). Todas as suspensões foram solubilizadas com auxílio de sonda metálica de ultrassom Q500 Sonicador da empresa Qsonica por 2 minutos a 23% - 115 W de potência.

Cada meio líquido possui diferentes concentrações de sais em sua composição, fator que pode influenciar largamente no comportamento de dispersão e estabilidade dos NMs utilizados nos testes de toxicidade. Através destas análises é possível verificar, por exemplo, a tendência de certo NM em se aglomerar e se depositar no fundo do recipiente, o que dificulta sua internalização pela *D. magna*.

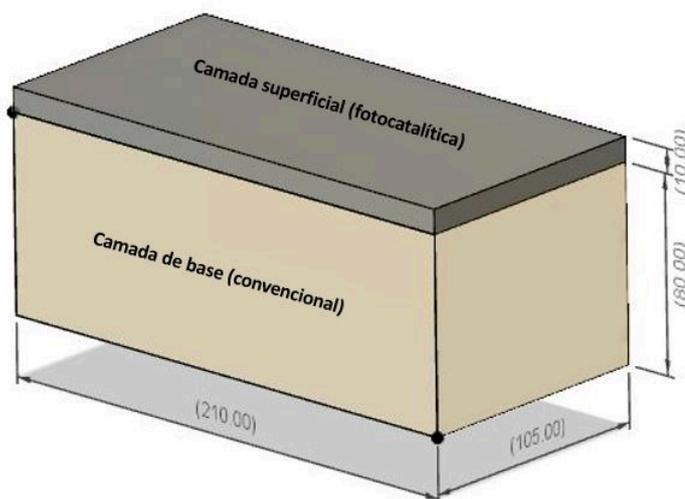
## 5.2 ETAPA 2 - PRODUÇÃO DAS AMOSTRAS DE PPC E CA

### 5.2.1 Formulação e Moldagem das PPCs

Nesta etapa foram produzidas as peças pré-moldadas de referência (0% NMs) e as com adição de  $TiO_2$ ,  $TiO_2/WO_3$  e  $ZnO$ , das quais foram obtidas as amostras de revestimento para o procedimento de lixiviação da etapa 3 do programa experimental. As peças possuem dimensões finais de 10,5 x 21 x 9 cm, contendo uma camada superficial de argamassa fotocatalítica com 1 cm de espessura (Figura 9). Na indústria, esse método de produção é possível com a utilização de vibro-prensas double-cap. Esta configuração é ideal para este tipo de revestimento, uma vez que as reações de fotocatalise ocorrem na interface exposta para a atmosfera, na qual

estão presentes os NMs. A moldagem em laboratório foi realizada com o auxílio de um molde metálico e uma prensa hidráulica.

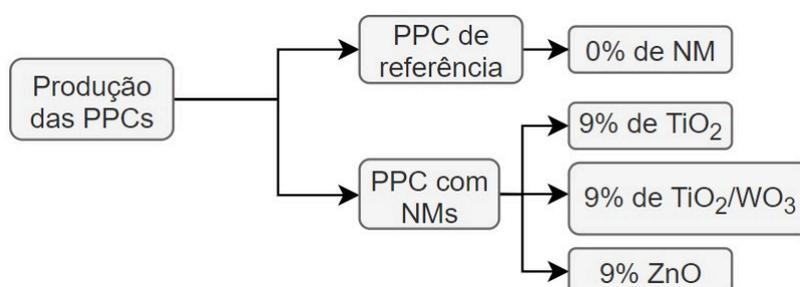
Figura 9 – Desenho esquemático de uma CCP com duas camadas e dimensões em milímetros.



Fonte: a autora.

Foram moldadas 12 PPCs, três para cada um dos seguintes NMs:  $TiO_2$ ,  $TiO_2/WO_3$  e  $ZnO$ , além da referência (sem nanomateriais). Os três NMs foram incorporados nas suas respectivas peças com o teor de 9% em relação a massa de cimento. Este percentual de incorporação foi adotado de acordo com as pesquisas de Melo (2011), Rosso (2019) e Bica (2019), que demonstraram uma relação otimizada entre fotocatalise e resistência mecânica. Todas as amostras de teste foram preparadas, desmoldadas e curadas de acordo com as práticas da ASTM C192/C192M (2018). A Figura 10 apresenta o fluxograma correspondente à elaboração das PPCs.

Figura 10 – Fluxograma da Etapa 2 para as PPC.



Fonte: a autora.

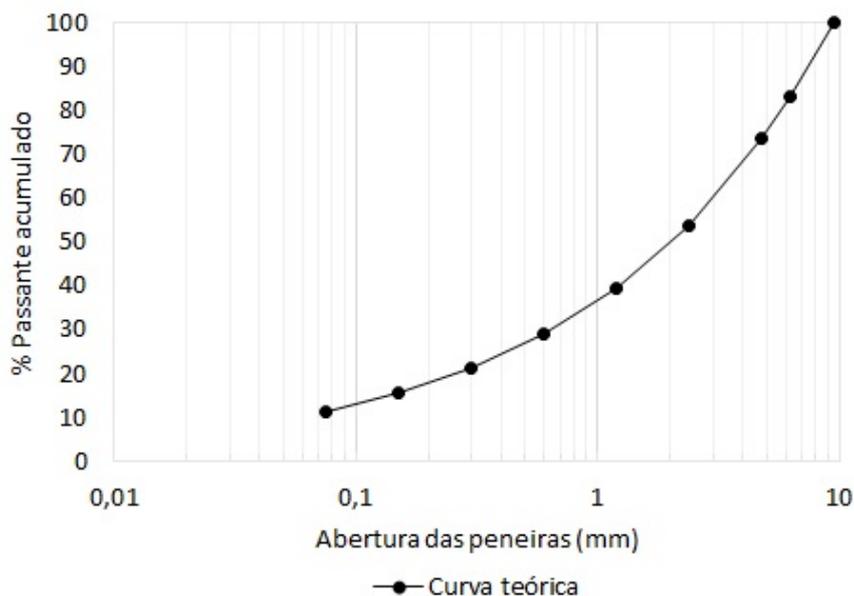
O concreto das PPCs foi produzido utilizando-se a curva granulométrica e o traço propostos, respectivamente, por Melo (2011) e Rosso (2019). Escolheu-se o traço de Rosso (2019), pois nesta pesquisa está se utilizando o mesmo agregado mineral e cimento Portland

que o autor supracitado utilizou, além do traço apresentar resistência à compressão simples superior a 35 MPa, critério mínimo para aplicação em vias de baixo e médio volume de tráfego, conforme a NBR-9781 (1987). Assim, o traço utilizado foi de 1:3,5 (cimento:agregado), fator água/cimento (a/c) de 0,427 e massa específica úmida após a compactação de  $2,339 \text{ g/cm}^3$ . O traço apresenta resistência à compressão de 47 MPa aos 28 dias de cura. A curva teórica adotada apresenta granulometria baseada no critério de máxima densificação de Füller, com diâmetro máximo dos grãos de 9,5 mm e expoente Füller-Talbot de 0,45. A Tabela 9 e a Figura 11 apresentam a curva granulométrica utilizada nas PPCs.

Tabela 9 – Composição granulométrica: porcentagem passante em cada peneira.

Peneiras - Série ASTM	% Passante acumulada	% Retida não acumulada
3/8"	100	0
1/4"	83,12	16,88
Nº 4	73,55	9,57
Nº 8	53,84	19,71
Nº 16	39,41	14,43
Nº 30	28,85	10,56
Nº 50	21,12	7,73
Nº 100	15,46	5,66
Nº 200	11,32	4,14
Fundo	0,00	11,32

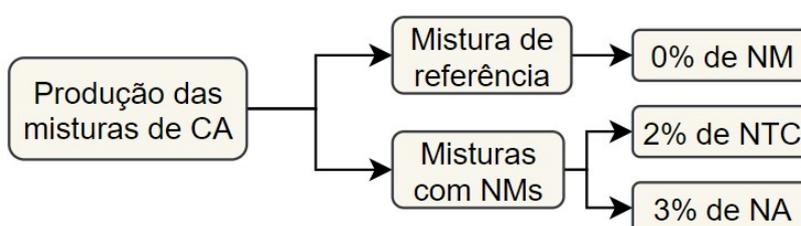
Figura 11 – Curva granulométrica teórica de máxima densificação da argamassa.



### 5.2.2 Formulação dos Revestimentos Asfálticos

Para a realização do procedimento de lixiviação na próxima etapa do método, foram produzidas uma mistura asfáltica de referência com CAP 50-70, uma com ligante nanomodificado com 3% de nanoargila (NA) e outra com ligante nanomodificado com 2% de nanotubo de carbono (NTC), em massa de CAP 50-70. Estes percentuais de incorporação foram estudados por Melo (2014) e apresentaram os melhores resultados quanto às características mecânicas do revestimento asfáltico. A Figura 12 ilustra as misturas asfálticas produzidas.

Figura 12 – Fluxograma da Etapa 2 para as amostras de CA.



Fonte: a autora.

Os ligantes asfálticos nanomodificados com NA e NTC foram preparados com um misturador de alto cisalhamento, Modelo L5M-A Silverson, equipado com controle de temperatura, cuba térmica e hélice cisalhante, conforme a Figura 13. A temperatura de incorporação dos nanomaterias no CAP 50-70 foi de 150 °C, sob nível de cisalhamento de 5.000 rpm com período de compatibilização de 1h40min, conforme Melo (2014).

Figura 13 – Misturador de Alto Cisalhamento.



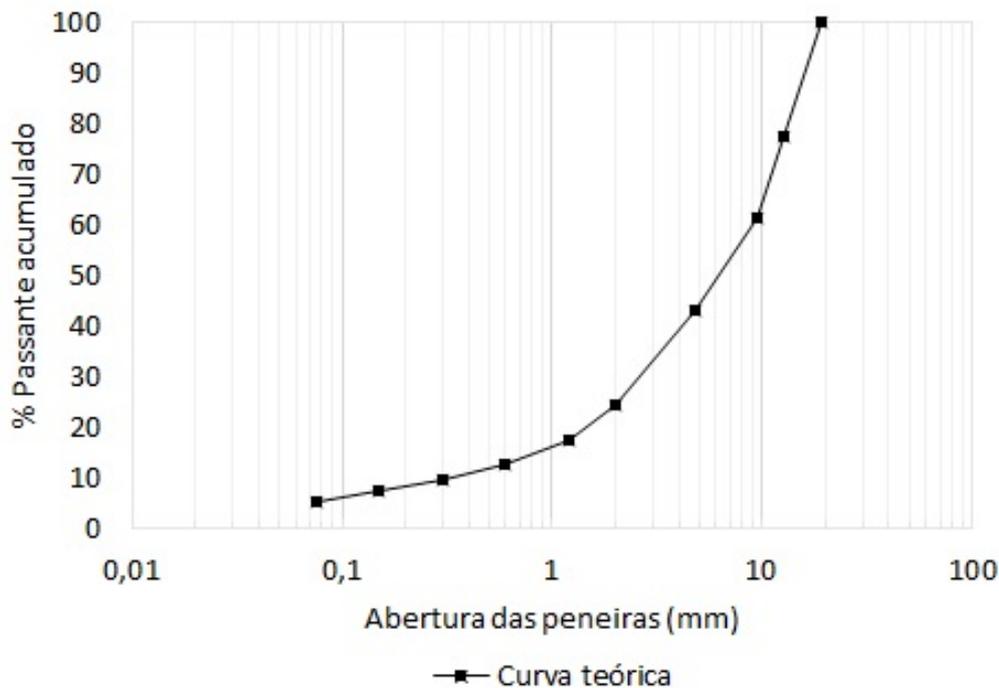
Fonte: a autora.

Utilizou-se para a produção das misturas asfálticas a curva granulométrica e o teor de ligante asfáltico de Melo (2014), que estudou os mesmos nanomateriais desta pesquisa em seu doutoramento, assim como a mesma classe de ligante asfáltico. O teor de ligante utilizado foi de 4,35% para todas as misturas asfálticas produzidas. A concepção da curva granulométrica atende a especificação Superpave, com porcentagem passante em cada peneira conforme a Tabela 10 e Figura 14.

Tabela 10 – Composição granulométrica: porcentagem passante em cada peneira.

Peneiras - Série ASTM	% Passante
3/4"	100
1/2"	77,5
3/8"	61,3
Nº 4	43,3
Nº 10	24,3
Nº 16	17,4
Nº 30	12,6
Nº 50	9,8
Nº 100	7,6
Nº 200	5,4

Figura 14 – Composição granulométrica dos agregados para as placas de CA.



Os agregados utilizados foram fracionados em oito peneiras para compor uma curva granulométrica adequada e de forma precisa. Todas as misturas foram preparadas utilizando

de um misturador mecânico, com prévio aquecimento dos materiais em estufa. O ligante asfáltico foi aquecido até obter-se uma viscosidade aparente de 0,17 Pa.s (conforme a curva viscosidade versus temperatura) e os agregados sob uma temperatura de 10 °C acima da temperatura do ligante asfáltico. Após a homogeneização mecânica da mistura, estas foram condicionadas durante 2 horas em estufa (simulação do envelhecimento a curto prazo em estufa), na temperatura de compactação, a qual o ligante asfáltico apresenta viscosidade de 0,28 Pa.s. Após as 2 horas em estufa, as misturas asfálticas não foram compactadas, mais sim desagregadas ainda quentes, de modo a obter seu estado solto, analogamente a amostra utilizada no método Rice (ABNT NBR 15619; ASTM D 2041). Obteve-se para cada mistura uma amostragem de aproximadamente 1500 g. Para nenhuma das misturas foi utilizado aditivo melhorador de adesividade ligante-agregado com o intuito de emular um cenário crítico, com grande liberação de ligante asfáltico nanomodificado. A Figura 15 apresenta uma das misturas após o procedimento relatado.

Figura 15 – Mistura asfáltica no estado solto e desagregada.



Fonte: a autora.

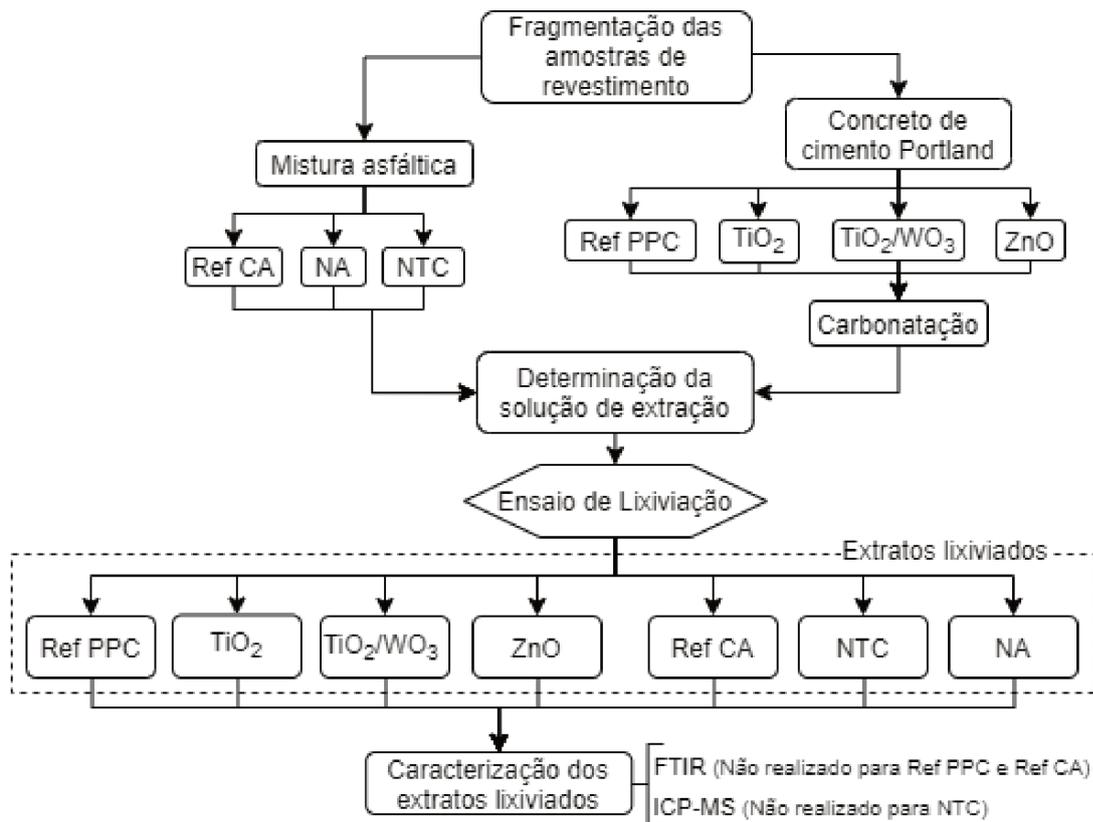
O objetivo da não compactação foi simular de maneira eficiente a camada mais superficial do revestimento, na qual os agregados encontram-se completamente envoltos em ligante asfáltico e expostos às intempéries e ações do tráfego.

Na sequência serão apresentados os procedimentos metodológicos utilizados no processo de lixiviação das amostras de revestimento.

### 5.3 ETAPA 3 - PROCEDIMENTO DE LIXIVIAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LIXIVIADO

A Figura 16 ilustra de forma resumida as etapas seguidas para a execução do procedimento de lixiviação das amostras de revestimento e caracterização do extrato lixiviado.

Figura 16 – Fluxograma da experimental da Etapa 3.



Fonte: a autora.

A metodologia escolhida para o processo de lixiviação é descrita pela ABNT:NBR 10005/2004 que teve como base o método "*Toxicity Characteristic Leaching Procedure*" (TCLP)(SW-846 Method 1311, USEPA 1994). Para a obtenção do extrato lixiviado é necessário considerar o enquadramento da amostra. Deste modo, o processo se baseou nos "Procedimentos de lixiviação para resíduos contendo teor de sólidos igual a 100%" da NBR 10005. Este processo conta com duas etapas principais, são elas:

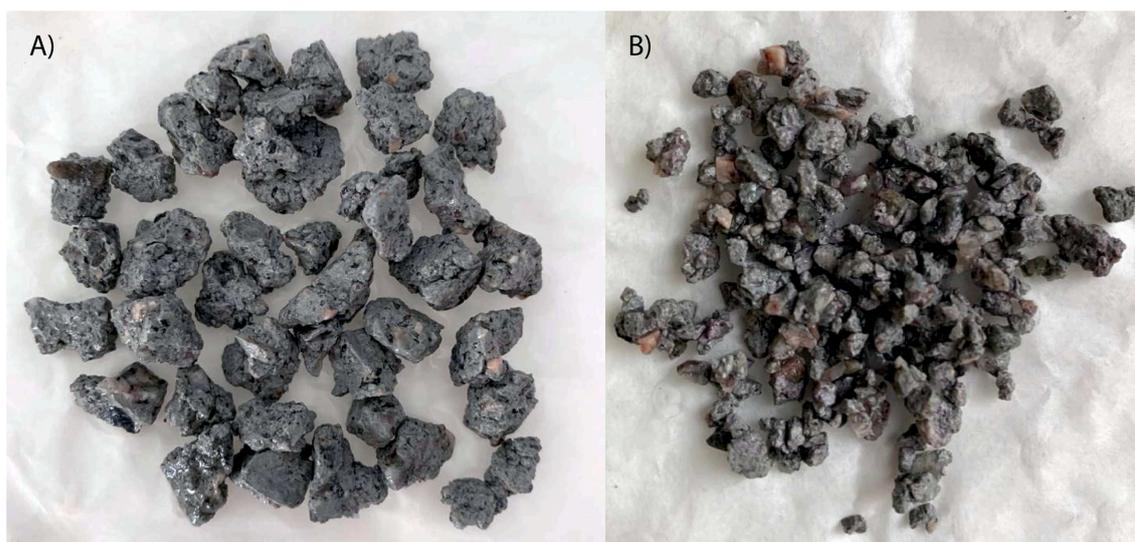
- Primeira Etapa - Preparação para o ensaio de lixiviação:

A NBR 10005 orienta que as amostras sólidas devem ter o diâmetro máximo de 9,5 mm. Deste modo, para as PPCs, utilizou-se formão e martelo para extrair as amostras de cada peça. Vale ressaltar que apenas a camada mais superficial das peças foi utilizada, uma vez que cada um dos NMs ( $TiO_2$ ,  $TiO_2/WO_3$  e  $ZnO$ ) foram adicionados apenas nos 10 mm superiores de cada peça (Figura 9). Com o objetivo de padronizar o tamanho das partículas, apenas o material passante na peneira de malha 9,5 mm e retido na 4,8 mm foi coletado para o processo de lixiviação.

Após a trituração, as amostras de concreto de cimento Portland (CCP) foram lavadas em água corrente com o auxílio de peneiras e deixadas secar em temperatura ambiente. Este processo teve como objetivo remover o material pulverulento da superfície das partículas

de concreto, o qual foi gerado pelo processo de rompimento das amostras. Além disso, as amostras foram dispostas de modo a permitir o processo de carbonatação, o qual foi verificado através da saturação destas com fenolftaleína. Na Figura 17(A) é possível observar uma quantidade de amostra saturada de fenolftaleína com a granulometria utilizada no processo de lixiviação. Na Figura 17(B) amostra foi triturada com o objetivo de observar o processo de carbonatação no interior do concreto. Quando a fenolftaleína é adicionada e a amostra passa a apresentar uma coloração lilás, significa que não ocorreu carbonatação, por outro lado, quando a amostra não apresenta alteração na sua coloração significa que ocorreu carbonatação. O processo de carbonatação ocorre de forma natural em ambientes onde a superfície do concreto está exposta ao gás carbônico e água, por isso torna-se importante verificar sua ocorrência nas amostras trabalhadas em laboratório, uma vez que este processo ocorrerá em campo.

Figura 17 – Amostras de CCP saturadas com fenolftaleína.



Fonte: a autora.

Para as amostras de CA não foi necessário romper as amostras, visto que estas encontravam-se em estado solto, então passaram diretamente pelo procedimento de padronização das partículas por meio de peneiramento, conforme realizado para as amostras de CCP. Após o peneiramento, as amostras foram reservadas em recipientes limpos para serem utilizadas posteriormente na determinação da solução de extração e ensaio de lixiviação. Ainda nesta etapa foi realizada a determinação da solução de extração utilizada para lixiviar tanto as amostras de PPC quanto as de CA. A norma NBR 10005:2004 disponibiliza duas possíveis soluções de extração escolhidas de acordo com o pH da amostra em água, conforme indicado abaixo:

- Solução 1 é indicada para amostras com  $\text{pH} \leq 5,0$ ;

- Solução 2 é indicada para amostras com pH > 5,0.

Para determinar o pH das amostras de revestimento, foram separados 5,0 g de cada amostra em béqueres e adicionados 96,5 mL de água deionizada. Após cobrir cada béquer com vidro relógio, as amostras foram agitadas por 5 min com agitador magnético, conforme descrito na norma. Passado este intervalo de tempo, foi realizada a medição do pH do líquido. Uma vez que todas as amostras apresentaram pH  $\leq 5,0$ , utilizou-se a Solução 1 com a seguinte formulação: 5,7 mL de ácido acético glacial, 64,3 mL de NaOH 1,0 N e 930 mL de água ultrapura.

- Segunda Etapa - Ensaio de lixiviação com as amostras de revestimento:

Foram dispostos 100 gramas de cada amostra em frascos contendo 2 litros de solução de extração com pH  $4,93 \pm 0,05$  (Figura 18). Após o fechamento dos frascos com fita PTFE (filme termoplástico para vedação), iniciou-se o processo de agitação a  $(55 \pm 2)$  rpm durante  $(18 \pm 2)$  horas à temperatura de até  $25^{\circ}\text{C}$ . A norma estabelece que seja utilizada a rotação de  $(30 \pm 2)$  rpm, contudo, por limitações do equipamento, a menor rotação possível para a execução do ensaio foi aquela citada anteriormente, de  $(55 \pm 2)$  rpm, o que torna o ensaio ainda mais rigoroso (Figura 19).

Figura 18 – Aparato do procedimento de lixiviação antes do início - amostras de CA



Fonte: a autora.

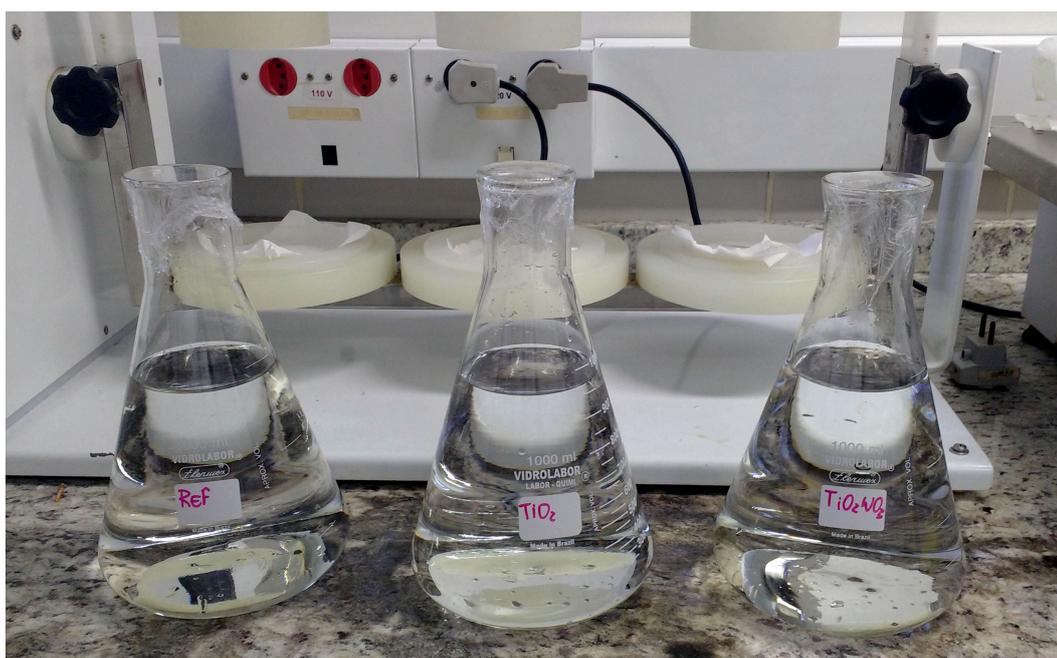
Figura 19 – Aparato do procedimento de lixiviação findada a agitação - amostras de PPC



Fonte: a autora.

Ao final do período de agitação, as amostras foram filtradas em filtro com porosidade de 0,45  $\mu\text{m}$  com auxílio de um aparelho de filtração a vácuo. Após este processo, as amostras foram evaporadas em estufa a 60°C por 24 horas com o objetivo de concentrar o extrato lixiviado. Depois de resfriadas, as amostras foram armazenadas em recipientes na geladeira do laboratório para então serem utilizadas nos testes toxicológicos. A Figura 20 mostra o aspecto das amostras após a filtração.

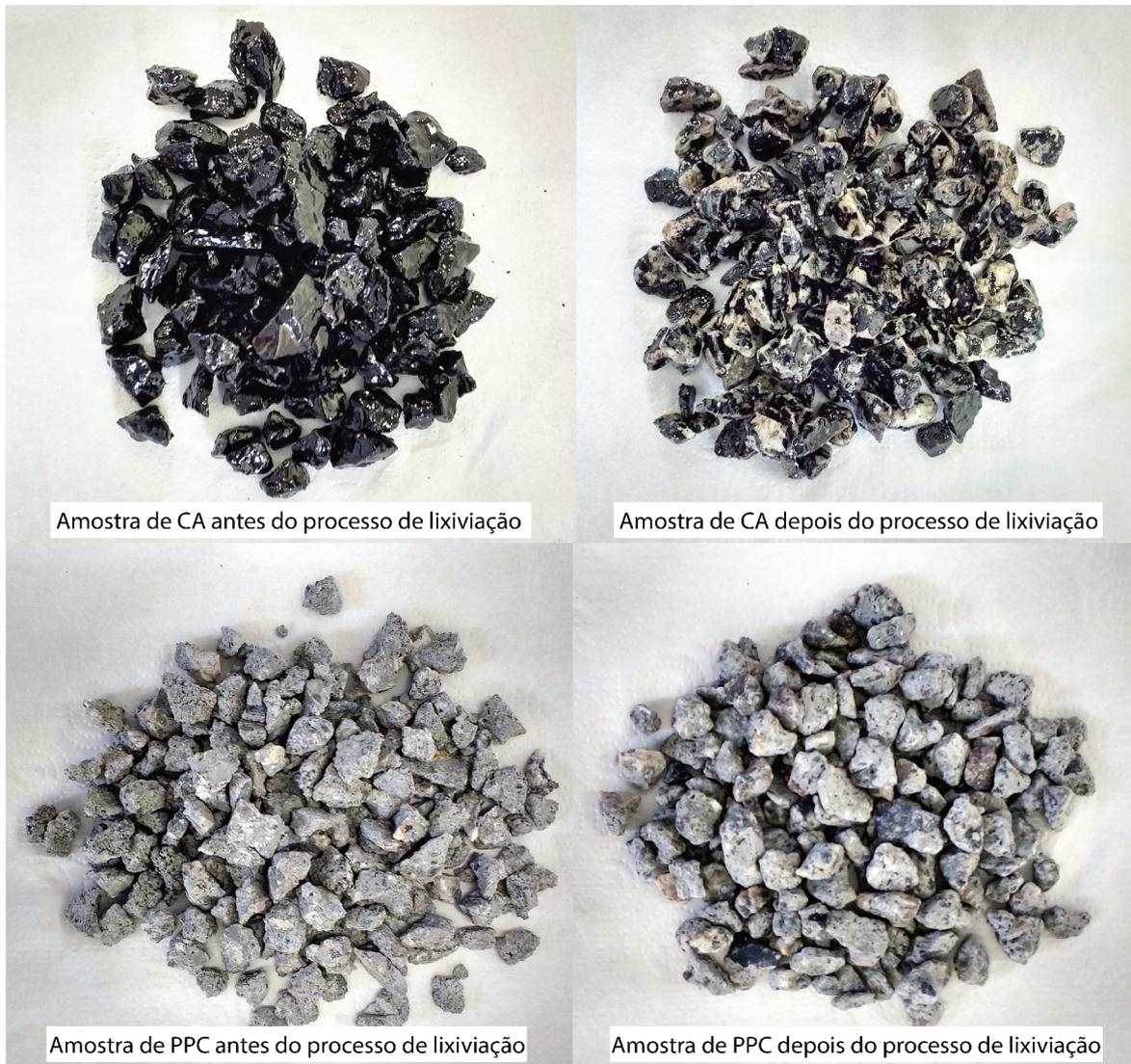
Figura 20 – Amostras de lixiviado de PPC após filtração.



Fonte: a autora.

A Figura 21 mostra o efeito do processo de lixiviação nas amostras particuladas de revestimento de CA e de PPC. Em ambas é possível verificar o afloramento do agregado mineral, anteriormente recoberto pelo ligante asfáltico e pela pasta de cimento.

Figura 21 – Comparação entre as amostras de CA e PPC antes e depois da lixiviação.



Fonte: a autora.

A seguir, serão apresentados as análises utilizadas na caracterização dos 7 diferentes lixiviados de revestimentos avaliados nesta pesquisa.

### 5.3.1 Caracterização dos Extratos Lixiviados

#### 5.3.1.1 Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)

A análise de ICP-MS foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC, no equipamento Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado ICP-MS, marca Perkin Elmer Sciex, modelo Elan 6000, (Toronto, Canadá), com introdução da amostra

por nebulizador pneumático. Esta técnica é capaz de detectar metais e diversos não-metais em concentrações tão baixas como uma parte em  $10^{15}$  em determinados isótopos. As amostras foram acidificadas com ácido nítrico ( $HNO_3$ ) para posterior determinação dos analitos de interesse. Essa análise tem como objetivo quantificar íons de Zn, Ti, W, Si e Al biodisponíveis nas amostras de lixiviado provenientes dos revestimentos nanomodificados, além das amostras de referência sem NMs, que foram verificadas para todos os metais citados como forma de controle negativo. A amostra de CA nanomodificada com NTC não pôde ser avaliada por esta técnica, uma vez que este equipamento possui limitações quanto à identificação e quantificação de carbono. Para a amostra de CA nanomodificada por NA foram avaliados os metais Si e Al, os quais fazem parte da sua composição química. Deste modo, o Si e Al atuam como elementos-traços da NA.

#### 5.3.1.2 Espectroscopia na região Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

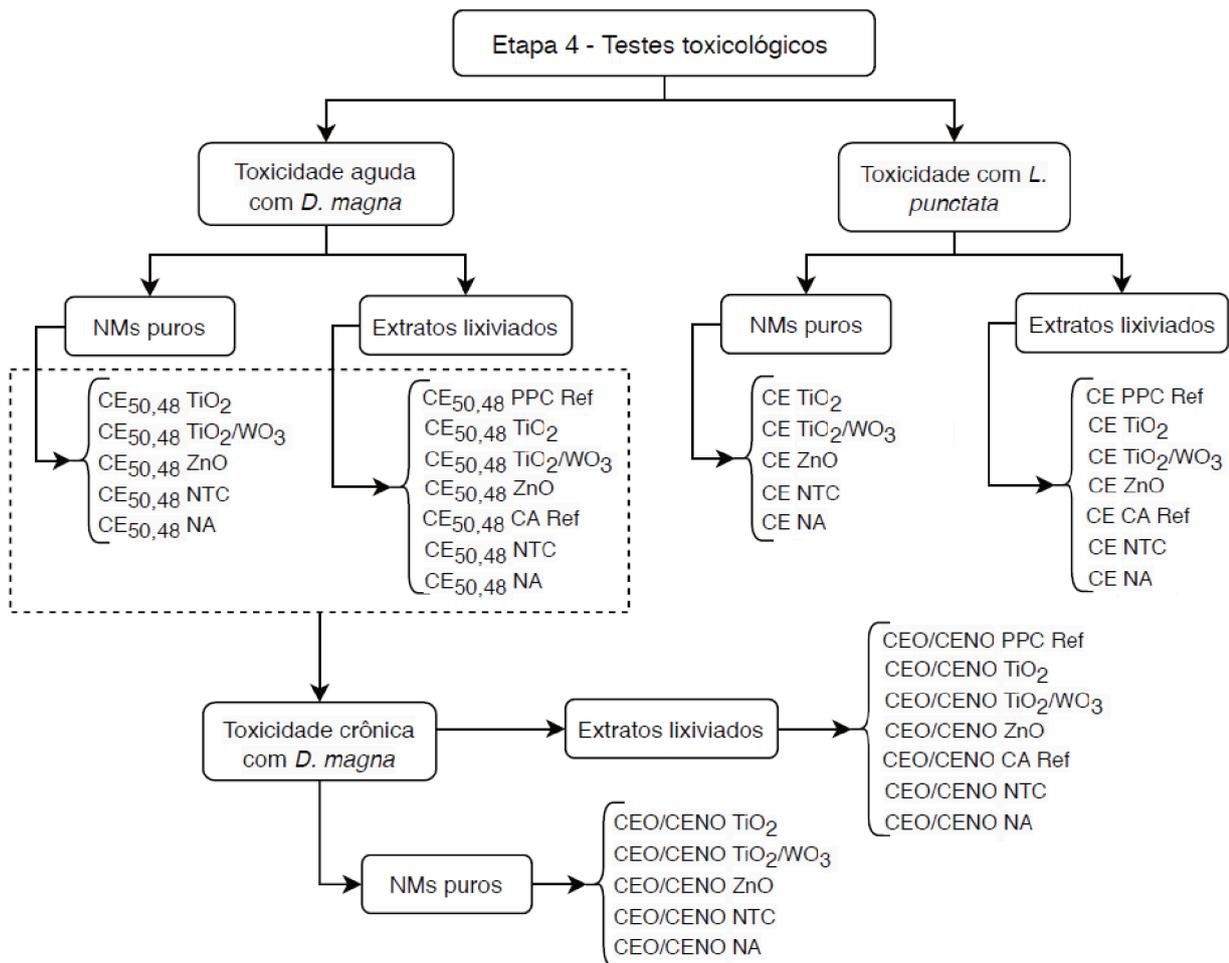
As medidas de FT-IR foram feitas com o espectrômetro da marca Agilent Technologies, modelo Cary 660 Series FT-IR Spectrometer. Cada amostra foi misturada com brometo de potássio (KBr) e moldada na forma de pastilha. Para cada amostra foi calculada a média de 20 varreduras no intervalo  $4000 - 400\text{ cm}^{-1}$  e resolução de  $4\text{ cm}^{-1}$  foi feita para cada amostra. A caracterização através dos espectros de FTIR permite qualificar os grupos funcionais contidos nas amostras sólidas em pó. Esta análise foi utilizada para a caracterização dos NMs puros em pó e dos lixiviados provenientes do revestimentos. Para isso, as amostras líquidas dos lixiviados foram liofilizadas à vácuo na temperatura de  $-40^\circ\text{C}$  por 24 horas no equipamento L101 da Liotop no laboratório LATESC da UFSC com o objetivo de desidratá-las e obter amostras sólidas. Deste modo, foi possível realizar a espectroscopia também nos lixiviados. Uma vez com os resultados da análise para os NMs puros e seus respectivos lixiviados, foi possível comparar os espectros e verificar a existência ou não das bandas características de cada NMs no espectro do seu respectivo lixiviado.

## 5.4 ETAPA 4 - TESTES TOXICOLÓGICOS

Esta etapa ocorreu de acordo com o fluxograma mostrado na Figura 22, a qual se inicia com a utilização dos extratos lixiviados dos revestimentos obtidos na Etapa 3 para a realização das análises toxicológicas. Inicialmente foram realizados os testes de toxicidade aguda com *D. magna*, com o objetivo de determinar a  $CE_{50,48}$  (concentração que causou efeito na capacidade natatória, imobilização ou mortalidade de 50% dos organismos-teste após um período de 48 horas) de cada um dos extratos lixiviados dos revestimentos e dos NMs puros. Um vez encontrados estes valores, tornou-se possível realizar os testes de toxicidade crônica com *D. magna* baseado na ISO 10706:2000, os quais tiveram como maior concentração do teste a décima parte da respectiva  $CE_{50,48}$ . Os testes de toxicidade crônica fornecem a CEO e CENO, que indicam a concentração com efeito observado nas *D. magnas* e a concentração

que não teve efeito observado, respectivamente. Em paralelo foram realizados os testes de toxicidade com a *L. punctata*. Além disso, foram realizadas as análises toxicológicas com os NMs puros com o objetivo de verificar a toxicidade de cada um isoladamente.

Figura 22 – Fluxograma da Etapa 4.



Fonte: a autora.

A escolha destes dois organismos para a realização dos testes de toxicidade foi motivada pela sua localização em níveis tróficos mais baixos. Esta característica é importante para a avaliação da amplificação da contaminação em toda a cadeia alimentar. Além disso, ambos são amplamente utilizados em pesquisas acadêmicas, favorecendo a busca por referências e comparação entre pesquisas.

Na sequência são detalhados os procedimentos utilizados no cultivo dos organismos-teste e nos testes de toxicidade realizados nesta pesquisa.

### 5.4.1 Metodologia de Cultivo para *Daphnia magna*

Os organismos jovens (neonatos) de *D. magna*, utilizados nos ensaios de toxicidade aguda e crônica, são provenientes do cultivo do Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX - UFSC). O cultivo desta espécie se baseia na NBR 12.713:2016 e ISO 6341:2012.

Realiza-se o cultivo dos organismos em recipientes de vidro com capacidade de 2000 ml, os quais contém água reconstituída (M4) como meio utilizado para o crescimento e cultivo dos organismos. Cada recipiente contém uma população de 30 a 35 indivíduos fêmeas em um volume de 1500 ml de meio de cultura M4, mantidos em temperatura controlada a  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e com fotoperíodo de 16 horas de luz, condições obtidas através do uso de uma estufa. Os organismos são alimentados com cultura de alga verde *Scenedesmus subpicatus* (ISO, 1989) juntamente com a renovação do meio de cultura, que é realizado três vezes por semana. Neste momento é feito o controle do número de organismos adultos e higienização dos recipientes.

Semanalmente são realizados testes de sensibilidade com a substância de referência dicromato de potássio ( $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ), de acordo com as normas NBR 12713:2016 e ISO 6341:2012, buscando avaliar a sensibilidade dos organismos. Os valores obtidos da  $\text{CE}_{50,24h}$  devem estar entre 0,6 e 1,7 mg/L para assegurar que o cultivo está de acordo com o padrão internacional e garantir a validação dos testes.

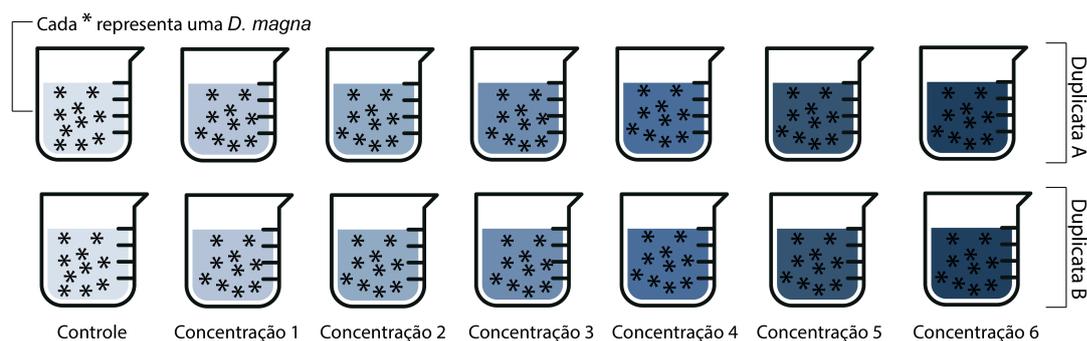
### 5.4.2 Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia magna*

A metodologia para teste de toxicidade aguda com o organismo-teste *D. magna* segue a NBR 12.713 (147) e consiste na exposição de *D. magna* neonatas, ou seja, com 2 até 26 horas de vida, à substância a ser testada por um curto intervalo de tempo (48 horas). O resultado obtido é denominado  $\text{CE}_{50,48h}$ , que é a concentração efetiva com efeito observado em relação a capacidade natatória, imobilização ou mortalidade de 50% dos organismos-teste após um período de 48 horas. Vale ressaltar que são considerados imóveis os organismos que não forem capazes de nadar em um intervalo de tempo de 15 segundos (150) e mortos aqueles que encontram-se depositados no fundo ou flutuando na superfície sem apresentar movimentação após 15 segundos (150).

O meio de diluição utilizado no teste é o meio ISO descrito na norma ISO 6341:2012. Os testes ocorreram através da exposição de organismos neonatos (2 a 26 horas de vida) aos 5 NMs e aos 7 diferentes extratos lixiviados das amostras de revestimento por um intervalo de 48 horas. O resultado obtido foi expresso em função da  $\text{CE}_{50,48h}$ . Os testes foram realizados em duplicata, expondo 20 organismos-teste por diluição, 10 em cada recipiente, à temperatura de 18 a 22° C, sem alimentação ou iluminação. A definição das concentrações utilizadas para avaliar os NMs partiu de referências bibliográficas, em contrapartida, para os extratos lixiviados os testes foram iniciados com diluições abrangentes para então refinar a busca pela  $\text{CE}_{50,48h}$ . Tanto as amostras líquidas de lixiviado quanto as dos NMs tiveram seus pHs corrigidos para a faixa de 7,6 a 8 visando evitar influências deste parâmetro nas análises.

A Figura 23 mostra uma representação do teste de toxicidade aguda com as duplicatas A e B para cada concentração avaliada no teste, além do controle, o qual é composto somente pelo meio ISO. Cada béquer contém 10 *D. magna*. As diferentes tonalidades de cor representam as concentrações, onde a cor mais clara representa o controle (sem amostra) e a cor mais escura, a maior concentração, ou seja, com maior quantidade de amostra no meio de diluição ISO.

Figura 23 – Representação do teste de toxicidade aguda.



Fonte: a autora.

Na Tabela 11, são apresentadas as concentrações avaliadas para cada NM nos testes de toxicidade aguda com *D. magna*. As concentrações foram obtidas através da razão entre a massa de NM em pó e o meio de diluição ISO (água + reagentes), o qual é normatizado para este tipo de teste.

Tabela 11 – Concentrações utilizadas para cada NM no teste de toxicidade aguda com *D. magna*.

Concentrações	NTC (mg/L)	NA (mg/L)	TiO <sub>2</sub> (mg/L)	TiO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub> (mg/L)	ZnO (mg/L)
Controle	0	0	0	0	0
Concentração 1	10*	1	1	1	1
Concentração 2	50	5	300	100	5
Concentração 3	100	10	600	400	10
Concentração 4	150	15	800	800	15
Concentração 5	200	18	1000	1000	20
Concentração 6	400	20	1200	1400	25

\*Concentração 1 = 10 mg de NM em 1 L de meio diluente ISO.

Fonte: a autora.

As diluições utilizadas para os 7 tipos de lixiviados nos testes de toxicidade aguda com *D. magna* foram expressas em percentual de amostra contida no volume total de 50 mL, o qual foi completado com o meio de diluição ISO (salvo na última concentração onde o volume total foi preenchido por amostra de lixiviado). Foram utilizadas as seguintes diluições: 4,2%,

6,25%, 10%, 20%, 50% e 100%, além do controle, onde não há exposição ao agente tóxico. Deste modo, a primeira diluição, por exemplo, foi composta de 4,2% de amostra de lixiviado (2,1 mL) e 95,8% de meio de diluição ISO (47,9 mL). Utilizou-se este tipo cálculo pois as amostras de lixiviado são consideradas misturas, uma vez que não se sabe com precisão as substâncias que a compõem.

Terminado o intervalo de 48 horas, foi realizada a contagem das *D. magnas* imobilizadas e mortas para cada diluição. Estes dados foram inseridos no programa *GraphPad Prism 6*, onde os resultados foram avaliados usando ANOVA unidirecional, possibilitando a determinação das concentrações correspondentes a  $CE_{50,48h}$  de cada ensaio. A partir destes resultados, os NMs foram classificados de acordo com a Diretiva da União Europeia 93/67/EEC, uma vez que o Brasil não possui normatização para a toxicidade de materiais ou lixiviados que não sejam resíduos ou efluentes domésticos e industriais.

A classificação apresentada pela Diretiva da União Europeia 93/67/EEC baseia-se no menor valor médio de  $CE_{50}$  dos três principais organismos ambientais: algas, crustáceos e peixes. O menor valor médio de  $CE_{50} < 1$  mg/L classifica o material como muito tóxico para os organismos aquáticos; 1–10 mg/L = tóxico para os organismos aquáticos; 10–100 mg/L = nocivo para os organismos aquáticos; > 100 mg/L = não classificado (151). Como não se sabe a concentração exata de NMs nos lixiviados, não foi possível classificá-los de acordo com esta diretiva.

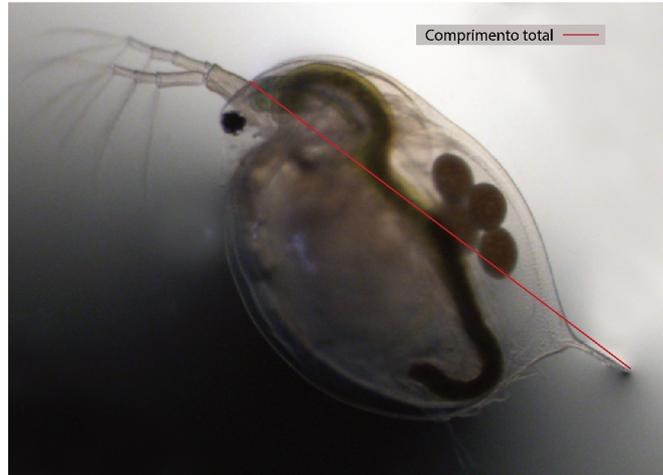
### 5.4.3 Teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*

O teste de toxicidade crônica foi baseado na ISO 10706/2000 e no protocolo da *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD), *Guideline 211:2012* (152). Este tipo de teste permite avaliar os efeitos subletais, estimando as concentrações do agente tóxico. No ensaio de toxicidade crônica, neonatos de *D. magna* foram expostos durante 21 dias aos agentes tóxicos (5 diferentes NMs e 7 diferentes lixiviados). Para cada diluição foram compostas 10 réplicas, dispondo individualmente 10 organismos neonatos em 10 béqueres de 50 mL. Finalizado o período de exposição, foram verificados os efeitos nos seguintes parâmetros:

- longevidade: corresponde ao tempo de vida de um organismo sob um determinado conjunto de condições de desenvolvimento (95). Nos testes de toxicidade crônicos realizados, esse parâmetro foi obtido através do acompanhamento da sobrevivência dos organismos-teste até a finalização do teste (vigésimo primeiro dia). Este valor é expresso pelo percentual de organismos sobreviventes em cada concentração, sendo 100% indicativo de que as 10 réplicas (*D. magnas*) sobreviveram e 0% que todas morreram antes de completar os 21 dias de teste.
- tamanho: este parâmetro foi adquirido através da medição do comprimento total de cada *D. magna* realizada ao final dos 21 dias de teste. Para isto, os organismos-teste foram fotografados com uma escala conhecida através de uma lupa e medidos utilizando

o programa ImageJ. Considerou-se por padrão o comprimento entre a cabeça e o final da carapaça, que compreende o espinho apical, conforme a Figura 24.

Figura 24 – Medida do comprimento total de *D. magna* realizada após 21 dias de teste.



Fonte: a autora.

- reprodução: para este parâmetro foram utilizados os dados registrados relativos ao número de filhotes gerados em cada postura. As posturas representam o evento de reprodução, ou seja, se foram contabilizados filhotes no intervalo de 24 horas significa que houve uma postura, se não existirem filhotes, não é contabilizada a postura. Para o cálculo da média de filhotes por réplica no período de duração do teste (21 dias), utilizou-se a Equação 5.1:

$$\text{Média - filhotes - por - réplica} = \frac{N^{\circ} - \text{total} - \text{de} - \text{filhotes}}{N^{\circ} - \text{de} - \text{posturas}} \quad (5.1)$$

Os valores obtidos através do cálculo da média de filhotes por réplica foi utilizado para o cálculo da média de filhotes por concentração de amostra através da Equação 5.2:

$$\text{Média - filhotes - por - concentração} = \frac{\sum \text{Média - filhotes - por - réplica}}{N^{\circ} - \text{de} - \text{réplicas}} \quad (5.2)$$

- idade da primeira postura: este parâmetro leva em consideração o dia (dentro do intervalo de 1 até 21 dias) em que cada réplica teve sua primeira contabilização de filhotes. O resultado é expresso através do dia médio entre todas as réplicas de cada concentração.

Alguns exemplos de manifestações da toxicidade nos parâmetros citados acima são: morte precoce do organismo-teste, redução do tamanho médio dos organismos-teste em determinada concentração, redução ou aumento anormal na reprodução, nascimento de filhotes mortos, idade de postura muito precoce ou ausência de reprodução.

Os testes de toxicidade crônica foram mantidos nas mesmas condições ambientais que os lotes de cultivo, ou seja, temperatura ambiente controlada de  $20 \pm 2^\circ\text{C}$  e luminosidade difusa, com fotoperíodo de 16 horas, alimentado com a cultura algacea *S. subspicatus*. Durante o teste foi realizado acompanhamento registrando a sobrevivência e o número de jovens gerados por fêmea. A manutenção dos testes foi realizada três vezes por semana e a contagem e retirada dos filhotes foi feita diariamente a partir da data da primeira postura. A manutenção consiste na substituição da solução-teste antiga por uma nova, no registro e retirada dos filhotes gerados no período e de organismos adultos mortos antes dos 21 dias de teste. Este procedimento caracteriza o teste crônico como sendo um teste semi-estático. A Figura 25 apresenta um esquema do teste de toxicidade crônica utilizando *D. magna* como organismo-teste.

Figura 25 – Teste de toxicidade crônica com *D. magna*.



Fonte: a autora.

Para a escolha das concentrações do teste de toxicidade crônica, o valor de  $CE_{50,48h}$  encontrado para cada NM e lixiviado foi dividido por 10 e o valor resultante foi tomado como o maior concentração do teste. A partir disto, foi possível definir as outras 4 concentrações distribuídos entre a maior concentração e o controle. Após a finalização do teste, os resultados foram inseridos no programa *GraphPad Prism 6* e a análise ANOVA foi realizada para definir as diferenças significativas entre os grupos através da variabilidade entre eles. Esta análise baseia-se no princípio da comparação entre os resultados obtidos e controle do teste ( $p = 0,05$ ). A menor concentração em que a diferença significativa exceda este valor é considerada como CEO. Determinada a CEO, foi originada a CENO como sendo a concentração inferior a CEO (95).

A Tabela 12 apresenta as concentrações utilizadas nos testes de toxicidade crônica com *D. magna* para os 5 NMs e 7 lixiviados avaliados nesta pesquisa, onde a letra "C" representa "concentração".

Tabela 12 – Concentrações utilizadas para cada NM e lixiviado no teste de toxicidade crônica com *D. magna*.

Amostras	Controle	C1	C2	C3	C4	C5
NTC (mg/L)	0	0,045*	0,09	0,18	0,36	0,73
NA (mg/L)	0	0,05	0,10	0,30	0,60	0,90
TiO <sub>2</sub> (mg/L)	0	0,63	1,25	2,50	5,00	10,00
TiO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub> (mg/L)	0	0,56	1,13	2,0	4,0	8,0
ZnO (mg/L)	0	0,025	0,050	0,100	0,200	0,400
Lixiviado - NTC (mL/L)	0	10,0**	20,0	30,0	40,0	50,0
Lixiviado - NA (mL/L)	0	5,0	10,0	15,0	20,0	30,0
Lixiviado - Ref CA (mL/L)	0	0,5	2,5	4,5	6,5	8,5
Lixiviado - TiO <sub>2</sub> (mL/L)	0	0,5	2,0	3,5	5,0	6,5
Lixiviado - TiO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub> (mL/L)	0	0,5	2,0	3,5	5,0	6,5
Lixiviado - ZnO (mL/L)	0	0,1	0,5	1,0	5,0	10,0
Lixiviado - Ref PPC (mL/L)	0	0,25	0,50	1,0	2,0	4,0

\*Exemplo: NTC = 0,45 mg de NTC em 1 L de meio M4.

\*\*Exemplo: Lixiviado - NTC = 10 mL de amostra em 0,9 L de meio M4.

Fonte: a autora.

#### 5.4.4 Metodologia de Cultivo para *Landoltia punctata*

As macrófitas *L. punctata*, utilizadas nos ensaios de toxicidade são provenientes do cultivo do Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX - UFSC) e o cultivo desta espécie se baseia na OECD 221:2006 e ISO 20079:2005. Vale ressaltar que as macrófitas utilizadas são provenientes de Santa Catarina, as quais encontram-se adaptadas ao clima da região.

A cultura é mantida em uma sala climatizada com temperatura controlada de 24 ± 2°C, sob a luminosidade de seis lâmpadas fluorescentes de 25W totalizando uma radiação de aproximadamente 8.800 lux e o fotoperíodo é de 12 horas. A troca do meio de cultura é realizada três vezes por semana com o objetivo de renovar os nutrientes e evitar a proliferação de possíveis contaminações por fungos ou algas.

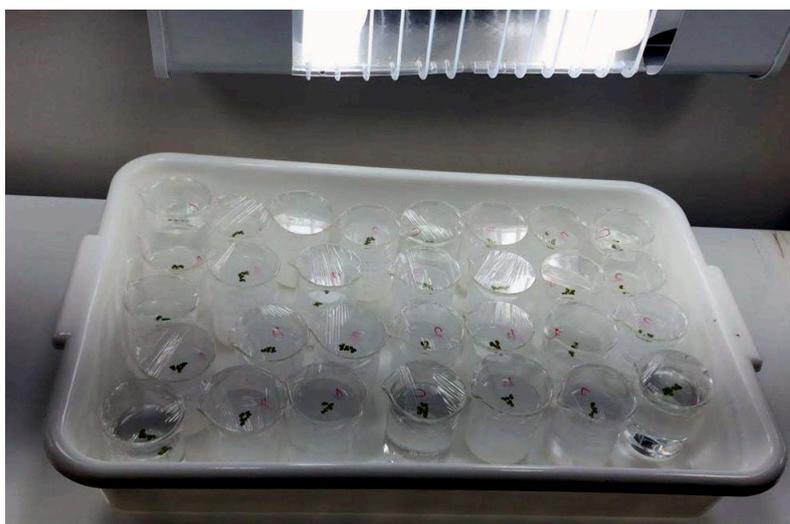
#### 5.4.5 Teste de Toxicidade com *Landoltia punctata*

Os testes de toxicidade com *Landoltia punctata* foram realizados seguindo os procedimentos padronizados pela norma ISO 20079:2005 e OECD 221:2006. Foram mantidas as mesmas condições ambientais de luminosidade, temperatura, pH, empregados na pré-cultura durante os testes.

O procedimento para realização do teste de toxicidade consistiu em inocular o organismo-teste em diferentes concentrações pré-definidas da solução contendo o material a ser avaliado. Simultaneamente, realizou-se o controle negativo (amostra somente com meio de cultura, sem substância tóxica), visando a confiabilidade dos resultados. Os organismos permaneceram

expostos às substâncias testadas por um período total de sete dias em béqueres de vidro contendo 50 mL de amostra. Em cada béquer foram adicionadas 10 frondes de *L. punctata* e após distribuídos espacialmente de forma randômica dentro da bandeja utilizada no teste, conforme mostrado na Figura 26.

Figura 26 – Teste de toxicidade com *L. punctata*



Fonte: a autora.

Para os 5 NMs, as concentrações utilizadas estão apresentadas na Tabela 13. Cada NM teve o preparo de uma solução-mãe com concentração de 10 g/L e homogeneização com o auxílio de aparelho ultrassônico com sonda metálica e por 2 minutos. Para os 7 extratos lixiviados, foram definidas as diluições de 1%, 10%, 20% e 50%. Deste modo, a primeira diluição, por exemplo, foi composta por 1% de amostra de lixiviado (0,5 mL) e 99% de meio de cultivo da *L. punctata* (49,5 mL). Antes do início de cada teste as amostras foram agitadas e o pH corrigido para 6,3-6,5, assim como para os NMs, de modo a evitar a influência deste fator nos testes.

Tabela 13 – Concentrações utilizadas para cada NM no teste de toxicidade com *L. punctata*.

Concentrações	NTC (mg/L)	NA (mg/L)	TiO <sub>2</sub> (mg/L)	TiO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub> (mg/L)	ZnO (mg/L)
Controle	0	0	0	0	0
Concentração 1	10*	10	300	200	10
Concentração 2	100	100	750	400	100
Concentração 3	500	500	1500	1000	500
Concentração 4	1000	1000	4500	2000	1000

\*Concentração 1 = 10 mg de NM em 1 L de meio de cultivo.

Fonte: a autora.

#### 5.4.5.1 Cálculo da Taxa de Crescimento

O monitoramento do teste para a verificação dos efeitos tóxicos se deu através da determinação das taxas de crescimento das plantas. Para avaliar a inibição de crescimento, as frondes foram contabilizadas no início do experimento ( $t=0$ ) bem como no decorrer dos sete dias de observação ( $t=7$ ), sendo que nesse processo foram contabilizadas todas as frondes visíveis. Concluído este procedimento, iniciou-se a estimativa das concentrações que resultaram na inibição de crescimento da macrófita ( $CE_{20}$  e  $CE_{50}$ ).

Em posse dos valores dos parâmetros de números de frondes (valores esses obtidos no início e no final do teste), foi calculada a taxa de crescimento por dia, através dos procedimentos recomendados pela normatização da ISO 20079:2004 (153) (Equação 5.3).

$$r_{(i-j)} = \frac{\ln(N_j) - \ln(N_i)}{t_j - t_i} \quad (5.3)$$

Onde:

- $r_{(i-j)}$ : Taxa média de crescimento específico do momento  $i$  para o  $j$ ;
- $N_i$ : Número de frondes observados nas amostras teste ou  $i$  controle ao início do teste;
- $N_j$ : Número de frondes observados nas amostras teste ou  $j$  controle ao final do teste;
- $t_i$ : Tempo do momento do início do período de teste;
- $t_j$ : Tempo do momento do fim do período de teste.

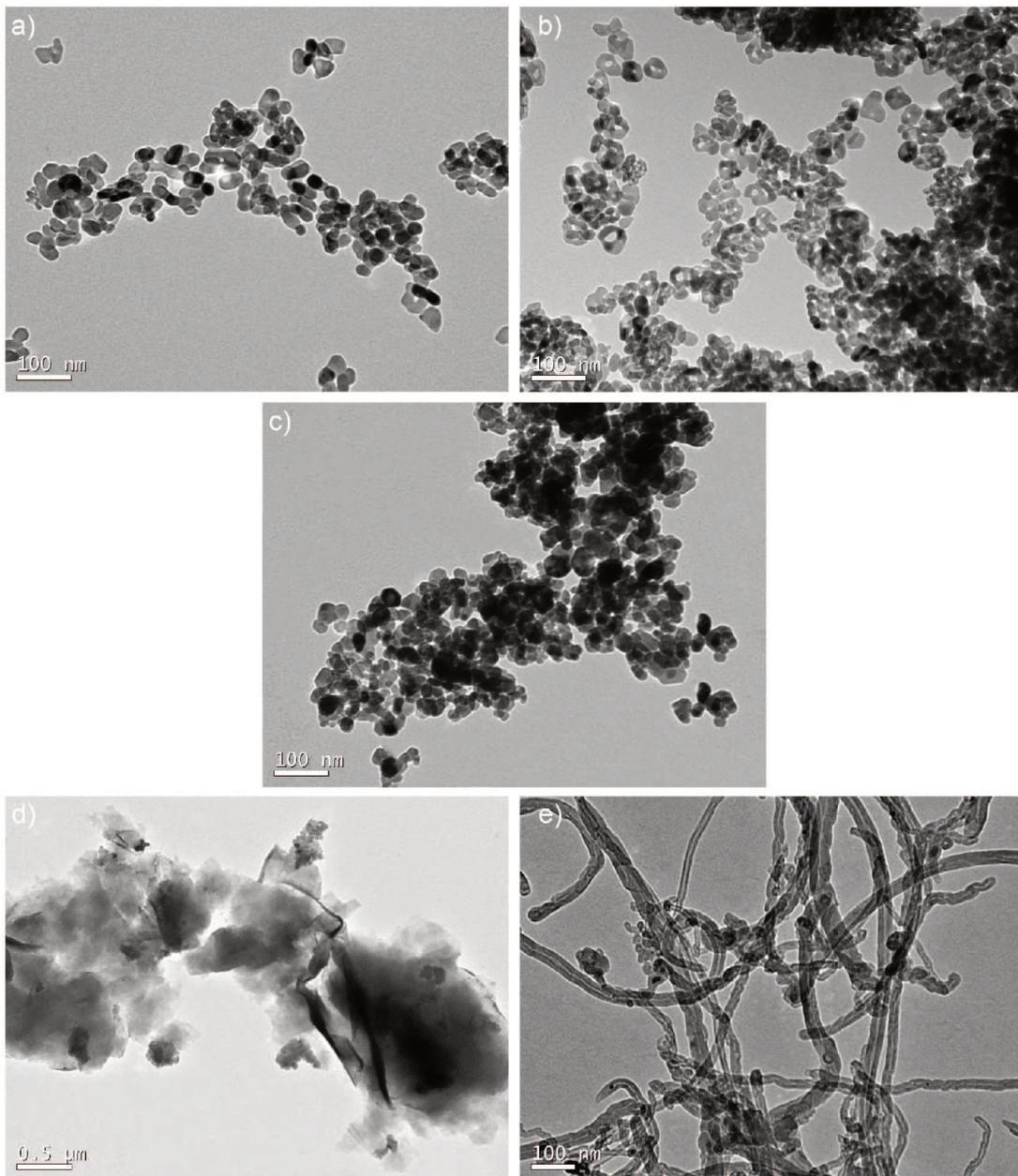
## 6 APRESENTAÇÃO E DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 6.1 CARACTERIZAÇÕES FÍSICO-QUÍMICAS DOS MATERIAIS

#### 6.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Na Figura 27, são apresentadas as micrografias resultantes da análise MET realizada nos NMs puros suspensos em água de osmose reversa, os quais foram incorporados aos revestimentos de PPC e CA, respectivamente.

Figura 27 – Micrografias geradas na MET dos NMs a)  $TiO_2$ , b)  $TiO_2/WO_3$ , c)  $ZnO$ , d) NA e e) NTC



Fonte: a autora.

Em todas as micrografias é possível observar aglomerados formados pelos NMs. Este fato pode ser justificado pelas forças de atração de Van der Waals e a duração do processo de sonicação das amostras, neste caso 2 minutos a 23% - 115 W de potência. Reches *et al.* (2018) observaram em seu estudo que mais de 95% da desaglomeração aparente de diferentes NMs ocorreu nos 20 primeiros minutos de sonicação em frequência de 20 kHz. O tempo de sonicação escolhido foi baixo, visto que este procedimento não foi utilizado para a dispersão dos NMs durante a elaboração das amostras. Neste caso, o objetivo foi suspender os NMs em água e verificar seu comportamento de aglomeração, fator muito importante para os ensaios de toxicidade pois o tamanho dos aglomerados influencia na absorção pelos micro-organismos.

Além disso, é possível verificar que as informações quanto à morfologia dos NMs divulgadas pelos fabricantes é compatível com o observado. Sendo o  $TiO_2/WO_3$  e o  $ZnO$  de morfologia esférica,  $TiO_2$  elipsoidal e esférica, *NTC* tubular e *NA* camadas.

### 6.1.2 Potencial Zeta (PZ), Diâmetro Efetivo (DE) e Índice de Polidispersão (PDISP)

A Tabela 14 apresenta os resultados da variação do DE, PZ, PDISP e pH dos NMs puros suspensos em água de osmose, meio de diluição ISO (utilizado no teste de toxicidade aguda), meio de cultivo M4 (utilizado no teste de toxicidade crônica) e meio de cultivo da *L. punctata*. Cada valor de dado é uma média de três medidas  $\pm$  desvio padrão.

Tabela 14 – Resultados de PZ, DE, PDISP e pH em diferentes meios de diluição.

NM	Teste	Água de osmose	ISO	M4	meio <i>L. punctata</i>
<i>NTC</i>	PZ (mV)	-1,42 $\pm$ 0,15	0,35 $\pm$ 0,07	5,43 $\pm$ 0,55	5,70 $\pm$ 0,69
	DE (nm)	414,10 $\pm$ 11,96	4361,36 $\pm$ 10,03	1488,62 $\pm$ 2,19	2579,40 $\pm$ 20,93
	PDISP	0,30 $\pm$ 0,03	0,24 $\pm$ 0,03	0,29 $\pm$ 0,01	0,43 $\pm$ 0,03
	pH	6,23	7,63	6,11	6,31
<i>NA</i>	PZ (mV)	0,36 $\pm$ 0,05	-0,61 $\pm$ 0,12	-0,19 $\pm$ 0,03	-0,65 $\pm$ 0,02
	DE (nm)	4467,31 $\pm$ 13,82	3082,24 $\pm$ 10,53	2530,03 $\pm$ 11,02	4746,88 $\pm$ 10,68
	PDISP	0,53 $\pm$ 0,05	0,58 $\pm$ 0,06	0,53 $\pm$ 0,02	0,54 $\pm$ 0,02
	pH	6,98	7,57	7,12	6,92
$TiO_2$	PZ (mV)	12,89 $\pm$ 0,38	-2,85 $\pm$ 0,09	3,84 $\pm$ 0,35	-5,37 $\pm$ 0,52
	DE (nm)	580,00 $\pm$ 1,39	1708,58 $\pm$ 6,96	1539,34 $\pm$ 8,12	793,71 $\pm$ 1,98
	PDISP	0,16 $\pm$ 0,03	0,21 $\pm$ 0,03	0,16 $\pm$ 0,01	0,28 $\pm$ 0,01
	pH	7,21	7,90	7,62	7,68
$TiO_2/WO_3$	PZ (mV)	12,86 $\pm$ 0,53	-2,27 $\pm$ 0,47	-4,26 $\pm$ 0,77	-3,39 $\pm$ 0,88
	DE (nm)	487,33 $\pm$ 3,10	1697,53 $\pm$ 10,07	1687,54 $\pm$ 9,69	514,84 $\pm$ 1,33
	PDISP	0,24 $\pm$ 0,11	0,07 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,01	0,30 $\pm$ 0,02
	pH	7,26	7,85	7,59	7,65

Continua na próxima página

Tabela 14 – Continuação da página anterior

NM	Teste	Água de os- mose	ISO	M4	meio <i>L. punctata</i>
ZnO	PZ (mV)	11,20±0,12	-2,20±0,40	-1,25±0,07	-3,19±0,47
	DE (nm)	517,65±11,07	1690,11±14,88	1121,55±0,77	1182,90±5,14
	PDISP	0,12±0,12	0,27±0,03	0,26±0,02	0,28±0,06
	pH	7,39	7,52	7,60	7,56

Fonte: a autora.

Elevados valores absolutos ( $> 30$  mV) de PZ indicam estabilidade da amostra em suspensão, e valores absolutos menores que 10 mV apontam a instabilidade da amostra. Já o PDISP fornece informações quanto à homogeneidade da distribuição dos tamanhos das partículas, onde valores menores que 0,05 são considerados altamente monodispersos e valores maiores que 0,7 são amostras com distribuição de tamanho muito variada. O DE indica o diâmetro efetivo das partículas no meio, o qual compreende o diâmetro da partícula associada a contra-íons difundidos na superfície da mesma.

Os NTCs são muito hidrofóbicos e tendem a se agregar em solução devido às altas forças de interação de Van der Waals ao longo do tubo externo. Como resultado, sua dispersão em água se torna dificultosa (154). Além disso, observou-se uma tendência de aglomeração ainda maior nos 3 meios (ISO, M4 e *L. punctata*) testados, a qual pode ser justificada pela complexidade iônica dos mesmos. Nota-se que os valores de DE partem de 414,10 nm em água, para valores superiores a 1488,62 nm nos 3 meios. Avaliando os dados de PZ resultantes, observa-se que todos os valores estão dentro da faixa considerada instável, o que pôde ser verificado visualmente pela rapidez com que os NMs se aglomeraram após a sonicação. O PDISP aponta para uma distribuição de diâmetros variada, o que pode ser justificado pelo formato tubular do NTC e pela sua variação de comprimento.

A NA modificada utilizada nesta pesquisa apresenta caráter organofílico, que a torna compatível com matrizes orgânicas e hidrofóbica. Esta característica é evidenciada ao observar os valores de DE obtidos em todos os meios testados, onde o menor valor de diâmetro encontrado foi de 2530,03 nm para o meio M4. Além disso, os valores absolutos de PZ indicam grande instabilidade da dispersão (todos entre -10 e 10 mV) e a alteração do sinal indica inversão de polaridade devido à característica iônica dos 3 meios. Os valores relativamente maiores de PDISP podem estar relacionados à estrutura lamelar (camada) da NA, que apresenta elevada área plana e baixa espessura, resultando numa dispersão menos homogênea.

Os 3 NMs de óxidos metálicos apresentaram comportamento semelhante quando aos parâmetros avaliados. Observa-se um incremento significativo no valor médio de DE quando se compara os 3 NMs suspensos em água de osmose com os 3 meios. Este incremento no DE dos NMs em suspensão nos meios ISO, M4 e *L. punctata*, pode ser justificado pela maior presença de sais nas soluções. Em relação aos resultados de PZ referentes ao  $TiO_2$ ,  $TiO_2/WO_3$  e  $ZnO$ ,

na água de osmose os 3 NMs apresentaram valores superiores a 10 mV, o que indica certa estabilidade na suspensão. Em contrapartida, nos meios ISO, M4 e *L. punctata*, os 3 NMs apresentaram instabilidade. Assim como para o DE, estes resultados podem estar relacionados também com a presença de sais dissolvidos, que podem alterar a carga superficial das partículas possibilitando a formação de aglomerados e com isso diminuindo a estabilidade dos NMs na suspensão. Assim, as suspensões dos NMs de óxidos metálicos podem ser considerados instáveis. Além disso, o PDISP foi  $< 0,3$  para todas as dispersões de óxidos metálicos obtidas, indicando a formação de sistemas monodispersos.

## 6.2 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS LIXIVIADOS

### 6.2.1 Espectrometria de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)

A análise por ICP-MS foi realizada a fim de quantificar a liberação de íons de *Zn*, *Ti* e *W* nas amostras líquidas obtidas através do processo de lixiviação dos revestimentos de PPC, e íons de *Si* e *Al* dos revestimentos de CA. As amostras foram acidificadas com ácido nítrico ( $HNO_3$ ) para posterior determinação dos analitos de interesse. Na Tabela 15 é possível observar os valores obtidos para os cinco metais e as amostras de referência, cada valor é uma média de três medidas  $\pm$  desvio padrão.

Tabela 15 – Resultado da quantificação de metais pela análise ICP-MS.

Amostra	Zn	Ti	W	Si	Al
PPC ZnO ( $\mu gL^{-1}$ )	653 $\pm$ 76	ND	ND	-	-
PPC TiO <sub>2</sub> ( $\mu gL^{-1}$ )	ND	2,60 $\pm$ 0,08	ND	-	-
PPC TiO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub> ( $\mu gL^{-1}$ )	ND	3,16 $\pm$ 0,08	216 $\pm$ 2	-	-
REF PPC ( $\mu gL^{-1}$ )	ND	ND	ND	-	-
CA NA ( $\mu gL^{-1}$ )	-	-	-	2,86 $\pm$ 0,06	3,59 $\pm$ 0,03
REF CA ( $\mu gL^{-1}$ )	-	-	-	ND	ND

ND: não detectado

Fonte: a autora.

Observa-se que nas 4 amostras de lixiviado foram encontrados íons metálicos dos NMs adicionados em cada revestimento. Contudo, as concentrações foram extremamente baixas, dificilmente detectáveis por outras formas de caracterização. As duas amostras de referência não acusaram a presença de nenhum tipo de íon metálico avaliado dentro dos níveis de detecção do equipamento.

Com o objetivo de verificar se a liberação de metais identificada pelo ICP-MS encontrava-se acima dos limites estabelecidos em norma, foi consultada a Resolução nº 430 do CONAMA (Conselho Nacional do Meio Ambiente) (155), que dispõe sobre as condições e padrões de lançamento de efluentes. Contudo, neste documento apenas o Zn Total figura entre os metais estudados nesta pesquisa. De acordo com a Resolução nº 430 a concentração máxima de Zn Total em efluentes é de 5 mg/L, muito acima do que foi encontrado na amostra de lixiviado.

Verificou-se, também, os limites de concentração para os enquadramentos dos corpos d'água estabelecidos pela Resolução nº 357 do CONAMA (156). Os metais Ti, W e Si, não aparecem entre as substâncias reguladas pela Resolução, contudo, o Zn e Al encontram-se dentro das concentrações exigidas para todas as classes em que são parâmetros avaliados.

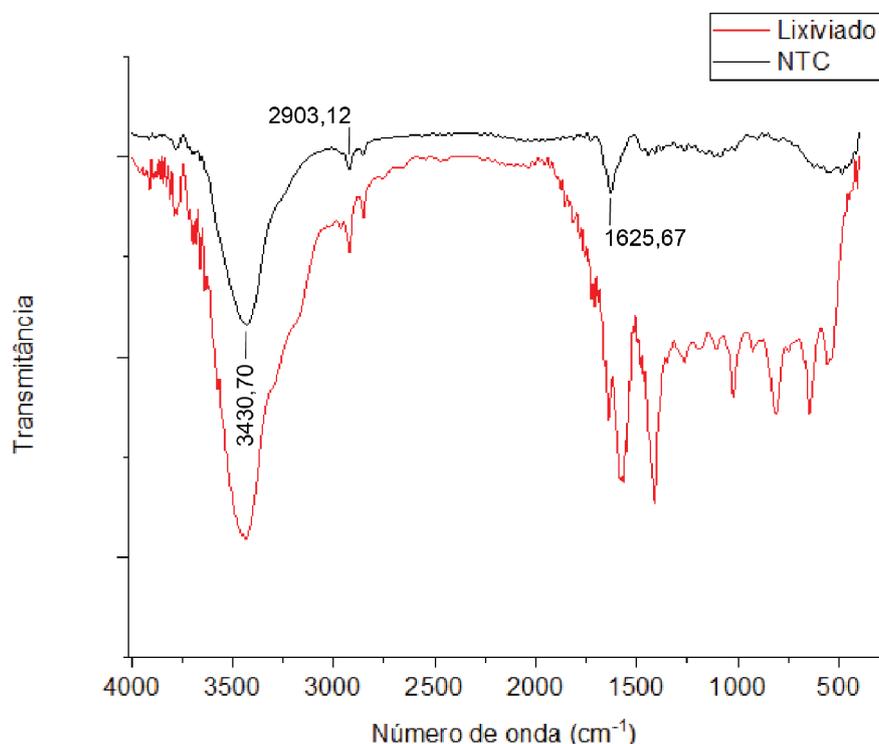
Grande parte da literatura sobre emissão de metais e sua regulação tratam sobre metais pesados, característica que não pertence a nenhum dos NMs estudados nesta pesquisa. Apesar disso, as análises toxicológicas foram realizadas, um vez que não se sabem os efeitos toxicológicos dos lixiviados de revestimentos, considerados misturas complexas pela dificuldade de definição das substâncias componentes.

### 6.2.2 Espectroscopia na Região Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

A análise FT-IR foi realizada inicialmente com os 5 NMs em pó e com as 7 amostras de lixiviado liofilizado. Vale ressaltar que os espectros foram deslocados no eixo vertical com o objetivo de facilitar sua visualização e comparação com os demais espectros presentes em cada gráfico.

Na Figura 28 são apresentados os espectros obtidos através análise FT-IR para o NTC e seu respectivo lixiviado de CA contendo NTC.

Figura 28 – Espectros de FT-IR do NTC puro e do lixiviado de revestimento contendo NTC.



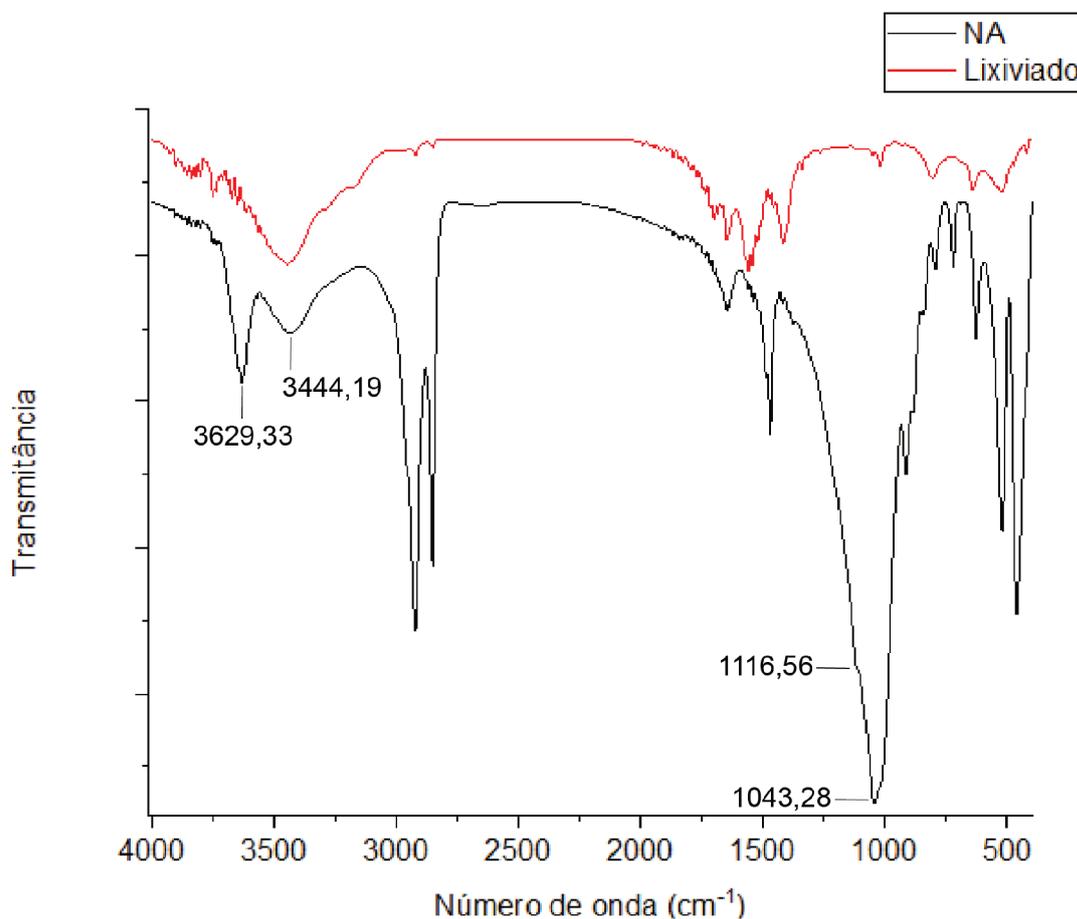
Nota-se a banda em torno de  $3420,70 \text{ cm}^{-1}$ , a qual pode ser atribuída ao modo vibratório de alongamento dos grupos O-H. A banda em  $2903,12 \text{ cm}^{-1}$  é atribuída à vibração

de alongamento assimétrica  $-CH_2$ . A banda em  $1625,67\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao estiramento do grupo carbonila ( $C=O$ ) (157), referente ao NTC.

O espectro do lixiviado de CA contendo NTC apresenta características semelhantes na banda em torno de  $3420,70\text{ cm}^{-1}$  e  $2903,12\text{ cm}^{-1}$ . Contudo, a partir de  $2000\text{ cm}^{-1}$  até  $500\text{ cm}^{-1}$  os espectros tornam-se muito diferentes, uma vez que o lixiviado é uma amostra complexa, podendo conter diferentes substâncias as quais não foram identificadas neste estudo. No espectro do lixiviado, não é possível afirmar a presença de NTC na forma em que se encontrava em seu estado puro, uma vez que a banda que o representa pode ter sofrido interferência de outras substâncias presentes no lixiviado.

Os espectros de FT-IR da NA e o lixiviado de revestimento de CA são apresentados na Figura 29.

Figura 29 – Espectro de FT-IR do NA e do lixiviado de revestimento CA contendo NA.



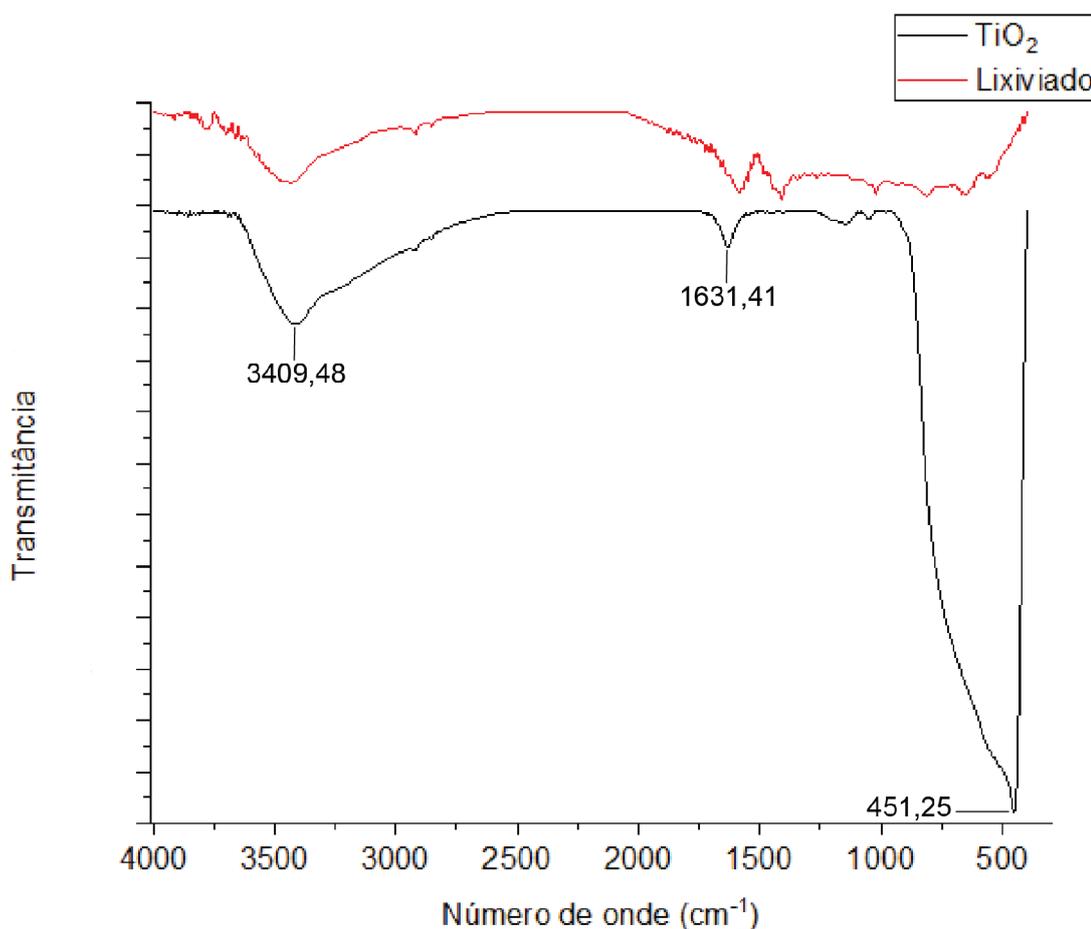
Com relação ao espectro da NA pura, observou-se que a banda em  $3640\text{ cm}^{-1}$  é atribuída ao alongamento da ligação Al-OH, enquanto a presença de umidade absorvida é observada a  $3440\text{ cm}^{-1}$ . As bandas encontradas em  $1116,56\text{ cm}^{-1}$  e  $1043,28\text{ cm}^{-1}$  são geradas pelo alongamento da ligação Si-O para fora e dentro do plano, respectivamente (158). É possível notar que as bandas correspondentes às ligações de Al e Si são bastante reduzidas quando se comparam os espectros do NM puro e do lixiviado. Este resultado vai ao encontro

dos valores obtidos para estes íons pelo ICP-MS, podendo indicar que certa quantidade da NA ficou retida no revestimento de CA.

Verifica-se nas figuras anteriores que houve grande diferença entre os espectros de cada NM e seu respectivo lixiviado. Tal fato pode indicar que os grupos funcionais identificados inicialmente, ficaram retidos na matriz asfáltica e não foram solubilizados pelo processo de lixiviação. É possível notar também que os espectros dos lixiviados são muito semelhantes, onde a banda entre 1300 e 1450  $cm^{-1}$  correspondem à flexão simétrica do  $CH_3$  e flexão assimétrica do  $(CH_2)_n$  provenientes do asfalto (159). A banda em 1600  $cm^{-1}$  é atribuída ao alongamento de C=O (aromático) (160), entre 1670 e 1820  $cm^{-1}$  estão os picos referentes ao carbonil (17), éster (1735-1750  $cm^{-1}$ ) e anidrido (1800-1830  $cm^{-1}$ ) (159).

A Figura 30 mostra os espectros do  $TiO_2$  juntamente com o respectivo lixiviado de PPC contendo o mesmo NM.

Figura 30 – Espectro de FT-IR do  $TiO_2$  e do lixiviado de PPC contendo  $TiO_2$



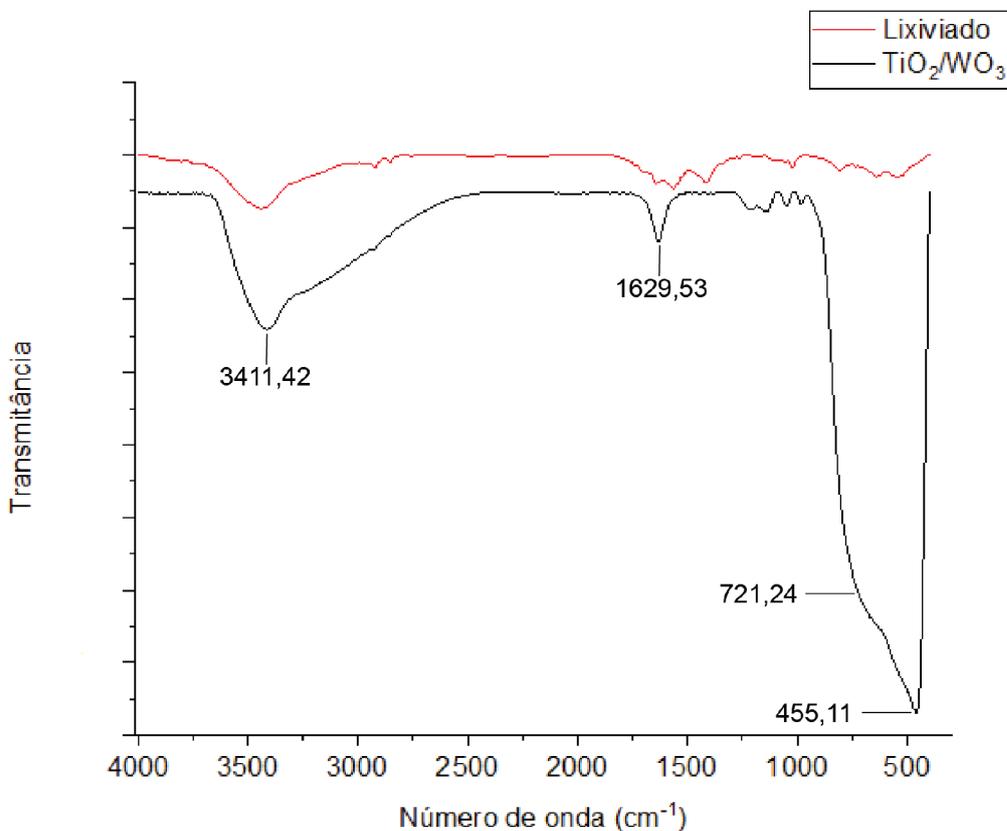
Uma banda larga observada entre 3600 e 3000  $cm^{-1}$  está relacionada ao modo de alongamento O-H do grupo hidroxila, indicando a presença de umidade na amostra. O pico característico de 1631,41  $cm^{-1}$  está associado às vibrações do grupo O-H das moléculas de água absorvidas. Portanto, os dois picos observados em 3409,48 e 1631,41  $cm^{-1}$  correspondem à moléculas de água e ao grupo hidroxila adsorvidos na superfície. A banda larga da região

de 1000 a 400  $cm^{-1}$  é atribuída aos modos de alongamento de Ti-O e de ponte de Ti-O-Ti. Para o  $TiO_2$  puro, o pico de 451,25  $cm^{-1}$  na faixa de 400-800  $cm^{-1}$  é contribuição do titânio anatase (161).

No espectro referente ao lixiviado de PPC contendo  $TiO_2$  é possível notar que a banda na faixa de 400-800  $cm^{-1}$  referente à ligação Ti-O praticamente desaparece. Este resultado vai ao encontro da baixa concentração de  $TiO_2$  verificada através da análise ICP-MS, a qual resultou em  $2,60 \pm 0,08 \mu g/L$ .

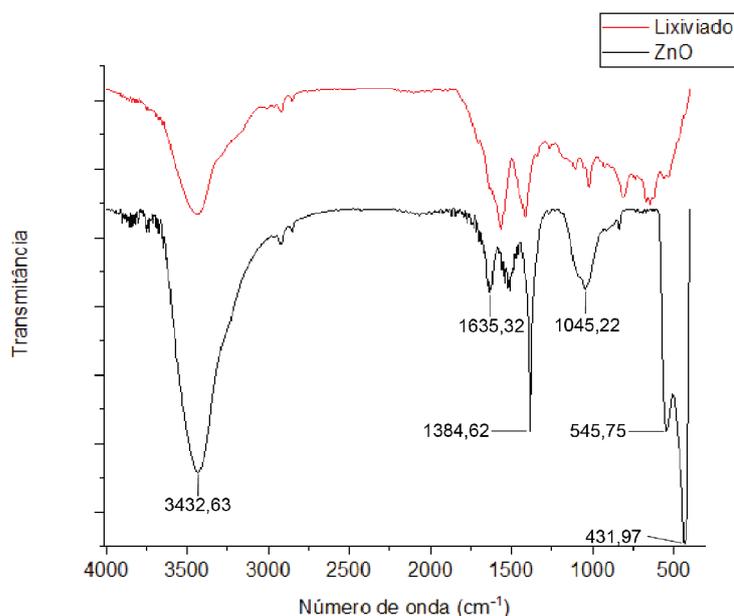
O espectro resultante da análise FTIR para o  $TiO_2/WO_3$  (Figura 31) é bastante semelhante ao do  $TiO_2$ , uma vez que seus espectros encontram-se em bandas próximas.

Figura 31 – Espectro de FT-IR do  $TiO_2/WO_3$  e do lixiviado de PPC contendo  $TiO_2/WO_3$



Os picos 3411,42 e 1629,53  $cm^{-1}$  correspondem à moléculas de água e ao grupo hidroxila adsorvidos na superfície. Uma banda em 721,24  $cm^{-1}$  pode ser atribuída às vibrações da ligação (O-W-O). É possível verificar uma forte banda de absorção em 455,11, indicando a presença da ligação Ti-O-Ti (162). Com relação ao espectro do lixiviado de PPC contendo  $TiO_2/WO_3$ , observou-se resultado semelhante ao lixiviado contendo  $TiO_2$ . A banda referente as ligações Ti-O-Ti e O-W-O fica quase imperceptível, corroborando com o resultado da análise ICP-MS que identificou concentrações de  $3,16 \pm 0,08 \mu g/L$  para o titânio e  $216 \pm 2 \mu g/L$  para o tungstênio.

A Figura 32 apresenta o espectro de FTIR para o  $ZnO$  e seu respectivo lixiviado de PPC.

Figura 32 – Espectro de FT-IR do *ZnO* e do lixiviado de PPC contendo *ZnO*

Observa-se uma banda de vibração significativa variando de  $400\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ , a qual é atribuída ao modo de alongamento característico da ligação Zn-O. Um pico amplo de  $3432,4\text{ cm}^{-1}$  indica a presença de resíduo hidroxila devido à umidade atmosférica (163). Os picos observados em  $1630$  e  $1384\text{ cm}^{-1}$  são devidos ao alongamento assimétrico e simétrico do carboxilato de zinco, respectivamente. O carboxilato pode ser proveniente de espécies reativas de plasma contendo carbono durante a síntese e a hidroxila resulta da natureza higroscópica do ZnO (164). Para o espectro do lixiviado de PPC contendo *ZnO*, observa-se a mesma tendência seguida pelo  $TiO_2$  e  $TiO_2/WO_3$ . Há uma redução drástica na banda de vibração variando de  $400\text{ cm}^{-1}$  a  $500\text{ cm}^{-1}$ , o que representa menos ligações Zn-O na amostra. De acordo com o resultado obtido no ICP-MS, a concentração de Zn presente na amostra de lixiviado foi de  $653 \pm 76\mu\text{gL}^{-1}$ , o que pode justificar a diferença entre os dois espectros encontrados no FT-IR.

Verifica-se, nas três figuras anteriores, que os espectros dos lixiviados se assemelham devido ao desaparecimento das bandas dos óxidos metálicos. Tal fato, somado ao resultado da análise de ICP-MS, reforça a hipótese de que os óxidos permaneceram aderidos ao revestimento mesmo após o processo de lixiviação. Vale ressaltar, para os 5 lixiviados avaliados através do FT-IR, há possibilidade da ocorrência de liberação dos NMs, contudo em concentrações abaixo do limite de detecção do equipamento.

### 6.3 TESTES TOXICOLÓGICOS

#### 6.3.1 Teste de Toxicidade Aguda com *Daphnia magna*

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda com os 5 NMs puros e com os 7 diferentes lixiviados são apresentados na Tabela 16 juntamente com a classificação da Diretiva UE 93/67/EEC, acordo com sua toxicidade. Vale ressaltar que a unidade de medida utilizada

para as amostras de lixiviado foi *mL/L*, uma vez que todas elas foram utilizadas em seu estado líquido para a realização dos testes.

Tabela 16 – Resultados dos testes de toxicidade aguda com *D. magna* dos 5 NMs e dos 7 lixiviados em ordem de toxicidade.

NM	pH	$CE_{50,48h}$	UE 93/67/EEC
ZnO	7,92	4,05 mg/L	Tóxico
NA	7,61	9,21 mg/L	Tóxico
NTC	7,63	117,80 mg/L	Não classificado
$TiO_2/WO_3$	7,85	954,10 mg/L	Não classificado
$TiO_2$	7,90	1074,20 mg/L	Não classificado
Lixiviado da PPC contendo $TiO_2/WO_3$	7,95	64,50 mL/L	Nocivo
Lixiviado da PPC contendo $TiO_2$	7,80	64,60 mL/L	Nocivo
Lixiviado da RefCA	7,73	83,50 mL/L	Nocivo
Lixiviado da RefPPC	7,65	104,00 mL/L	Não classificado
Lixiviado da PPC contendo ZnO	7,62	105,00 mL/L	Não classificado
Lixiviado de CA contendo NA	7,81	306,00 mL/L	Não classificado
Lixiviado de CA contendo NTC	7,75	464,80 mL/L	Não classificado

Fonte: a autora.

A classificação de NMs e sais metálicos solúveis para diferentes categorias de perigo foi realizada de acordo com a Diretiva da UE 93/67/EEC. Essa classificação baseia-se no menor valor médio de  $CE_{50}$  (concentração que causa letalidade ou efeito em 50% da população testada) dos três principais organismos ambientais: algas, crustáceos e peixes (165). Se o valor médio de  $CE_{50}$  for menor que 1 mg/L, o produto químico é classificado como muito tóxico para os organismos aquáticos; se for entre 1 e 10 mg/L = tóxico para os organismos aquáticos; entre 10 e 100 mg/L = nocivo para os organismos aquáticos; ou maior que 100 mg/L = não classificado (151, 165).

Avaliando os resultados é possível observar que o ZnO apresentou elevada toxicidade quando comparado aos outros NM, com a  $CE_{50,48h}$  de 4,05 mg/L. OSCAR (2018) encontrou a  $CE_{50,48h}$  de 6,86 mg/L para nanobastões de ZnO (ZnONB) com diâmetro entre 25 e 35 nm. Gonçalves *et al.* (2018), entretanto, encontraram o valor de 2,76 mg/L de ZnONB com diâmetro médio de 25 nm. Kim *et al.* (2017) apresentaram o valor de 1,4 mg/L de nanopartículas de ZnO com diâmetros variando de 20 a 30 nm. Bacchetta *et al.* (2016) chegaram a valores ainda menores de  $CE_{50,48h}$ , 0,99 mg/L para nanopartículas de 30 nm. A variação dos resultados pode ocorrer devido a fatores como: sensibilidade do cultivo dos organismos empregados, metodologia de preparação da solução a ser utilizada no teste, via de sintetização do NM, forma do NM, entre outros.

Além do ZnO, apenas a NA também foi enquadrada como tóxica de acordo com a

Diretiva UE 93/67/EEC, a qual apresentou a  $CE_{50,48h}$  de 9,21 mg/L. Robinson, Capper e Klaine (2010) demonstraram que a sobrevivência da *D. magna* foi afetada adversamente pela NA modificada e encontraram a  $CE_{50,48h}$  de 5,17 mg/L, valor de concentração menor do que 9,21 mg/L encontrado neste estudo, porém relativamente próximo. A adição de agentes modificadores nas nanoargilas, com sal quaternário de amônio utilizados para torná-las organofílicas, podem aumentar sua toxicidade. Sharma *et al.* (2010) verificaram, através de ensaios de toxicidade com *Salmonella sp.*, que a genotoxicidade da NA foi causada principalmente pelo sal quaternário de amônio presente na Cloisite® 30B, resultando na produção de espécies reativas do oxigênio, o que indica que as células passaram por estresse oxidativo.

Dentre os NMs considerados como "não classificados" pela Diretiva UE 93/67/EEC, está o NTC que apresentou a  $CE_{50,48h}$  de 117,80 mg/L. Trompeta *et al.* (2019) avaliaram o NTC em *D. magna* e concluíram que não foi observada relação entre sobrevivência e concentração, uma vez que quase todos os organismos sobreviveram pelo período do experimento. Além disso, os autores constataram a baixa dissolução do NTC no meio ISO, mesmo após sonicação, resultando na deposição do NM no fundo dos recipientes. O mesmo efeito foi constatado durante os testes elaborados para este estudo. Bacchetta *et al.* (2018) testaram NTC com diâmetro variando entre 6 e 13 nm e verificaram um nível baixo de toxicidade, não atingindo a  $CE_{50}$  para a população testada mesmo nas concentrações mais altas (50 mg/L). Contudo, observaram que todos os organismos em todas as concentrações apresentavam ingestão do NTC, assim como nesta pesquisa.

Além do NTC, os NMs  $TiO_2/WO_3$  e  $TiO_2$  obtiveram as maiores valores de  $CE_{50,48h}$  que correspondem a 954,10 mg/L e 1074,20 mg/L, respectivamente, de modo que ficam enquadrados como "não classificados" pela Diretiva UE 93/67/EEC. De acordo com Novak *et al.* (2018), diversos autores não encontraram efeito toxicológico em *D. magna* para concentrações de  $TiO_2$  acima de 100 mg/L. Lu *et al.* testaram diferentes fases cristalinas de  $TiO_2$  e  $TiO_2/WO_3$  com diâmetros de 14 a 20 nm e nenhum dos NMs exibiu toxicidade sob condições visíveis de luz ou escuridão após 48h exposição, resultando em  $CE_{50,48h}$  superior a 100 mg/L. Os resultados apresentados por Novak *et al.* (2018) mostraram que, em concentrações tão altas quanto 100 mg/L, o  $TiO_2$  não mostrou efeito tóxico em *D. magna*, portanto, uma  $CE_{50,48h}$  não foi calculada. Além disso, é possível observar que a dopagem do  $TiO_2$  com 6% de  $WO_3$  não ocasionou alterações na toxicidade do NM, visto que ambos apresentaram valores muito similares de  $CE_{50,48h}$  nos testes de toxicidade aguda.

Dentre os 7 lixiviados testados, 3 foram classificados como "nocivos" e 4 "não classificados", de acordo com a Diretiva UE93/67/EEC. Nota-se uma inversão na ordem de toxicidade quando comparados os resultados dos NMs em pó e dos lixiviados. Nos testes de toxicidade aguda com os pós, o  $TiO_2/WO_3$  e  $TiO_2$  foram enquadrados no intervalo de "não classificados", contudo, as amostras dos seus respectivos lixiviados de PPC foram classificadas como "nocivas", seguidas pelas amostras de REF CA e REF PPC. Isto se deve, possivelmente, pela mistura dos NMs  $TiO_2/WO_3$  e  $TiO_2$  com o cimento Portland, o que pode ter resultado na formação de

substâncias nocivas para as *D. magnas* liberadas durante o processo de lixiviação. O mesmo não ocorreu para o ZnO, terceiro NM que faz parte do grupo incorporado às PPCs, o qual foi classificado como "tóxico" quando NM puro e "não classificado" para seu respectivo lixiviado. Os resultados do ICP-MS para os íons Ti, W e Zn, indicam que houve liberação dos mesmos, mas em baixíssimas concentrações. Estes dados foram confirmados pelos resultados do FT-IR, cujos espectros resultantes para os respectivos lixiviados apontaram para a inexistência dos óxidos ligados aos metais destes 3 NMs. Outro ponto importante a ser observado é que a toxicidade do lixiviado da REF PPC está muito próximo de ser considerado "nocivo", o que indica para a possibilidade de que alguma substância presente no revestimento, independente do NM, já tenha caráter levemente tóxico para os organismos-teste.

As amostras de lixiviado de CA contendo NA e NTC foram as duas menos tóxicas dentre todos os lixiviados. Apesar disso, a amostra de lixiviado da REF CA foi classificada como "nociva" de acordo com a Diretiva UE93/67/EEC. Tanto os resultados do ICP-MS quando do FT-IR apontam para a uma baixa liberação de íons presentes na NA e praticamente nula presença de NTC e NA no lixiviado, respectivamente. É possível que os NMs adicionados ao ligante asfáltico tenham dificultado a liberação de substâncias tóxicas, permanecendo melhor aderidas à matriz asfáltica nano-modificada durante o processo de lixiviação do que na amostra REF CA. Deste modo, a referência pode ter liberado mais substâncias tóxicas que ficaram dissolvidas no lixiviado, resultando em toxicidade.

Apesar de algumas amostras analisadas terem apresentado baixa toxicidade aguda, ainda é necessário realizar a verificação do seu efeito crônico sobre a *D. magna*, uma vez que os efeitos resultantes dos dois testes (agudo e crônico) não são excludentes. Deste modo, ainda que a  $CE_{50,48h}$  tenha sido elevada (e classificada como não tóxica), é necessário verificar se a longa exposição dos organismos às amostras pode ocasionar efeitos significativos.

### 6.3.2 Teste de Toxicidade Crônica com *Daphnia magna*

Os resultados obtidos dos ensaios de toxicidade crônica com os 5 NMs puros e com os 7 lixiviados, são apresentados na Tabela 17. No teste de toxicidade crônica foram analisados os parâmetros longevidade, tamanho, reprodução e idade da primeira postura de filhotes, conforme explicitado na metodologia. As concentrações que apresentaram efeito estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) em cada um destes parâmetros foram classificadas como CEO (Concentração de Efeito Observado), e as concentrações testadas imediatamente abaixo, como a CENO (Concentração de Efeito Não Observado). Para os testes nos quais não foi verificado efeito significativo ( $p < 0,05$ ) nos parâmetros avaliados, anotou-se "NE", indicando que o valor da concentração que causa toxicidade não foi encontrado.

Tabela 17 – Resultados dos testes de toxicidade crônica dos 5 NMs puros e dos 7 lixiviados.

NM	Classificação	Longevidade	Tamanho	Reprodução	Idade 1ª postura
NTC	CEO	0,73 mg/L	0,73 mg/L	NE	NE
	CENO	0,36 mg/L	0,36 mg/L	NE	NE
Lixiv. CA/NTC	CEO	NE	NE	NE	NE
	CENO	NE	NE	NE	NE
NA	CEO	NE	0,10 mg/L	0,05 mg/L	NE
	CENO	NE	0,05 mg/L	<0,05 mg/L	NE
Lixiv. CA/NA	CEO	NE	NE	NE	NE
	CENO	NE	NE	NE	NE
TiO <sub>2</sub>	CEO	10,0 mg/L	5,0 mg/L	10,0 mg/L	NE
	CENO	5,0 mg/L	2,5 mg/L	5,0 mg/L	NE
Lixiv. PPC/TiO <sub>2</sub>	CEO	NE	NE	NE	NE
	CENO	NE	NE	NE	NE
TiO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub>	CEO	NE	NE	4,0 mg/L	NE
	CENO	NE	NE	2,0 mg/L	NE
Lixiv. PPC/TiO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub>	CEO	NE	NE	3,5 mL/L	NE
	CENO	NE	NE	2,0 mL/L	NE
ZnO	CEO	0,40 mg/L	NE	0,10 mg/L	NE
	CENO	0,20 mg/L	NE	0,05 mg/L	NE
Lixiv. PPC/ZnO	CEO	NE	NE	5,0 mL/L	NE
	CENO	NE	NE	1,0 mL/L	NE
Lixiv. REF PPC	CEO	NE	4,0 mL/L	NE	NE
	CENO	NE	2,0 mL/L	NE	NE
Lixiv. REF CA	CEO	NE	NE	NE	NE
	CENO	NE	NE	NE	NE

NE: Não Encontrado

Fonte: a autora.

A Tabela 18 classifica os resultados apresentados na Tabela 17 de acordo com a CEO encontrada para os parâmetros avaliados.

Tabela 18 – Ranking da toxicidade das amostras para os parâmetros que apresentaram efeito no teste de toxicidade crônica.

Posição	Longevidade	Tamanho	Reprodução
1º	ZnO	NA	NA

Continua na próxima página

Tabela 18 – Continuação da página anterior

Posição	Longevidade	Tamanho	Reprodução
2º	NTC	NTC	ZnO
3º	TiO <sub>2</sub>	Lixiviado REF PPC	Lixiviado de PPC/TiO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub>
4º	-	TiO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub>
5º	-	-	Lixiviado de PPC/ZnO
6º	-	-	TiO <sub>2</sub>

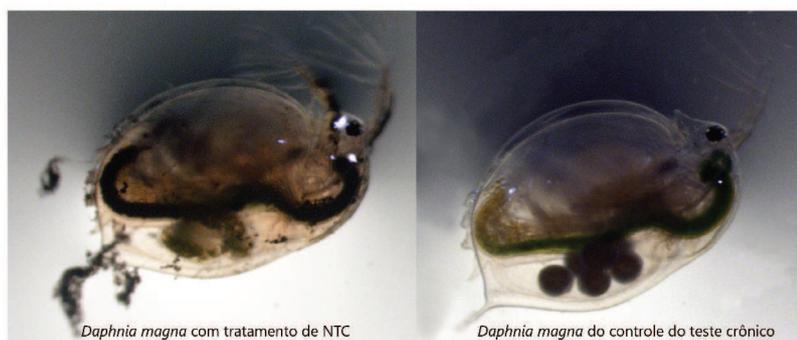
Fonte: a autora.

O parâmetro "Idade da 1ª postura" não consta na tabela, uma vez que este não apresentou efeito significativo nas concentrações testadas para todas as amostras, tanto para os NMs quanto para os lixiviados.

Com base nos dados apresentados acima para o parâmetro longevidade, é possível verificar que nenhuma das amostras de lixiviado apresentou toxicidade, contudo, 3 das 5 amostras contendo NMs resultaram em efeito toxicológico significativo. São eles: ZnO com a CEO de 0,4 mg/L; NTC com a CEO de 0,73 mg/L; e TiO<sub>2</sub> com a CEO de 10 mg/L. Wang *et al.* (2019) avaliaram a toxicidade de NPs de ZnO com tamanho de 50 nm e encontraram efeito significativo na longevidade da *D. magna* a partir de 0,20 mg/L, entretanto, Adam *et al.* (2014) não verificaram efeito significativo utilizando NPs de ZnO com diâmetro de 30 nm. A diferença entre os resultados pode ser decorrente da via de síntese das NPs de ZnO utilizadas nas pesquisas e da sua alta instabilidade no meio de cultivo M4, apontada através dos ensaios Potencial Zeta, Diâmetro Efetivo e Índice de Polidispersão.

Quanto ao NTC, Mouchet *et al.* não obtiveram efeito significativo na longevidade das *D. magnas*, contudo eles citam que os efeitos observados nos organismos podem estar relacionados à exposição aos aglomerados, induzindo obstruções intestinais decorrentes da internalização, porém não necessariamente aos efeitos intrínsecos do NTC. A Figura 33 mostra a comparação entre duas *D. magnas* ao final do teste de toxicidade crônica com o NM NTC, sendo uma exposta ao NM e outra do controle (sem exposição).

Figura 33 – *D. magna* do teste crônico com NTC.



Fonte: a autora.

É possível observar que o aparelho digestivo (tubo que vai da cabeça até a calda) apresenta coloração escura, o que é um indício da ingestão do NTC. Além disso, é possível verificar aglomerados de NTC aderidos à sua carapaça, o que pode dificultar sua mobilidade e torná-la um alvo fácil para predadores na natureza.

Liu *et al.* (2019) avaliaram diferentes composições cristalinas de  $TiO_2$  com diâmetros entre 14 e 18 nm e verificaram uma tendência de redução na longevidade da *D. magna* com o aumento da exposição às concentrações dos NMs variando de 0,25 a 1,0 mg/L. Não foi observada relação entre a longevidade e as diferentes formas cristalinas avaliadas, apontando que esta característica pode não ser a causa do efeito toxicológico. O  $TiO_2$  apresenta alta atividade fotocatalítica na presença de radiação produzindo espécies reativas de oxigênio, contudo, na ausência de luz, seus efeitos toxicológicos são muito baixos ou até mesmo negligenciáveis (179). Uma vez que os testes de toxicidade crônica possuem um fotoperíodo de 16 horas com iluminação e 8 horas de escuridão, pode-se dizer que o  $TiO_2$  torna-se mais tóxico na presença de luz, causando efeito na longevidade dos organismos-teste.

Apesar de 3 NMs terem causado efeito toxicológico na longevidade da *D. magna*, seus respectivos lixiviados não causaram. Tal resultado indica que houve uma redução da toxicidade para o parâmetro longevidade quanto estes NMs são inseridos nos revestimentos. Conforme observado nos espectros do FT-IR, grande parte dos NMs incorporados aos revestimentos continuaram aderidos após o processo de lixiviação. No ICP-MS também verificou-se uma concentração muito baixa dos íons metálicos Ti e Zn nas amostras, indicando sua manutenção no revestimento após a lixiviação.

Quanto ao parâmetro tamanho, 4 amostras apresentaram efeito toxicológico significativo. Os NMs *NA* (CEO = 0,100 mg/L), *NTC* (CEO = 0,730 mg/L) e  $TiO_2$  (CEO = 5,00 mg/L), além da amostra de lixiviado de referência das PPCs (REF PPC - CEO - 4,0 mL/L). A literatura aponta que alguns tipos de *NA* contêm elementos como Al e Si que, se liberados em quantidades suficientes, podem provocar respostas tóxicas nos organismos-testes (180, 171, 181). Os resultados do ICP-MS mostraram uma pequena liberação de íons de Al e Si nas amostras de lixiviado de CA contendo *NA*. Tal fato pode ser um indício de que o efeito toxicológico no tamanho da *D. magna* tenha sido ocasionado, em partes, pela presença destes dois íons na amostra. Vicentini *et al.* (2017) verificaram a diminuição da longevidade, reprodução e crescimento das *D. magnas* com o aumento da concentração para os 4 tipos de dióxido de silício ( $SiO_2$ ) funcionalizados avaliados, sendo a menor CEO = 3,12 mg/L (Nanotubo de  $SiO_2$  amino-funcionalizado). Nogueira *et al.* (2020) avaliaram a toxicidade crônica em *D. magna* para dois tipos de NP de óxido de alumínio ( $Al_2O_3$ ). Os resultados mostraram diminuição na longevidade, crescimento e reprodução dos organismos nas concentrações de 3,12 mg/L e 6,25 mg/L. As CEOs apresentadas por Vicentini *et al.* (2017) e Nogueira *et al.* (2020) são muito superiores à CEO encontrada para a *NA*, indicando que esta é muito mais tóxica que os NMs avaliados por eles. De acordo com Sharma *et al.* (2010), os agentes modificadores das nanoargilas (sal quaternário de amônio) podem elevar sua toxicidade, o que

justificaria a baixa concentração encontrada para a CEO.

Com relação ao *NTC*, Alloy e Roberts (2011) encontrou efeitos toxicológicos significativos ( $p < 0,01$ ) nas concentrações de 5 mg/L e 10 mg/L para *NTC* com diâmetro entre 20 e 30 nm e comprimento entre 0,5 e 2  $\mu m$ , suspenso em água com matéria orgânica natural. Conforme citado anteriormente, (178) explicitam que os efeitos observados nos organismos-teste podem estar relacionados à exposição aos aglomerados de *NTC*, induzindo obstruções intestinais decorrentes da internalização, porém não necessariamente aos efeitos intrínsecos do *NTC*. Além da redução da longevidade, outro feito também relacionado com a ingestão do *NTC* é o tamanho, uma vez que a dificuldade na absorção do alimento decorrente de obstruções no aparelho digestivo pode causar retardo no desenvolvimento da *D. magna*.

Além da longevidade, o efeito do  $TiO_2$  no tamanho da *D. magna* foi avaliado por Liu *et al.* (2019) para diferentes composições cristalinas de  $TiO_2$  com diâmetros entre 14 e 18 nm. Os resultados sugerem que concentrações acima de 0,5 mg/L podem inibir o crescimento da *D. magna*. Zhu, Chang e Chen (2010) observaram que, durante os testes de toxicidade crônica, a *D. magna* ingeriu alguns agregados de  $TiO_2$ , os quais permaneceram no corpo da *D. magna*. Isto sugere que estes organismos-teste podem não conseguir excretar todo o  $TiO_2$  ingerido, podendo a toxicidade observada estar relacionada ao acúmulo do NM no organismo. A CEO de 5 mg/L para o parâmetro tamanho encontrada no teste de toxicidade crônica realizado nesta pesquisa, está bastante acima da quantidade de íons de Ti encontrados através do ICP-MS. Isso mostra a adição de  $TiO_2$  no revestimento não apresenta potencial toxicidade a *D. magna* para o parâmetro tamanho quando lixiviado em laboratório.

Dentre os testes de toxicidade crônica com as 7 amostras de lixiviado, apenas a amostra REF PPC causou efeito toxicológico significativo no tamanho da *D. magna*, resultando na CEO de 4,0 mL/L. Este resultado aponta para uma possível redução da toxicidade tanto da matriz cimentícia quanto dos NMs quando associados para compor o revestimento. Observa-se que nenhum dos lixiviados contendo NMs apresentou toxicidade para os parâmetros longevidade e tamanho, ao contrário dos NMs avaliados.

A reprodução foi o parâmetro mais afetado pelos NMs puros e lixiviados, com 4 dos 5 NMs e 2 dentre os 7 lixiviados causando efeito na reprodução da *D. magna*. As CEOs encontradas para os NMs foram: NA = 0,05 mg/L, ZnO = 0,10 mg/L,  $TiO_2/WO_3$  = 4,0 mg/L e  $TiO_2$  = 10,0 mg/L. As CEOs encontradas para os lixiviados foram: lixiviado de PPC contendo  $TiO_2WO_3$  = 3,5 mL/L e lixiviado de PPC contendo ZnO = 5,0 mL/L.

A NA apresentou efeito toxicológico significativo para a reprodução, com a CEO igual a 0,5 mg/L. Conforme explicitado anteriormente no texto, o sal quaternário de amônio utilizado para transformar as nanoargilas em organofílicas tem potencial para aumentar a toxicidade deste NM, podendo ser este o principal agente causador dos efeitos da *D. magna*. Esta suposição é reforçada quando avaliamos o resultado do teste de toxicidade crônica com o lixiviado de CA contendo NA. Observa-se que esta amostra não causou efeito crônico na *D. magna*, e tanto o FT-IR quanto o ICP-MS indicam que grande parte da NA permaneceu no revestimento após

o processo de lixiviação. Além disso, vale ressaltar que a quantidade de *NA* adicionada ao ligante asfáltico é de apenas 3% de *NA* em peso de ligante, além da propriedade organofílica favorecer sua manutenção na matriz asfáltica.

Com relação ao efeito toxicológico do *ZnO* na reprodução da *D. magna*, Adam *et al.* (2014) encontraram a CEO de 0,131 mg/L para NPs de *ZnO* com diâmetro de 30 nm. Wang *et al.* (2019) encontraram o valor de CEO igual a 0,20 mg/L para NPs de *ZnO* com diâmetro de 50 nm. Neste estudo, o valor de CEO encontrado foi de 0,10 mg/L para *ZnO* com 20 nm de diâmetro. Observa-se que o *ZnO* utilizado nesta pesquisa apresentou maior toxicidade no parâmetro reprodução que os outros trabalhos citados, apesar dos valores apresentados serem bastante próximos. Uma possível justificativa é o menor diâmetro (20 nm) do *ZnO* utilizado nesta pesquisa, tornando-o mais reativo. Vale ressaltar que o efeito causado pelo *ZnO* foi manifestado através do aumento significativo na reprodução da *D. magna*, reação natural dos organismos quando se encontram em situação de estresse. Além do NM puro, o lixiviado de PPC contendo *ZnO* também apresentou efeito toxicológico significativo na reprodução da *D. magna* com a CEO de 5,0 mL/L. Este efeito pode ser decorrente tanto dos íons metálicos de Zn identificados pelo ICP-MS, quando por elementos lixiviados da própria matriz cimentícia.

Tanto o  $TiO_2/WO_3$  (CEO = 4,0 mg/L) quanto o  $TiO_2$  (CEO = 10 mg/L) causaram efeito significativo na reprodução da *D. magna*. Gokce, Koytepe e Ozcan (2018) verificaram diferenças significativas na taxa reprodutiva da *D. magna* em todas as concentrações acima de 0,5 mg/L para o  $TiO_2$  com diâmetro de 30 nm. Liu *et al.* (2019) relataram efeito significativo na reprodução a partir da concentração de 0,25 mg/L para diferentes composições cristalinas de  $TiO_2$  com diâmetros entre 14 e 18 nm. Os valores de CEO encontrados nesta pesquisa para o  $TiO_2/WO_3$  e  $TiO_2$  foram substancialmente superiores que os resultados da literatura. Fatores como a via de sintetização do NM podem influenciar diretamente na sua toxicidade. Observa-se também que o  $TiO_2/WO_3$  mostrou-se mais tóxico que o  $TiO_2$ . Este resultado pode estar relacionado com o *dopping* de trióxido de tungstênio ( $WO_3$ ) que recobre as NP de  $TiO_2$ , uma vez que esta é a única característica que difere entre os dois NMs. Além disso, o lixiviado de PPC contendo  $TiO_2/WO_3$  causou efeito significativo na *D. magna*, enquanto que a amostra de lixiviado contendo  $TiO_2$  não causou efeito. De acordo com os resultados do ICP-MS, o processo de lixiviação foi capaz de liberar íons de W ( $216 \pm 2 \mu g/L$ ) e Ti ( $3,16 \pm 0,08 \mu g/L$ ) da amostras de revestimento, ainda que grande parte dos óxidos tenha ficado retida, conforme apontam os espectros do FT-IR. Apesar disso, a adição de  $TiO_2$  mostrou-se mais segura, uma vez que não causou efeito toxicológico significativo em nenhum dos parâmetros analisados.

Em suma, 4 dos 7 lixiviados não causaram efeito toxicológico significativo nas concentrações testadas nesta pesquisa. São eles: lixiviado de CA contendo *NTC*, lixiviado de CA contendo *NA*, lixiviado *REFCA* e lixiviado de PPC contendo  $TiO_2$ . Nota-se que todas as amostras referentes à matriz asfáltica não apresentaram toxicidade após o processo de lixiviação, o que significa que houve uma boa estabilização e adesão da *NA* e do *NTC* no revestimento. Além disso, a característica hidrofóbica do ligante asfáltico pode ter colaborado

com a dificuldade na dissolução de elementos tóxicos na solução de extração durante o ensaio de lixiviação. Quanto ao lixiviado de PPC contendo  $TiO_2$ , nenhum dos parâmetros foi afetado através da exposição da *D. magna* ao lixiviado. Em contrapartida, o  $TiO_2$  puro causou efeito em 3 dos 4 parâmetros avaliados. Este resultado mostra que há uma redução na toxicidade deste NM quando incorporado à matriz cimentícia para as concentrações avaliadas nesta pesquisa.

### 6.3.3 Teste de Toxicidade com *Ladoltia punctata*

Na Tabela 19 é possível verificar as concentrações que apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$  de acordo com one-way Anova) inibindo 20% ( $CE_{20}$ ) e 50% ( $CE_{50}$ ) do crescimento da *L. punctata* quando comparada com a taxa de crescimento do grupo de controle.

Tabela 19 – Concentrações que causaram efeito significativo na taxa de crescimento da *L. punctata* para os 5 NMs e 7 lixiviados.

Amostra	$CE_{20}$	$CE_{50}$
NA (mg/L)	55,13	641,20
NTC (mg/L)	502,30	-
ZnO (mg/L)	630,27	-
$TiO_2$ (mg/L)	980,01	1930,51
$TiO_2/WO_3$ (mg/L)	1005,42	1503,74
Lixiviado de CA contendo NTC (mL/L)	50,36	184,32
Lixiviado de REF PPC (mL/L)	57,36	184,04
Lixiviado de PPC contendo $TiO_2/WO_3$ (mL/L)	58,67	184,04
Lixiviado de PPC contendo $TiO_2$ (mL/L)	66,95	195,80
Lixiviado de PPC contendo ZnO (mL/L)	72,78	206,59
Lixiviado de REF CA (mL/L)	88,56	237,53
Lixiviado de CA contendo NA (mL/L)	89,66	235,09

Fonte: a autora.

A NA foi o NM que apresentou menor  $CE_{50}$  dentre os 5 NMs. Comparando a  $CE_{50,48h}$  de 9,21 mg/L encontrada para a *D. magna* no teste de toxicidade aguda, com a  $CE_{50}$  de 641,20 mg/L, verificou-se uma grande diferença entre a toxicidade para os dois organismos-teste. Isto ocorre pois a *D. magna* realiza a ingestão nos NMs inseridos no meio através do mecanismo utilizado para sua alimentação, o que intensifica os efeitos toxicológicos do NM. Já a *L. punctata* é uma macrófita com paredes celulares espessas, protegendo-a e dificultando a captação do NM. Além disso, a NA apresentou elevada instabilidade quando suspensa no meio de cultivo da *L. punctata*, fazendo com que sua sedimentação ocorresse de maneira acelerada. Deste modo, somente as partículas que ficaram aderidas às raízes, ou os componentes que sofreram dissolução agiram de forma a causar efeitos no crescimento das plantas. O lixiviado de

CA contendo *NA* resultou na  $CE_{50}$  de 235,09 mL/L. Este valor foi muito próximo ao encontrado para o lixiviado de REF CA, indicando que substâncias presentes na matriz asfáltica podem ter colaborado para este resultado.

Na Tabela 19 é possível observar que não foram encontrados valores de  $CE_{50}$  para o *NTC* e *ZnO*, apenas de  $CE_{20}$ , com as concentrações avaliadas no teste de toxicidade com *L. punctata*. Em contrapartida, os respectivos valores de  $CE_{50}$  para os lixiviados contendo *NTC* e *ZnO* causaram efeito em concentrações menores que os NMs puros. Nota-se que os resultados dos lixiviados contendo *NTC* e *ZnO* foram próximos aos encontrados para as amostras de REF CA e REF PPC, indicando que outros fatores além dos NMs podem ter causado retardo no crescimento das plantas. Vale ressaltar que a diluição do meio de cultura causada pela adição da amostra de lixiviado também pode ter colaborado com a inibição de crescimento, uma vez que os nutrientes utilizados pela *L. punctata* ficam disponíveis em menor quantidade.

Tanto o  $TiO_2$  quanto o  $TiO_2/WO_3$  apresentaram concentrações bastante elevadas para a  $CE_{50}$  na *L. punctata*, iguais a 1930,51 mL/L e 1503,74 mg/L, respectivamente, indicando baixa toxicidade. Koce (2017) avaliou o efeito do  $TiO_2$  anatase (diâmetro de 25 nm) no crescimento da *Lemna minor*, espécie de planta aquática com características muito semelhantes à *L. punctata*. O resultado da pesquisa demonstrou que as nanopartículas de  $TiO_2$  não inibiram, ou inibiram ligeiramente, o crescimento da *L. minor* e os efeitos da variação de concentrações foi mínimo, sendo necessário aumentar muito a quantidade de  $TiO_2$  para causar efeitos significativos. Nota-se que as amostras de lixiviado contendo  $TiO_2$  e  $TiO_2/WO_3$  seguiram a tendência de resultados encontrados no teste de toxicidade aguda com a *D. magna*, onde as concentrações dos lixiviados que causaram efeito foram menores que dos NMs. Isto indica que substâncias presentes na matriz cimentícia podem causar efeitos nos organismos-teste.

#### 6.3.4 Síntese dos Resultados de Toxicidade para os Lixiviados

Na Tabela 20 é possível conferir um resumo dos resultados de toxicidade aguda e crônica nos testes com *D. magna* para cada um dos 7 lixiviados avaliados nesta pesquisa. No caso da *L. punctata*, nenhum dos 7 lixiviados causou efeito significativo no crescimento das macrófitas, por isso não constam na tabela.

Tabela 20 – Síntese dos resultados dos testes de toxicidade aguda e crônica com *D. magna* dos 7 lixiviados.

Amostra	Teste agudo	Teste crônico			
		Longevidade	Tamanho	Reprodução	Idade 1ª postura
Lixiv. CA/NTC	NC	NE	NE	NE	NE
		NE	NE	NE	NE
Lixiv. CA/NA	NC	NE	NE	NE	NE

Continua na próxima página

Tabela 20 – Continuação da página anterior

Amostra	Teste agudo	Teste crônico			
		Longevidade	Tamanho	Reprodução	Idade 1ª postura
Lixiv. CA/NA	NC	NE	NE	NE	NE
Lixiv. PPC/ $TiO_2$	Nocivo	NE	NE	NE	NE
		NE	NE	NE	NE
Lixiv. PPC/ $TiO_2/WO_3$	Nocivo	NE	NE	CEO=3,5	NE
		NE	NE	CENO=2,0	NE
Lixiv. PPC/ $ZnO$	NC	NE	NE	CEO=5,0	NE
		NE	NE	CENO=1,0	NE
Lixiv. REF PPC	NC	NE	CEO=4,0	NE	NE
		NE	CENO=2,0	NE	NE
Lixiv. REF CA	Nocivo	NE	NE	NE	NE
		NE	NE	NE	NE

NC: Não classificado - Diretiva UE 93/67/EEC.

NE: Não encontrado efeito crônico nas condições e concentrações avaliadas.

CEO: Concentração com Efeito Observado (mL/L).

CENO: Concentração com Efeito Não Observado (mL/L).

Fonte: a autora.

Apesar de alguns lixiviados terem causado efeito toxicológico significativo na *D. magna*, não se pode afirmar que estes efeitos foram decorrentes exclusivamente dos NMs presentes nos revestimentos. O lixiviado é uma mistura complexa composta por diversas substâncias químicas liberadas das amostras de revestimento durante o processo de lixiviação, as quais também podem ser potencialmente prejudiciais aos organismos. Portanto, os efeitos apresentados são referentes à mistura como um todo e não podem ser atribuídos aos NMs sem investigações mais aprofundadas sobre a composição química do lixiviado.

## 7 CONCLUSÕES E RECOMENDAÇÕES

### 7.1 CONCLUSÕES

A presente pesquisa tratou sobre a avaliação da toxicidade do lixiviado de revestimentos nanomodificados de concreto asfáltico e de concreto de cimento Portland nos organismos *Daphnia magna* e *Landoltia punctata*. Para tanto, foram realizados procedimentos de lixiviação nos revestimentos de CA contendo NTC - 2% e NA - 3% e PPC contendo  $TiO_2$  - 9%,  $TiO_2/WO_3$  - 9% e ZnO - 9%. Estes teores foram adicionados em peso de ligante e cimento, respectivamente. A pesquisa buscou caracterizar os NMs em seu estado puro para entender o comportamento toxicológico particular de cada um deles e verificar se a incorporação em revestimentos pode resultar num aumento da toxicidade dos lixiviados.

Constatou-se, com base nos testes de toxicidade aguda com *D. magna*, que apenas 2 dos 5 NMs puros se enquadraram na classificação de material tóxico estabelecido pela UE 93/67/EEC, são eles o ZnO e a NA organofílica. Ainda sobre os testes de toxicidade aguda com *D. magna*, 3 dos 7 lixiviados foram classificados como "nocivos" pela UE 93/67/EEC, são eles: lixiviado de PPC contendo  $TiO_2/WO_3$ , lixiviado de PPC contendo  $TiO_2$  e lixiviado de REF CA.

Conclui-se que, nas concentrações e condições em que foram realizados os testes de toxicidade crônica, os lixiviados dos revestimentos contendo NTC, NA ou  $TiO_2$  não foram tóxicos para o organismo-teste *D. magna*. Os lixiviados de PPC contendo  $TiO_2/WO_3$  e ZnO apresentaram toxicidade no parâmetro reprodução, contudo não se pode afirmar que o efeito foi causado pelos NMs, uma vez que a amostra de lixiviado de REF PPC causou efeito no parâmetro tamanho. Isto indica que podem existir outras substâncias tóxicas presentes no lixiviado que colaboraram com os resultados encontrados para os lixiviados contendo  $TiO_2/WO_3$  e ZnO.

Quanto à toxicidade dos 5 NMs puros e dos 7 lixiviados para as *L. punctata*, os resultados apontaram que tanto os NMs quanto os lixiviados podem ser considerados não tóxicos para esta macrófita.

Em suma, nas condições em que foram avaliados os revestimentos de CCP e CA nanomodificados, não há indícios de impactos negativos diretamente associados aos NMs liberados durante o processo de lixiviação, cuja metodologia pode ser considerada conservadora. Contudo, pesquisas em diferentes cenários, como em organismos que vivem no solo ou em sedimentos, devem ser desenvolvidas para complementar o perfil toxicológico dos lixiviados de revestimentos nanomodificados, auxiliando na tomada de decisão quanto ao uso destes materiais.

### 7.2 RECOMENDAÇÕES

- Realizar uma especificação completa dos metais presentes nos lixiviados em busca de verificar outros componentes que podem causar efeitos toxicológicos;

- Utilizar outras metodologias de lixiviação menos agressivas e mais próximas do cenário real para a obtenção das amostras líquidas;
- Verificar a ocorrência de efeitos mutagênicos na *D. magna* e efeitos multigeracionais dos filhos dos organismos tratados com lixiviado;
- Avaliar os danos na parede celular da *L. punctata* e verificar se houve absorção de NMs ou íons metálicos;
- Testar outros organismos como a bactéria marinha luminescente *Aliivibrio fischeri*, amplamente utilizada em avaliações toxicológicas;
- Realizar a liofilização das amostras de lixiviado antes de iniciar os testes de toxicidade, visando reduzir a diluição do meio de cultivo utilizado nos testes.

## REFERÊNCIAS

- 1 GOPALAKRISHNAN, K. *et al.* *Nanotechnology in Civil Infrastructure - A Paradigm Shift*. [S.l.: s.n.], 2011. 273 p. Citado na página 23.
- 2 MOORE, M. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the aquatic environment? *Environment international*, Elsevier, v. 32, n. 8, p. 967–976, 2006. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 31.
- 3 ROCO, M. C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current opinion in biotechnology*, Elsevier, v. 14, n. 3, p. 337–346, 2003. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 31.
- 4 LAI, R. W. S. *et al.* Regulation of engineered nanomaterials: current challenges, insights and future directions. *Environmental Science and Pollution Research*, v. 25, n. 4, p. 3060–3077, Feb 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11356-017-9489-0>>. Citado na página 23.
- 5 HANDY, R. D.; OWEN, R.; VALSAMI-JONES, E. The ecotoxicology of nanoparticles and nanomaterials: current status, knowledge gaps, challenges, and future needs. *Ecotoxicology*, v. 17, n. 5, p. 315–325, Jul 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s10646-008-0206-0>>. Citado na página 23.
- 6 MOHAJERANI, A. *et al.* Nanoparticles in construction materials and other applications, and implications of nanoparticle use. *Materials*, v. 12, n. 19, p. 1–25, 2019. ISSN 19961944. Citado na página 23.
- 7 TEIZER, J. *et al.* Nanotechnology and Its Impact on Construction: Bridging the Gap between Researchers and Industry Professionals. *Journal of Construction Engineering and Management*, v. 138, p. 594–604, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 31.
- 8 MOHAMED, A. S. Y. Nano-innovation in construction, a new era of sustainability. *energy*, v. 65, p. 28, 2015. Citado na página 23.
- 9 AZAHAR, W. *et al.* Application of nanotechnology in asphalt binder: A conspectus and overview. *Jurnal Teknologi*, v. 76, 2015. Citado na página 23.
- 10 BALBO, J. *Pavimentação asfáltica: materiais, projeto e restauração*. [S.l.]: Oficina de Textos, 2007. ISBN 9788586238567. Citado 2 vezes nas páginas 23 e 27.
- 11 MELO, J. V. S. de; TRICHÊS, G. Evaluation of properties and fatigue life estimation of asphalt mixture modified by organophilic nanoclay. *Construction and Building Materials*, v. 140, p. 364–373, 2017. ISSN 09500618. Citado na página 23.
- 12 RECHES, Y. *et al.* Agglomeration and reactivity of nanoparticles of sio<sub>2</sub>, tio<sub>2</sub>, al<sub>2</sub>o<sub>3</sub>, fe<sub>2</sub>o<sub>3</sub>, and clays in cement pastes and effects on compressive strength at ambient and elevated temperatures. *Construction and Building Materials*, Elsevier, v. 167, p. 860–873, 2018. Citado 4 vezes nas páginas 23, 31, 32 e 74.
- 13 BICA, B. O. *Análise da Eficiência Fotocatalítica e do Desempenho Mecânico de Peças Pré-Moldadas de Concreto Para Pavimentação Nanomodificadas com Óxido de Zinco e Dióxido de Titânio*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019. Citado 6 vezes nas páginas 23, 30, 32, 48, 50 e 53.

- 14 MELO, J. V. S. de *et al.* Development and evaluation of the efficiency of photocatalytic pavement blocks in the laboratory and after one year in the field. *Construction and Building Materials*, v. 37, p. 310 – 319, 2012. ISSN 0950-0618. Non Destructive Techniques for Assessment of Concrete. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950061812005430>>. Citado 3 vezes nas páginas 23, 34 e 35.
- 15 FANG, C. *et al.* Nanomaterials applied in asphalt modification: A review. *Journal of Materials Science and Technology*, Elsevier Ltd, v. 29, p. 589–594, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmst.2013.04.008>>. Citado na página 23.
- 16 MELO, J. V. S. de. Desenvolvimento E Estudo Do Comportamento Reológico E Desempenho Mecânico De Concretos Asfálticos Modificados Com Nanocompósitos. 2014. Citado 6 vezes nas páginas 23, 31, 32, 50, 55 e 56.
- 17 LI, R. *et al.* Developments of nano materials and technologies on asphalt materials – A review. *Construction and Building Materials*, Elsevier Ltd, v. 143, p. 633–648, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.03.158>>. Citado 4 vezes nas páginas 23, 24, 32 e 79.
- 18 LEE, J.; MAHENDRA, S.; ALVAREZ, P. J. Nanomaterials in the construction industry: a review of their applications and environmental health and safety considerations. *ACS Nano*, v. 4, n. 7, p. 3580–3590, 2010. Citado 4 vezes nas páginas 23, 24, 33 e 37.
- 19 LOUIE, S. M.; MA, R.; LOWRY, G. V. Transformations of Nanomaterials in the Environment. *Frontiers of Nanoscience*, v. 7, p. 55–87, 2014. Citado 3 vezes nas páginas 23, 24 e 35.
- 20 KÜNNIGER, T. *et al.* Release and environmental impact of silver nanoparticles and conventional organic biocides from coated wooden façades. *Environmental Pollution*, Elsevier, v. 184, p. 464–471, jan 2014. ISSN 0269-7491. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749113005046>>. Citado na página 24.
- 21 BAALOUSHA, M. *et al.* Outdoor urban nanomaterials: The emergence of a new, integrated, and critical field of study. *Science of The Total Environment*, Elsevier, v. 557-558, p. 740–753, jul 2016. ISSN 0048-9697. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0048969716305587>>. Citado na página 24.
- 22 SANCHEZ, F.; SOBOLEV, K. Nanotechnology in concrete - A review. *Construction and Building Materials*, Elsevier Ltd, v. 24, n. 11, p. 2060–2071, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 32.
- 23 MAUTER, M. S. *et al.* The role of nanotechnology in tackling global water challenges. *Nature Sustainability*, Springer US, v. 1, n. 4, p. 166–175, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41893-018-0046-8>>. Citado na página 24.
- 24 BERNUCCI, L. B. *et al.* Pavimentação asfáltica: formação básica para engenheiros. *Rio de Janeiro*, v. 504, 2008. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 28.
- 25 CNT, C. N. d. T. Pesquisa CNT de rodovias 2018: relatório gerencial. SEST. SENAT. Brasília, 2018. Citado na página 27.

- 26 DNIT. Manual de pavimentação. 2006. Citado 3 vezes nas páginas 27, 28 e 29.
- 27 CNT, C.-N.-d.-T. *Impactos da qualidade do asfalto sobre o transporte rodoviário*. Brasil, 2019. 78 p. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 28.
- 28 MELO, J. V. Desenvolvimento de peças pré-moldadas de concreto fotocatalíticas para pavimentação e purificação do ar. p. 191, 2011. Citado 4 vezes nas páginas 27, 48, 50 e 53.
- 29 GODINHO, D. P. Pavimento intertravado: uma reflexão sob a ótica da durabilidade e sustentabilidade. UFMG, 2009. Citado na página 29.
- 30 FOLLI, A. *et al.* Field study of air purifying paving elements containing TiO<sub>2</sub>. *Atmospheric Environment*, Elsevier Ltd, v. 107, n. 2, p. 44–51, 2015. ISSN 18732844. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.atmosenv.2015.02.025>>. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 32.
- 31 MIYAZAKI, K.; ISLAM, N. Nanotechnology systems of innovation-An analysis of industry and academia research activities. *Technovation*, v. 27, n. 11, p. 661–675, 2007. Citado na página 31.
- 32 FARRÉ, M.; SANCHÍS, J.; BARCELÓ, D. Analysis and assessment of the occurrence, the fate and the behavior of nanomaterials in the environment. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 30, n. 3, p. 517–527, 2011. Citado na página 31.
- 33 HEILIGTAG, F. J.; NIEDERBERGER, M. The fascinating world of nanoparticle research. *Materials Today*, Elsevier Ltd., v. 16, n. 7-8, p. 262–271, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2013.07.004>>. Citado na página 31.
- 34 STEYN, W. J. Potential Applications of Nanotechnology. *Journal of Transportation Engineering Asce*, v. 135, p. 764–772, 2009. Citado na página 31.
- 35 BIRGISSON, B. *et al.* American Road Map for Research for Nanotechnology-Based Concrete Materials. *Transportation Research Record: Journal of the Transportation Research Board*, v. 2142, n. August 2006, p. 130–137, 2010. Disponível em: <<http://trrjournalonline.trb.org/doi/10.3141/2142-20>>. Citado na página 31.
- 36 MELO, J. V. S. de; TRICHÊS, G. Study of the influence of nano-TiO<sub>2</sub> on the properties of Portland cement concrete for application on road surfaces. *Road Materials and Pavement Design*, v. 0629, n. February, p. 1–16, 2017. ISSN 1468-0629. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/14680629.2017.1285811>>. Citado 2 vezes nas páginas 31 e 32.
- 37 RECHES, Y. Nanoparticles as concrete additives: Review and perspectives. *Construction and Building Materials*, Elsevier Ltd, v. 175, p. 483–495, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2018.04.214>>. Citado na página 31.
- 38 AREFI, M. R.; REZAEI-ZARCHI, S. Synthesis of zinc oxide nanoparticles and their effect on the compressive strength and setting time of self-compacted concrete paste as cementitious composites. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, n. 4, p. 4340–4350, 2012. ISSN 14220067. Citado na página 31.
- 39 GHAHARI, S. A.; GHAFARI, E.; LU, N. Effect of ZnO nanoparticles on thermoelectric properties of cement composite for waste heat harvesting. *Construction and Building Materials*, v. 146, p. 755–763, 2017. ISSN 09500618. Citado na página 32.

- 40 NOCHAIYA, T. *et al.* Microstructure, characterizations, functionality and compressive strength of cement-based materials using zinc oxide nanoparticles as an additive. *Journal of Alloys and Compounds*, Elsevier B.V., v. 630, p. 1–10, 2015. ISSN 09258388. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jallcom.2014.11.043>>. Citado na página 32.
- 41 SINGH, V. P. *et al.* Photocatalytic, hydrophobic and antimicrobial characteristics of ZnO nano needle embedded cement composites. *Construction and Building Materials*, Elsevier Ltd, v. 158, p. 285–294, 2018. ISSN 09500618. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.10.035>>. Citado na página 32.
- 42 ZHANG, R. *et al.* Influences of nano-TiO<sub>2</sub> on the properties of cement-based materials: Hydration and drying shrinkage. *Construction and Building Materials*, Elsevier Ltd, v. 81, p. 35–41, 2015. ISSN 09500618. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2015.02.003>>. Citado na página 32.
- 43 LI, H.; ZHANG, M. hua; OU, J. ping. Abrasion resistance of concrete containing nano-particles for pavement. *Wear*, v. 260, n. 11-12, p. 1262–1266, 2006. ISSN 00431648. Citado na página 32.
- 44 SIKKEMA, J. K.; ONG, S. K.; ALLEMAN, J. E. Photocatalytic concrete pavements: Laboratory investigation of NO oxidation rate under varied environmental conditions. *Construction and Building Materials*, Elsevier Ltd, v. 100, n. X, p. 305–314, 2015. ISSN 09500618. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2015.10.005>>. Citado na página 32.
- 45 PÉREZ-NICOLÁS, M. *et al.* Atmospheric NO<sub>x</sub> removal: Study of cement mortars with iron- and vanadium-doped TiO<sub>2</sub> as visible light-sensitive photocatalysts. *Construction and Building Materials*, v. 149, p. 257–271, 2017. ISSN 09500618. Citado na página 32.
- 46 LUÉVANO-HIPÓLITO, E. *et al.* Synthesis, characterization and photocatalytic activity of WO<sub>3</sub>/TiO<sub>2</sub> for NO removal under UV and visible light irradiation. *Materials Chemistry and Physics*, v. 148, n. 1-2, p. 208–213, 2014. ISSN 02540584. Citado na página 32.
- 47 YAO, Y. *et al.* In situ construction and sensing mechanism of TiO<sub>2</sub>–WO<sub>3</sub> composite coatings based on the semiconductor heterojunctions. *Journal of Materials Research and Technology*, Elsevier, v. 8, n. 4, p. 3580–3588, jul 2019. ISSN 2238-7854. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2238785419300651>>. Citado na página 32.
- 48 SANTAGATA, E. *et al.* Rheological Characterization of Bituminous Binders Modified with Carbon Nanotubes. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, Elsevier B.V., v. 53, p. 546–555, 2012. ISSN 18770428. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1877042812043674>>. Citado na página 32.
- 49 MELO], J. V. S. [de; TRICHÊS, G.; ROSSO], L. T. [de. Experimental evaluation of the influence of reinforcement with multi-walled carbon nanotubes (mwcnts) on the properties and fatigue life of hot mix asphalt. *Construction and Building Materials*, v. 162, p. 369 – 382, 2018. ISSN 0950-0618. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950061817324364>>. Citado na página 32.
- 50 ARABANI, M.; FARAMARZI, M. Characterization of CNTs-modified HMA's mechanical properties. *Construction and Building Materials*, Elsevier Ltd, v. 83, p. 207–215, 2015. Citado na página 32.

- 51 LIU, G. *et al.* Influence of organo-montmorillonites on fatigue properties of bitumen and mortar. *International Journal of Fatigue*, Elsevier Ltd, v. 33, n. 12, p. 1574–1582, 2011. ISSN 01421123. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfatigue.2011.06.014>>. Citado na página 32.
- 52 YOU, Z. *et al.* Nanoclay-modified asphalt materials: Preparation and characterization. *Construction and Building Materials*, Elsevier Ltd, v. 25, n. 2, p. 1072–1078, 2011. ISSN 09500618. Citado na página 32.
- 53 ABNT. *ABNT NBR 10005:2004 Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos*. [S.l.], 2004. 16 p. Citado 2 vezes nas páginas 33 e 44.
- 54 BERENICE, C.; ARANDA, A. *Leaching tests comparison for solidified and stabilized contaminated sediments*. 99 p. Tese (Doutorado) — UNIVERSITY OF OSLO, 2008. Citado na página 33.
- 55 KOIVISTO, A. J. *et al.* Quantitative material releases from products and articles containing manufactured nanomaterials: Towards a release library. *NanoImpact*, v. 5, p. 119–132, 2017. ISSN 24520748. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.impact.2017.02.001>>. Citado na página 33.
- 56 COUCHINHO, R. P. d. S. *Medição do coeficiente de atrito da superfície de pavimentos: estudo do equipamento Grip Tester*. Tese (Doutorado) — INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA. Citado na página 33.
- 57 BITTNAR, Z. *et al.* *Nanotechnology in Construction: Proceedings of the NICOM3*. [S.l.]: Springer Science & Business Media, 2009. Citado na página 35.
- 58 OBERDÖRSTER, G.; STONE, V.; DONALDSON, K. Toxicology of nanoparticles: a historical perspective. *Nanotoxicology*, Taylor & Francis, v. 1, n. 1, p. 2–25, 2007. Citado 3 vezes nas páginas 35, 37 e 38.
- 59 SALIERI, B. *et al.* Life cycle assessment of manufactured nanomaterials: Where are we? *NanoImpact*, Elsevier, v. 10, n. June 2017, p. 108–120, 2018. ISSN 24520748. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.12.003>>. Citado na página 35.
- 60 TANGAA, S. R. *et al.* Trophic transfer of metal-based nanoparticles in aquatic environments: A review and recommendations for future research focus. *Environmental Science: Nano*, Royal Society of Chemistry, v. 3, n. 5, p. 966–981, 2016. ISSN 20518161. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C5EN00280J>>. Citado na página 35.
- 61 MCQUEEN, C. *Comprehensive Toxicology*. Elsevier Science, 2010. ISBN 9780080468846. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=jzCAKsa2CpMC>>. Citado na página 37.
- 62 CHEN, L.; GIESY, J. P.; XIE, P. The dose makes the poison. *Science of the Total Environment*, v. 621, n. June, p. 649–653, 2018. Citado na página 37.
- 63 WIESNER, M. R. *et al.* Assessing the risks of manufactured nanomaterials. *Environmental Science and Technology*, v. 40, n. 14, p. 4336–4345, 2006. ISSN 0013936X. Citado na página 37.

- 64 OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental health perspectives*, National Institute of Environmental Health Science, v. 113, n. 7, p. 823, 2005. Citado na página 37.
- 65 HOLSAPPLE, M. P. *et al.* Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part ii: Toxicological and safety evaluation of nanomaterials, current challenges and data needs. *Toxicological Sciences*, v. 88, n. 1, p. 12–17, 2005. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1093/toxsci/kfi293>>. Citado na página 37.
- 66 AGUILAR, Z. *Nanomaterials for medical applications*. [S.l.]: Newnes, 2012. Citado na página 37.
- 67 FLISS, M. S. *et al.* Facile detection of mitochondrial dna mutations in tumors and bodily fluids. *Science*, American Association for the Advancement of Science, v. 287, n. 5460, p. 2017–2019, 2000. Citado na página 37.
- 68 ADAMS, L. K.; LYON, D. Y.; ALVAREZ, P. J. Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO<sub>2</sub>, SiO<sub>2</sub>, and ZnO water suspensions. *Water Research*, v. 40, n. 19, p. 3527–3532, 2006. ISSN 00431354. Citado 2 vezes nas páginas 37 e 40.
- 69 BRAYNER, R. *et al.* Toxicological impact studies based on *Escherichia coli* bacteria in ultrafine ZnO nanoparticles colloidal medium. *Nano Letters*, v. 6, n. 4, p. 866–870, 2006. ISSN 1530-6984. Citado na página 37.
- 70 HUANG, Z. *et al.* Toxicological effect of ZnO nanoparticles based on bacteria. *Langmuir*, v. 24, n. 8, p. 4140–4144, 2008. ISSN 07437463. Citado 2 vezes nas páginas 37 e 40.
- 71 GOODMAN, C. M. *et al.* Toxicity of gold nanoparticles functionalized with cationic and anionic side chains. *Bioconjugate Chemistry*, v. 15, n. 4, p. 897–900, 2004. ISSN 10431802. Citado na página 37.
- 72 GE, Y.; SCHIMEL, J. P.; HOLDEN, P. a. Evidence for negative effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles on soil bacterial communities. *Environ Sci. Technol.*, v. 45, n. 4, p. 1659–64, 2011. ISSN 1520-5851. Citado 2 vezes nas páginas 37 e 40.
- 73 HU, C. W. *et al.* Toxicological effects of TiO<sub>2</sub> and ZnO nanoparticles in soil on earthworm *Eisenia fetida*. *Soil Biology and Biochemistry*, Elsevier Ltd, v. 42, n. 4, p. 586–591, 2010. ISSN 00380717. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.soilbio.2009.12.007>>. Citado na página 37.
- 74 WANG, B. *et al.* Acute toxicological impact of nano- and submicro-scaled zinc oxide powder on healthy adult mice. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 10, n. 2, p. 263–276, 2008. ISSN 13880764. Citado na página 37.
- 75 KASEMETS, K. *et al.* Toxicity of nanoparticles of ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Toxicology in Vitro*, Elsevier Ltd, v. 23, n. 6, p. 1116–1122, 2009. ISSN 08872333. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2009.05.015>>. Citado na página 38.
- 76 BLAISE, C. *et al.* Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. *Environmental Toxicology: An International Journal*, Wiley Online Library, v. 23, n. 5, p. 591–598, 2008. Citado na página 38.

- 77 NEL, A. Toxic Potential of Materials. *Science*, v. 311, n. 5726, p. 622–627, 2007. ISSN 0036-8075. Citado na página 38.
- 78 REHN, B. *et al.* Investigations on the inflammatory and genotoxic lung effects of two types of titanium dioxide: Untreated and surface treated. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 189, n. 2, p. 84–95, 2003. ISSN 0041008X. Citado na página 38.
- 79 KANG, S. *et al.* Single-walled carbon nanotubes exhibit strong antimicrobial activity. *Langmuir*, v. 23, n. 17, p. 8670–8673, 2007. ISSN 07437463. Citado 2 vezes nas páginas 38 e 40.
- 80 DING, L. *et al.* Molecular Characterization of the Cytotoxic Mechanism of Multiwall Carbon Nanotubes and Nano-Onions on Human Skin Fibroblast. *Nano Letter*, v. 5, n. 12, p. 2448–2464, 2005. ISSN 1530-6984. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2733876/pdf/nihms122160.pdf>>. Citado 2 vezes nas páginas 38 e 40.
- 81 YANG, H. *et al.* Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. *Journal of Applied Toxicology*, v. 29, n. 1, p. 69–78, 2009. ISSN 0260437X. Citado 2 vezes nas páginas 38 e 40.
- 82 BHATTACHARYA, K. *et al.* Mechanisms of carbon nanotube-induced toxicity: Focus on pulmonary inflammation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, Elsevier B.V., v. 65, n. 15, p. 2087–2097, 2013. ISSN 0169409X. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.05.012>>. Citado na página 38.
- 83 DONALDSON, K. *et al.* Carbon nanotubes: A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. *Toxicological Sciences*, v. 92, n. 1, p. 5–22, 2006. ISSN 10966080. Citado na página 38.
- 84 LAM, C.-w. *et al.* A Review of Carbon Nanotube Toxicity and Assessment of Potential Occupational and Environmental Health Risks. *Critical Reviews in Toxicology*, v. 36, n. 3, p. 189–217, 2006. ISSN 1040-8444. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408440600570233>>. Citado na página 38.
- 85 BOTTINI, M. *et al.* Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. *Toxicology Letters*, v. 160, n. 2, p. 121–126, 2006. ISSN 03784274. Citado na página 38.
- 86 KRYUCHKOVA, M. *et al.* Evaluation of toxicity of nanoclays and graphene oxide: in vivo A Paramecium caudatum study. *Environmental Science: Nano*, Royal Society of Chemistry, v. 3, n. 2, p. 442–452, 2016. ISSN 20518161. Citado 2 vezes nas páginas 38 e 40.
- 87 LI, P. R. *et al.* Evaluation on cytotoxicity and genotoxicity of the exfoliated silicate nanoclay. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 2, n. 6, p. 1608–1613, 2010. ISSN 19448244. Citado na página 38.
- 88 LORDAN, S.; KENNEDY, J. E.; HIGGINBOTHAM, C. L. Cytotoxic effects induced by unmodified and organically modified nanoclays in the human hepatic HepG2 cell line. *Journal of Applied Toxicology*, v. 31, n. 1, p. 27–35, 2011. ISSN 0260437X. Citado na página 38.
- 89 STUECKLE, T. A. *et al.* Short-Term Pulmonary Toxicity Assessment of Pre-and Post-incinerated Organomodified Nanoclay in Mice. *ACS Nano*, v. 12, n. 3, p. 2292–2310, 2018. ISSN 1936086X. Citado na página 38.

- 90 CHEN, Y. *et al.* Rice husk and sewage sludge co-combustion ash: Leaching behavior analysis and cementitious property. *Construction and Building Materials*, v. 163, p. 63–72, 2018. ISSN 09500618. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.10.112>>. Citado 2 vezes nas páginas 38 e 45.
- 91 GWENZI, W.; MUPATSI, N. M. Evaluation of heavy metal leaching from coal ash-versus conventional concrete monoliths and debris. *Waste Management*, Pergamon, v. 49, p. 114–123, mar 2016. ISSN 0956-053X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956053X15302622>>. Citado na página 38.
- 92 BORRELY, S. I. *Autarquia Associada à Universidade de São Paulo*. Tese (Doutorado) — UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, 2001. Citado na página 38.
- 93 COSTA, C. R. *et al.* A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. *Química Nova*, Sociedade Brasileira de Química, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008. Citado 2 vezes nas páginas 39 e 40.
- 94 RAND, G.; PETROCELLI, S. *Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications*. 1 1985. Citado na página 39.
- 95 COSTA, C. H. da. *AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DA NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE CROMO III ATRAVÉS DE ENSAIOS IN VIVO E IN VITRO*. 197 p. Tese (Tese de doutorado) — Universidade Federal de Santa Catarina, 2014. Citado 5 vezes nas páginas 39, 43, 44, 67 e 69.
- 96 RESTREPO, J. J. B. Determinação da taxa de transferência de elementos-traço de resíduos sólidos urbanos para lixiviado. 2013. Citado na página 39.
- 97 RAND, G. *Fundamentals Of Aquatic Toxicology: Effects, Environmental Fate And Risk Assessment*. Taylor & Francis, 1995. ISBN 9781560320913. Disponível em: <<https://books.google.com.br/books?id=YDqDy4bkW2QC>>. Citado 2 vezes nas páginas 39 e 40.
- 98 ROSSETTO, A. L. d. O. F. Avaliação dos efeitos tóxicos da nanopartícula e micropartícula de óxido de cobre em diferentes organismos aquáticos. *Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2016.*, p. 166, 2016. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/168228>>. Citado 2 vezes nas páginas 39 e 43.
- 99 COSTA, C. H. da. Estudo ecotoxicológico para valorização do resíduo produzido no processo de polimento de piso porcelanato na indústria cerâmica. 2010. Citado na página 39.
- 100 AZEVEDO, F. d.; CHASIN, A. d. M. As bases toxicológicas da ecotoxicologia. *São Carlos, SP: RiMa*, v. 2004, 2003. Citado na página 39.
- 101 BRASIL, C. Resolução. 357, de 17 de março de 2005. *Conselho Nacional do Meio Ambiente-CONAMA*, v. 357, 2005. Citado na página 39.
- 102 FUZINATTO, C. F. Avaliação Da Qualidade Da Água De Rios Localizados Na Ilha De Santa Catarina Utilizando Parâmetros Toxicológicos E O Índice De Qualidade De Água. *Dissertação mestrado Eng Ambiental UFSC*, p. 214, 2009. ISSN 1098-6596. Citado 2 vezes nas páginas 39 e 41.

- 103 LEAD, J. R. *et al.* Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects—An updated review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 37, n. 8, p. 2029–2063, 2018. ISSN 15528618. Citado 2 vezes nas páginas 40 e 41.
- 104 NAVARRO, E. *et al.* Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi. *Ecotoxicology*, v. 17, n. 5, p. 372–386, 2008. ISSN 09639292. Citado 2 vezes nas páginas 40 e 42.
- 105 ARUOJA, V. *et al.* Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the Total Environment*, Elsevier B.V., v. 407, n. 4, p. 1461–1468, 2009. ISSN 00489697. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.10.053>>. Citado na página 40.
- 106 HEINLAAN, M. *et al.* Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO<sub>2</sub> to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. *Chemosphere*, Pergamon, v. 71, n. 7, p. 1308–1316, apr 2008. ISSN 0045-6535. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653507014919>>. Citado na página 40.
- 107 ARUOJA, V. *et al.* Toxicity of 12 metal-based nanoparticles to algae, bacteria and protozoa. *Environmental Science: Nano*, Royal Society of Chemistry, v. 2, n. 6, p. 630–644, 2015. ISSN 20518161. Citado na página 40.
- 108 CHEN, X.; O'HALLORAN, J.; JANSEN, M. A. The toxicity of zinc oxide nanoparticles to *Lemna minor* (L.) is predominantly caused by dissolved Zn. *Aquatic Toxicology*, Elsevier B.V., v. 174, p. 46–53, 2016. ISSN 18791514. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2016.02.012>>. Citado na página 40.
- 109 BAI, W. *et al.* Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: A physicochemical study of toxicity mechanism. *Journal of Nanoparticle Research*, v. 12, n. 5, p. 1645–1654, 2010. ISSN 13880764. Citado na página 40.
- 110 DASARI, T. P.; PATHAKOTI, K.; HWANG, H.-M. Determination of the mechanism of photoinduced toxicity of selected metal oxide nanoparticles (ZnO, CuO, Co<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and TiO<sub>2</sub>) to *E. coli* bacteria. *Journal of Environmental Sciences*, Elsevier, v. 25, n. 5, p. 882–888, may 2013. ISSN 1001-0742. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001074212601521>>. Citado na página 40.
- 111 KAWETEERAWAT, C. *et al.* Toxicity of metal oxide nanoparticles in *Escherichia coli* correlates with conduction band and hydration energies. *Environmental Science and Technology*, v. 49, n. 2, p. 1105–1112, 2015. ISSN 15205851. Citado na página 40.
- 112 FEKETE-KERTÉSZ, I. *et al.* The effect of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the aquatic ecosystem: A comparative ecotoxicity study with test organisms of different trophic levels. *Periodica Polytechnica Chemical Engineering*, v. 60, n. 4, p. 231–243, 2016. ISSN 15873765. Citado na página 40.
- 113 COSTA, P. M.; FADEEL, B. Emerging systems biology approaches in nanotoxicology: Towards a mechanism-based understanding of nanomaterial hazard and risk. *Toxicology and Applied Pharmacology*, Academic Press, v. 299, p. 101–111, may 2016. ISSN 0041-008X. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X15301605>>. Citado na página 40.

- 114 LI, P. R. *et al.* Evaluation on cytotoxicity and genotoxicity of the exfoliated silicate nanoclay. *ACS Applied Materials and Interfaces*, v. 2, n. 6, p. 1608–1613, 2010. ISSN 19448244. Citado na página 40.
- 115 WAGNER, A. *et al.* Toxicity evaluations of nanoclays and thermally degraded byproducts through spectroscopical and microscopical approaches. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, Elsevier, v. 1861, n. 1, p. 3406–3415, jan 2017. ISSN 0304-4165. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304416516303257>>. Citado na página 40.
- 116 ARENZON, A.; NETO, T. J. P.; GERBER, W. Manual sobre toxicidade em efluentes industriais. *Porto Alegre: Cespe/Senai de Artes Gráficas Henrique D'ávila Bertaso*, 2011. Citado na página 40.
- 117 HJORTH, R. *et al.* Regulatory adequacy of aquatic ecotoxicity testing of nanomaterials. *NanoImpact*, Elsevier, v. 8, n. July, p. 28–37, 2017. ISSN 24520748. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.impact.2017.07.003>>. Citado 2 vezes nas páginas 40 e 41.
- 118 LYON, D. *et al.* Ecotoxicological impacts of nanomaterials. In: WIESNER, M.; BOTTERO, J. (Ed.). *Environmental Nanotechnology: Applications and Impacts of Nanomaterials*. New York, NY, USA: Mcgraw-hill, 2007. p. 445–480. Citado na página 40.
- 119 MANGALAMPALLI, B. *et al.* Genotoxicity, biochemical, and biodistribution studies of magnesium oxide nano and microparticles in albino wistar rats after 28-day repeated oral exposure. *Environmental Toxicology*, v. 33, n. 4, p. 396–410, 2018. ISSN 15227278. Citado na página 41.
- 120 KNIE, J. L.; LOPES, E. W. *et al.* *Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações*. [S.l.]: FATMA/GTZ, 2004. Citado na página 41.
- 121 ALVES, A. C. B.; SILVANO, J. Avaliação da sensibilidade de daphnia magna straus, 1820 (cladóceras, crustácea) ao dicromato de potássio. *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*, Instituto Adolfo Lutz, v. 65, n. 1, p. 59–61, 2006. Citado na página 41.
- 122 KATO, Y. *et al.* Environmental sex determination in the branchiopod crustacean daphnia magna: Deep conservation of a doublesex gene in the sex-determining pathway. *PLOS Genetics*, Public Library of Science, v. 7, n. 3, p. 1–12, 03 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001345>>. Citado na página 41.
- 123 LES, D. H.; CRAWFORD, D. J. *Landoltia* (Lemnaceae), a new genus of duckweeds. *Novon*, JSTOR, p. 530–533, 1999. Citado na página 41.
- 124 POTT, V. Lemnaceae. *Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo*, Instituto de Botânica São Paulo, v. 2, p. 135–140, 2002. Citado na página 41.
- 125 MOHEDANO, R. d. A. *et al.* *Uso de macrófitas lemnáceas (Landoltia punctata) no polimento e valorização do efluente de suinocultura e na fixação de carbono*. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Santa Catarina, 2012. Citado na página 41.
- 126 OTTO, R.; VERLOOVE, F. New xenophytes from la palma (canary islands, spain), with emphasis on naturalized and (potentially) invasive species. *Collectanea Botanica*, v. 35, p. e001, 07 2016. Citado na página 42.

- 127 DROST, W.; MATZKE, M.; BACKHAUS, T. Heavy metal toxicity to *Lemna minor*: studies on the time dependence of growth inhibition and the recovery after exposure. *Chemosphere*, Pergamon, v. 67, n. 1, p. 36–43, feb 2007. ISSN 0045-6535. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653506013361>>. Citado na página 42.
- 128 POWERS, K. W. *et al.* Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI. characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicological Sciences*, v. 90, n. 2, p. 296–303, 2006. ISSN 10966080. Citado na página 42.
- 129 KUNZMANN, A. *et al.* Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, Elsevier B.V., v. 1810, n. 3, p. 361–373, 2011. ISSN 03044165. Citado na página 42.
- 130 LIN, P. C. *et al.* Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. *Biotechnology Advances*, Elsevier B.V., v. 32, n. 4, p. 711–726, 2014. ISSN 07349750. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.11.006>>. Citado na página 42.
- 131 RAO, C.; BISWAS, K. Characterization of Nanomaterials by Physical Methods. *Annual Review of Analytical Chemistry*, v. 2, n. 1, p. 435–462, 2009. ISSN 1936-1327. Citado na página 42.
- 132 SAPSFORD, K. E. *et al.* AuNP130-Analyzing nanomaterial bioconjugates: A review of current and emerging purification and characterization techniques. *Analytical Chemistry*, v. 83, n. 12, p. 4453–4488, 2011. ISSN 00032700. Citado na página 43.
- 133 IKHMAYIES, S. J. Characterization of nanomaterials. *Jom*, v. 66, n. 1, p. 28–29, 2014. ISSN 10474838. Citado na página 43.
- 134 KASZUBA, M. *et al.* High-concentration zeta potential measurements using light-scattering techniques. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, v. 368, n. 1927, p. 4439–4451, 2010. ISSN 1364503X. Citado na página 43.
- 135 BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, Elsevier B.V., v. 235, p. 337–351, 2016. ISSN 18734995. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>>. Citado na página 43.
- 136 CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta potential measurement. In: \_\_\_\_\_. *Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery*. Totowa, NJ: Humana Press, 2011. p. 63–70. ISBN 978-1-60327-198-1. Disponível em: <[https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6)>. Citado na página 43.
- 137 DANAEI, M. *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. *Pharmaceutics*, v. 10, p. 1–17, 2018. ISSN 19994923. Citado na página 44.
- 138 CASANOVA, M. C. R. *Síntese, caracterização e estudo da estabilidade de nanopartículas metálicas estabilizadas com polieletrólitos e tióis*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2010. Citado na página 44.

- 139 NEDER, L. d. T. C. *Tratamento de Resíduos Industriais Perigosos : Tecnologia de Encapsulamento por Complexos Argilominerais - CAMs*. 111 p. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 1998. Citado 2 vezes nas páginas 44 e 45.
- 140 ARANDA, C. B. A. *Leaching test comparison for solidified and stabilized contaminated sediments: Assessment of selected inorganic contaminants*. Dissertação (Mestrado) — University of OSLO. Citado na página 44.
- 141 CAUDURO, F. *Avaliação experimental de procedimentos de lixiviação de resíduos*. 97 p. Tese (Mestrado) — Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. Citado 2 vezes nas páginas 44 e 45.
- 142 Chapter 14 - leaching tests. In: CHANDLER, A. J. *et al.* (Ed.). *Municipal Solid Waste Incinerator Residues*. Elsevier, 1997, (Studies in Environmental Science, v. 67). p. 579 – 606. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166111697800209>>. Citado na página 45.
- 143 NATH, S. Fly ash and zinc slag blended geopolymer: Immobilization of hazardous materials and development of paving blocks. *Journal of Hazardous Materials*, Elsevier, v. 387, p. 121673, apr 2020. ISSN 0304-3894. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389419316279>>. Citado na página 45.
- 144 LU, C.-C.; HSU, M. H.; LIN, Y.-P. Evaluation of heavy metal leachability of incinerating recycled aggregate and solidification/stabilization products for construction reuse using tclp, multi-final ph and edta-mediated tclp leaching tests. *Journal of Hazardous Materials*, v. 368, p. 336 – 344, 2019. ISSN 0304-3894. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389419300780>>. Citado na página 45.
- 145 ROSSO, L. T. d. *Desenvolvimento de Argamassa Translúcida Fotocatalítica para Pavimentação Urbana*. Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019. Citado 3 vezes nas páginas 48, 50 e 53.
- 146 NOGUEIRA, M. G. *Comparação do comportamento em campo de concretos asfálticos com cap 30-45 e com cap 50-70 para revestimentos de pavimentos*. 170 p. Tese (Mestrado) — USP - Universidade de São Paulo, 2008. Citado na página 50.
- 147 ABNT. *Ecotoxicologia aquática Toxicidade aguda Método de ensaio com Daphnia spp. Cladocera, Crustacea*. Rio de Janeiro, 2016. 8 p. Citado 2 vezes nas páginas 52 e 65.
- 148 ISO. *water quality Determination of the inhibition of the mobility of Daphnia magna Straus (Cladocera, Crustacea) Acute toxicity test*. USA, 2012. Citado na página 52.
- 149 OECD. *Test No. 221: Lemna sp. Growth Inhibition Test*. [s.n.], 2006. 22 p. Disponível em: <<https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264016194-en>>. Citado na página 52.
- 150 NETO, A. C. N. *Avaliação de toxicidade aguda e crônica em águas do Rio Jundiá e em afluentes e efluentes da ETE Novo Horizonte, Jundiá, São Paulo*. Tese (Doutorado) — Universidade de São Paulo, 2009. Citado na página 65.
- 151 BONDARENKO, O. *et al.* Toxicity of Ag , CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro : a critical review. *Arch Toxicol.*, p. 1181–1200, 2013. Citado 2 vezes nas páginas 67 e 82.

- 152 OECD. *Test No. 211: Daphnia magna Reproduction Test*. [s.n.], 2012. 25 p. Disponível em: <<https://www.oecd-ilibrary.org/content/publication/9789264185203-en>>. Citado na página 67.
- 153 ISO. *Water quality Determination of the toxic effect of water constituents and waste water on Lemna minor Duckweed growth inhibition test*. USA, 2005. 8 p. Citado na página 72.
- 154 SCHIERZ, A.; ZÄNKER, H. Aqueous suspensions of carbon nanotubes: Surface oxidation, colloidal stability and uranium sorption. *Environmental Pollution*, v. 157, n. 4, p. 1088–1094, 2009. ISSN 02697491. Citado na página 75.
- 155 CONAMA. *Resolução N° 430, De 13 De Maio De 2011*. Brasília, 2011. 8 p. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=646>>. Citado na página 76.
- 156 CONAMA. *Resolução N° 357, De 17 De Março De 2005*. Brasília, 2005. 36 p. Citado na página 77.
- 157 FARHADIAN, M.; SANGPOUR, P.; HOSSEINZADEH, G. Preparation and photocatalytic activity of WO<sub>3</sub>-MWCNT nanocomposite for degradation of naphthalene under visible light irradiation. *RSC Advances*, v. 6, n. 45, p. 39063–39073, 2016. ISSN 20462069. Citado na página 78.
- 158 NARRO-CÉSPEDES, R. I. *et al.* Surface Modification of Sodium Montmorillonite Nanoclay by Plasma Polymerization and Its Effect on the Properties of Polystyrene Nanocomposites. *Journal of Nanomaterials*, v. 2018, 2018. ISSN 16874129. Citado na página 78.
- 159 YAO, H.; DAI, Q.; YOU, Z. Fourier transform infrared spectroscopy characterization of aging-related properties of original and nano-modified asphalt binders. *Construction and Building Materials*, v. 101, p. 1078 – 1087, 2015. ISSN 0950-0618. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0950061815305067>>. Citado na página 79.
- 160 ZHANG, H. L.; WANG, H. C.; YU, J. Y. Effect of aging on morphology of organo-montmorillonite modified bitumen by atomic force microscopy. v. 242, n. December 2009, p. 37–45, 2011. Citado na página 79.
- 161 PRAVEEN, P. *et al.* Structural, optical and morphological analyses of pristine titanium di-oxide nanoparticles - Synthesized via sol-gel route. *Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, Elsevier B.V., v. 117, p. 622–629, 2014. ISSN 13861425. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.saa.2013.09.037>>. Citado na página 80.
- 162 SAFAEI, E.; MOHEBBI, S. Photocatalytic activity of nanohybrid Co-TCPP@TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub> in aerobic oxidation of alcohols under visible light. *Journal of Materials Chemistry A*, v. 4, n. 10, p. 3933–3946, 2016. ISSN 20507496. Citado na página 80.
- 163 NAGARAJU, G. *et al.* Electrochemical heavy metal detection, photocatalytic, photoluminescence, biodiesel production and antibacterial activities of Ag–ZnO nanomaterial. *Materials Research Bulletin*, v. 94, n. September, p. 54–63, 2017. ISSN 00255408. Citado na página 81.

- 164 XIONG, G. *et al.* Photoluminescence and FTIR study of ZnO nanoparticles: The impurity and defect perspective. *Physica Status Solidi (C) Current Topics in Solid State Physics*, v. 3, n. 10, p. 3577–3581, 2006. ISSN 18626351. Citado na página 81.
- 165 Commission of the European Communities, CEC. technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances. Part II, Environmental Risk Assessment. *Office for official publications of the European Communities*, p. 337, 1996. Citado na página 82.
- 166 OSCAR, B. V. *AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOESTRUTURAS DE ÓXIDO DE ZINCO INCORPORADAS EM ARGAMASSA*. 114 p. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Santa Catarina, 2018. Citado na página 82.
- 167 GONÇALVES, R. A. *et al.* Comparative assessment of toxicity of ZnO and amine-functionalized ZnO nanorods toward *Daphnia magna* in acute and chronic multigenerational tests. *Aquatic Toxicology*, Elsevier, v. 197, n. February, p. 32–40, 2018. ISSN 18791514. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.002>>. Citado na página 82.
- 168 KIM, S. *et al.* Time-Dependent Toxicity Responses in *Daphnia magna* Exposed to CuO and ZnO Nanoparticles. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, Springer US, v. 98, n. 4, p. 502–507, 2017. ISSN 14320800. Citado na página 82.
- 169 BACCHETTA, R. *et al.* Role of soluble zinc in ZnO nanoparticle cytotoxicity in *Daphnia magna*: A morphological approach. *Environmental Research*, Elsevier, v. 148, p. 376–385, 2016. ISSN 10960953. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.04.028>>. Citado na página 82.
- 170 ROBINSON, S. E.; CAPPER, N. A.; KLAINE, S. J. The effects of continuous and pulsed exposures of suspended clay on the survival, growth, and reproduction of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, v. 29, n. 1, p. 168–175, 2010. Citado na página 83.
- 171 SHARMA, A. K. *et al.* Genotoxicity of unmodified and organo-modified montmorillonite. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, Elsevier, v. 700, n. 1-2, p. 18–25, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 83 e 87.
- 172 TROMPETA, A. F. A. *et al.* Toxicity testing of MWCNTs to aquatic organisms. *RSC Advances*, Royal Society of Chemistry, v. 9, n. 63, p. 36707–36716, 2019. ISSN 20462069. Citado na página 83.
- 173 BACCHETTA, R. *et al.* Comparative toxicity of three differently shaped carbon nanomaterials on *Daphnia magna*: does a shape effect exist? *Nanotoxicology*, Informa Healthcare USA, Inc, v. 12, n. 3, p. 201–223, 2018. ISSN 17435404. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/17435390.2018.1430258>>. Citado na página 83.
- 174 NOVAK, S. *et al.* The significance of nanomaterial post-exposure responses in *Daphnia magna* standard acute immobilisation assay: Example with testing TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Academic Press, v. 152, p. 61–66, may 2018. ISSN 0147-6513. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651318300071>>. Citado na página 83.
- 175 LU, H. *et al.* Dependence of the irradiation conditions and crystalline phases of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on their toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Science: Nano*, Royal Society of Chemistry, v. 4, n. 2, p. 406–414, 2017. ISSN 20518161. Citado na página 83.

- 176 WANG, Y. *et al.* Combined effects of ZnO nanoparticles and toxic *Microcystis* on life-history traits of *Daphnia magna*. *Chemosphere*, Elsevier Ltd, v. 233, p. 482–492, 2019. ISSN 18791298. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.269>>. Citado 2 vezes nas páginas 86 e 89.
- 177 ADAM, N. *et al.* The chronic toxicity of zno nanoparticles and zncl<sub>2</sub> to daphnia magna and the use of different methods to assess nanoparticle aggregation and dissolution. *Nanotoxicology*, Taylor and Francis, v. 8, n. 7, p. 709–717, 2014. PMID: 23837602. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/17435390.2013.822594>>. Citado 2 vezes nas páginas 86 e 89.
- 178 MOUCHET, F. *et al.* International standardized procedures for in vivo evaluation of multi-walled carbon nanotube toxicity in water. *Toxicological and Environmental Chemistry*, v. 98, p. 829–847, 2016. ISSN 10290486. Citado 2 vezes nas páginas 86 e 88.
- 179 LIU, S. *et al.* Effect of chronic toxicity of the crystalline forms of TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the physiological parameters of *Daphnia magna* with a focus on index correlation analysis. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Elsevier Inc., v. 181, n. March, p. 292–300, 2019. ISSN 10902414. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.06.014>>. Citado 3 vezes nas páginas 87, 88 e 89.
- 180 OKAMOTO, A.; YAMAMURO, M.; TATARAZAKO, N. Acute toxicity of 50 metals to *Daphnia magna*. *Journal of Applied Toxicology*, v. 35, p. 824–830, 2015. ISSN 10991263. Citado na página 87.
- 181 TULLIO, S. C.; CHALCRAFT, D. R. Converting natural nanoclay into modified nanoclay augments the toxic effect of natural nanoclay on aquatic invertebrates. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Elsevier Inc., v. 197, 2020. ISSN 10902414. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110602>>. Citado na página 87.
- 182 VICENTINI, D. S. *et al.* NanolImpact Toxicological impact of morphology and surface functionalization of amorphous SiO<sub>2</sub> nanomaterials. *NanolImpact*, Elsevier B.V., v. 5, p. 6–12, 2017. ISSN 2452-0748. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.impact.2016.11.003>>. Citado na página 87.
- 183 NOGUEIRA, D. J. *et al.* Crystalline phase-dependent toxicity of aluminum oxide nanoparticles toward *Daphnia magna* and ecological risk assessment. *Environmental Research*, Elsevier Inc., v. 182, n. November 2019, p. 108987, 2020. ISSN 0013-9351. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108987>>. Citado na página 87.
- 184 ALLOY, M. M.; ROBERTS, A. P. Effects of suspended multi-walled carbon nanotubes on daphnid growth and reproduction. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Elsevier, v. 74, p. 1839–1843, 2011. ISSN 01476513. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.06.020>>. Citado na página 88.
- 185 ZHU, X.; CHANG, Y.; CHEN, Y. Toxicity and bioaccumulation of TiO<sub>2</sub>nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*. *Chemosphere*, Elsevier Ltd, v. 78, p. 209–215, 2010. ISSN 00456535. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.11.013>>. Citado na página 88.
- 186 GOKCE, D.; KOYTEPE, S.; OZCAN İmren. Effects of nanoparticles on daphnia magna population dynamics. *Chemistry and Ecology*, Taylor and Francis, v. 34, n. 4, p. 301–323,

2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/02757540.2018.1429418>>. Citado na página 89.

187 KOCE, J. D. Plant Physiology and Biochemistry Effects of exposure to nano and bulk sized TiO<sub>2</sub> and CuO in Lemna. *Plant Physiology et Biochemistry*, Elsevier Masson SAS, v. 119, p. 43–49, 2017. ISSN 0981-9428. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2017.08.014>>. Citado na página 91.

## APÊNDICE A – APÊNDICE

### A.1 RESULTADO DOS TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA COM *D. MAGNA* NOS 5 NMS

Tabela 21 – Resultados dos testes de toxicidade crônica dos 5 NMs puros.

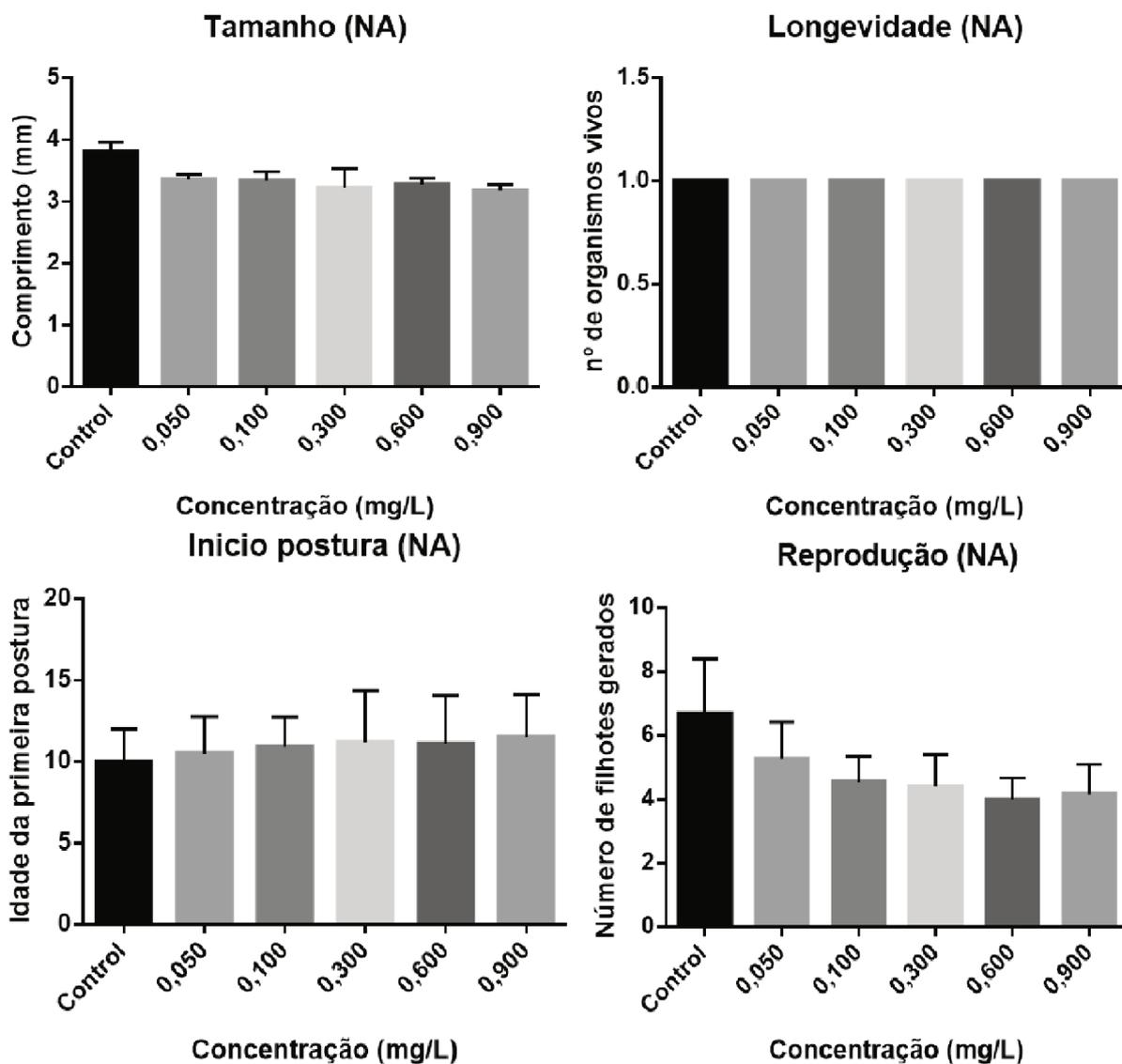
NM	Concentração (mg/L)	Longevidade (%)	Tamanho (mm)	Reprodução (filhotes)	Idade da primeira postura (dias)
NTC	Controle	100	3,506±0,30	3,424±0,73	13,10±1,91
	0,045	100	3,689±0,06	3,133±1,04	12,90±2,23
	0,091	100	3,715±0,25	3,378±1,63	12,50±1,08
	0,180	100	3,769±0,28	3,023±0,89	13,30±2,06
	0,360	100	3,673±0,24	3,817±1,25	13,90±2,76
	0,730	70*	3,133±0,04*	3,194±2,05	12,71±1,25
	CEO mg/L	0,730	0,730	> 0,730	> 0,730
	CENO mg/L	0,360	0,360	> 0,730	> 0,730
NA	Controle	100	3,808±0,15	6,685±1,71	10,00±2,00
	0,050	100	3,662±0,07	5,274±1,15*	10,50±2,27
	0,100	100	3,335±0,15*	4,542±0,79*	10,90±1,85
	0,300	100	3,229±0,30*	4,396±1,01*	11,20±3,15
	0,600	100	3,279±0,09*	3,989±0,68*	11,10±2,96
	0,900	100	3,171±0,10*	4,161±0,93*	11,50±2,64
	CEO mg/L	>0,900	0,100	0,050	> 0,900
	CENO mg/L	>0,900	0,050	< 0,050	> 0,900
TiO <sub>2</sub>	Controle	100	4,125±0,34	3,392±1,56	11,44±1,01
	0,65	70	4,385±0,12	2,408±1,84	12,00±1,76
	1,25	90	4,176±0,12	2,919±1,26	12,20±1,98
	2,50	90	4,371±0,09	2,704±1,16	11,67±1,12
	5,00	100	3,713±0,24*	2,575±0,63	12,70±1,83
	10,00	40*	3,624±0,25*	0,417±0,92*	14,00±0,00
	CEO mg/L	10,00	5,00	10,00	> 10,00
	CENO mg/L	5,00	2,50	5,00	> 10,00
TiO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub>	Controle	100	3,511±0,12	6,570±1,08	11,80±1,81
	0,56	90	3,567±0,11	6,651±1,54	12,22±1,64
	1,13	100	3,400±0,29	7,530±1,64	12,90±2,42
	2,00	100	3,495±0,08	5,860±0,59	11,20±1,68

*Continua na próxima página*

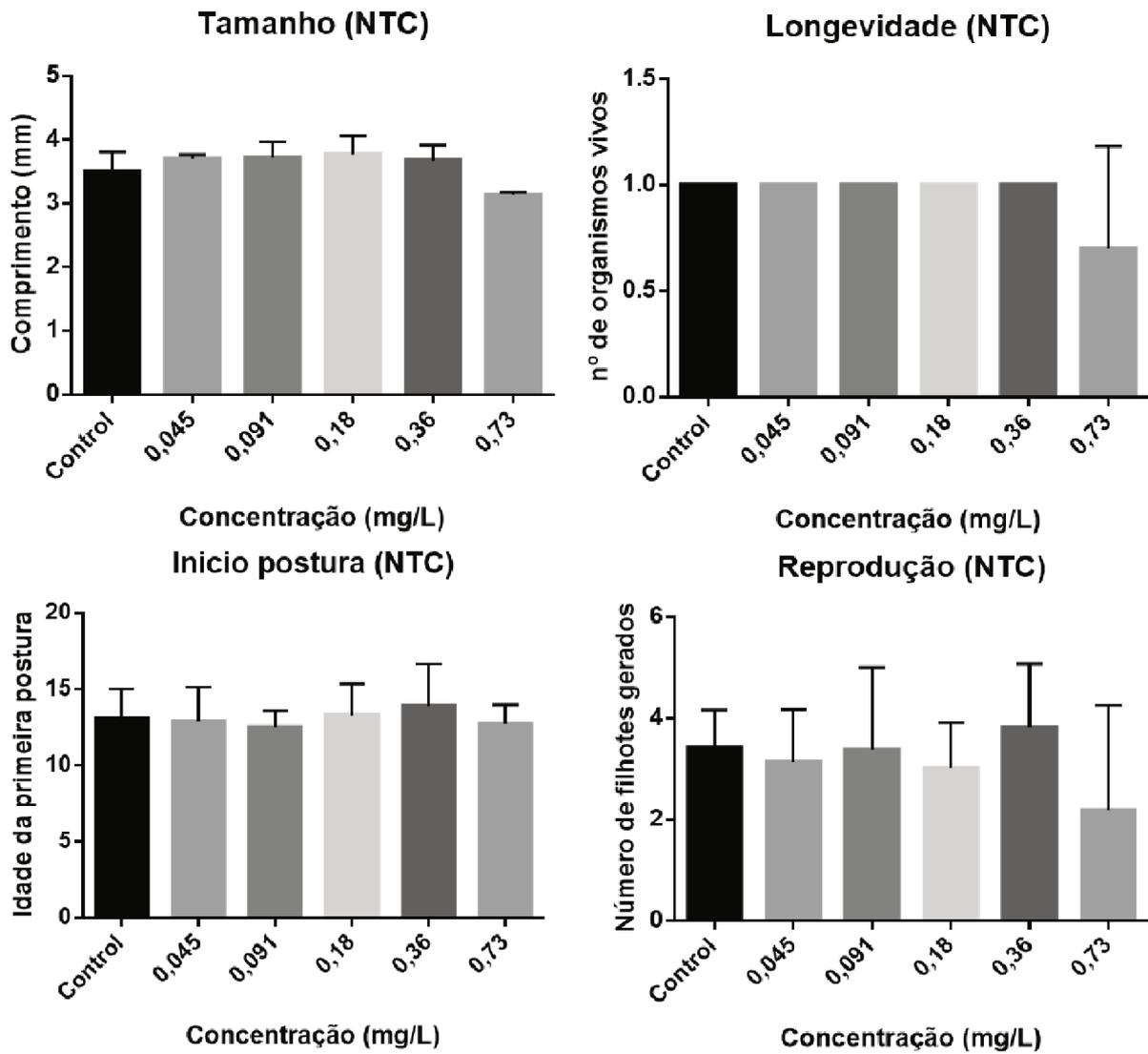
Tabela 21 – Continuação da página anterior

NM	Concentração (mg/L)	Longevidade (%)	Tamanho (mm)	Reprodução ( <i>nascimentos</i> / organismo)	Idade da primeira postura
	4,00	100	3,545±0,04	5,070±0,95*	11,30±0,67
	8,00	100	3,374±0,23	4,320±0,45*	13,20±2,57
	CEO mg/L	>8,00	>8,00	4,00	>8,00
	CENO mg/L	>8,00	>8,00	2,00	>8,00
ZnO	Controle	100	4,017±0,44	4,766±0,81	11,60±2,87
	0,025	100	3,858±0,12	4,850±0,74	11,70±2,66
	0,050	100	3,881±0,09	4,600±1,19	10,80±1,32
	0,100	100	3,871±0,17	3,030±0,89*	12,60±3,44
	0,200	100	3,806±0,12	4,370±1,03	12,10±2,13
	0,400	80*	4,176±0,24	4,213±1,19	13,00±2,33
	CEO mg/L	0,400	>0,400	0,100	>0,400
	CENO mg/L	0,200	>0,400	0,050	>0,400

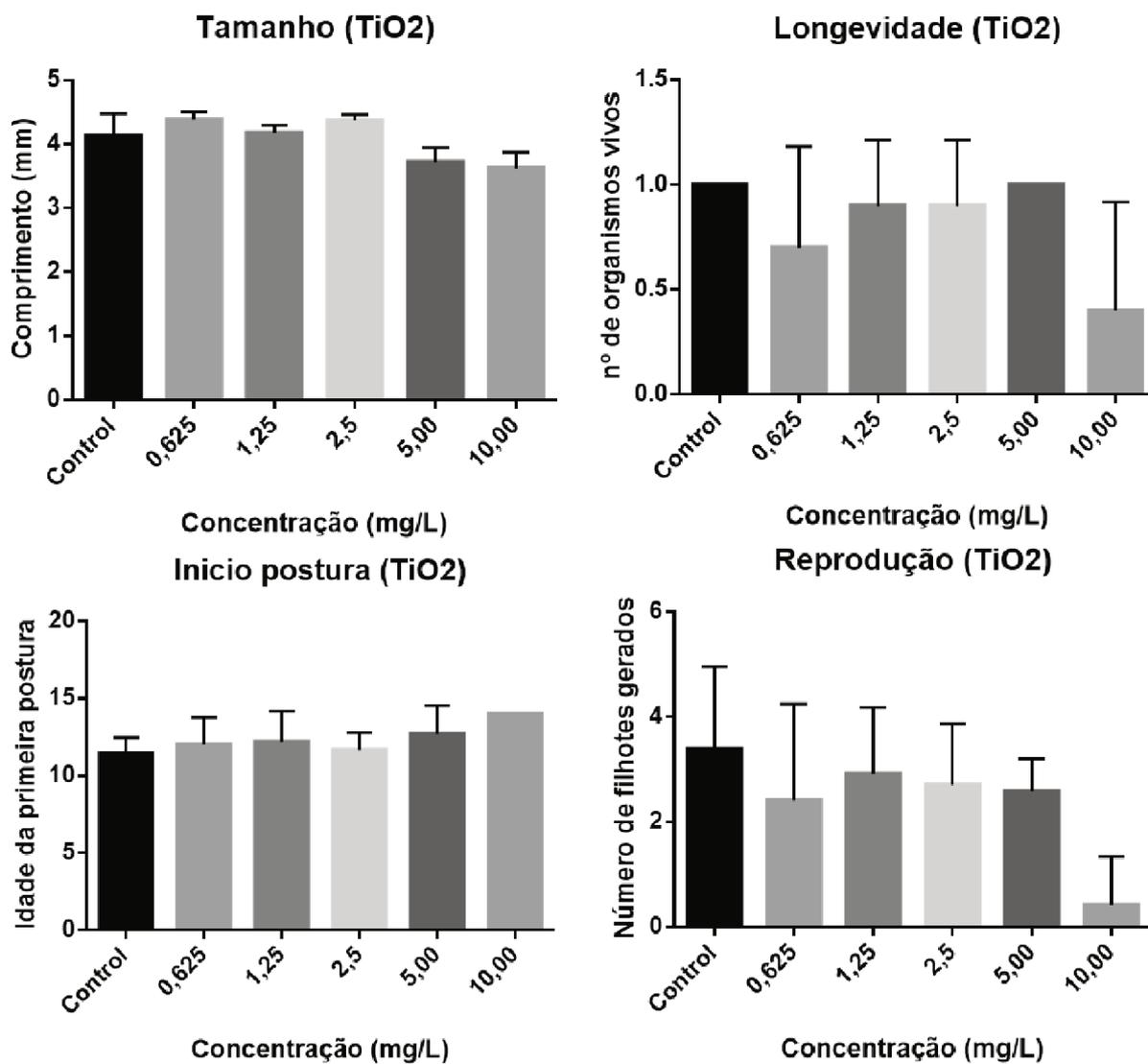
\*Resultado que apresentou efeito estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) nos organismos-teste.

Figura 34 – Gráficos do resultado do teste crônico com *D. magna* em NA

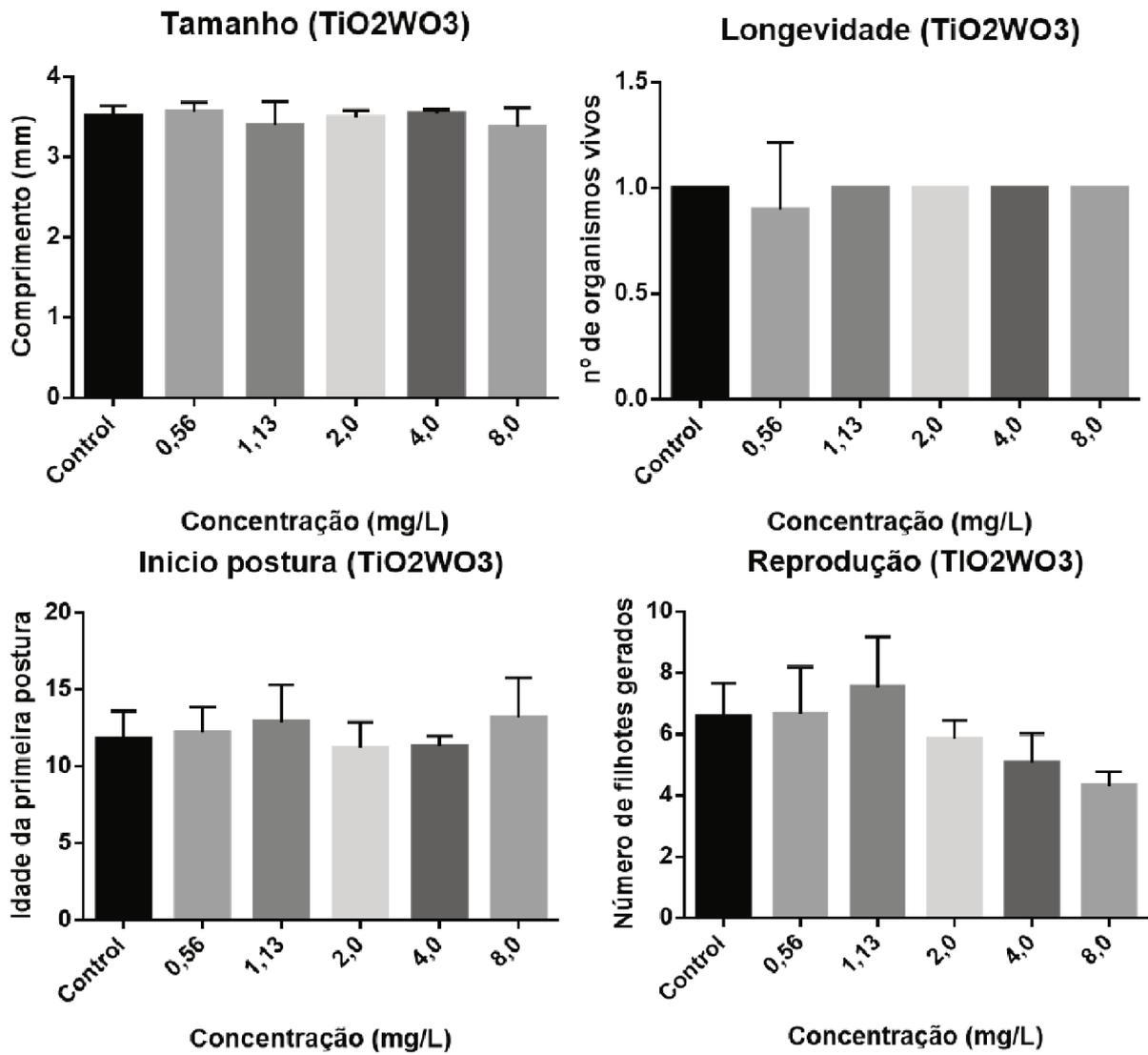
Fonte: a autora.

Figura 35 – Gráficos do resultado do teste crônico com *D. magna* em NTC

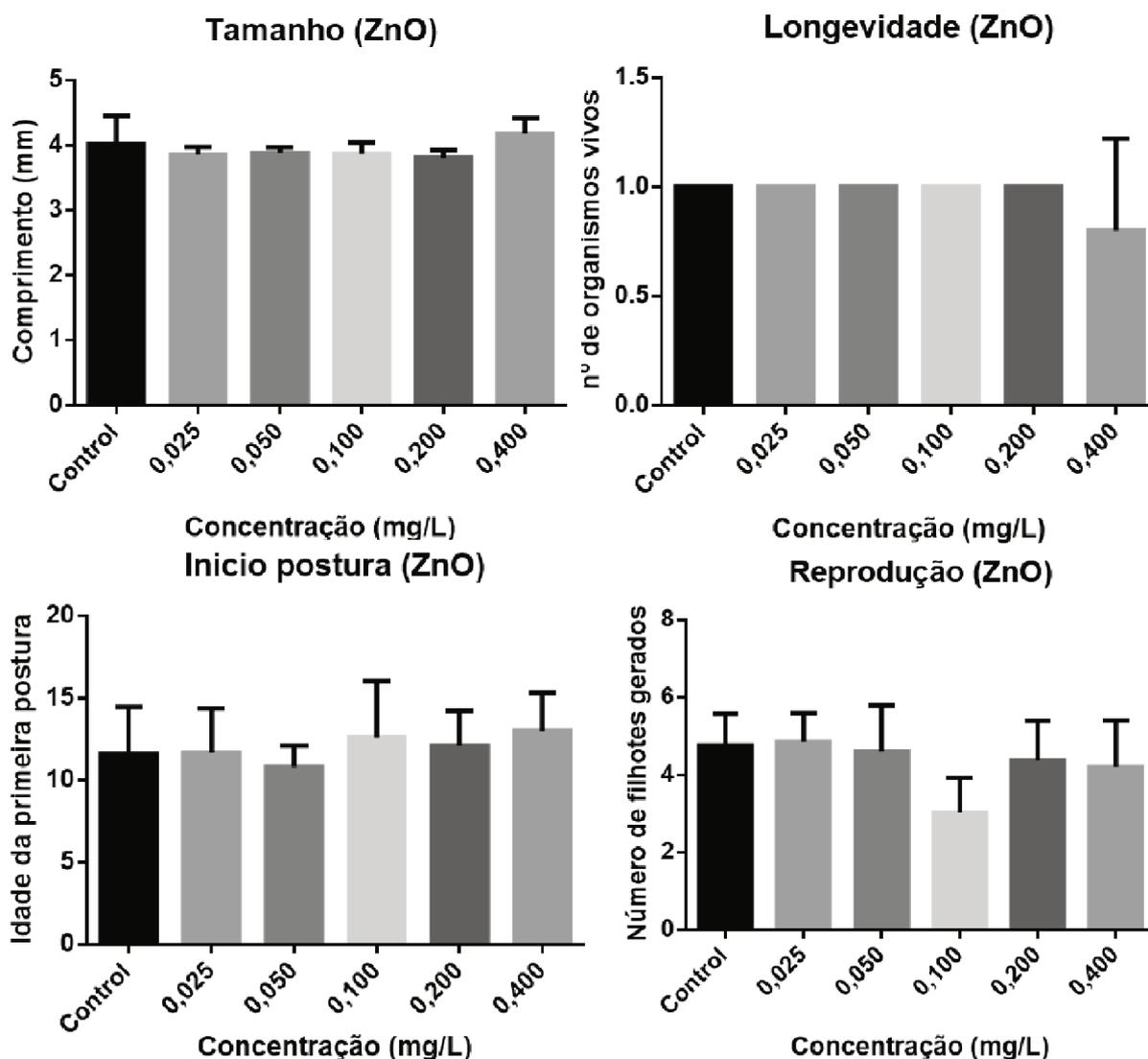
Fonte: a autora.

Figura 36 – Gráficos do resultado do teste crônico com *D. magna* em  $TiO_2$ 

Fonte: a autora.

Figura 37 – Gráficos do resultado do teste crônico com *D. magna* em  $TiO_2WO_3$ 

Fonte: a autora.

Figura 38 – Gráficos do resultado do teste crônico com *D. magna* em ZnO

Fonte: a autora.

## A.2 RESULTADOS DOS TESTES DE TOXICIDADE CRÔNICA COM *D. MAGNA* NAS 7 AMOSTRAS DE LIXIVIADO

Tabela 22 – Resultados dos testes de toxicidade crônica dos lixiviados

NM	Concentração (mL/L)	Longevidade (%)	Tamanho (mm)	Reprodução ( $\frac{\text{nascimentos}}{\text{organismo}}$ )	Idade da primeira postura
	Controle	100	2,210±0,05	9,850±1,12	12,20±1,47
	10	90	2,231±0,04	7,900±1,85	11,33±2,17
	20	90	2,208±0,07	8,756±1,55	11,44±1,13

Tabela 22 – Continuação da página anterior

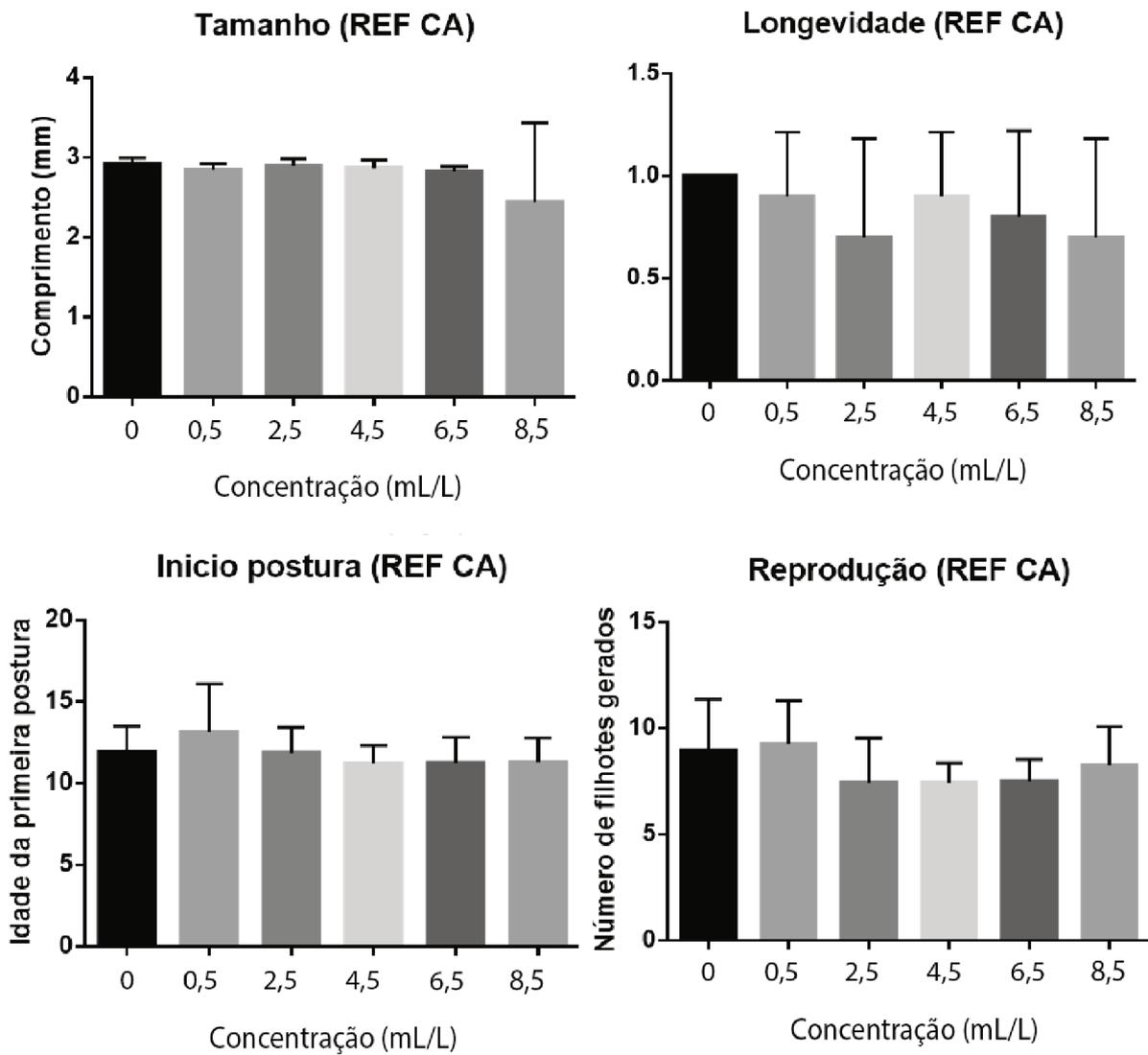
NM	Concentração (mL/L)	Longevidade (%)	Tamanho (mm)	Reprodução ( <i>nascimentos</i> / <i>organismo</i> )	Idade da primeira postura
	30	80	2,193±0,06	9,413±1,06	12,38±1,68
	40	100	2,115±0,07	9,360±1,44	12,00±2,16
	50	80	2,126±0,03	8,925±2,89	11,38±1,88
	CEO (mL/L)	> 50	> 50	> 50	> 50
	CENO (mL/L)	> 50	> 50	> 50	> 50
NA	Controle	100	2,834±0,06	7,855±0,94	11,80±2,74
	5,0	80	2,889±0,07	7,404±1,86	11,38±1,68
	10	70	2,887±0,07	8,214±0,84	11,00±1,15
	15	100	2,901±0,09	6,585±1,56	11,70±1,76
	20	90	2,869±0,08	6,172±1,11	11,67±1,66
	30	90	2,860±0,06	7,256±2,27	11,56±2,51
	CEO (mL/L)	> 30	> 30	> 30	> 30
	CENO (mL/L)	> 30	> 30	> 30	> 30
TiO <sub>2</sub>	Controle	100	2,854±0,07	6,830±0,99	10,40±1,26
	0,5	100	2,804±0,08	5,670±2,43	11,00±1,58
	2,0	100	2,843±0,11	5,140±0,89	11,00±1,88
	3,5	100	2,834±0,06	5,850±1,93	10,70±1,63
	5,0	100	2,858±0,09	5,590±0,58	10,30±0,67
	6,5	100	2,850±0,05	5,480±1,53	10,50±1,58
	CEO (mL/L)	>6,5	>6,5	>6,5	>6,5
	CENO (mL/L)	>6,5	>6,5	>6,5	>6,5
TiO <sub>2</sub> /WO <sub>3</sub>	Controle	90	2,856±0,04	7,056±1,45	12,44±2,24
	0,5	90	2,891±0,07	5,506±1,63	11,44±1,66
	2,0	90	2,915±0,22	5,833±1,64	12,11±1,90
	3,5	90	2,909±0,06	5,178±1,02*	11,00±1,00
	5,0	80	2,932±0,17	5,350±1,04	11,38±1,59
	6,5	80	2,866±0,05	6,500±1,65	12,75±2,76
	CEO (mL/L)	>6,5	>6,5	3,5	>6,5
	CENO (mL/L)	>6,5	>6,5	2,0	>6,5
ZnO	Controle	90	2,860±0,13	3,533±2,06	12,88±1,13
	0,1	90	2,752±0,27	4,367±1,22	14,33±2,23
	0,5	100	2,815±0,13	4,410±1,88	13,56±1,81
	1,0	80	2,877±0,04	3,900±2,34	12,50±1,60
	5,0	100	2,862±0,09	5,700±1,13*	12,00±1,15

Continua na próxima página

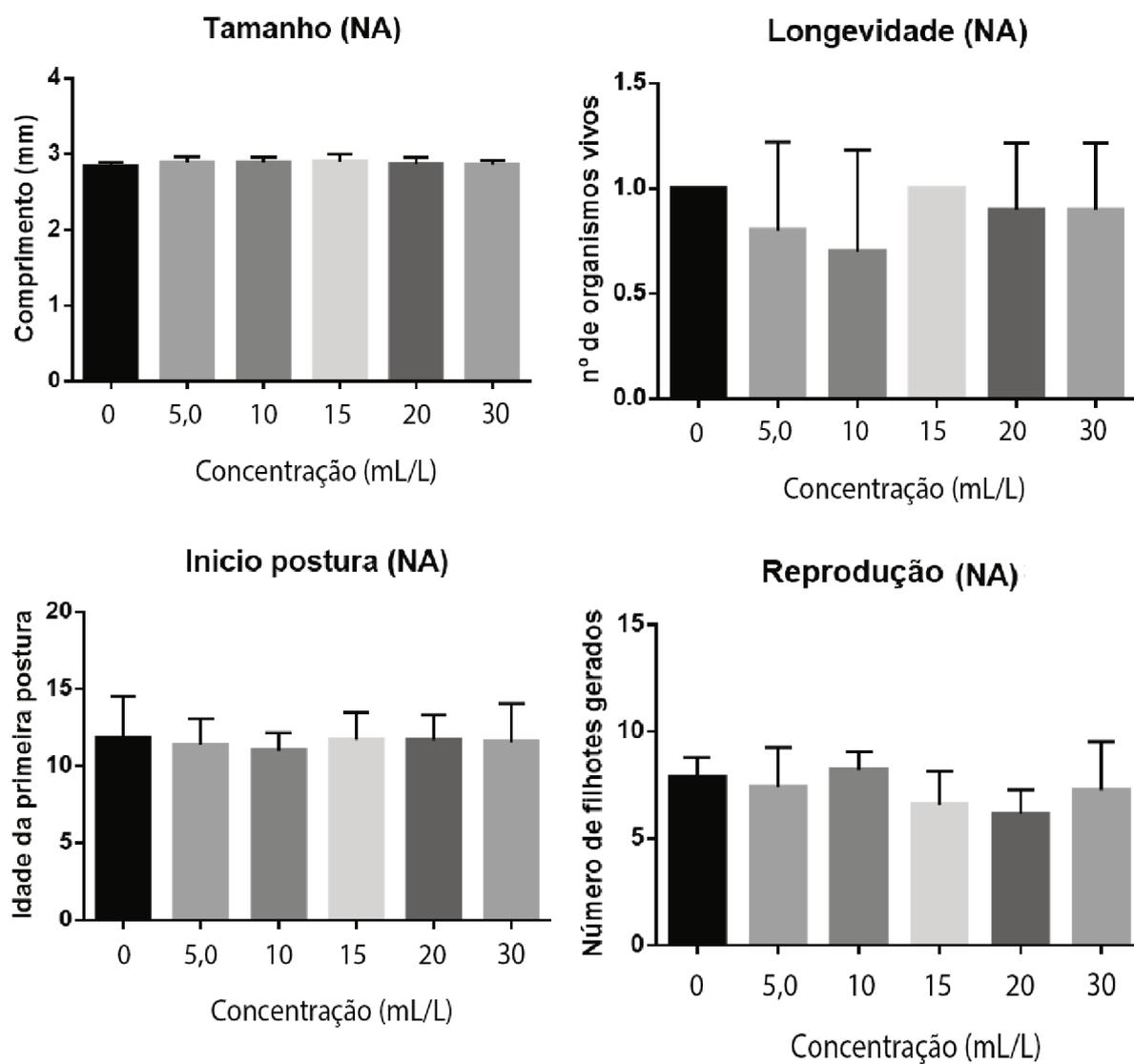
Tabela 22 – Continuação da página anterior

NM	Concentração (mL/L)	Longevidade (%)	Tamanho (mm)	Reprodução ( $\frac{\text{nascimentos}}{\text{organismo}}$ )	Idade da primeira postura
	10,0	100	2,537±0,60	4,890±1,16	12,60±1,57
	CEO (mL/L)	>10,0	>10,0	5,0	>10,0
	CENO (mL/L)	>10,0	>10,0	1,0	>10,0
REFPPC	Controle	90	2,860±0,13	3,533±2,06	12,88±1,13
	0,25	100	2,766±0,11	4,090±1,97	12,70±0,83
	0,50	80	2,777±0,13	4,550±1,17	11,38±1,30
	1,00	90	2,740±0,13	4,511±1,09	13,00±1,22
	2,00	100	2,780±0,09	4,510±0,54	12,70±2,40
	4,00	100	2,714±0,11*	3,560±1,55	12,89±1,16
	CEO (mL/L)	>4,00	4,00	>4,00	>4,00
	CENO (mL/L)	>4,00	2,00	>4,00	>4,00
REFCA	Controle	100	2,919±0,07	8,940±2,42	11,90±1,59
	0,5	90	2,846±0,07	9,256±2,05	13,33±2,97
	2,5	70	2,893±0,09	7,414±2,14	11,86±1,57
	4,5	90	2,868±0,09	7,422±2,14	11,22±1,09
	6,5	80	2,822±0,06	7,488±1,04	11,25±1,58
	8,5	70	2,443±0,98	8,271±1,82	11,29±1,49
	CEO (mL/L)	>8,5	>8,5	>8,5	>8,5
		CENO (mL/L)	>8,5	>8,5	>8,5

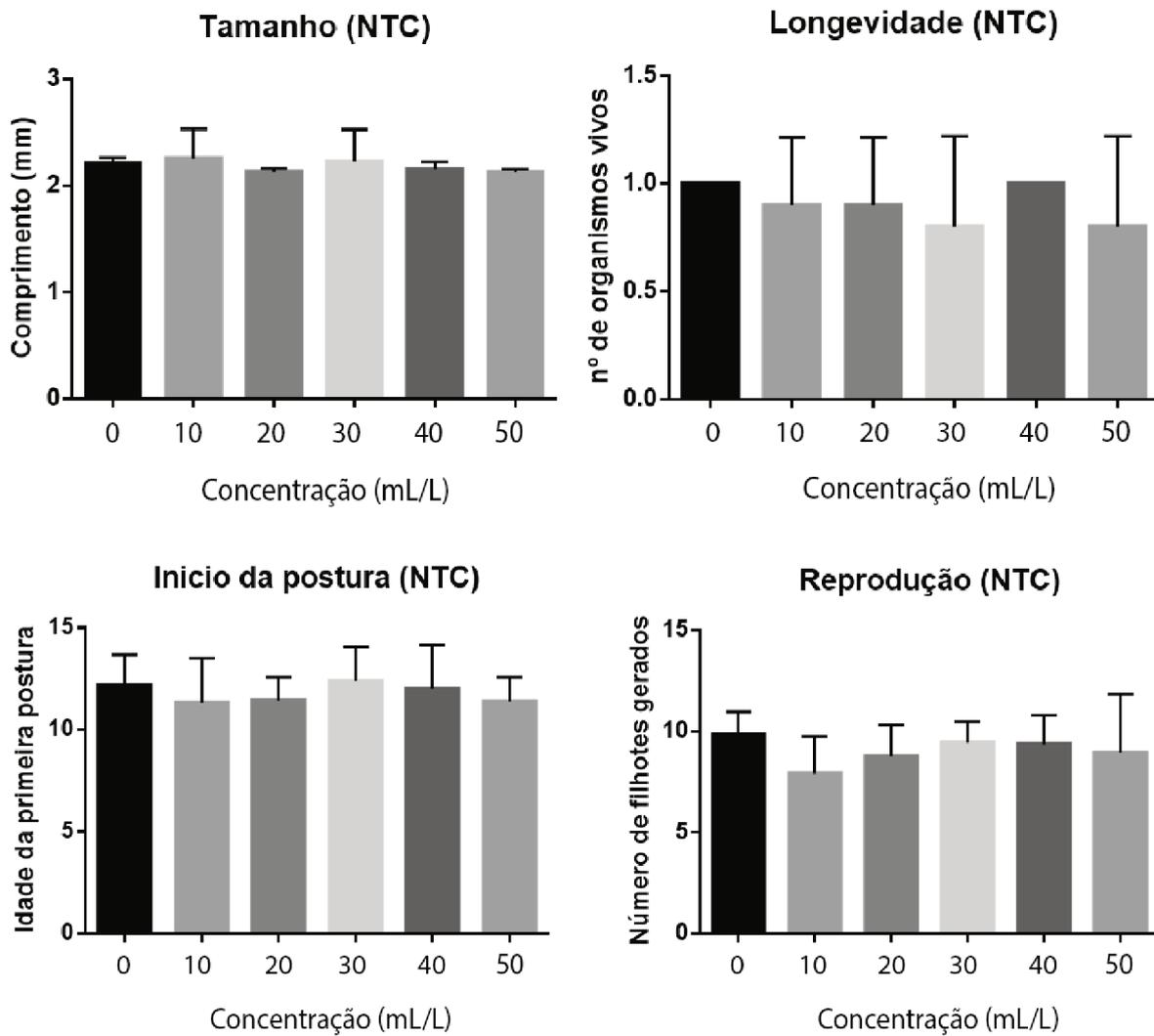
\*Resultado que apresentou efeito estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) nos organismos-teste.

Figura 39 – Gráficos do resultado do teste crônico com *D. magna* no lixiviado de REFCA

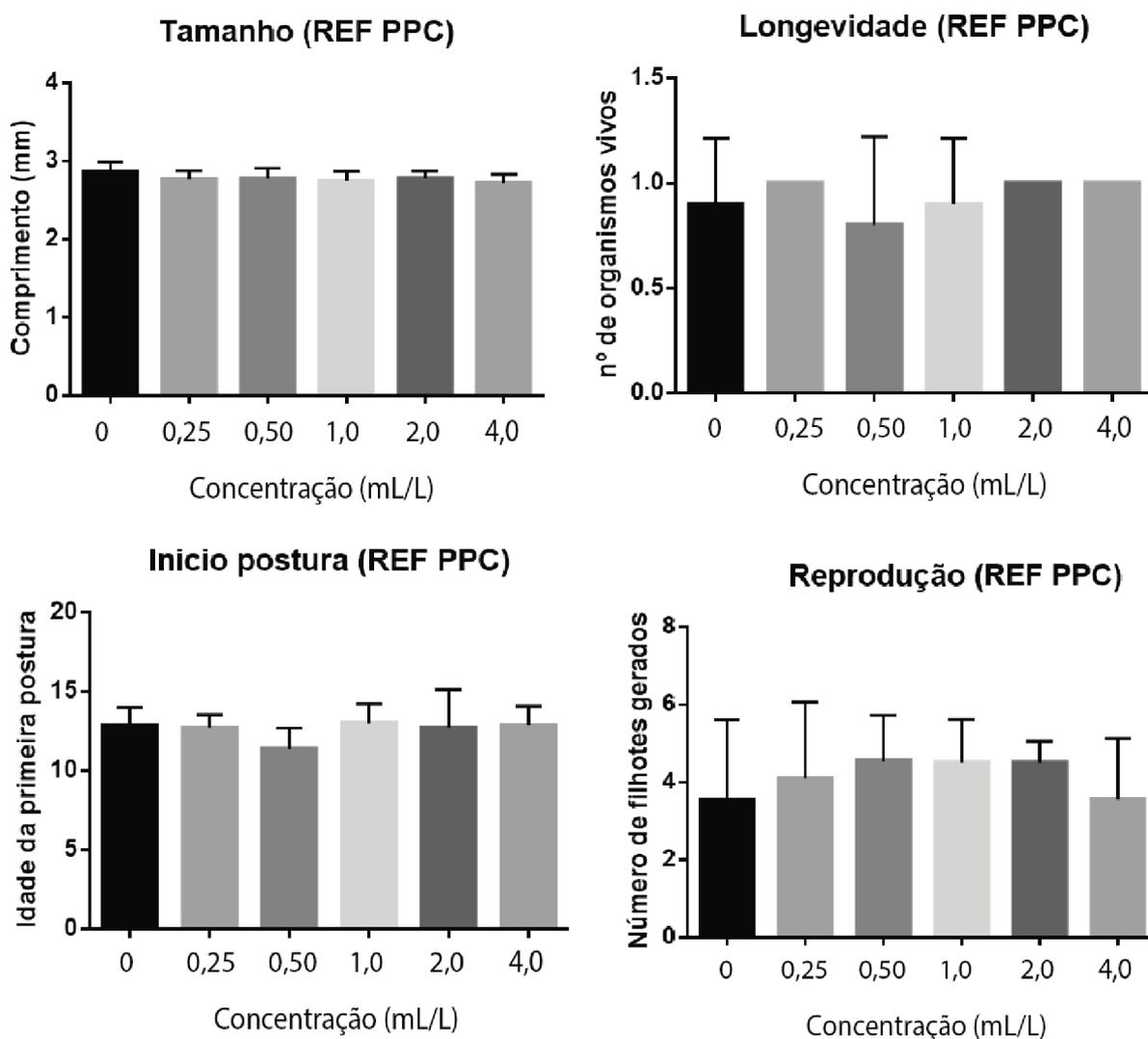
Fonte: a autora.

Figura 40 – Gráficos do resultado do teste crônico com *D. magna* no lixiviado de NA

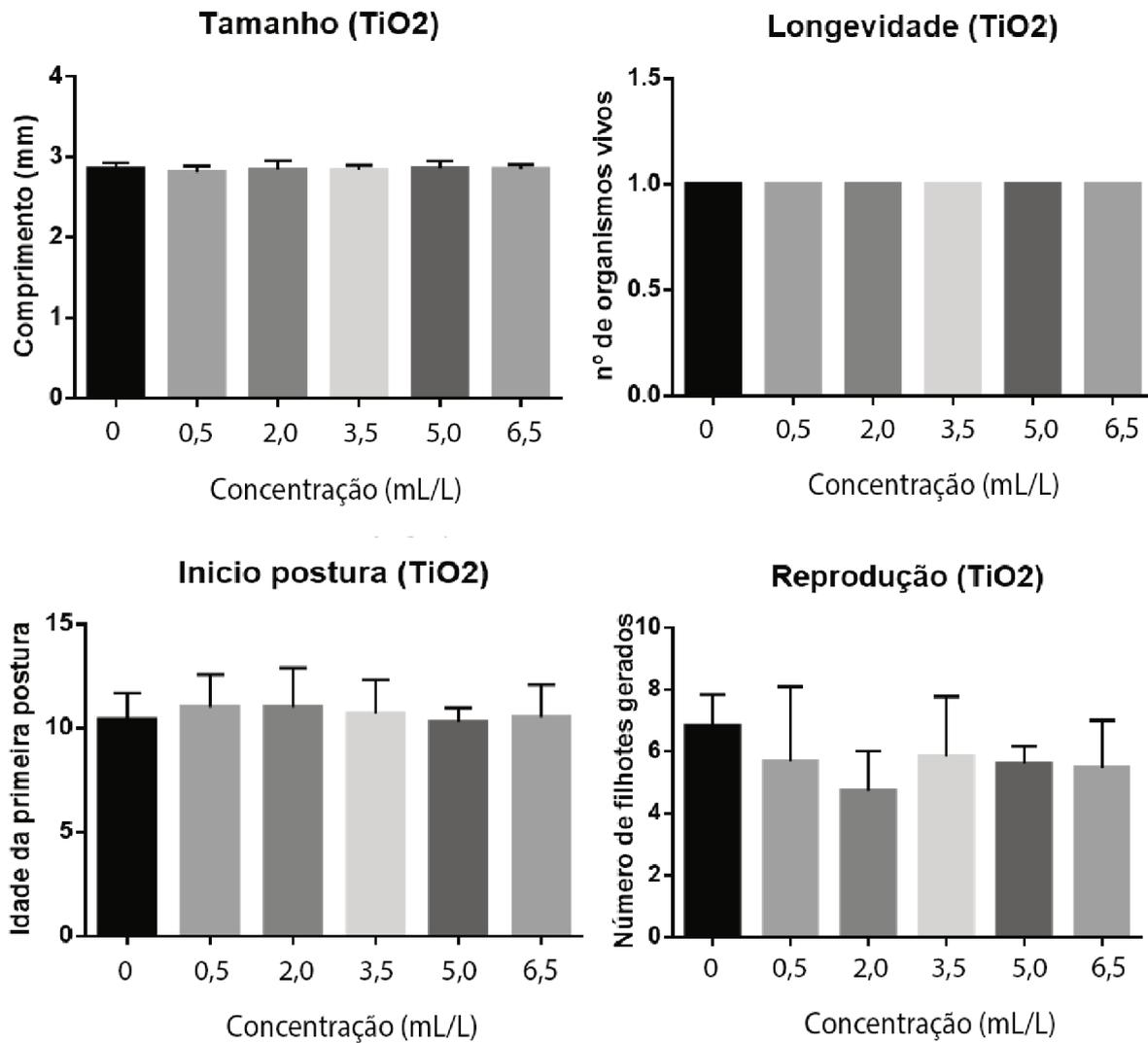
Fonte: a autora.

Figura 41 – Gráficos do resultado do teste crônico com *D. magna* no lixiviado de NTC

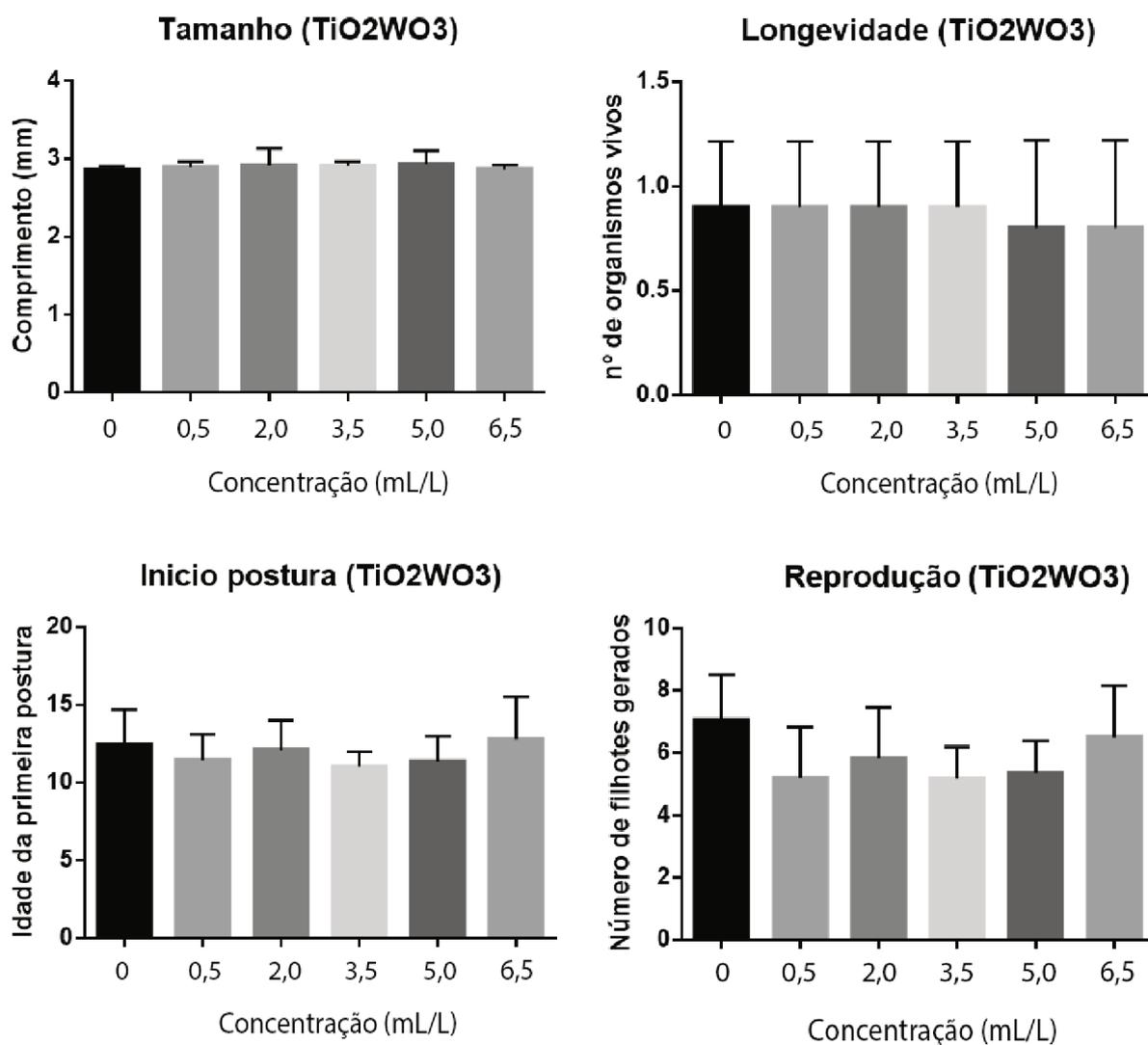
Fonte: a autora.

Figura 42 – Gráficos do resultado do teste crônico com *D. magna* no lixiviado de REFPPC

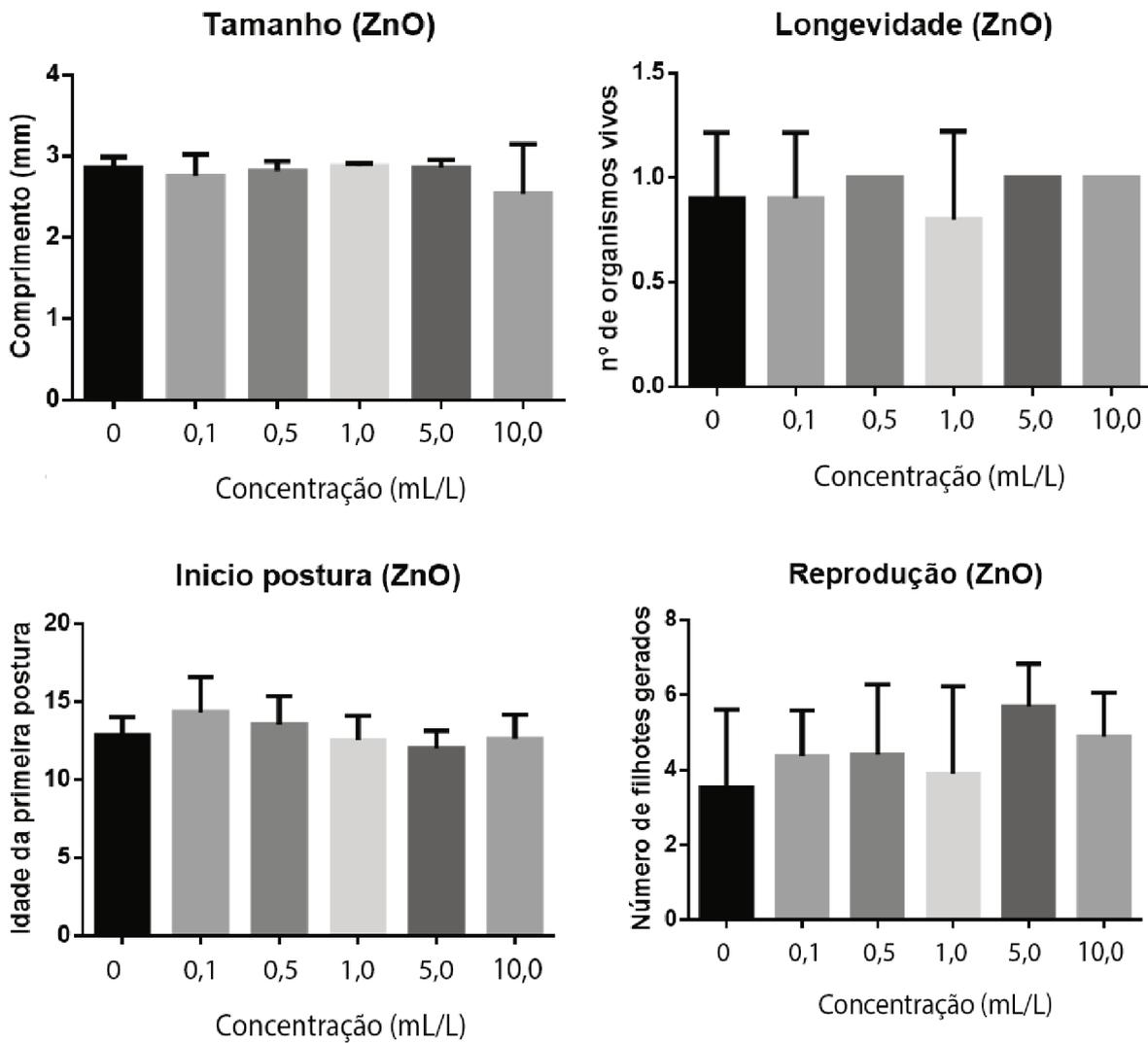
Fonte: a autora.

Figura 43 – Gráficos do resultado do teste crônico com *D. magna* no lixiviado de  $TiO_2$ 

Fonte: a autora.

Figura 44 – Gráficos do resultado do teste crônico com *D. magna* no lixiviado de  $TiO_2WO_3$ 

Fonte: a autora.

Figura 45 – Gráficos do resultado do teste crônico com *D. magna* no lixiviado de ZnO

Fonte: a autora.

A.3 RESULTADOS DOS TESTES DE TOXICIDADE COM *L. PUNCTATA*Tabela 23 – Taxa de crescimento (*r*) da *L. punctata* em meio contendo NMs isoladamente

NM	Controle mg/L	C 1 (mg/L)	C 2 (mg/L)	C 3 (mg/L)	C 4 (mg/L)
<i>NTC</i>	0,19±0,01	0,19±0,03	0,18±0,02	0,16±0,06	0,15±0,02*
<i>NA</i>	0,24±0,02	0,22±0,03	0,18±0,02*	0,14±0,02*	0,09±0,01*
<i>TiO<sub>2</sub></i>	0,16±0,02	0,15±0,02	0,14±0,04	0,13±0,03	0,01±0,02*
<i>TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub></i>	0,17±0,02	0,15±0,01	0,14±0,02	0,14±0,02	0,02±0,02*
<i>ZnO</i>	0,18±0,04	0,16±0,03	0,15±0,01	0,14±0,02	0,12±0,03*

\*Valores com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação ao grupo de controle.

Fonte: a autora.

Tabela 24 – Concentrações utilizadas para cada NM no teste de toxicidade com *L. punctata*.

Concentrações	<i>NTC</i> (mg/L)	<i>NA</i> (mg/L)	<i>TiO<sub>2</sub></i> (mg/L)	<i>TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub></i> (mg/L)	<i>ZnO</i> (mg/L)
Controle	0	0	0	0	0
C 1	10*	10	300	200	10
C 2	100	100	750	400	100
C 3	500	500	1500	1000	500
C 4	1000	1000	4500	2000	1000

\*Concentração 1 = 10 mg de NM em 1 L de meio de cultivo.

Fonte: a autora.

Tabela 25 – Taxa de crescimento *r* *Landoltia punctata* dos lixiviados

Lixiviado	Controle	FD 100	FD 10	FD 5	FD 2
<i>NTC</i>	0,22±0,01	0,19±0,03	0,09±0,03	0,09±0,01	0,00
<i>NA</i>	0,24±0,02	0,23±0,01	0,17±0,02	0,12±0,02	0,01±0,01
<i>RefCA</i>	0,24±0,02	0,22±0,03	0,15±0,00	0,15±0,01	0,00
<i>TiO<sub>2</sub></i>	0,20±0,03	0,19±0,01	0,12±0,02	0,05±0,01	0,00
<i>TiO<sub>2</sub>/WO<sub>3</sub></i>	0,20±0,03	0,21±0,02	0,11±0,02	0,04±0,02	0,00
<i>ZnO</i>	0,22±0,01	0,22±0,02	0,15±0,02	0,06±0,03	0,01±0,01
<i>RefPPC</i>	0,20±0,03	0,19±0,01	0,10±0,01	0,01±0,01	0,00

Fonte: a autora.