

Avaliação toxicológica de nanoestruturas de óxido de zinco aplicadas em argamassas

Bianca Vicente Oscar

Orientador: Dra. Denice Schulz Vicentini
Coorientadora: Dra. Silvia Pedroso Melegari

2015/1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA SANITÁRIA E
AMBIENTAL

Bianca Vicente Oscar

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOESTRUTURAS DE
ÓXIDO DE ZINCO APLICADAS EM ARGAMASSAS**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Engenharia Sanitária e Ambiental
da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito à obtenção do
título de Engenheira Sanitarista e
Ambiental.

Orientadora: Dra. Denice Schulz
Vicentini

Coorientadora: Dra. Sílvia Pedroso
Melegari

Florianópolis
Julho/2015

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

Oscar, Bianca Vicente

Avaliação Toxicológica de Nanoestruturas de Óxido de zinco aplicadas em argamassas / Bianca Vicente Oscar ; orientadora, Denice Schulz Vicentini ; coorientador, Sílvia Pedroso Melegari . - Florianópolis, SC, 2015. 87 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental.

Inclui referências

1. Engenharia Sanitária e Ambiental. 2. Nanotoxicologia . 3. Bioincrustação . 4. Óxido de zinco. I. Vicentini, Denice Schulz . II. Melegari , Sílvia Pedroso . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental. IV. Título.

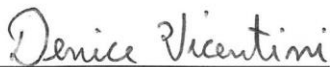
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA SANITÁRIA E
AMBIENTAL

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOESTRUTURAS DE
ÓXIDO DE ZINCO APLICADAS EM ARGAMASSAS**

BIANCA VICENTE OSCAR

Trabalho submetido à Banca Examinadora como
parte dos requisitos para Conclusão do Curso de
Graduação em Engenharia Sanitária e Ambiental –
TCC II

BANCA EXAMINADORA:



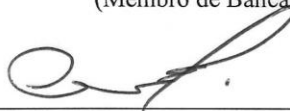
Denice Schulz Vicentini, Dra.
(Orientadora)



Silvia Pedroso Melegari, Dra.
(Coorientadora)



Ana Letícia de Oliveira Franco
Rossetto, Ma.
(Membro de Banca)



Cristiane Funghetto Fuzinato, Dra.
(Membro de Banca)

FLORIANÓPOLIS, (SC)
JULHO/2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus pais pela compreensão, incentivo e apoio em todas as fases da minha vida. Agradeço em especial ao meu pai pela incessante dedicação e essencial ajuda na realização desse trabalho. Você é meu herói.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina pelo suporte e estrutura disponibilizada.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPQ pelo apoio financeiro para o desenvolvimento desse trabalho.

À empresa Ceramfix – Argamassas e Rejuntas pela argamassa doada para o desenvolvimento da pesquisa.

Ao professor William Gerson Matias pela oportunidade, pelo incentivo e por acreditar sempre no meu trabalho nesses 5 anos de LABTOX.

À Denice Schulz Vicentini e a Sílvia Pedroso Melegari pela orientação, auxílio em toda a pesquisa e principalmente pela paciência.

Aos membros da banca, Ana Letícia de Oliveira Rossetto e Cristiane Funghetto Fuzinato pela disponibilidade e contribuições para a melhora deste trabalho.

À todos os colegas da equipe LABTOX, pois todos, de forma direta ou indireta contribuíram para esta pesquisa. Sem deixar de citar Cristiane F. Fuzinato e Renata Amanda Gonçalves pelo auxílio nos ensaios e Rodrigo Costa Puerari pela amizade, cumplicidade e ajuda.

À funcionária Maria Lúcia dos Passos, responsável pelo setor da limpeza do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental. Tanto pela contribuição na pesquisa quanto pela amizade.

Aos amigos e familiares que conviveram com minhas ausências durante estes anos conturbados de faculdade.

Enfim, a todos que contribuíram para a realização desse sonho, muito obrigada!

*“Education is the most powerful weapon which
you can use to change the world.”*

(Nelson Mandela, 2003)

RESUMO

A deterioração de argamassas de revestimento decorre de diferentes formas de ataques, entre elas a biodeterioração. Os principais agentes causadores desse dano às estruturas na construção civil são as bactérias, algas, fungos, líquens e vegetais, os quais podem causar agravos estéticos, estruturais e econômicos. Uma alternativa para prevenir a bioincrustação nas argamassas é a incorporação de nanomateriais (NM) a sua composição. Dentre os materiais em nanoescala estudados, o óxido de zinco (ZnO) se destaca pelas suas excelentes propriedades biocidas já comprovadas na literatura. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo avaliar toxicologicamente nanoestruturas de ZnO através de testes de toxicidade aguda com microcrustáceo *Daphnia magna* e com a bactéria marinha bioluminescente *Aliivibrio fischeri*, teste de toxicidade crônica com *D. magna*, incorporação e aplicação de nanomateriais em diferentes concentrações (0,5 – 2%) em argamassas comerciais e avaliação toxicológica *in situ* através da aspersão de soluções em superfícies que apresentavam bioincrustação. Neste estudo, trabalhou-se com nanobastões de óxido de zinco puros (NB de ZnO) e amina-funcionalizados (NB de ZnO@NH₂). Os NB foram caracterizados através de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), Difração de Raio-X (DRX) e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). A CE_{50,48h} com *D. magna* e a CE_{50,15min}, resultado dos ensaios com a bactéria *A. fischeri*, indicaram maior toxicidade aguda para o NB de ZnO@NH₂. Nos ensaios com os elutriatos com ambos os organismos, obteve-se também maior toxicidade com o NB de ZnO@NH₂, porém observou-se que o aumento da concentração de NB ZnO puro incorporado a argamassa reduzia a toxicidade do elutriato. Os ensaios em superfícies com bioincrustação comprovaram esses resultados, uma vez que a menor concentração de incorporação de NM aspergida apresentou melhor resultado na eliminação dos microrganismos. No ensaio de toxicidade crônica, o NB de ZnO mostrou-se mais tóxico para os parâmetros reprodução e longevidade enquanto que o NB de ZnO@NH₂ apresentou maior efeito para o parâmetro crescimento.

Palavras-chave: Nanotoxicologia. Nanobastão de Óxido de Zinco. *Daphnia magna*. *Aliivibrio fischeri*. Argamassa. Bioincrustação. Biodeterioração.

ABSTRACT

The deterioration of rendering mortars is the result of different types of attack, including biodeterioration. The main cause of biodeterioration is bacteria, algae, fungi, lichens and plants which can cause aesthetic, structural and economic damages. An alternative to prevent biofouling in mortars is the incorporation of nanomaterials (NM). Among the nanoscale studied, zinc oxide (ZnO) is notable for its excellent biocidal properties. Thus, this study aimed to assess toxicological ZnO nanostructures through acute toxicity tests with microcrustacean *Daphnia magna* and marine bacteria *Aliivibrio fischeri*, chronic toxicity test on *D. magna* and incorporation and application of nanomaterials in different concentrations (0,5 – 2%) in commercial mortar and toxicological evaluation in situ by spraying solutions on surfaces that had biofouling. In this study, zinc oxide nanorods pure (ZnO NR) and amine-functionalized (ZnO@NH₂ NR) were tested. The NR was characterized through the techniques of Transmission Electron Microscopy (TEM), X – Ray Diffraction and infrared spectroscopy. The EC₅₀ to *D. magna* and the EC_{50,15 min} to *A. fischeri* indicated higher acute toxicity of ZnO@NH₂ NR. Tests with elutriate with both organisms were obtained highest toxicity also of ZnO@NH₂ NR, however, it was observed that the increase of concentration of ZnO NR pure incorporated into a mortar, reduced to the elutriate toxicity. The test in surfaces with biofouling confirmed these results, because the lowest concentration of NM incorporation (0,5%) sprayed, showed better results for the elimination of microorganisms. Regarding the chronic test, effects on reproduction and longevity were observed with ZnO NR and effects on growth were observed with ZnO@NH₂ NR.

Keywords: Nanotoxicology. Zinc oxide nanorods. *Daphnia magna*. *Aliivibrio fischeri*. Mortar. Biofouling, Biodeterioration.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cadeia produtiva da nanotecnologia.	24
Figura 2 - Esquema ilustrativo da funcionalização do NB de ZnO com @NH ₂	27
Figura 3 – Microcrustáceo <i>D. magna</i>	32
Figura 4- Fluxograma de síntese dos NB de ZnO.....	35
Figura 5 - Fluxograma de funcionalização dos NB de ZnO.	36
Figura 6 - Representação do método de preparação de amostra para MET.	37
Figura 7 - Amostras sólidas para a extração do elutriato.	39
Figura 8 - Obtenção do elutriato das amostras.....	39
Figura 9 - Esquema indicativo das amostras do ensaio agudo com <i>D. magna</i>	43
Figura 10 - Testes crônicos em andamento.....	44
Figura 11- Disposição das pastilhas na superfície para o ensaio de diferentes concentrações de NM adicionados ao controle de referência. Sendo: Tipo 2 - controle de referencia, Biocida – controle positivo 1, ZnO 0,5%, 1% e 2% de adição de NB de ZnO a argamassa e ZnO@NH ₂ 1% - argamassa com adição de 1% de NB de ZnO@NH ₂	47
Figura 12 – Assentamento das pastilhas de vidro para posterior rejuntamento com diferentes composições de argamassa e NM.....	48
Figura 13 - Superfície externa escolhida para a aspersão das soluções.	49
Figura 14 - Superfície interna escolhida para o ensaio.	49
Figura 15 - Imagem por MET dos NB de ZnO.....	51
Figura 16 - Difratoograma de Raio-X do NB de ZnO.	52
Figura 17 - Espectros de FTIR a) @NH ₂ , b) NB de ZnO e c) NB de ZnO@NH ₂	53
Figura 18 - Valores de CE ₅₀ para os testes agudo com <i>D. magna</i> com os elutriatos nas condições com pH original e ajustado.	56
Figura 19 - Resultado para o parâmetro longevidade para NB de ZnO e NB de ZnO@NH ₂	60
Figura 20 - Resultado para o parâmetro crescimento para NB de ZnO e NB de ZnO@NH ₂	60
Figura 21 - Resultado para o parâmetro reprodução para NB de ZnO e NB de ZnO@NH ₂	61
Figura 22 - Comparação e destaque da redução do espinho apical de uma <i>D.</i> <i>magna</i> do (A) controle negativo e da (B) solução de 0,44 mg/L de NB de ZnO e comparação do tamanho de uma <i>D. magna</i> exposta a solução de 0,65 mg/L (2,3 mm) de NB de ZnO (C) com o controle negativo (B).	63
Figura 23 - Resultado obtido da aplicação das soluções de NB de ZnO e NB de ZnO@NH ₂ na superfície externa (A) antes da aplicação e (B) após 7 dias de aplicação diária.	66
Figura 24 - Disposição das áreas na superfície interna para aplicação das soluções de NB de ZnO e de ZnO@NH ₂	67

Figura 25 - Resultados obtidos da aplicação das soluções de NB de ZnO E NB de ZnO@NH ₂ na superfície interna. (A) antes da aplicação e (B) após 7 dias de aplicação diária.	69
Figura 26 - Pastilhas de vidro rejuntadas com diferentes concentrações de NB de ZnO.	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de $CE_{50, 48h}$ obtidos nos testes agudos com <i>D. magna</i> para soluções em meio ISO. Os ensaios com as soluções que apresentarem pH original fora da faixa recomendada, foram realizados no pH original e em pH ajustado para $7,0 \pm 0,5$.	54
Tabela 2- Resultados dos testes agudo com <i>D. magna</i> para os elutriatos preparados em meio ISO. Os ensaios com os elutriatos foram realizados no pH original e em pH ajustado ara $6,0 \pm 0,2$.	55
Tabela 3 - Resultados de CEO e CENO para os dois ensaios de toxicidade crônica com <i>D. magna</i> .	61
Tabela 4 – Valores de $CE_{50, 15min}$ obtidos nos testes de toxicidade aguda com <i>A. fischeri</i> para soluções de NM com pH entre 6,9 – 8,3, em água de osmose.	64
Tabela 5 - Valores de $CE_{50, 15 min}$ obtidos nos testes de toxicidade aguda com <i>A. fischeri</i> para os elutriatos preparados em água de osmose tendo o pH ajustado para $7,0 \pm 0,2$.	64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Listagem dos equipamentos utilizados.	33
Quadro 2 - Reagentes utilizados nos experimentos.	34
Quadro 3 - Controles dos testes toxicológicos.	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnica
CEO – Concentração de Efeito Observado
CENO – Concentração de Efeito não Observado
CE₅₀ – Concentração efetiva 50%
DRX – Difração de Raio – X
FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
LABTOX – Laboratório de Toxicologia Ambiental
MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão
NB – Nanobastão
NB de ZnO – Nanobastão de Óxido de Zinco
NB de Zn@NH₂ – Nanobastão de Óxido de Zinco Funcionalizado
NP – Nanopartícula
NM – Nanomaterial
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
ZnO – Óxido de Zinco

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL.....	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3.1	BIOINCRUSTAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÕES	21
3.1.1	Biodeterioração na Construção Civil	21
3.2	NANOTECNOLOGIA.....	22
3.2.1	ZnO e sua Ação Biocida.....	25
3.3	TOXICOLOGIA AMBIENTAL	27
3.3.1	Nanotoxicologia	28
3.3.2	Testes Toxicológicos.....	29
3.3.2.1	Organismos-testes	30
3.3.2.1.1	Microcrustáceo <i>D. magna</i>	30
3.3.2.1.2	Bactéria <i>A. fischeri</i>	32
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	33
4.1	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	33
4.2	SÍNTESE DOS NANOMATERIAS	34
4.3	CARACTERIZAÇÃO DOS NM	36
4.3.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	36
4.3.2	Difração de Raio-X (DRX)	37
4.3.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	37
4.4	ENSAIOS TOXICOLÓGICOS.....	38
4.4.1	Preparação das amostras de NM para os ensaios toxicológicos	38
4.4.2	Análises Toxicológicas	40
4.4.3	Cultivo de <i>D. magna</i>	40
4.4.4	Teste Agudo com <i>D. magna</i>	41
4.4.5	Teste Crônico com <i>D. magna</i>	43
4.4.6	Teste Agudo com <i>A. fischeri</i>	45
4.5	ENSAIOS EM SUPERFÍCIES.....	46
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	51
5.1	CARACTERIZAÇÃO DO NM	51
5.1.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	51
5.1.2	Difração de Raio – X.....	51
5.1.3	Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier	52
5.2	TESTES TOXICOLÓGICOS	53

5.2.1	Teste Agudo com <i>D. magna</i>	53
5.2.2	Teste Crônico com <i>D. magna</i>	59
5.2.3	Teste Agudo com <i>A. fischeri</i>	63
5.2.4	Ensaio em Superfície.....	65
5.2.4.1	Superfícies com bioincrustação	65
5.2.4.2	Capacidade de prevenir a bioincrustação.....	69
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
7.	CONCLUSÃO	75
8.	RECOMENDAÇÕES	77
9.	REFERÊNCIAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

Os estudos das manifestações patológicas em edificações têm levado cada vez mais em consideração à deterioração causada por microrganismos na construção civil. Sabe-se que as patologias encontradas nas edificações não são ocasionadas apenas por falhas cometidas durante o projeto ou execução da obra, mas também por fatores muitas vezes deixados de lado, tais como a agressividade do meio no local onde a estrutura será executada.

A deterioração prematura dos revestimentos de argamassa é decorrente de diferentes formas de ataque, as quais podem ser classificadas em físico -mecânicas, químicas e biológicas (CARASEK, 2015). Em condições favoráveis, pode ocorrer o crescimento de microrganismos na estrutura, que além de danos estéticos, podem causar danos estruturais.

O nome dado às mudanças indesejáveis nas propriedades do material causadas por microrganismos é biodeterioração (VIDELA, 2003). Este fenômeno ocorre principalmente devido aos processos metabólicos dos organismos incrustados, pois estes microrganismos liberam ácidos orgânicos e inorgânicos durante o seu ciclo de vida (LOPES et al., 2003).

Os métodos mais utilizados para cessar essa bioincrustação são os métodos de intervenção. Métodos como a utilização de jatos de água e aplicações de biocidas vêm sendo deixados de lado uma vez que são paliativos, removem os organismos temporariamente. Além disso, a utilização de biocidas não vem sendo bem aceita devido aos problemas com sua toxicidade e potencial de causar danos ao meio ambiente (FONSECA et al, 2010).

Nesse contexto a nanotecnologia surge como uma alternativa para amenizar e/ou resolver estes problemas através da aplicação de nanomateriais (NM) que combinam a redução da quantidade de material utilizado, elevada eficiência e a redução de custos.

A nanotecnologia é baseada no conhecimento e domínio de processos, materiais e produtos na escala nanométrica (10^{-9} m) (ROSSETTO, 2012). Nascida da união da pesquisa básica em física, química e biologia a nanotecnologia é considerada uma das tecnologias mais promissoras devido a sua multidisciplinaridade (ISO, 2008).

O objetivo da inserção dessa tecnologia no mercado é modificar as propriedades químicas e físicas de materiais. Hoje, a nanotecnologia é utilizada nas mais distintas áreas, tais como, alimentícia, eletrônica, farmacêutica, biotecnológica, cosmética, médico-hospitalar, agrícola e de segurança nacional.

O óxido de zinco (ZnO) é um material intensamente investigado na literatura devido as suas propriedades químicas e físicas, que proporcionam sua utilização em diversas aplicações (SOUZA et al., 2014). Os estudos envolvendo a aplicação de nanoestruturas de ZnO ressaltam suas diversas propriedades e entre elas, principalmente a sua propriedade biocida (VICENTINI et al., 2010; GHULE et al., 2006).

A nanotecnologia é uma ciência recente e não existem políticas específicas para controlar os efeitos dos NM no meio ambiente e na saúde humana. Até então, não se sabe ao certo as consequências do crescimento da aplicação desses compostos na garantia de qualidade de vida e na preservação do meio ambiente (ROSSETTO, 2012). Dessa forma, a nanotoxicologia surge como um ramo da toxicologia destinado ao estudo das interações dos nanomateriais e de suas nanoestruturas com os o sistema biológico e o meio ambiente.

Assim sendo, o presente estudo visa a avaliação da toxicidade da incorporação de nanobastões (NB) de ZnO a composições de argamassa comercial, explorando as propriedades biocidas do óxido metálico e assim tornando-se uma opção na prevenção de bioincrustação e biodeterioração na construção civil.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade da incorporação de NB de ZnO puros e funcionalizados a composições de argamassa comercial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar os NM através de técnicas físico-químicas;
- Realizar ensaios de toxicidade aguda das suspensões de NB de ZnO puros e funcionalizados utilizando o microcrustáceo *Daphnia magna*;
- Realizar ensaios de toxicidade aguda das suspensões de NB de ZnO puros e funcionalizados utilizando a bactéria *Aliivibrio fischeri*;
- Avaliar os efeitos crônicos do NB de ZnO puros e funcionalizados causados ao microcrustáceo *D. magna* quanto a longevidade, crescimento e reprodução;
- Determinar a toxicidade aguda do elutriado de amostras sólidas de diferentes composições da mistura argamassa comercial pura e com NM incorporados;
- Avaliar a atividade biocida de soluções de NB de ZnO *in situ*, em paredes que apresentam bioincrustação em sua superfície.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOINCRUSTAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÕES

A bioincrustação pode ser definida como a fixação de organismos vivos, microscópicos ou não, a quaisquer substratos. Essa associação pode acarretar tanto em consequências benéficas quanto danosas. A terminologia para esses termos ainda não está bem estabelecida. De qualquer forma, Allsopp et al. (2004) define as biotransformações desejáveis como biodegradação enquanto que as transformações deletérias como biodeterioração. Biodegradação remete, por exemplo, a biodegradação de plásticos e resíduos industriais, ou seja, a habilidades dos organismos de processar um material residual. Biodeterioração, segundo Hueck (1968), é qualquer mudança indesejável nas propriedades de materiais causadas pela atividade metabólica dos organismos.

3.1.1 Biodeterioração na Construção Civil

Após a construção, as edificações estão inevitavelmente sujeitos a colonização por organismos que podem induzir uma degradação a estrutura. Esses organismos podem ser bactérias, algas, cianobactérias, fungos, líquens e vegetais (TRAN et al., 2013). A bioincrustação e consequentemente a biodeterioração podem causar problemas estéticos, muitas vezes estruturais e perda econômica uma vez que se faz necessário investimento na manutenção e reparação das fachadas. Tran et al. (2013) ainda afirma que nesses ambientes, fatores como inclinação, orientação, distância entre o solo e a exposição à sombra influenciam tanto quanto porosidade, rugosidade da superfície, composição química e pH.

A deterioração causada pelos agentes biológicos pode ocorrer através de vários mecanismos. Entre eles, está a liberação de ácidos inorgânicos, pelos processos vitais das

bactérias quimiolitotróficas, e ácidos orgânicos devido à presença das bactérias quimiorganotróficas (LOPES et al., 2003).

Em construções, as argamassas são amplamente utilizadas sejam elas de revestimento interno ou externo, de assentamento ou de rejunte. O enfraquecimento das propriedades desses materiais é um problema recorrente. Segundo Kurth (2008), aproximadamente 30% das alterações visíveis nas construções é devido ao impacto da ação de organismos.

Os procedimentos usuais para a prevenção da biodeterioração são os métodos de intervenção. Métodos químicos são os mais frequentemente utilizados, porém, os biocidas não vêm sendo bem aceitos, pois não promovem uma longa duração da proteção fazendo com que sejam necessárias várias reaplicações do produto (RUSSEL & CHOPRA, 1990). Além da curta durabilidade, Tiano (1998) afirma que a aplicação desses produtos envolve outros problemas como alta toxicidade e danos ao meio ambiente.

Em sua pesquisa, Fonseca et al. (2010), analisou a redução da bioincrustação através de dois experimentos: a inoculação de cianobactérias e espécies clorofiladas em amostras sólidas de argamassa tratadas e a aplicação de soluções aquosas em uma parede externa coberta por organismos. O estudo visava a comparação do potencial biocida de três tipos de tratamento, dois biocidas convencionais e aplicação de nanopartícula (NP) de dióxido de titânio com cerca de 20 nm. A conclusão desse estudo confirmou que a incorporação de NM é uma alternativa para prevenir a bioincrustação nas argamassas.

3.2 NANOTECNOLOGIA

Segundo Rangel & Ferreira (2009) o termo nanotecnologia foi introduzido pelo engenheiro japonês Norio Taniguuchi, em 1974, para designar uma nova tecnologia que ia além do controle de materiais e da

engenharia em microescala. Com o passar do tempo, o conceito do termo foi modificado, sendo a definição atual mais aproximada à formulação de Eric Drexler nos anos 80, onde a nanotecnologia correspondia à metodologia de processamento envolvendo a manipulação “átomo a átomo”.

De acordo com a Zarbin (2007) e Poole & Owens (2003), nanotecnologia é o estudo de materiais cujos tamanhos das partículas que os constituem encontram-se na faixa dos nanômetros e que tem aplicação no mundo real. O termo nanotecnologia está associado a um grupo multidisciplinar envolvendo áreas da física, química, biologia, engenharia, processos eletrônicos, materiais, aplicações e conceitos em que a característica determinante é o tamanho (ISO, 2008).

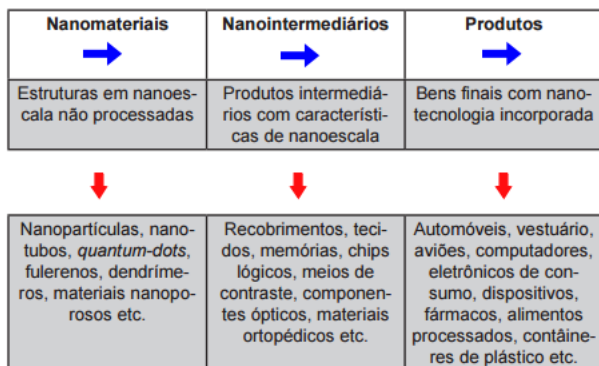
Desta forma, NM são materiais que apresentam pelo menos uma das três dimensões em escala nanométrica, entre 1 e 100 nanômetros, e que apresentam propriedades diferentes dos mesmos materiais em escala atômica, molecular ou *bulk* devido efeitos de tamanho e superfície (MARTINS & TRINDADE, 2012). Os NM possuem dimensões intermediárias entre as moléculas e as partículas submicrométricas (MARTINS & TRINDADE, 2012).

Em termos tecnológicos, a primeira motivação para o desenvolvimento de NM está associado à redução das dimensões de dispositivos, aumentando sua compactação devido a inserção de material em nanoescala. No entanto, mais que a procura pelo simples benefício direto da redução de tamanho, a grande motivação para o desenvolvimento de objetos e dispositivos nanométricos reside no fato que novas e incomuns propriedades físicas e químicas surgem nessa nova escala (MELO & PIMENTA, 2004). Conforme relatado por Zarbin (2007), todas as propriedades do material (ópticas, elétricas, magnéticas, de transporte, catalíticas, etc), manifestam-se a partir de um determinado tamanho. Quando as partículas deste material possuem dimensões abaixo desse tamanho dito crítico, esta propriedade se torna diferenciada.

Para Fortunato (2005), a nanotecnologia pode ser definida em três vertentes principais: nanoeletrônica, nanobiotecnologia e nanomateriais (NM). A primeira está associada a tecnologias de informação e computação, permitindo a manipulação de quantidades de informação extremamente grandes associadas a rápidas velocidades de processamento; a segunda associando a engenharia à nanoescala com a biologia para manipular sistemas vivos ou construir materiais biologicamente e a terceira, controlar as dimensões nanométricas das substâncias ou partículas para produzir materiais nanoestruturados.

Os setores que mais têm se destacado no lançamento de produtos obtidos por via nanotecnológica, ou contendo nanotecnologia embarcada, são: energético, de iluminação, automobilístico, de embalagens, cosméticos, têxteis, farmacêuticos e esportivos (ABDI, 2011). Tendo empresas atuantes em diferentes etapas da sua cadeia produtiva, como apresentado na Figura 1.

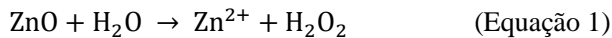
Figura 1 - Cadeia produtiva da nanotecnologia.



Fonte: (LQES/UNICAMP, LQES/UNICAMP, apud ABDI, 2011).

3.2.1 ZnO e sua Ação Biocida

O ZnO é um material intensamente investigado na literatura devido as suas propriedades químicas e físicas, que proporcionam sua utilização em diversas aplicações como: diodos emissores de luz, células solares, sensores de gás, fotocatalise, entre outros (SOUZA et al, 2014). Além disso, segundo Vicentini et al. (2010), o ZnO é amplamente utilizado por apresentar excelentes propriedades biocidas inclusive em pH neutro, devido à formação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na superfície dos NM (Equação 1).



O H₂O₂ é um poderoso agente oxidante e apresenta maior reatividade que as moléculas de oxigênio (GHULE et al., 2006). Sua ação está relacionada à produção de radicais hidroxilas no meio intracelular, esses radicais livres atacam os seguintes componentes celulares: lipídios, proteínas e DNA (PERES, 2005).

No estudo de Yamamoto et al. (2001) foram avaliados os efeitos do tamanho das NP sobre a atividade biocida de pós de ZnO. Observou-se que quatro fatores podem afetar a atividade dos pós cerâmicos, sendo eles: eluição dos cátions a partir do pó, geração de oxigênio ativo a partir da superfície do pó, o pH e a destruição mecânica da membrana celular. Nesse mesmo estudo, ao medir as alterações na condutividade elétrica com o crescimento de bactérias, verificou-se que a atividade biocida é aumentada com a redução do tamanho de partícula do ZnO e que sua atividade biocida é resultado da geração de H₂O₂ a partir da superfície de ZnO.

Em outro estudo, Xia et al, (2008) verificou que o ZnO absorvido pelas células é rapidamente dissociado (conforme equação 1) e íons Zn⁺² são liberados, aumentando a concentração desse íon dentro da célula e prejudicando a atividade mitocondrial.

No estudo de Vicentini et al. (2010) foram preparados filmes nanocompósitos de quitosana com NP de ZnO visando a aplicação em curativos dérmicos hidrofílicos para feridas e queimaduras. Os filmes foram testados com as bactérias *Escherichia coli* e *Staphylococcus. Aureus* e revelaram que a presença das NP de ZnO inibiu totalmente o crescimento destas bactérias. Em outro estudo, Ghule et al. (2006) avaliou as propriedades biocidas de papel de parede preparado com a deposição de NP de ZnO sobre as fibras de celulose. Nesse estudo foi observado um aumento do efeito biocida do papel com NP ZnO para a bactéria *E. coli* com o aumento do tempo de exposição passando de 1 h para 3 h e com a presença da luz UV. Bellotti et al. (2015) comprovou o potencial fungicida de NP de ZnO através da adição do NM em tintas de pintura interna a base de água. Porém, em comparação com os outros NM analisados (NP de prata e NP de cobre), a adição de NP de ZnO apresentou a menor eficiência que as demais. Entretanto, Bellotti et al. (2015) ressalta que a concentração desse NM não foi a efetiva necessária para a obtenção de um resultado mais significativo.

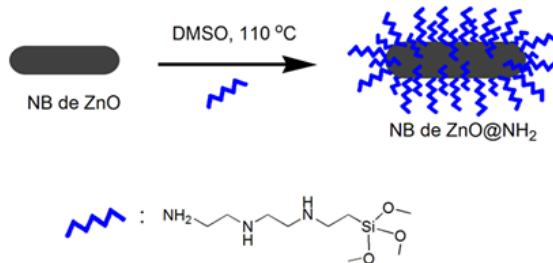
Corroborando com os autores indicados anteriormente, Horie et al. (2009 apud SUMAN, 2015), constatou que as NP de ZnO apresentavam uma alta toxicidade mesmo em concentrações baixas e além disso, demonstraram uma forte capacidade de adsorção de proteínas.

Com o surgimento da nanociência e nanotecnologia, verificou-se uma enorme variedade de nanoestruturas tais como nanofios, nanobastões (NB), nanofitas, nanocabos e nanotubos. Com isso, várias formas alotrópicas do ZnO foram desenvolvidas, dentre elas os NB de ZnO. Da mesma forma, diversas técnicas vêm sendo desenvolvidas para potencializar o uso desses materiais. Uma delas é a funcionalização dos NM, a qual consiste na modificação da superfície através da ancoragem por ligações químicas de

diferentes grupamentos químicos que irão alterar algumas propriedades nestes NM.

No caso, a funcionalização do NB de ZnO pode ser realizada para modificar as propriedades do ZnO, conferindo a ele novas propriedades. Uma das principais intenções da funcionalização neste caso é reduzir a exposição total da superfície do NB (Figura 2), evitando que o efeito biocida seja intenso num primeiro estágio, objetivando também uma redução na toxicidade. A funcionalização atua como um revestimento “*shell*” e pode ainda alterar o caráter ácido-básico do NM.

Figura 2 - Esquema ilustrativo da funcionalização do NB de ZnO com @NH₂.



Fonte: Banco de dados LABTOX.

3.3 TOXICOLOGIA AMBIENTAL

Segundo Brilhante & Caldas (1999), toxicologia ambiental estuda as interações tóxicas de substâncias químicas no ecossistema e sua capacidade de afetar a fisiologia normal de organismos vivos. Complementando a definição, Yu (2005) afirma que trata-se de uma ciência multidisciplinar que engloba muitas áreas de estudo, como biologia, química, bioquímica, estudos de solo, água, atmosfera e estatística.

Como extensão da toxicologia ambiental tem-se a ecotoxicologia, termo definido por René Truhaut em 1969.

Ronco et al. (2004), a define como sendo uma área especializada da toxicologia ambiental, cujos objetivos dos estudos estão baseados nos efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre a dinâmica das populações e comunidades integrantes de ecossistemas definidos.

Os dados mais comuns obtidos para a identificação do risco toxicológico provêm de bioensaios (BRILHANTE & CALDAS, 1999). Através deles, estima-se a magnitude do problema da exposição de grupos de organismos a determinado xenobiótico.

3.3.1 Nanotoxicologia

A ciência e tecnologia em nanoescala têm atraído considerável atenção nos últimos anos pela expectativa dos impactos que os materiais nanoestruturados podem causar na melhoria econômica, na qualidade de vida e na preservação do meio ambiente (ROSSETTO, 2012).

Com o crescente interesse e desenvolvimento na área de nanotecnologia, surge uma ampla discussão sobre os potenciais riscos associados à exposição de organismos e ao meio ambiente como um todo. Isso por que, a alteração das propriedades dos materiais quando em escala nano pode provocar alteração do seu potencial toxicológico. Por ser uma ciência relativamente nova, os bancos de dados referentes ao risco toxicológico desses materiais ainda são pequenos e incompletos. O estudo deste problema é uma das necessidades prioritárias no campo da nanotoxicologia (MONSERRAT, 2010).

Dessa forma, entende-se que nanotoxicologia é a ciência que objetiva o estudo da toxicidade dos NM em relação ao homem e ao meio ambiente. Segundo Donaldson et al. (2004), é um termo construído para lidar com as novas ameaças potenciais que o uso generalizado de novas NP poderia trazer em apoio ao crescimento de uma indústria de nanotecnologia, segura e sustentável.

De acordo com Paschoalino (2010), alguns estudos sugerem que os NM, por sua pequena dimensão, podem ter uma permeabilidade maior através da pele, mucosa e membranas celulares, podendo ter efeito tóxico ampliado, já que possuem uma reatividade superior, principalmente devido ao aumento da área superficial.

Drobne (2007), por exemplo, afirma que os alvos mais relevantes de indução de toxicidade gerada pelas NP são a membrana celular, mitocôndrias e o núcleo da célula.

Tendo em vista o crescimento da nanociência e da preocupação das consequências de sua aplicação ao meio ambiente, o Laboratório de Toxicologia Ambiental – LABTOX desenvolve desde 2008 pesquisas relacionadas à síntese e a funcionalização de NM além de realizar a avaliação toxicológica destes. Como mencionado por Drobne (2007), não é possível definir de que modo todos os NM agem sobre os sistemas biológicos pela análise de um único composto. Isso por que, além do tamanho, sua composição, concentração, instabilidade e outros fatores também interferem no seu comportamento dentro dos organismos. Neste contexto, o LABTOX faz parte de uma Rede Cooperativa de Pesquisas em Nanotoxicologia financiada pelo CNPq, que tem como principal objetivo, através da cooperação entre UFSC e outras universidades nacionais e internacionais, contribuir para o banco de dados toxicológicos dos NM.

3.3.2 Testes Toxicológicos

Os testes de toxicidade são ensaios laboratoriais que têm como objetivo avaliar os efeitos nocivos das substâncias a serem analisadas, bem como o seu grau de toxicidade sobre organismos vivos (ROSSETTO, 2012). Segundo Knie & Lopes (2004), os testes ecotoxicológicos possuem diversas aplicações, entre elas licenciamento de produtos químicos, fiscalização de efluentes, monitoramento de qualidade de águas, entre outros. Atualmente, os ensaios ecotoxicológicos

destinam-se a investigação do efeito tóxico ou nocivo de uma determinada substância para o organismo, e quando comprovado, este efeito e o grau de toxicidade do material analisado são identificados. Essas informações são de grande valia na tomada de decisões, tais como na comparação de materiais diferentes para aplicação, nas medidas que devem ser realizadas para minimizar os impactos causados, e de que forma tal intervenção atinge o meio ambiente exposto.

De acordo com Rand et al (1995), a toxicidade depende das propriedades, tempo de exposição e concentração da substância química à qual o organismo é exposto. Os testes de toxicidade podem ser realizados no local de origem do organismo (*in situ*) ou em laboratório.

3.3.2.1 Organismos-testes

Organismos-teste são espécies mantidas em laboratório e cujos conhecimentos de sua biologia são bem estabelecidos para que possam ser utilizadas como indicadores da toxicidade. Tanto a forma de cultivo como as metodologias de ensaio para estes organismos são definidas em normas técnicas, permitindo a reprodutibilidade dos resultados (ARENZON et al., 2011).

Arenzon et al. (2011) ressalta que a escolha desses organismos-teste, precisa considerar o nível trófico que ele está inserido: produtores primários (p. e. algas), consumidores primários (p. e. microcrustáceos), consumidores secundários (p. e. peixes) ou decompositores (p. e. bactérias).

Segundo Matias (2005), a seleção desses organismos deve levar em consideração também os seguintes aspectos: facilidade de reprodução, facilidade de cultivo quando necessário, velocidade de crescimento e desenvolvimento, disponibilidade no mercado e facilidade de manipulação.

3.3.2.1.1 Microcrustáceo *D. magna*

D. magna Straus, 1820 (Cladocera, Crustacea), vulgarmente conhecida como “pulga d’água” é um microcrustáceo planctônico, com comprimento de 0,5 mm na fase jovem e 5 - 6 mm na fase adulta. Atua como consumidor primário na cadeia alimentar aquática, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado em suspensão, principalmente algas. Os organismos deste gênero têm larga distribuição no hemisfério norte (NBR 12.713, 2010).

As *D. magna* se reproduzem por partenogênese cíclica, por isso, as populações consistem quase que inteiramente de fêmeas. A produção de machos é estimulada principalmente por causa de baixas temperaturas, ou alta densidade de indivíduos e subsequente acumulação de produtos de excreção, e/ou uma diminuição de disponibilidade de alimento. Estas condições podem induzir o aparecimento de ovos sexuais, ou efípios (FLOHR, 2007).

Segundo Clare (2007), as condições ideais do meio de cultura destes organismos compreendem temperatura variando em 20 ± 2 , pH entre 6,5 e 9,5 sendo o pH ótimo entre 7,2 e 8,5 e dureza acima de 150 mg/L de CaCO_3 (águas duras).

Segundo Knie & Lopes (2004), as vantagens da utilização desse organismo em bioensaios normatizados são: facilidade de cultivo em laboratório, produção de descendentes geneticamente idênticos garantindo uniformidade nos testes, reage sensivelmente a vários agentes nocivos e seu ciclo de vida e reprodução são curtos.

Na Figura 3 é possível visualizar o microcrustáceo *D. magna* bem como partes de sua estrutura.

Figura 3 – Microcrustáceo *D. magna*.



Fonte: A autora.

3.3.2.1.2 Bactéria marinha bioluminescente *A. fischeri*

A. fischeri é uma bactéria marinha bioluminescente, gram-negativa, anaeróbia facultativa. Em condições ambientais favoráveis essas bactérias emitem luz naturalmente, necessitando somente de condições de oxigênio de 0,5 mg/L (KNIE & LOPES, 2004) e salinidade.

Durante seu metabolismo o microrganismo utiliza parte da energia obtida no ciclo de Krebs para emitir luz. Ao entrar em contato com substâncias tóxicas a produção de energia é inibida e as bactérias cessam ou diminuem a emissão de luz (UMBUZEIRO & RODRIGUES, 2004).

Segundo Fuzinato (2009), *A. fischeri* possui uma distribuição global, sendo encontrada nos oceanos, em vida livre ou associada a outros organismos marinhos, como por exemplo, a lula *Euprymna scolopes*.

A norma referência para ensaios é a NBR 15411-3 (ABNT, 2006), que especifica ensaios toxicológicos com a bactéria bioluminescente utilizando-a na sua forma liofilizada. Para a realização do teste as amostras devem possuir pH entre 6 e 8,5. Caso não se encontrem nessa faixa, o pH deve ser ajustado para $7 \pm 0,2$. Além disso, a amostra deve possuir salinidade mínima de 20g/L e apresentar-se com pouca cor e turbidez.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os ensaios laboratoriais, a aplicação de soluções de NB de ZnO puros e funcionalizados a superfícies com presença de microrganismos e a exposição de amostragens as intempéries em um ambiente propício a bioincrustação foram conduzidos nas dependências do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os ensaios de bancada e a sínteses dos nanomateriais utilizados foram realizados no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX).

4.1 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1.1 Equipamentos

Os equipamentos utilizados no desenvolvimento da pesquisa estão listados na Quadro 1.

Quadro 1 - Listagem dos equipamentos utilizados.

Equipamentos	Especificações
Balança analítica	Shimadzu - AUY220
Estufa de secagem e esterilização	SPLabor
Centrífuga	Parsec, CT-0603
Capela	SPLabor
Aagitador magnético	Biomixer - 78HW-1
Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	TEM JEM 1011 - Laboratório Central de Microscopia Eletronica (LCME) da UFSC
Ultrassom	Q500 Sonicator - QSonica 500W, sendo utilizado com 30% de sua potencia (150 W)
Difratômetro de raios-X (DRX)	X'Pert, Philips - Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) da
Espectrômetro de Infravermelho	Bruker - FT-IR ALPHA (4000 - 400 cm ⁻¹) - Central de Análises do Departamento de Química da UFSC

Fonte: A autora.

4.1.2 Reagentes

Os reagentes e solventes utilizados para a realização dos experimentos e caracterização dos produtos estão listados no Quadro 2, seguida das suas respectivas procedências.

Quadro 2 - Reagentes utilizados nos experimentos.

Reagentes	Pureza	Fabricante	Local
Acetato de zinco diidratado (Acetato de Zn)	≥ 98%	Sigma-Aldrich	St. Louis, USA
Hidróxido de potássio (KOH)	88%	J. T. Baker	México, MX
3-[2-(2-aminaetilamina)etilamina] propil-trimetoxisilano (@NH ₂)	NI	ACROS	New Jersey, USA
Metanol (MeOH)PA	99,80%	Synth	Diadema, SP
Etanol (EtOH)PA	99,50%	Synth	Diadema, SP
Dimetilsulfóxido (DMSO)	99,90%	Synth	Diadema, SP
Água de osmose reversa	18,2 Mohm cm a 25°C		

*NI – Não Informado

Fonte: A autora.

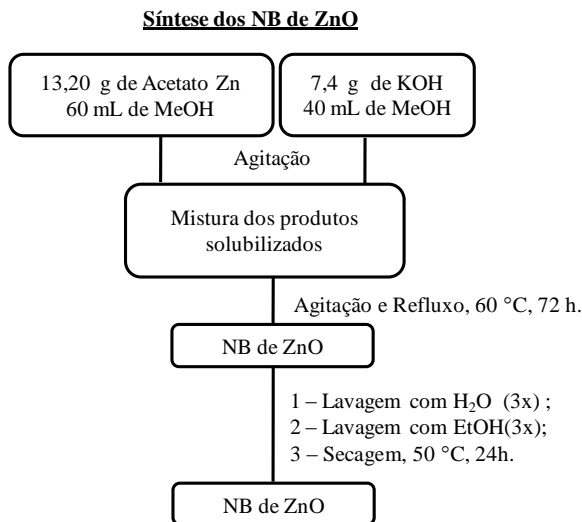
4.2 SÍNTESE DOS NANOMATERIAS

4.2.1 Síntese dos NB de ZnO

Os NB de ZnO foram sintetizados seguindo a metodologia proposta por Yang et al. (2011), com algumas adaptações conforme fluxograma ilustrado na Figura 4. As massas equivalentes a 60 mmol (13,20 g) de acetato de zinco e 130 mmol (7,4 g) de KOH foram solubilizadas em 60 mL e 40 mL de metanol, respectivamente. Em seguida, as duas soluções foram misturadas e mantidas sob refluxo a 60°C por 72 h. Os NB de ZnO foram separados por centrifugação, lavados três vezes com água e etanol e secos na estufa a 50 °C por 24 h.

A vantagem desta síntese em relação às sínteses tradicionais de nanoestruturas de ZnO é a ausência da etapa de tratamento térmico, reduzindo o custo do NM sintetizado.

Figura 4- Fluxograma de síntese dos NB de ZnO.



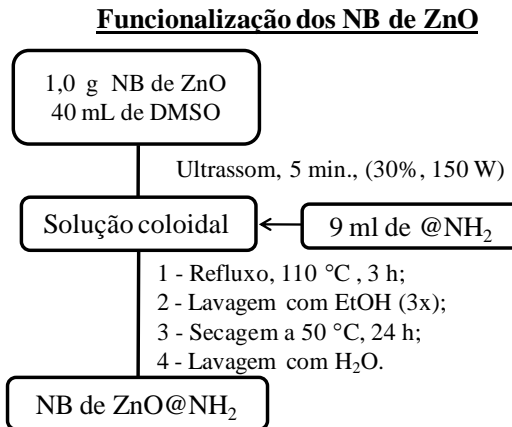
Fonte: A autora.

4.2.2 Funcionalização dos NB de ZnO

Os NB de ZnO foram funcionalizados de acordo com a metodologia proposta por Yang et al. (2011), com algumas alterações conforme fluxograma ilustrado na Figura 5. Um grama de NB de ZnO foi suspensa em DMSO com auxílio do ultrassom. Na suspensão coloidal resultante foi adicionado o 3-[2-(2-aminaetilamina)etilamina] propil-trimetoxissilano e mantido sob refluxo a 110 °C por 3 h. Em seguida, os NB de ZnO@NH₂ foram lavados com etanol e secos. Depois de secos, os NB foram lavados excessivamente com água e secos novamente.

A funcionalização dos NM sintetizados teve como principal objetivo tentar reduzir a exposição total da superfície do NB evitando assim que seu efeito biocida seja intenso num primeiro estágio de exposição.

Figura 5 - Fluxograma de funcionalização dos NB de ZnO.



Fonte: A autora.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DOS NM

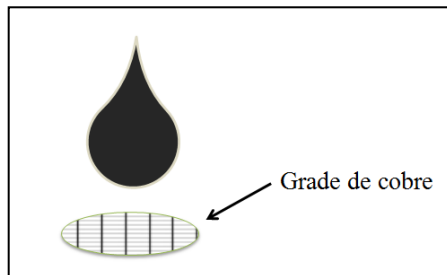
4.3.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A morfologia e o tamanho dos NB de ZnO foram analisados via MET (Quadro 1). O microscópio fornece imagens que permitem a visualização dos materiais em escala nanométrica, podendo assim identificar a estrutura morfológica, o tamanho e o diâmetro dos NM.

O método de preparação da amostra para a análise de MET consistiu em depositar uma gota da solução de NB de ZnO 1 g/L, previamente sonicada no ultrassom por 3 min, sobre um filme de carbono amorfo de 3-5 nm de espessura suportado sobre uma grade de cobre de 300-400 mesh e 3 mm de diâmetro Figura 6. Em seguida, a amostra foi seca a temperatura ambiente por 24 h.

O meio diluente utilizado no ensaio foi água ultra pura.

Figura 6 - Representação do método de preparação de amostra para MET.



Fonte: A autora.

4.3.2 Difração de Raio-X (DRX)

A pureza dos NB de ZnO foi verificada via DRX. Como resultado, o aparelho fornece dados para plotagem do difratograma. No difratograma são identificados os picos característicos da fase cristalina do material puro.

A amostra de pó do NB de ZnO foi prensada para a formação de uma pastilha de aproximadamente 3,4 mm. Esta pastilha foi inserida no compartimento do equipamento. O ângulo de difração em 2θ foi registrado de 5 a 80° à temperatura ambiente e o tubo utilizado como fonte dos raios-X foi o cobre, $\text{CuK}\alpha$, com $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$.

4.3.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Nos espectros de FTIR é possível identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nas amostras. Para realizar as análises de FTIR foram preparadas pastilhas das amostras da molécula funcionalizante -NH_2 e dos NM com KBr anidro.

4.4 ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

4.4.1 Preparação das amostras de NM para os ensaios toxicológicos

Os ensaios de bancada foram realizados com dois tipos de amostras, os NB de ZnO puros e funcionalizados diluídos nos meios específicos para cada ensaio toxicológico dependendo do organismo a ser exposto, e os elutriatos preparados a partir de composições de argamassa de rejunte com diferentes porcentagens de NM adicionadas. A preparação dos elutriatos teve a intenção de aproximar os resultados obtidos em bancada da realidade do emprego do rejunte como produto final. Considerando a lixiviação e o carreamento de parte de sua composição por meio da chuva ou situações de grande umidade encontradas em ambientes internos.

As soluções de NB de ZnO e NB de ZnO@NH₂ foram preparadas a partir da pesagem dos NM em uma balança de precisão analítica. Os possíveis aglomerados foram dispersos no meio específico do teste com auxílio do ultrassom (Quadro 1).

Para os ensaios com o elutriato, foram seguidas as recomendações da NBR 15.469 (ABNT, 2007). A norma indica a proporção de uma parte de sedimento para quatro partes de água de diluição. A preparação das amostras sólidas levou em conta proporções de preparo indicadas pelo próprio fabricante da argamassa de rejunte base dos ensaios - 1 kg da argamassa comum a 250 mL de água e 1kg de argamassa com propriedades biocidas para 255 mL de água. Dessa forma, para a obtenção de uma massa sólida de peso total de 30 g, foram adicionados 7,5 mL de água de osmose para a argamassa comum e 7,65 mL para argamassa com propriedades biocidas. A massa resultante da mistura foi aplicada em moldes de 8x8x0,2 cm conforme mostrado na Figura 7.

Figura 7 - Amostras sólidas para a extração do elutriato.



Fonte: A autora.

As amostras permaneceram em repouso por 48 h. Em seguida, foram submetidas a agitação constante por 30 min em um béquer de 1 L com um volume de 120 mL de meio diluente (Figura 8). Depois desse tempo, foram deixadas em repouso por 1 h para então, obter-se o elutriato.

Figura 8 - Obtenção do elutriato das amostras.



Fonte: A autora.

Para os ensaios em superfície foram preparados duas amostras distintas, sendo uma delas: soluções com diferentes porcentagens de adição de NM à água de osmose e outra, adição direta de NM à argamassa para posterior simulação de aplicação na construção civil.

4.4.2 Análises Toxicológicas

Das análises toxicológicas foram realizados testes agudo e crônico utilizando o organismos-teste *D. magna*, testes de toxicidade aguda com a bactéria marinha luminescente *A. fischeri*, análises através de comparação de imagens de superfície com ocorrência de bioincrustação pré e pós-aplicação de soluções de NB puros e funcionalizados e exposição de diferentes composições de NM adicionados a argamassa a um ambiente visando a possibilidade de ocorrência de bioincrustação.

4.4.3 Cultivo de *D. magna*

O cultivo do microcrustáceo *D. magna* é mantido de acordo com as recomendações da ABNT NBR 12.713/2010 pelo próprio LABTOX. A cultura dos organismos-testes é mantida em béqueres de vidro de 2000 mL com aproximadamente 1,5 L de água de cultivo. O cultivo é mantido em estufa com temperatura variando em 20 ± 2 °C e luminosidade controlada por fotoperíodo de 16 horas de luz.

A manutenção da cultura é feita três vezes por semana onde a água de cultivo M4 (NBR 12.713, 2010) é trocada e uma nova quantidade de alimento, algas unicelulares como *Scenedesmus subspicatus*, é disponibilizada para o lote. Os organismos adultos são transferidos para o novo meio de cultivo, os filhotes são utilizados nos testes toxicológicos realizados no laboratório. Os filhotes que não utilizados para testes são descartados num recipiente com hipoclorito de sódio (NaClO).

Todos os procedimentos relacionados à cultura das *D. magna* se refletem na sua sensibilidade. Logo, são realizados periodicamente testes de sensibilidade com dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) como descreve a norma ISO 6341 (2012), que são mantidos em uma carta-controle. A faixa de sensibilidade recomendada para a utilização dos organismos nos testes é entre 0,6 mg/L e 1,7 mg/L de $CE_{50, 48h}$.

4.4.4 Teste Agudo com *D. magna*

A metodologia do teste de toxicidade aguda utilizando *D. magna* como organismo-teste foi realizada de acordo com a NBR 12.713 (ABNT, 2010). O teste consiste na exposição de neonatos (2 até 26 horas de vida) a uma concentração da substância a ser testada diluída no meio ISO, por um curto intervalo de tempo (48 h). O ensaio é realizado em duplicada para cada diluição. Em cada recipiente do teste foram adicionados 25 mL de amostra e colocados 10 neonatos de *D. magna*.

Neste ensaio não houve troca de meio de cultivo ou alimentação. Como resultado foi observado efeitos sobre a capacidade natatória ou imobilização do organismo-teste. Após 48 horas, o número de neonatos imóveis é contabilizado e através do programa estatístico *Trimmed Spearman Karber*, o resultado é expresso pela concentração efetiva que causa imobilidade a 50% da população exposta ($CE_{50, 48h}$).

Nos ensaios trabalhou-se com dois tipos de amostras: NB de ZnO diluídos em meio ISO e elutriados extraídos de composições de argamassa de rejunte e NM incorporado também diluídos em meio ISO. Devido a instabilidade do NM, as amostras para os ensaios agudos com *D. magna* foram mantidas por no máximo dois dias à temperatura 10 °C.

Para a realização dos testes referentes à diluição de NM no meio padronizou-se a elaboração de soluções de 1 g/L e foram analisadas nessas concentrações as soluções de

NB de ZnO, NB de ZnO@NH₂ e os controles dos testes estabelecidos na Quadro 3.

Quadro 3 - Controles dos testes toxicológicos.

Material	Nome do Controle
Rejunte comercial	Controle de referência
Rejunte comercial com propriedades biocidas	Controle positivo 1
ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	Controle positivo 2

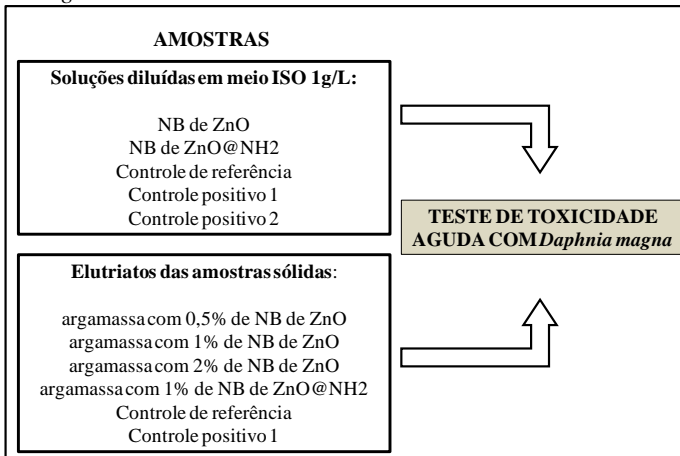
Fonte: A autora.

Para os ensaios com o elutriato, foram preparadas amostras com total de 30 g de composição de argamassa com adição de NM para 120 mL de meio de teste ISO. A argamassa utilizada nos ensaios foi doada pela empresa Ceramfix – Argamassas e Rejuntas, localizada na cidade de Gaspar – SC.

Trabalhou-se com seis amostras sólidas sendo elas: composições de rejunte com NB de ZnO nas proporções de 0,5, 1 e 2% de NM, e composição de argamassa com 1% de NB de ZnO@NH₂, controle de referência e controle positivo 1.

O esquema abaixo ilustra de forma mais simplificada os ensaios agudos realizados com *D. magna*.

Figura 9 - Esquema indicativo das amostras do ensaio agudo com *D. magna*.



Fonte: A autora.

Por não apresentarem o pH recomendado para os ensaios com o microscutáceo *D. magna*, (faixa de 5,0 a 9,0, segundo a NBR 12.713) as amostras que continham algum resíduo de argamassa seja ela com características biocidas ou não, tiveram seu pH ajustados para $6,0 \pm 0,2$, apresentando-se assim dentro da faixa recomendada na NBR 12.713 (ABNT, 2010).

4.4.5 Teste Crônico com *D. magna*

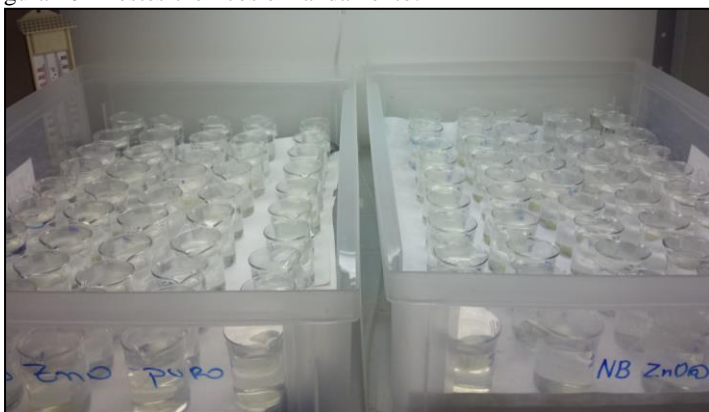
No teste de toxicidade crônica os neonatos da espécie *D. magna* foram expostos a diferentes diluições da amostra por um período de 21 dias. Mantido sob as mesmas condições de temperatura e luminosidade da cultura, três parâmetros principais foram observados no teste: crescimento, reprodução e longevidade.

O parâmetro crescimento foi avaliado através da medição do comprimento de cada indivíduo exposto com o auxílio de uma lupa e uma escala milimetrada. A reprodução

foi avaliada pela contagem de filhotes gerados durante todo o tempo de exposição. E a longevidade, pela sobrevivência dos organismos durante o tempo do ensaio.

O teste consistiu em 10 réplicas por diluição, sendo um organismo em cada réplica. Mantido sobre as condições do cultivo, foi realizado a troca do meio M4 e a alimentação três vezes por semana.

Figura 10 - Testes crônicos em andamento.



Fonte: A autora.

A sobrevivência dos organismos expostos e contagem dos filhotes nascidos eram monitoradas diariamente. O tamanho dos organismos expostos foi verificado apenas no final do ensaio (21 dias). O resultado do teste é expresso em concentração de efeito observado (CEO) e concentração de efeito não observado (CENO). A CEO indica a menor concentração da amostra que causa efeito significativo nos organismos e a CENO é a maior concentração da amostra que não causa efeito significativo aos organismos. Para conseguir tais resultados usou-se o programa estatístico *Dunnnett*.

Foram realizados dois testes crônicos, ambos na concentração de 1g/L diluídos em meio M4, porém um com solução de ZnO puro e outro com ZnO funcionalizado. Trabalhou-se com as seguintes diluições para ambos os testes: 0,98 mg/L (0,098%); 0,65 mg/L (0,065%); 0,44 mg/L, (0,044%) e 0,29 mg/L (0,029%). Estas concentrações foram estabelecidas baseadas nos resultados dos ensaios agudos. O controle negativo foi o próprio meio de cultura M4 e controle positivo foi a solução de 1 g/L diluído em M4 com uma concentração de 0,098% de 1g/L de controle positivo 2.

4.4.6 Teste Agudo com *A. fischeri*

O teste de toxicidade aguda realizado com a bactéria marinha luminescente *A. fischeri* foi baseado na NBR 15.411-3 (ABNT, 2006). O equipamento utilizado foi o Microtox® 500. Trata-se de um luminômetro capaz de medir a luminescência emitida pelas bactérias.

O ensaio consiste na exposição dos microrganismos a 8 diluições da amostra, sendo o máximo de 80%, conforme indicado pelo equipamento. Esta exigência considera as interferências na amostra bruta, pois para a realização do teste a amostra deve possuir algumas características como pH entre 6,5 - 8, ausência de cor e salinidade mínima de 20 g/L. Caso esses parâmetros não estejam em acordo, o ajuste deve ser realizado.

A temperatura do ensaio é controlada pelo próprio equipamento, sendo as séries de diluições mantidas a $15^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e o reagente bacteriano a 3°C . A medição da luminescência é realizada em dois momentos: um antes da exposição da bactéria a amostra e após 15 minutos de exposição. Como resultado determina-se a $CE_{50,15\text{min}}$ e o fator de diluição.

Para a validação do ensaio é realizado um teste de sensibilidade com solução de controle positivo 2 com o lote de bactéria. Os ensaios com as amostras a serem testadas só

podem ser realizados se a sensibilidade do lote estiver na faixa de 2 a 10 mg/L, caso contrário, o lote deve ser descartado.

O teste agudo com a bactéria foi realizado com as soluções NB de ZnO e NB de ZnO@NH₂ nas concentrações de 1g/L controle de referência e controle positivo 1 e os elutriatos com as concentrações 0,5; 1 e 2% de NB de ZnO na argamassa de rejunte pura, controle de referência, controle positivo 1 e NB de ZnO@NH₂ 1% na argamassa de rejunte pura.

4.5 ENSAIOS EM SUPERFÍCIES

Além dos ensaios em bancada, foram realizados dois tipos ensaios em superfícies. Um primeiro tipo de ensaio avaliou o surgimento de bioincrustação em pastilhas de vidro rejuntadas com argamassa com NM. Um segundo tipo de ensaio avaliou o potencial biocida de soluções contendo os NM aplicados através da aspersão destas soluções em superfícies que já apresentavam deterioração por atividade biológica. Este segundo tipo de ensaio se subdividiu em duas etapas onde foram utilizadas superfícies bioincrustadas externas e internas.

Para o primeiro tipo de teste foram aplicadas pastilhas de vidro numa parede interna do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental UFSC. Antes de seu assentamento, a superfície foi limpa com solução de hipoclorito de sódio, deixada secar por dois dias e em seguida limpa com solução de ácido acético.

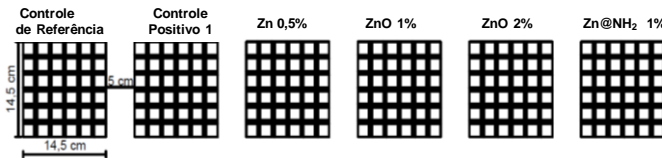
Após dois dias da limpeza completa, as pastilhas foram assentadas na parede com argamassa de assentamento vendida comercialmente. O procedimento de limpeza foi realizado, pois a aderência das pastilhas à superfície é prejudicada se esta apresentar algum sinal de bioatividade.

Uma semana após o assentamento as pastilhas (Figura 12) foram rejuntadas com diferentes composições de argamassa com NM sendo elas: rejunte com adição de 0,5, 1 e 2% de NB de ZnO, rejunte com adição 1% de NB de ZnO@NH₂, além dos controles (controle de referência e controle positivo 1). O monitoramento deste ensaio foi de 203 dias.

A umidade é um dos parâmetros limitantes para a bioincrustação. Por isso, após a secagem do rejunte, as pastilhas de vidro foram diariamente umedecidas com água da torneira por meio de um borrifador.

A disposição das pastilhas na superfície, bem como a porcentagem de NM adicionado a composição da argamassa estão identificados na Figura 11.

Figura 11- Disposição das pastilhas na superfície para o ensaio de diferentes concentrações de NM adicionados ao controle de referência. Sendo: Controle de referência, controle positivo 1, ZnO 0,5%, 1% e 2% de adição de NB de ZnO a argamassa e ZnO@NH₂ 1% - argamassa com adição de 1% de NB de ZnO@NH₂.



Fonte: A autora.

Figura 12 – Assentamento das pastilhas de vidro para posterior rejuntamento com diferentes composições de argamassa e NM.



Fonte: A autora.

O segundo tipo de ensaio em superfícies, onde soluções de NM foram aplicadas em superfícies bioincrustadas foi subdividido em duas etapas. Para tal análise optou-se numa primeira etapa por uma superfície externa (chão), (Figura 13), suscetível às intempéries do tempo, e uma segunda etapa numa parede interna (Figura 14), sem sofrer qualquer interferência das condições externas de intempéries.

Figura 13 - Superfície externa escolhida para a aspersão das soluções.



Fonte: A autora.

Figura 14 - Superfície interna escolhida para o ensaio.



Fonte: A autora.

Durante sete dias foram borrifadas soluções de NB de ZnO e NB de ZnO@NH₂ em regiões delimitadas na área de

estudo. Para a região externa foram empregadas soluções com concentração fixa de 1g/L de NB de ZnO, NB de ZnO@NH₂, controle positivo 1 e 2. Para a área interna foram empregadas soluções de NB de ZnO nas concentrações de 0,5, 1 e 2 g/L e de NB de ZnO@NH₂ na concentração de 1 g/L, além dos controles de referência controle positivo 1.

A avaliação da atividade biocida e capacidade de impedir a bioincrustação em todos os ensaios em superfícies foi acompanhada através de registros fotográficos.

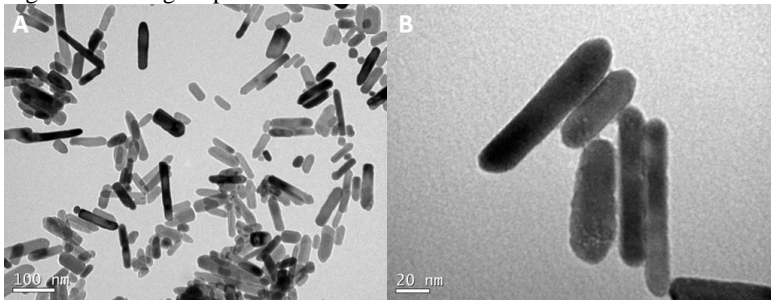
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO NM

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens de MET confirmaram a morfologia alongada do tipo 2D dos NB de ZnO com diâmetros entre 30 e 40 nm e comprimentos variados. Como é possível visualizar na Figura 15, os NB apresentaram poucos domínios aglomerados, disponibilizando elevada área superficial.

Figura 15 - Imagem por MET dos NB de ZnO.

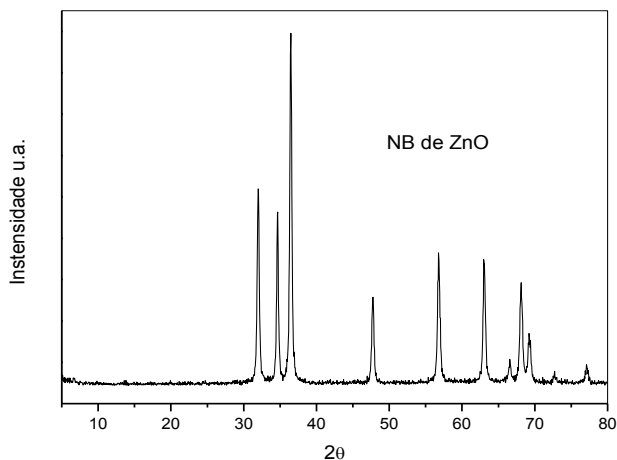


Fonte: Banco de dados LABTOX.

5.1.2 Difração de Raio – X

O difratograma obtido com a análise de DRX (Figura 16) mostrou os picos característicos do ZnO indicando a pureza da fase cristalina dos NB de ZnO sintetizados. A estrutura cristalina hexagonal do NB foi identificada conforme cartão do banco de dados internacional (JCPDS N° 36-1451).

Figura 16 - Difratoograma de Raio-X do NB de ZnO.



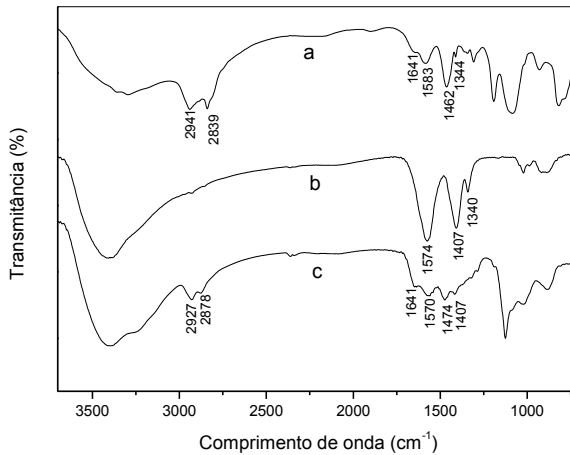
Fonte: Banco de dados LABTOX.

5.1.3 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

A funcionalização dos NB de ZnO foi confirmada pelo aparecimento de algumas bandas dos grupos funcionais específicos no FTIR. O espectro de FTIR dos NB de ZnO@NH₂ (Figura 17c) apresentou as bandas características da @NH₂ e dos NB de ZnO mostradas na Figura 17 a e b, respectivamente. As principais bandas de absorção que caracterizam a funcionalização aparecem em 2927 cm⁻¹ e 2878 cm⁻¹ e são atribuídas aos estiramentos vibracionais assimétricos e simétricos do CH₂ alifático, respectivamente, e também a banda em 1462 cm⁻¹ oriunda da vibração da deformação angular simétrica de CH₂. A presença dos CH₂ nos NB de ZnO é um indício forte de que a @NH₂ está ancorada na superfície da estrutura do ZnO, pois o ZnO não contém carbono em sua estrutura. As outras bandas que caracterizam a presença do grupo amina estão localizadas em 1641 cm⁻¹ e 1570 cm⁻¹ e são atribuídas às vibrações das

deformações angulares simétricas no plano de N-H de amina primária. (YANG et al., 2011). Isso indica que a funcionalização se dá pelo lado da molécula silano e não pelo lado amina.

Figura 17 - Espectros de FTIR a) @NH₂, b) NB de ZnO e c) NB de ZnO@NH₂.



Fonte: Banco de dados LABTOX.

5.2 TESTES TOXICOLÓGICOS

5.2.1 Teste Agudo com *D. magna*

Os resultados obtidos pelos ensaios de toxicidade aguda podem ser observados nas Tabelas 1 e 2. Avaliando os resultados de toxicidade aguda com *D. magna*, podemos verificar que os NM puros testados apresentaram alta toxicidade. O NB de ZnO e o NB de ZnO@NH₂, apresentaram CE_{50, 48h} de 2,9 e 2,0 mg/L, respectivamente. Estes NM apresentaram toxicidade superior ao controle positivo 2 do teste (ZnSO₄, CE_{50, 48h} de 8 mg/L).

Outros estudos já reportaram na literatura a toxicidade de NP de ZnO. Skjlding et al. (2014) encontraram uma $CE_{50,48h}$ de 1,9 mg/L para o microcrustáceo *D. magna* para as NP de ZnO com valor próximo ao encontrado nos ensaios toxicológicos realizados nesta pesquisa que foi de 2,9 mg/L. Blinova et al (2010), testando também as mesmas NP encontrou uma $CE_{50, 48h}$ para o mesmo organismos variando entre 1,7 e 9,0 mg/L em águas naturais. Lopes et al. (2014), por sua vez, encontraram valores próximos de 1,41 mg/L de toxicidade para as NP de ZnO. É importante salientar que a variação de toxicidade encontrada no presente estudo quando comparado aos resultados apresentados nas bibliografias citadas pode ser justificada pela diferença estrutural das NP, uma vez que neste estudo foi investigado o NB de ZnO e também pela sensibilidade da cultura dos organismos empregados.

Tabela 1 – Valores de $CE_{50, 48h}$ obtidos nos testes agudos com *D. magna* para soluções em meio ISO. Os ensaios com as soluções que apresentarem pH original fora da faixa recomendada, foram realizados no pH original e em pH ajustado para $7,0 \pm 0,5$.

Solução	pH	CE_{50} (mg/L)	CE_{50} com pH ajustado (mg/L)
Controle de referência	10,7	$5,7 \times 10^2$	$8,2 \times 10^2$
Controle positivo 1	10,9	$3,4 \times 10^2$	$5,1 \times 10^2$
Controle positivo 2	6,6	8,0	-
NB de ZnO	7,2	2,9	-
NB de ZnO@NH ₂	7,5	2,0	-

Fonte: A autora.

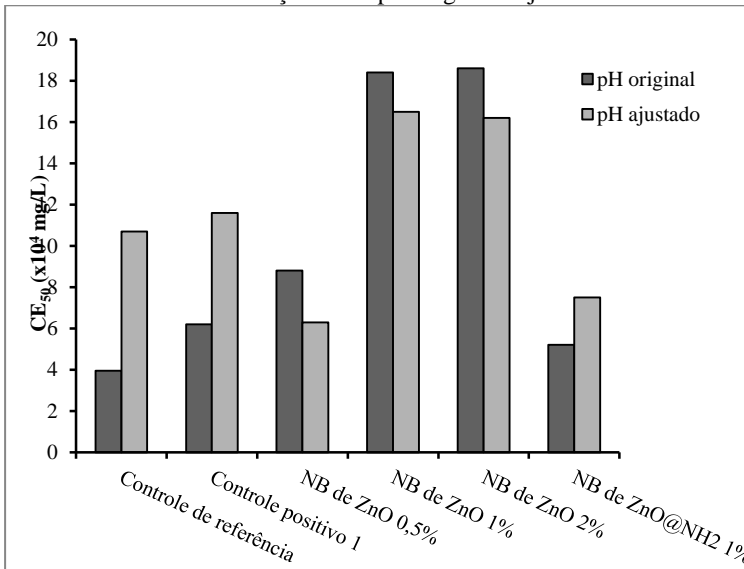
Tabela 2- Resultados dos testes agudo com *D. magna* para os elutriatos preparados em meio ISO. Os ensaios com os elutriatos foram realizados no pH original e em pH ajustado ara $6,0 \pm 0,2$.

Elutriato	pH	CE₅₀ (mg/L)	CE₅₀ com pH ajustado (mg/L)
Controle de referência	11,6	$3,95 \times 10^4$	$10,7 \times 10^4$
Controle positivo1	11,7	$6,2 \times 10^4$	$11,6 \times 10^4$
NB de ZnO 0,5%	11,1	$8,8 \times 10^4$	$6,3 \times 10^4$
NB de ZnO 1%	10,9	$18,4 \times 10^4$	$16,5 \times 10^4$
NB de ZnO 2%	9,2	$18,6 \times 10^4$	$16,2 \times 10^4$
NB de ZnO@NH ₂ 1%	10,1	$5,2 \times 10^4$	$7,5 \times 10^4$

Fonte: A autora.

Para avaliar a variação de toxicidade dos elutriatos testados, foi realizada uma comparação dos valores encontrados de CE_{50, 48h} que pode ser visualizada na Figura 18.

Figura 18 - Valores de $CE_{50,48h}$ para os testes agudo com *D. magna* com os elutriatos nas condições com pH original e ajustado.



Fonte: A autora.

Os valores de $CE_{50,48h}$ encontrados para os testes com elutriatos apresentaram toxicidade muito diferente dos ensaios agudo com as soluções de NM. Tanto nas soluções de NM quanto nos elutriatos com pH ajustado que tinham em sua composição apenas argamassas, apresentaram toxicidade menor quando comparadas as mesmas amostras com pH originais. Esse resultado demonstra que parte da toxicidade aguda destas amostras se deve ao elevado pH causado pela presença de argamassa na mistura.

Tran et al. (2013) afirmou que um dos principais agentes físicos inibitórios do crescimento e desenvolvimento dos organismos é o pH. O ajuste deste parâmetro para a realização dos ensaios de toxicidade aguda com *D. magna* é recomendado pela norma NBR 12.713 (ABNT, 2010) para a faixa de 5,0 a 9,0, para descartar a possibilidade de falsos positivos induzidos apenas pela toxicidade do pH.

A composição que apresentou toxicidade mais próxima ao controle positivo 1 foram as misturas com 0,5% de NB de ZnO e 1% de NB de ZnO@NH₂. Avaliando os resultados dos ensaios de toxicidade dos elutriatos na condição de pH corrigido, é possível verificar que a composição de 0,5% de NB de ZnO e 1% de NB de ZnO@NH₂ adicionadas ao rejunte resultaram em misturas mais tóxicas que o controle positivo 1. Estes resultados contrariam os dados da literatura que afirmam que o aumento da concentração de NM de ZnO aumenta a toxicidade à *D. magna* (SANTO, et al., 2014; ADAMS et al., 2006). Uma hipótese para justificar esse resultado seria que com o aumento da concentração dos NM em solução, aumenta também a tendência da formação de aglomerados, diminuindo assim área superficial ativa dos NM em questão. Entretanto esse comportamento não pode ser confirmado até o momento, e investigações futuras precisam ser conduzidas no sentido explicar os mecanismos que podem estar ocorrendo para o caso dos NB, como por exemplo, estudo de comportamento da dispersão, estabilidade e tamanho das partículas em suspensão com o aumento da concentração.

Os elutriatos oriundos da mistura de argamassa com NB de ZnO apresentaram diminuição da toxicidade com o aumento da porcentagem de NM adicionado, em abas as condições (pH original e ajustado). Pode ser observado ainda que o aumento das porcentagens de NM na mistura com argamassa ocasionam uma diminuição do pH desses elutriatos, aproximando-se da faixa de pH recomendada pela norma.

O meio levemente ácido dos elutriatos favorece a formação de H₂O₂, principal responsável pela ação biocida do ZnO (GHULE et al., 2006). A liberação do H₂O₂ nesta condição pode justificar o aumento da toxicidade quando comparado as CE_{50, 48h} encontradas para as mesmas amostras com pH original (Figura 18). Como já citado no presente estudo, Vicentini et al. (2010) verificaram que mesmo em

meio neutro a formação de H_2O_2 é favorecida, porém, não tão intensa quando tem-se uma condição ácida.

A funcionalização interfere no comportamento no NM influenciando principalmente na sua carga de superfície, solubilidade, formação de aglomerados, estabilidade quando em suspensão e a sua absorção biológica (SKJLDING et al., 2014). Analisando a toxicidade de NP de ZnO pura e com duas diferentes funcionalizações (NP de ZnO, NP de ZnO-OH e NP de ZnO-octila), Skjlding et al. (2014) concluíram que as diferentes funcionalizações garantem biodisponibilidade diferentes ao organismo-teste *D. magna* mesmo a NP sendo a mesma. Assim, o comportamento do NM é fortemente influenciado pela natureza da funcionalização.

Segundo TIAN et al. (2011), a funcionalização de polímeros é muito desejável em aplicações de liberação controlada, favorecendo o melhoramento das propriedades dos polímeros tradicionais. A funcionalização com grupamentos aminas é de grande interesse para a área da medicina. O autor relata que com a adição desse grupamento os fármacos são liberados de forma controlada e seus efeitos colaterais são reduzidos.

Esse comportamento não foi o observado nos resultados dos ensaios toxicológicos do presente estudo. O NB de $ZnO@NH_2$ no elutriato apresentaram os menores valores de $CE_{50, 48h}$ ou seja, a maior toxicidade quando comparado ao NB de ZnO e aos controles positivos. Dessa forma, verificou-se que a funcionalização potencializou a ação biocida do NB de ZnO em até 30%. Essa potencialização do efeito tóxico pode ser explicada pelo efeito “cavalo de Tróia”, devido a presença de grupamentos orgânicos ao redor da estrutura inorgânica. Esses grupamentos orgânicos podem ser mais facilmente reconhecidos e internalizados pelos organismos, potencializando assim o efeito tóxico pela liberação de íons de Zn no interior do organismo (PESSANHA, N., 2013; PERREAULT, et. al., 2012).Entretanto a correção do pH da

amostra de elutriato contendo NB de ZnO@NH₂ ocasionou na redução da toxicidade da amostra. Dessa forma, concluiu-se que a acidificação interfere na ação dos grupos funcionais, reduzindo a biodisponibilidade dos íons Zn²⁺, liberados pelo NB.

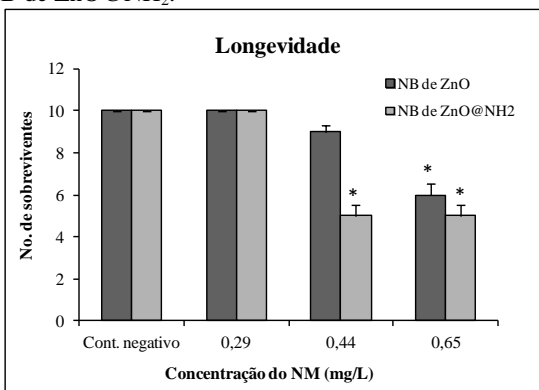
5.2.2 Teste Crônico com *D. magna*

Os filhotes do cultivo de *D. magna* mantido pelo LABTOX que foram empregados nos testes crônicos apresentavam sensibilidade igual a 1,05 mg/L para dicromato de potássio. Estes valores estão dentro da faixa recomendada pela norma (NBR 12.713, 2010). As diluições empregadas no teste crônico foram definidas considerando os resultados obtidos nos ensaios agudos com o mesmo organismo.

Na diluição de 0,98 mg/L, maior concentração testada, houve a mortalidade de todos os organismos exposto em cerca de 10 dias para ambos os NM testados. Dessa forma, não foi possível adquirir dados relativos a toxicidade crônica dessa diluição uma vez que esta apresentou toxicidade subaguda.

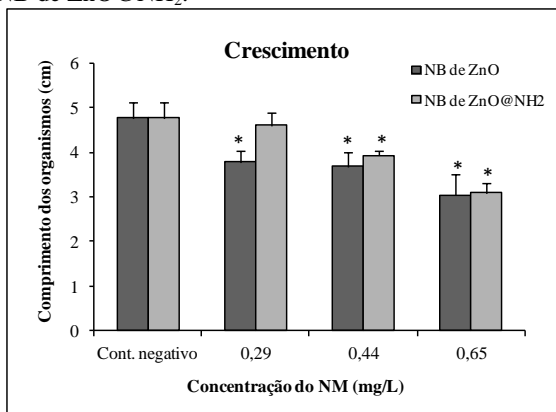
Os resultados obtidos neste ensaio correspondentes aos parâmetros longevidade, crescimento e reprodução estão apresentados nas Figuras 19, 20 e 21 respectivamente.

Figura 19 - Resultado para o parâmetro longevidade para NB de ZnO e NB de ZnO@NH₂.



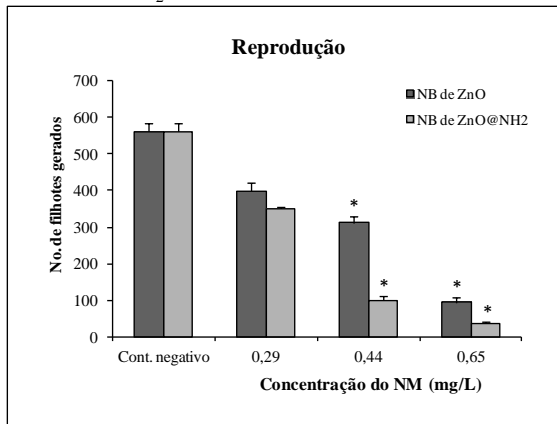
Fonte: A autora.

Figura 20 - Resultado para o parâmetro crescimento para NB de ZnO e NB de ZnO@NH₂.



Fonte: A autora.

Figura 21 - Resultado para o parâmetro reprodução para NB de ZnO e NB de ZnO@NH₂.



Fonte: A autora.

Os parâmetros de CEO e CENO obtidos através da análise estatística do programa estatístico *Dunnnett* são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados de CEO e CENO para os dois ensaios de toxicidade crônica com *D. magna*.

NM	Parâmetro	Longevidade	Crescimento	Reprodução
NB de ZnO	CEO	0,65 mg/L	0,29 mg/L	0,44 mg/L
	CENO	0,44 mg/L	≤ 0,29 mg/L	0,29 mg/L
NB de ZnO@NH ₂	CEO	0,44 mg/L	0,44 mg/L	0,44 mg/L
	CENO	0,29 mg/L	0,29 mg/L	0,29 mg/L

Fonte: A autora.

Com relação ao parâmetro longevidade, os NB de ZnO@NH₂ apresentaram maior toxicidade uma vez que já indicaram efeito na diluição de 0,44 mg/L enquanto que para os NB de ZnO puro o efeito foi observado apenas na menor diluição do teste que foi de 0,65 mg/L. Assim como no controle negativo, na maior diluição do ensaio, não houve

mortalidade dos organismos em nenhuma das amostras testadas.

Para o crescimento, o comprimento médio dos organismos do controle negativo foi equivalente a $4,78 \pm 0,34$ mm. A menor concentração que apresentou efeito nesse parâmetro na solução de NB de ZnO foi $0,29$ mg/L, apresentando um tamanho médio dos organismos de $3,79 \pm 0,23$ mm. Para a solução de NB de ZnO@NH₂, a menor diluição que apresentou efeito nesse parâmetro foi a de $0,44$ mg/L que apresentou um tamanho médio dos organismos de $3,9 \pm 0,09$ mm.

Para o parâmetro reprodução, o programa estatístico *Dunnnett* não considerou a relevância estatística nas quantidades de organismos gerados na concentração de $0,29$ mg/L para ambas as soluções. Quando comparadas ao controle negativo, com um total de $562 \pm 21,24$ organismos, as amostras apresentaram $436 \pm 24,33$ organismos foram gerados no ensaio com a solução de NB de ZnO e $418 \pm 7,69$ organismos para a solução de NB de ZnO@NH₂ na diluição de $0,29$ mg/L. Dessa forma, as duas amostras analisadas apresentaram efeito crônico para o parâmetro reprodução a partir da diluição de $0,44$ mg/L. Lopes et. al. (2014) também realizaram ensaios de toxicidade crônica com NP de ZnO. Como resultado, ela obteve uma CEO foi de $0,125$ mg/L para o parâmetro reprodução. A CENO não foi encontrada nesse estudo.

De modo geral, a solução de NB de ZnO apresentou-se mais tóxica para o parâmetro crescimento enquanto que a solução de NB de ZnO@NH₂ para o parâmetro longevidade. Para o parâmetro reprodução, as duas amostras indicaram toxicidade estatisticamente semelhantes, porém, analisando a Figura 21, os NB de ZnO@NH₂ apresentaram-se mais tóxicos. Com isso, considera-se que os grupamentos amina decorrentes da funcionalização atuam principalmente na longevidade e na reprodução dos organismos expostos.

Foram observadas ainda alterações morfológicas nos organismos expostos aos NM testados. Conforme pode ser

visualizado na Figura 22. Onde na Figura 22A tem-se uma *D. magna* do controle negativo, na Figura 22B um organismos da concentração de 0,44 mg/L de NB ZnO que apresentou encurtamento apical e na Figura 22C um organismo exposto a concentração de 0,65 mg/L de NB ZnO com tamanho reduzido.

Figura 22 - Comparação e destaque da redução do espinho apical de uma *D. magna* do (A) controle negativo e da (B) solução de 0,44 mg/L de NB de ZnO e comparação do tamanho de uma *D. magna* exposta a solução de 0,65 mg/L (2,3 mm) de NB de ZnO (C) com o controle negativo (B).



Fonte: A autora.

5.2.3 Teste Agudo com *A. fischeri*

Foram utilizadas bactérias de dois diferentes lotes sendo eles 13F4067 e 13F4064, que apresentaram médias de sensibilidade de 3,85 mg/L e 3,025 mg/L respectivamente. Esses valores de $CE_{50,15min}$ garantem a confiabilidade dos resultados uma vez que a sensibilidade deve permanecer no intervalo entre 2 e 10 mg/L. Os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda com *A. fischeri* podem ser observados nas Tabela 4 e 5.

Tabela 4 – Valores de $CE_{50, 15\text{min}}$ obtidos nos testes de toxicidade aguda com *A. fischeri* para soluções de NM com pH entre 6,9 – 8,3, em água de osmose.

Solução	$CE_{50,15\text{ min}}$ (mg/L)
Controle de referência	$87,2 \times 10^1$
Controle positivo 1	$54,6 \times 10^1$
Controle positivo 2	2,97
NB de ZnO	50,4
NB de ZnO@NH ₂	9,0

Fonte: a autora.

Tabela 5 - Valores de $CE_{50, 15\text{ min}}$ obtidos nos testes de toxicidade aguda com *A. fischeri* para os elutriatos preparados em água de osmose tendo o pH ajustado para $7,0 \pm 0,2$.

Elutriato	$CE_{50, 15\text{ min}}$ (mg/L)
Controle de referência	$34,2 \times 10^3$
Controle positivo1	$7,7 \times 10^3$
NB de ZnO 0,5%	$38,0 \times 10^3$
NB de ZnO 1%	$68,0 \times 10^3$
NB de ZnO 2%	$165,0 \times 10^3$
NB de ZnO@NH ₂ 1%	$8,5 \times 10^3$

Fonte: A autora.

Tanto para elutriatos quanto para soluções de NM, as amostras que continham NB de ZnO@NH₂ na sua composição apresentaram alta toxicidade comparadas a todas as demais amostras, até mesmo aos controles. Diluído em solução de 1 g/L, o NB de ZnO@NH₂ apresentou potencial toxicológico maior que a própria solução que continha argamassa com propriedades biocidas (controle positivo 1).

Como mencionado anteriormente, parte significativa da ação biocida é o pH. Com a redução do pH da solução controle de referencia e controle positivo 1, antes na faixa de 11 -12 e depois ajustadas para $7 \pm 0,2$, presume-se que sua

toxicidade também tenha sido reduzida, justificando assim os valores baixos encontrados para ambos os controles.

Quanto a tolerância ao pH, as bactérias são classificadas em neutrófilas, acidiófilas e alcalinófilas. A maioria das bactérias são neutrófilas, crescem em faixas de pH entre 5,4 a 8,5 (Holt et al. 1994). Com a redução do pH consequentemente tem-se a redução do potencial toxicológicos das amostras favorecendo assim o desenvolvimento de microrganismos que antes eram impedido pelo caráter básico do meio.

A bactéria *E. coli*, por exemplo, comumente encontrada em bioincrustações em banheiros, possui um pH ótimo de desenvolvimento entre 6,5 e 7,5 (AMABIS & MARTHO, 2002).

Quanto aos elutriatos, o aumento da concentração de NB de ZnO a composição com argamassa resultou numa diminuição da toxicidade, corroborando com os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade agudo com *D. magna*. Mesmo com a maior concentração de NM adicionados as condições de pH não eram as ideais para a liberação de H₂O₂ e Zn²⁺ além disso, deve ser considerado intervenções do sal NaCl adicionados a solução para a realização do ensaio.

Heinlaan et. al. (2008) confirmou em seu estudo o alto potencial tóxico de NP de ZnO para a bactéria *A. fischeri*. O mesmo resultado obtido neste ensaio, porém no presente estudo verificou-se que o efeito tóxico dos NB de ZnO é potencializando com sua funcionalização por meio de grupamentos amina, possivelmente pelo efeito “cavalo de Tróia” de internalização do NB de ZnO@NH₂ como já citado nos ensaios com *D. magna*.

5.2.4 Ensaios em Superfície

5.2.4.1 Superfícies com bioincrustação

Os resultados obtidos após 7 dias de aplicação de soluções de NB de ZnO e NB de ZnO@NH₂ tanto para a

superfície externa quanto para a interna podem ser visualizados nas imagens apresentadas abaixo. Na Figura 23A é apresentada a situação inicial do ensaio e na Figura 23B o resultado obtido após 7 dias de aspersão das soluções indicadas na figura. É possível verificar que ambas as soluções de 1g/L apresentaram o efeito biocida esperado.

Figura 23 - Resultado obtido da aplicação das soluções de NB de ZnO e NB de ZnO@NH₂ na superfície externa (A) antes da aplicação e (B) após 7 dias de aplicação diária.



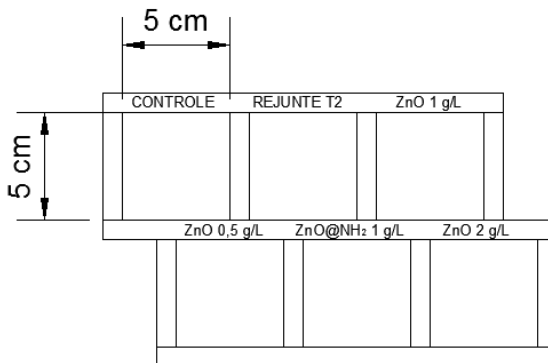
Fonte: A autora.

Além dos efeitos obtidos nas áreas delimitadas para o estudo, o entorno do ensaio realizado na área externa

também apresentou redução de bioincrustação. Isso ocorreu devido, principalmente as ocorrências de chuvas. Durante os 7 dias do ensaio, 4 foram chuvosos. Esse fato também justifica a redução dos organismos na área delimitada para o controle, onde não foram borrifadas soluções. Mesmo assim, é possível verificar a diferença de bioincrustação entre a área delimitada pelo controle e as demais. Contudo, não foi possível identificar visualmente qual dos NM testados foi mais eficiente, apenas que ambos agiram eficazmente como anti-bioincrustantes. Essa comportamento foi observado em ambos os NM e o controle positivo 1, que apresentaram toxicidade equivalentes nos testes agudos com *D. magna*, com valores de $CE_{50, 48h}$ muito próximas.

Para o ensaio realizado na superfície interna, não exposta às condições de intemperismo, optou-se pela seguinte disposição das áreas de aplicação das soluções, conforme esquematizado na Figura 24.

Figura 24 - Disposição das áreas na superfície interna para aplicação das soluções de NB de ZnO e de ZnO@NH₂.



Fonte: A autora.

Os resultados obtidos podem ser visualizados nas imagens da Figura 25. Como é possível visualizar nas imagens o efeito biocida das soluções de NB aplicadas em

superfícies internas também foi comprovado, demonstrando que os NM testados possuem potenciais para serem aplicados como biocidas para combater bioincrustações.

O efeito relativamente menor na superfície interna é justificado pelo menor tempo de permanência das soluções nas áreas delimitadas. Isso se deve ao fato de que no ambiente externo a área delimitada era no chão, e no ambiente interno, uma parede. Dessa forma, o excesso da solução borrifada não permanecia na área, mas escorria, podendo inclusive influenciar em áreas próximas. Entretanto essa condição não alterou o resultado final do teste.

Foi possível verificar que a aplicação da solução de NB de ZnO 0,5 g/L apresentou, visualmente, maior efeito tóxico quando comparado com os demais NM testados. Dessa forma, em situações onde a bioincrustação existe, soluções com a adição do NM testado na concentração de 0,5 mg/L já seria o suficiente para obter-se o efeito biocida desejado. Esse resultado corrobora com os ensaios realizados com os organismos *D. magna* e *A. fischeri*.

Figura 25 - Resultados obtidos da aplicação das soluções de NB de ZnO E NB de ZnO@NH₂ na superfície interna. (A) antes da aplicação e (B) após 7 dias de aplicação diária.



Fonte: A autora.

5.2.4.2 Capacidade de prevenir a bioincrustação

Este ensaio teve como principal objetivo identificar em qual composição de mistura de argamassa e NM seria suficiente para prevenir a proliferação de microrganismos.

Neste ensaio relativo à aplicação de argamassas com percentuais distintos de NM não foi observado crescimento de organismos em nenhuma das amostras testadas, nem no controle. Com este resultado duas hipóteses podem ser levantadas. A primeira seria que o efeito biocida de todas as

argamassas testadas está sendo eficiente no combate a bioincrustação. Essa hipótese pode ser justificada considerando que mesmo a argamassa pura usada como controle de referencia, possui efeito biocida devido seu elevado pH quando em contato com a água (elutriato). Dessa forma, o fator tempo foi limitante, uma vez que argamassa ainda permaneceu com o pH não adequada para o crescimento dos microrganismos.

Uma segunda hipótese que pode ser levantada é a de que as condições do ensaio foram inadequadas para propiciar o crescimento dos microrganismos e formação da bioincrustação. Esta condição seria a temperatura. A *E. coli* por exemplo, tem sua temperatura ótima em torno de 35°C. Através de medições periódicas verificou-se que a temperatura média do ambiente onde o experimento foi conduzido não ultrapassou os 27°C, mesmo nos dias quentes do verão.

Figura 26 - Pastilhas de vidro rejuntadas com diferentes concentrações de NB de ZnO.



Fonte: A autora.

Contudo, nenhuma destas hipóteses pode ser confirmada, não sendo possível chegar às conclusões esperadas com este ensaio até o momento. Assim, o monitoramento desta área será continuado com o objetivo de

verificar se a bioincrustação irá ocorrer e qual dos NM testados será o mais eficiente para preveni-la.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No estudo realizado, a concentração de 0,5% de NB de ZnO apresentou melhor resultado entre as porcentagens testadas de NB puro para os dois organismos testados, bem como a concentração de 0,5 g/L desse NM na argamassa para os ensaios de aspersão de soluções em superfície com a presença de bioincrustação. Esses resultados sugerem que baixas concentrações do NM podem ser suficiente para obter o efeito biocida desejado. Além disso, a funcionalização deste NM pode potencializar o efeito tóxico, e trazer uma vida útil mais longa a esse biocida. Contudo, estudos complementares serão conduzidos para confirmar essa hipótese. Estes estudos deverão avaliar o comportamento da dispersão, estabilidade e tamanho das partículas em suspensão com o aumento da concentração e sua correlação com a toxicidade.

É importante salientar que os resultados obtidos nos ensaios toxicológicos demonstraram a alta toxicidade desse NM, reforçando a problemática relacionada a sua utilização e principalmente ao seu descarte no meio ambiente. Com o objetivo de reduzir essa toxicidade, novas técnicas de funcionalização devem ser propostas para modificar as propriedades do ZnO e reduzir sua facilidade de incorporação pelos organismos num primeiro estágio.

7. CONCLUSÃO

Com os resultados encontrados nesse estudo conclui-se que:

- As amostras de NB de ZnO puro e funcionalizado apresentaram alta toxicidade para os organismos expostos;
- De modo geral, as soluções de NB de ZnO@NH₂ apresentaram maior toxicidade aguda tanto para o microcrustáceo *D. magna* quanto para a bactéria *A. fischeri*;
- O parâmetro pH tem grande influencia na formação e na liberação de H₂O₂ que por sua vez, é o principal agente biocida do ZnO;
- A toxicidade dos elutriados de NB de ZnO e seus respectivos pH diminuíram com o aumento da porcentagem do NB incorporado a argamassa;
- O NM incorporado que mais se aproximou da toxicidade do controle positivo 1 foi o NB de ZnO@NH₂ na proporção de 1% para ambos os organismos testados;
- A funcionalização com a @NH₂ apresentou-se como um intensificador do potencial toxicológico do NB de ZnO;
- No teste crônico, o NB de ZnO puro e NB de ZnO@NH₂ apresentaram toxicidade parecida para reprodução;
- Ainda no teste crônico, o NB de ZnO puro apresentou maior potencial toxicológico para o parâmetro crescimento enquanto que o NB de ZnO@NH₂ apresentou maior potencial toxicológico para o parâmetro longevidade;
- Para ensaios em superfície, o NB de ZnO e o NB de ZnO@NH₂ apresentaram ação biocida

para ambas as superfícies bioincrustadas testadas.

8. RECOMENDAÇÕES

Com base nos ensaios realizados e nos resultados obtidos, a fim de complementar a pesquisa, recomenda-se:

- Investigar se a adição dos NM incorporados à argamassa interfere nas características da mesma, em seu estado puro e aplicado, através de ensaios físicos tais como resistência e módulo de elasticidade;
- Investigar o comportamento dos NM em solução através do estudo da dispersão, estabilidade e tamanho da partícula em suspensão para avaliar o efeito de aglomeração e sua correlação com a toxicidade;
- Investigar a toxicidade dos NM testados em diferentes níveis tróficos através de ensaios de bioacumulação;
- Verificar a ação dos NM para os organismos característicos encontrados em bioincrustações (fungos, bactérias e algas);
- Investigar a toxicidade dos NB de ZnO em nível celular para compreender os mecanismos de ação dos NM;
- Verificar sob quais organismos as soluções contendo ZnO puro e funcionalizado age através de análises

por raspagem da superfície antes e após a aplicação das soluções;

- Realizar o ensaio referente à prevenção a bioincrustação em locais com as condições ambientais favoráveis para o desenvolvimento dos microrganismos;
- Escolher e delimitar novas áreas para aspersão de soluções com diferentes concentrações de NM a fim de evitar que estas influenciem e/ou sejam influenciadas pela aspersão de outras soluções.

9. REFERÊNCIAS

ADAMS, L. K., LYON, D. Y. & ALVAREZ, P. J. **Comparative eco-toxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions.** Water Res, 40, 3527-32, 2006.

AGENCIA BRASILEIRA DE DESENVOLVIMENTO INDUSTRIAL – ABDI. **Cartilha Sobre nanotecnologia.** Unicamp/Funcamp, 2011.

ALLSOPP, D.; SEAL, K. J.; GAYLARDE, C. C. **Introduction to biodeterioration.** Cambridge: Cambridge University Press, 2004.

AMABIS, J. M., MARTHO, G. R. **Fundamentos da biologia moderna.** Editora Moderna, 3 ed. São Paulo, 2002.

ARENZON, A. **Manual sobre toxicologia em efluentes industriais.** Federação das Indústrias do Rio Grande do Sul – FIERGS, 2011.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS: NBR 12.713 – **Ecotoxicologia aquática – Toxicidade aguda – Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera),** 2010.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS: NBR 15.411-3 – **Ecotoxicologia aquática – Determinação do efeito inibitório de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (Ensaio de bacterialuminescente) Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas.** 2006.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - NBR 15469: **Ecotoxicologia aquática: preservação e preparo de amostras.** Rio de Janeiro, 2007.

BELLOTTI, N., ROMAGNOLI, R., QUINTERO, C., DOMINGUEZ-WONG, C., RUIZ, F., DEYA C. **Nanoparticles as antifungal additives for indoor water borne paints.** Progress in Organic Coatings 86, 33-40. Argentina, 2015.

BLINOVA, I., IVASK, A., HEINLAAN, M., MORTIMER, M., KAHRU, A. **Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water.** Environmental Pollution 158, pp 41-47, 2010.

BRILHANTE, O. M., CALDAS, L. Q. A. **Gestão e avaliação de risco em saúde ambiental.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 1999.

CARASEK, H. **Patologia das argamassas de revestimento.** Instituto Brasileiro do Concreto, 2015.

CLARE, J. **Daphnia: Na aquarist's Guide.** Disponível em: <<<http://www.caudata.org/daphnia/>> Acesso em 14/06/2015.

DONALDSON, K., STONE, V., TRAN, C. L., KREYLING, W., BORM, P. J. A. **Nanotoxicology.** Revista Occupational And Environmental Medicine, Vol.61, p.727-728, Reino Unido, 2004.

DROBNE, D. **Nanotoxicology for safe and sustainable nanotechnology.** Arh Hig Rada Toksikol, Ljubljana, Slovenia, p. 471- 478, 2007.

FLOHR, L. **Ensaio toxicológicos com *Daphnia magna* como alternativa para classificação de resíduos sólidos industriais.** Dissertação de Mestrado. Florianópolis, 2007.

FORTUNATO, E. **As Metas da nanotecnologia: Aplicações e implicações.** Centro de Investigação de

Materiais. Departamento de Ciência dos Materiais, Universidade Nova de Lisboa FCT, 2005.

FONSECA, A. J., PINA, F., MACEDO, M. F., LEAL, N., ROMANOWSKA-DESKINS, A., LAIZ, L., GOMES-BOLEA, A., SAIZ-JIMENEZ, C. **Anatase as an alternative application for preventing biodeterioration of mortars: Evoluotion and comparison with other biocides.** International Biodeterioration & Biodegradation 64, 388-396 p. Espanha, 2010.

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 de Mestrado. Florianópolis, 2009.

GHULE, K., GHULE VITHAL, A., CHEN, B-J., LING, Y-C. **Preparation and characterization of ZnO nanoparticles coated paper and its antibacterial activity Study.** Green Chemistry, 8, pp 1034–1041, 2006.

HEINLAAN, M., IVASK, A., BLINOVA, I., DUBOURGUIERM H-C., KAHRU, A. **Toxicity of Nnanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*.** Chemosphere 71, pp 1308 – 1316, 2008.

HOLT, J. G, KRIEG, N.R., SNEATH P.H.A., STALEY, J.T., WILLIAMS, S. T. **Bergey's manual of determinative bacteriology**, 9^o Ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 1994.

HUECK, H. J. **The biodeterioration of materials – an appraisal.** Elsevier Publishing Co. Amsterdam, 1968.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Nanotechnologies - Health and**

safety practices in occupational settings relevant to nanotechnologies. ISO 12885, 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Water Quality Determination of the inhibition of mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera – Crustacea).** ISO 6341, 2012.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004.

KURTH, J. C. **Mitigating biofilm growth through the modification of concrete design and practice.** Master thesis, Georgia Institute of Technology. USA, 2008.

LOPES, C. V. G., CARVALHO, F. J. P. de C., KRIEGER, N. **Biodeterioração – Ataques de microrganismos a monumentos históricos.** Ciência Hoje, 34, número 200, 2003.

MARTINS, M. A., TRINDADE; T. **Os nanomateriais e a descoberta de novos mundos na bancada do químico.** Revista Química Nova, Vol 35, No 7, 1434 – 1446. Portugal, 2012.

MATIAS, W. G. **Introdução a toxicologia.** Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, UFSC, Florianópolis. 2005.

MELO, C. P., PIMENTA, M. **Nanociências e nanotecnologias.** Parcerias Estratégicas, nº 18, p. 9-21, 2004.

MONSERRAT, J. M. **Oxidative stress generation by microcystins in aquatic animals: Why and how.** Environ. Int., 36: 226 – 235, 2010.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. **Os nanomateriais e a questão ambiental.** Revista Química Nova, Campinas, p. 421-430, 2010.

PERES, F. A. S. **Tratamento de águas de resfriamento com peróxido de hidrogênio.** Dissertação de Mestrado. Programa de Pós- Graduação em Ciência dos Materiais e Metalurgia da PUC-Rio. 94 p. 2005.

PERREAULT, F.; OUKARROUM, A.; MELEGARI, S. P.; MATIAS, W. G., POPOVIC, R. **Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*.** Chemosphere 87, 13388 – 1394, 2012.

PESSANHA, N. F. N. **Obtenção e caracterização de nanocompósitos Prata/Argila Organofílica.** Dissertação de mestrado. Rio de Janeiro, 2013.

POOLE, C. P., OWENS, F. J. **Introduction to nanotechnology.** South Carolina: Wiley, John & Sons, 2003.

RAND, G. M.; WELLS, P. G. & MCCARTY, L. S. Introduction to aquatic toxicology. In: RAND, G.M. (ed.). **Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment.** 2nd edition. North Palm Beach, Florida: Taylor e Francis. p. 1.125, 1995.

RANGEL, M. C., FERREIRA, H. S. **Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise.** Revista Química Nova, Vol 32, No 7, p.1860-1870. Bahia, 2009.

LOPES, S. RIBEIRO, F. WOJNAROWICZ, J., LOJIKOWSKI, W., JURKSCHAT, K., CROSSLEY, A., SOARES, A. M. V. M., LOUREIRO, S. **Zinc oxide**

nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*: size – dependent effects and dissolution. Environmental Toxicology and Chemistry, 33. Pp 190 – 198, 2014.

RONCO, A.; BÁEZ, M. C. D.; GRANADOS, Y. P. **Ensayos toxicológicos y métodos de evaluación de calidad de aguas – estandarización, intercalibración, resultados y aplicaciones;** Morales, G. C., Ed.: Centro Internacional de Investigaciones para El Desarrollo: Ottawa, cap. I, 2004.

ROSSETTO, A. L. O. F. **Estudo comparativo entre os efeitos tóxicos agudos e crônicos do óxido de cobre na forma de nanopartícula e micropartícula.** Dissertação de mestrado. Florianópolis, SC, 2012.

RUSSEL, A. D., CHOPRA, I. **Understanding antibacterial action and resistance.** Horwood Ltd, Chichester, 1990.

SANTO, N.; FASCIO, U.; TORRES, F., GUAZZONI, N.; TREMOLADA, P.; BETTINETTI, R.; MANTECCA, P.; BACCHETTA, R. **Toxic effects and ultrastructural damages to *Daphnia magna* of two differently sized ZnO nanoparticles: Does size matter?** Water Research 53, 339-350, 2014.

SKJLDING, L. M., WINTHER-NIELSEN, M., BAUN, A. **Trophic transfer of differently functionalized zinc oxide nanoparticles from crustaceans (*Daphnia magna*) to zebrafish (*Danio rerio*).** Aquatic Toxicology 157, PP 101-108, 2014.

SOUZA, J.S.; ALVES, W.A.; BAVYKIN, D. **Crescimento de nanobastões de ZnO sobre vidro através do método hidrotérmico.** In: VIII Congresso de Microscopia dos Materiais, São Paulo, 2014.

SUMAN, T. Y., RADHIKA RAJASREE, S. R., KIRUBAGARAN, R. **Evaluation of Zinc Oxide nanoparticles toxicity on marine algae *Chlorella vulgaris* through flow cytometric, cytotoxicity and oxidative stress analysis.** *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 113. Pp 23-30. India, 2015.

TIAN, H.; TANG, Z.; ZHUANG, X.; CHEN, X.; JING, X.. **Biodegradable synthetic polymers: Preparation, Functionalization and Biomedical Application.** *Progress in Polymer Science*. doi: 10.1016/j.proppolymsci.2011.06.004, 2011.

TIANO, P. **Biodeterioration of monumental Rocks: Decay mechanism and control methods.** *Science and Technology for Cultural Heritage*. USA, 1998.

TRAN, T. H., GOVIN, A., GUYONNET, R., GROSSEAU, P., LORS, C., DAMIDOT, D., DEVES, O., RUOT, B. **Avrami's law based kinetic modeling of colonization of Mortar Surface by Alga *Klebsormidium flaccidum*.** *International Biodeterioration & Biodegradation* 79, 73-80p. França, 2013.

UMBUZEIRO, G. de A.; ROGRIGUES, P. F. **O teste de toxicidade com bactérias luminescentes e o controle da poluição.** Informativo técnico. Ambiente técnico – CRF/CETESB ano 4 no 007. São Paulo, 2004.

VICENTINI, D. S.; SMANIA, J. A.; LARANJEIRA, M. C. M. **Chitosan/poly (vinyl alcohol) films containing ZnO nanoparticles and plasticizers.** *Materials Science & Engineering. C, Biomimetic Materials, Sensors and Systems*, v. 30, p. 503-508, 2010.

VIDELA, H. A. **Biocorrosão, biofouling e biodeterioração de Materiais.** Ed. Edgard Blucher. São Paulo, 2003.

XIA, T., KOYOCHICH, M., LIONG, M., MADLER, L., GILBERT, B., SHI, H., YE, J. I., ZINK, J. I., NEL, A. E. **Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties.** ACS Nano, 2, pp. 2121–2134, 2008.

YAMAMOTO, O. **Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide.** International Journal of Inorganic Materials 3 643–646, 2001.

YANG, Y., LIU, T. **Fabrication and characterization of graphene oxide/zinc oxide nanorods hybrid.** Applied Surface Science 257, pp 8950 – 8954, 2011.

YU, M-H. **Environmental toxicology: biological and health effects of pollutants.** 2^a ed. CRC Press LLC. Florida, 2005.

ZARBIN, A. J. G. **Química de (nano)materiais.** Revista Química Nova, Vol 30, No 6, p.1469-1479. Paraná, 2007.