

Renata Amanda Gonçalves

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOBASTÕES DE ÓXIDO
DE ZINCO E APLICAÇÃO EM MEMBRANA
NANOCOMPÓSITA DE FILME FINO PARA REMOÇÃO DE
SAIS**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Engenharia Ambiental.
Orientador: Prof. Dr. William Gerson Matias
Coorientadora: Dra. Ana Leticia de O. F. Rossetto

Florianópolis (SC)
2018

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

gonçalves, Renata Amanda

Avaliação toxicológica de nanobastões de óxido de zinco e aplicação em Membrana nanocompósita de filme fino para remoção de sais / Renata Amanda Gonçalves ; orientador, William Gerson Matias, coorientadora, Ana Leticia de Oliveira Franco Rossetto, 2018.
176 p.

tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis, 2018.

inclui referências.

1. Engenharia ambiental. 2. Nanotoxicidade. 3. Nanobastão de óxido de zinco. 4. Nanofiltração. 5. Tratamento de água. I. Matias, William Gerson. II. de Oliveira Franco Rossetto, Ana Leticia. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental. IV. Título.



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



TERMO DE APROVAÇÃO

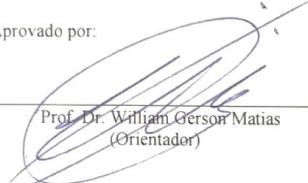
“Avaliação toxicológica de nanobastões de óxido de zinco e aplicação em membrana nanocompósita de filme fino para remoção de sais”

Renata Amanda Gonçalves

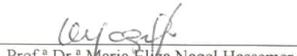
A Tese foi julgada e aprovada pela banca examinadora no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

DOCTORA EM ENGENHARIA AMBIENTAL

Aprovado por:


Prof. Dr. William Gerson Matias
(Orientador)

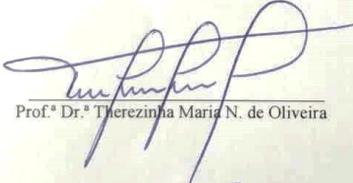

Dr.ª Ana Leticia de Oliveira Franco Rossetto
(Coorientadora)


Prof.ª Dr.ª Maria Eliza Nagel Hassemer


Prof.ª Dr.ª Cristiane Funghetto Fuzinato


Prof.ª Dr.ª Regina de Fátima M. Moreira


Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Mohedano


Prof.ª Dr.ª Therezinha Maria N. de Oliveira


Prof.ª Dr.ª Maria Eliza Nagel Hassemer
(Coordenadora)

FLORIANÓPOLIS, SC – BRASIL
ABRIL/2018

Dedico à minha mãe, Roseli
Josefina Brach Gonçalves (*in
memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Antonio, pelo apoio a e a minha mãe Roseli (*in memoriam*), por continuar sendo minha maior fonte de determinação, força e garra para continuar, sempre. Não tenho palavras para expressar o quanto sou grata.

Ao meu irmão Rafael, pelos muitos chocolates trazidos na reta final desta jornada.

Ao meu marido, Colton, por me fazer ver a vida de um jeito diferente, por me entender e esperar e por todo o apoio dado na reta final desta pesquisa.

Ao meu orientador, professor Dr. William Gerson Matias, pela confiança e oportunidade, pelos conhecimentos repassados e pela orientação para a execução dessa tese.

À minha coorientadora, Dra. Ana Letícia de Oliveira Franco Rossetto, por toda ajuda e conhecimento repassado desde o primeiro dia em que cheguei ao laboratório.

As amigas, Karine Goulart de Oliveira e a Naira Mottim Justino, por toda a ajuda laboratorial, pela cumplicidade e amizade e por tornar esta caminhada mais suave e alegre.

À professora Dra. Therezinha Maria Novais de Oliveira, por sempre acreditar em mim, por toda a ajuda e conselhos concedidos e, principalmente, pela amizade. Serei eternamente grata a Sra. És uma pessoa admirável que sempre será um exemplo para mim.

À toda equipe do LABTOX-UFSC, pelo aprendizado, companheirismo e auxílio em todos os momentos. Deixo um agradecimento especial à Denice S. Vicentini, pela síntese dos NM e todo auxílio na parte química desta pesquisa e aos IC's que trabalharam diretamente comigo: Martina e Maycon, vocês são mara!

Ao professor Dr. Pedro J. J. Alvarez e à professora Dra. Qilin Li, pela oportunidade e conhecimento repassados. E a toda equipe dos laboratórios do professor Dr. Alvarez e da Dra. Li por todo o auxílio no período em que estive na Rice University.

À Rice University e a todos os seus funcionários, pela oportunidade e pelos belos dias vividos nesta instituição.

A todos os amigos brasileiros que fiz no período sanduíche em que estive na Rice University, pela amizade, descontração e sorrisos. Por tornar a vida fora do país mais brasileira e mais confortável. Agradeço em especial a minha

amiga Ana Paula Pereira Alves, minha eterna roommie, pela amizade e companheirismo incondicional, sou imensamente grata pela sua amizade!

As amigas, Tamila Kleine, Paula Eduarda Corrêa, Paula Teixeira Quinaud e Soraia Carolina de Mello, por todos os momentos de descontração e sorrisos.

Aos amigos, Rafael Steuernagel e João Henrique Macedo Sá, por toda ajuda incondicional ao longo destes 4 anos, sou imensamente grata!

À Silvia Pedroso Melegari do Centro de Estudos do Mar da Universidade Federal do Paraná.

À professora Dra. Luciane Ouriques, e ao Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV) do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Laboratório de Materiais Elétricos (LAMATE) do Departamento de Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina

Ao Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) e ao Laboratório de Materiais Vitrocerâmicos (VITROCER) do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Catarina.

À Central de Análises do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e ao Pesquisador Dr. Celso Barbosa de Sant'Anna Filho coordenador do Laboratório de Microscopia da Diretoria de Metrologia Aplicada às Ciências da Vida, Unidade Xerém-RJ.

Ao professor Silvio Marques Zanata do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná, pela doação das células N2A.

Aos professores e ao Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo fomento à pesquisa através da bolsa de estudos.

Todas as vitórias ocultam uma abdicação.
(Simone de Beauvoir)

RESUMO

Os nanomateriais vem sendo amplamente utilizados na composição de diversos produtos de uso industrial e pessoal. Assim, eles podem se tornar contaminantes dos compartimentos ambientais. A poluição aquática é uma problemática constante e o fornecimento de água potável para suprir as necessidades da população é um dos maiores desafios da atualidade. Portanto, há a necessidade do desenvolvimento de mecanismos eficientes para a remoção dos poluentes da água. Entre os processos existentes, as membranas de nanofiltração com incorporação de nanomateriais tem se mostrado uma boa alternativa aos processos de tratamento de água. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar a toxicidade de nanobastões de óxido de zinco puros e amino-funcionalizados, para o microcrustáceo de água doce *Daphnia magna*, para a bactéria marinha bioluminescente *Aliivibrio fischeri* e para as células de neuroblastomas de rato N2A; bem como, desenvolver, caracterizar e avaliar o processo de filtração e a toxicidade de membranas nanocompósitas de filme fino de poliamida com diferentes concentrações de nanobastões de óxidos de zinco amino-funcionalizados. De modo geral, a metodologia foi realizada em quatro etapas, sendo elas: a caracterização dos nanomateriais, a avaliação da toxicidade dos nanomateriais, o desenvolvimento, caracterização e avaliação das membranas poliméricas e a avaliação da toxicidade das membranas. Em relação aos resultados dos testes toxicológicos dos nanobastões, para as *D. magna* houve efeito agudo, indução da geração de espécies reativas de oxigênio, efeito crônico sobre o crescimento, a longevidade e a reprodução, além de efeitos crônicos nas gerações de daphnias não expostas aos nanobastões. Para *A. fischeri* foi observado a redução da bioluminescência. Para as células N2A ocorreu a redução da viabilidade celular, a indução de espécies reativas de oxigênio e o aumento nos níveis de lipoperoxidação. Em relação as membranas poliméricas, estas apresentaram morfologia específica de membranas de filme fino de poliamida, apresentaram caráter hidrofílico apesar de ocorrer o aumento do ângulo de contato e redução da permeabilidade hidráulica conforme o aumento da concentração do nanomaterial. Para os ensaios de rejeição de sais, as membranas apresentaram melhor

retenção de NaCl do que MgCl₂. Ocorreu a liberação de íons Zn das membranas, contudo, a quantidade de íons liberada não foi suficiente para causar efeitos agudos em *D. magna*.

Palavras-chave: nanotoxicidade, nanobastão, óxido de zinco, teste multigeracional, membrana nanocompósita de filme fino, nanofiltração, tratamento de água.

ABSTRACT

Nanomaterials have been used on the composition of several products for industrial use and personal care. In this way, they become potential pollutants of the environment. The water pollution is a constant concern and to provide drinking water to supply the world's population is one of today's greatest challenges. Therefore, there is a need to develop efficient water treatment mechanisms. Among the existing process, nanofiltration membranes incorporating nanomaterials sounds a good alternative for the water treatment. Thus, this study aimed to evaluate the toxicity of pure and amino-functionalized zinc oxide nanorods to the freshwater microcrustacean *Daphnia magna*, to the bioluminescent marine bacteria *Aliivibrio fischeri* and to the rat neuroblastoma N2A cells. As well as preparing, characterizing and evaluating the filtration process and the toxicity of thin film nanocomposite membranes with different concentrations of amino-functionalized zinc oxide nanorods. This work was carried out in four stages: the characterization of nanorods, the evaluation of their toxicity, the use of the nanorods in the polymeric membrane and the evaluation of membrane toxicity. Regarding to the results of toxicity test of both nanorods with *D. magna*, there were acute effects, induction of reactive oxygen species generation, chronic effects on growth, longevity and reproduction of the organisms, as well as causing chronic effects in future generation of the daphnids. Reduction of the bioluminescence emission was observed for *A. fischeri*. For N2A cells, there were the reduction of cell viability, the induction of reactive oxygen species generation and alteration in lipoperoxidation levels. Regarding to the membranes, the prepared membranes presented specific morphology of polyamide thin film membranes, presented a hydrophilic character, despite the increase of the contact angle and reduction of the hydraulic permeability as the nanomaterial concentration increased. For the salt rejection assays, the membranes showed better NaCl retention than MgCl₂. The release of Zn ions from the membranes occurred, however, the amount released was not sufficient to cause acute effects on *D. magna*.

Key-words: nanotoxicity, nanorod, zinc oxide, multigenerational

test, nanocomposite thin film polyamide membrane, nanofiltration, water treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema ilustrativo da filtração tipo <i>Cross-flow</i> e <i>Dead-end</i>	48
Figura 2. Estrutura típica de membranas poliméricas nanocompósitas.	51
Figura 3. Estrutura química da unidade repetitiva da PSF.....	56
Figura 4. PA derivada do MPD e TMC via polimerização interfacial. Duas estruturas podem ocorrer, uma parte reticulada (<i>crosslinked</i>) (m) e uma parte linear (n).....	58
Figura 5. Estrutura hexagonal de ZnO indicando os planos de crescimento.	59
Figura 6. Esquema geral do desenvolvimento da pesquisa.....	63
Figura 7. Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado no processo de filtração.....	81
Figura 8. Representação esquemática do sistema de lixiviação.	84
Figura 9. Difractogramas de raios-X de (a) NBZnO e (b) NBZnO@AF.	85
Figura 10. Espectros de FTIR do agente funcionalizante AEAEATPMS, do NBZnO e do NBZnO@AF.....	86
Figura 11. Imagens de MET de NBZnO (a esquerda) e NBZnO@AF (a direita) em todos os meios estudados.....	87
Figura 12. Geração de EROs em <i>D. magna</i> para (a) NBZnO, (b) NBZnO@AF e (c) ZnSO ₄ . As maiores concentrações correspondem aos valores de CE50 _(48h) obtidas nos testes agudos para cada amostra. * = diferente significativamente em comparação ao controle (p < 0,05).	95
Figura 13. Cortes transversais de <i>D. magna</i> do controle e expostas a CE50 _(48h) de NBZnO, NBZnO@AF e ZnSO ₄ por microscopia de luz. As setas pretas indicam as microvilosidades do intestino em condições normais. Setas brancas com bordas pretas indicam as microvilosidades do intestino danificadas. Setas brancas indicam NM no interior do intestino.	97
Figura 14. Cortes transversais do intestino de <i>D. magna</i> do controle e expostas a CE50 _(48h) de NBZnO e NBZnO@AF analisados por MET. MV = microvilosidades; M= mitocôndria. As setas pretas indicam danos nas microvilosidades do intestino. .	98
Figura 15. Micrografias por MEV de <i>D. magna</i> do (a) controle e expostas à CE50 _(48h) de (b) ZnSO ₄ , (c) NBZnO e (d) NBZnO@AF. As imagens referem-se aos filamentos das antenas de <i>D. magna</i> .	

.....	100
Figura 16. Curva de viabilidade celular de células N2A expostas ao NBZnO, ao NBZnO@AF e ao ZnSO ₄	112
Figura 17. Geração de EROs em células N2A expostas ao NBZnO, ao NBZnO@AF e ao ZnSO ₄ . * = diferença significativa em relação ao controle (p < 0,05).....	114
Figura 18. LPO de células N2A expostas ao NBZnO, ao NBZnO@AF e ao ZnSO ₄ . * = diferença significativa em relação ao controle (p < 0,05).....	114
Figura 19. Espectros de FTIR das membranas (a) e detalhe dos de PSF e MC (b). PSF = membrana de PSF pura (suporte). MC = membrana com filme fino de PA sem NB. MF = correspondem as membranas com filme fino de PA com 0,25, 0,5 e 1% de NBZnO@AF.....	116
Figura 20. Imagens de MEV das membranas produzidas. PSF = membrana de PSF pura (suporte). MC = membrana com filme fino de PA sem NB. MF = correspondem as membranas com filme fino de PA com 0,25, 0,5 e 1% de NBZnO@AF. As setas brancas e as barras indicam o filme fino de PA sobre a membrana suporte.....	118
Figura 21. Ângulo de contato das membranas.....	120
Figura 22. Permeabilidade hidráulica das membranas.....	122
Figura 23. Fluxo permeado de (a) NaCl e (b) MgCl ₂ em função da pressão.....	124
Figura 24. Retenção de sais (a) NaCl e (b) MgCl ₂ para MC, MF025, MF050 e MF1. Tempo de filtração = 1 h. Concentração: 2000 mg.L ⁻¹	126
Figura 25. Liberação de íons das membranas após 72 h de lixiviação.....	129

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Toxicidade de diferentes NM utilizando diversos organismos-teste.....	34
Tabela 2. Características das principais EROs formadas <i>in vivo</i>	40
Tabela 3. Toxicidade de NM ZnO a diferentes organismos.	42
Tabela 4. Características dos PSM.....	47
Tabela 5. Membranas poliméricas nanoestruturadas.....	53
Tabela 6. Membranas poliméricas com inserção de NM ZnO em sua composição.....	60
Tabela 7. Condições de cultivo recomendadas para <i>D. magna</i> . 67	
Tabela 8. Reagentes utilizados no preparo das membranas.	78
Tabela 9. Resumo das características físico-químicas de NBZnO e NBZnO@AF. Resultados expressos pela média ± desvio padrão (DP).	89
Tabela 10. Quantificação da fração livre de íons Zn em relação aos valores obtidos de CE50 nos meios estudados.....	91
Tabela 11. Resultados dos testes de toxicidade aguda do NBZnO, NBZnO@AF e ZnSO ₄ utilizando o organismo-teste <i>D. magna</i> (n = 16).	92
Tabela 12. Resultados de toxicidade crônica (F0) para <i>D. magna</i> expostas ao NBZnO, ao NBZnO@AF e ao ZnSO ₄ (n=10).	101
Tabela 13. Resultados dos testes de sensibilidade de F1 e F12 utilizando como substância de referência o K ₂ Cr ₂ O ₇	105
Tabela 14. Resultado do teste crônico de recuperação para o controle, o NBZnO, o NBZnO@AF e o ZnSO ₄ após 21 dias de exposição. Organismos cultivados apenas em M4. NO = dados não obtidos. * = diferente significativamente em relação ao controle.....	107
Tabela 15. Número total de filhotes do teste crônico de recuperação após 21 dias de teste. NO = dados não observados.	108
Tabela 16. Resultados dos testes de toxicidade aguda com NBZnO, NBZnO@AF e ZnSO ₄ para <i>A. fischeri</i> (n = 6). Resultados expressos em CE50 _(15 min)	110
Tabela 17. Resultados dos testes de toxicidade aguda com <i>D. magna</i> utilizando a água de lixiviação das membranas. Parâmetro = mortalidade. Tempo de teste = 48 h. n = 10.	130

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AC – Ângulo de contato
AS – Área superficial
CE₅₀ – Concentração efetiva que causa imobilidade em 50% da população exposta
CEO – Concentração de efeito observado
CENO – Concentração de efeito não observado
DH – Diâmetro hidrodinâmico
DRX – Difração de Raios-X
EDX - Espectroscopia de raios-X de energia dispersiva
EROS – Espécies reativas de oxigênio
FAAS – Absorção atômica com chama
FD – Fator de diluição
FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
F0 – Geração de *D. magna* que iniciaram o teste crônico
F1 – Filhotes da primeira ninhada de *D. magna*, utilizados no teste crônico de recuperação.
F12 - Filhotes da 12^a ninhada de *D. magna*, utilizados no teste crônico de recuperação.
IF – Inversão de fases
LPO – Lipoperoxidação
MC – Membrana controle composta de PSFPA
MDA – Malondialdeído
MET – Microscopia de transmissão eletrônica
MEV – Microscopia eletrônica de varredura
MEV-FEG – Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo
MF025 – Membrana nanocompósita de filme fino com incorporação 0,25% de NBZnO@AF
MF050 – Membrana nanocompósita de filme fino com incorporação 0,50% de NBZnO@AF
MF1 – Membrana nanocompósita de filme fino com incorporação 1% de NBZnO@AF
MPD – m-fenilenodiamina
MTT – [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio]
MF – Microfiltração
N2A – Célula de neuroblastoma de rato
NB – Nanobastão
NBZnO – Nanobastão de óxido de zinco

NBZnO@AF – Nanobastão de óxido de zinco amino-funcionalizado
NF – Nanofiltração
NM – Nanomaterial ou nanomateriais
NP – Nanopartícula ou nanopartículas
NT – Nanotecnologia
OR – Osmose reversa
QTS – Quitosana
PA – Poliamida
PE – Polietersulfona
PEI – Polietierimida
PI – Polimerização interfacial
PP – Polipropileno
PSF – Polisufona
PSM – Processo de separação por membranas
PVDF – Fluoreto de polivinilideno
 P_m – Permeabilidade hidráulica
 $P\zeta$ – Potencial zeta
TMC – Cloreto de trimesol
UP – Água ultrapura
UF – Ultrafiltração

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 JUSTIFICATIVA	27
1.2 HIPÓTESES.....	29
1.3 OBJETIVOS.....	30
1.3.1 Objetivo geral	30
1.3.2 Objetivos específicos	30
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	33
2.1 TOXICOLOGIA AMBIENTAL E NANOTOXICOLOGIA ...	33
2.1.1 Testes de toxicidade aguda	36
2.1.2 Teste de toxicidade crônica	36
2.1.3 Testes de toxicidade <i>in vitro</i>	38
2.1.4 Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	39
2.1.5 Toxicidade de nanomateriais de ZnO	41
2.2 ORGANISMOS TESTES	43
2.2.1 <i>Daphnia magna</i>	43
2.2.2 <i>Aliivibrio fischeri</i>	44
2.2.3 Células Neuro 2A.....	45
2.3 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS (PSM).....	46
2.3.1 Nanofiltração (NF)	49
2.3.2 Membranas poliméricas nanocompósitas	50
2.3.3 Membrana nanocompósita de filme fino (<i>Thin-film nanocomposite membrane - TFM</i>).....	52
2.3.4 Processo de preparo de membranas.....	54
2.4 CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DOS MATERIAIS UTILIZADOS NA PESQUISA.....	55
2.4.1 Polissulfona (PSF).....	55
2.4.2 Poliamida (PA)	56
2.4.3 Óxido de Zinco (ZnO).....	58
3 MATERIAIS E MÉTODOS	63
3.1 SÍNTESE DOS NANOBASTÕES	64
3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOBASTÕES	64
3.2.1 Difração de raios-X (DRX)	65
3.2.2 Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	65
3.2.3 Área superficial (AS).....	65
3.2.4 Potencial zeta (Pz) e Diâmetro hidrodinâmico (DH)	66

3.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	66
3.3. TESTES DE TOXICIDADE COM <i>Daphnia magna</i>	66
3.3.1 Cultivo de <i>Daphnia magna</i>	66
3.3.2 Toxicidade aguda	67
3.3.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs)	68
3.3.4 Toxicidade crônica (F0)	69
3.3.5 Teste crônico de recuperação de F1 e F12	70
3.4 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DE <i>Daphnia magna</i>	71
3.4.1 Procedimentos para microscopia de luz	71
3.4.2 Procedimentos para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	72
3.4.3 Procedimentos para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	72
3.5 TESTES DE TOXICIDADE COM <i>Aliivibrio fischeri</i>	73
3.6 CITOTOXICIDADE COM N2A	74
3.6.1 Cultura Celular	74
3.6.2 Teste de atividade mitocondrial (MTT)	74
3.6.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs)	75
3.6.4 Lipoperoxidação (MDA)	76
3.7 QUANTIFICAÇÃO IÔNICA NOS MEIOS-TESTE	77
3.8 PREPARO DAS MEMBRANAS	77
3.8.1 Preparo da membrana suporte de PSF	78
3.8.2 Polimerização do filme fino de PA sobre a membrana suporte	79
3.9 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	80
3.9.1 Espessura	80
3.9.2 Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (MEV-FEG)	80
3.9.3 Ângulo de contato (AC)	80
3.9.4 Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	81
3.10 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE FILTRAÇÃO	81
3.10.1 Compactação	82
3.10.2 Permeabilidade hidráulica (Pm)	82
3.10.3 Fluxo do permeado	82
3.10.4 Eficiência de retenção	83
3.10.5 Liberação de íons da membrana	83
3.10.6 Teste de toxicidade com a água de lixiviação das membranas	84
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	85

4.1	CARACTERIZAÇÃO DOS NANOBASTÕES	85
4.1.1	Difração de raios-X (DRX)	85
4.1.2	Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	86
4.1.3	Microscopia eletrônica de transmissão (MET)	87
4.1.4	Área superficial (AS).....	88
4.1.5	Potencial zeta (Pz) e Diâmetro hidrodinâmico (DH)	89
4.1.6	Quantificação iônica	90
4.2	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS NANOBASTÕES ...	92
4.2.1	Toxicidade aguda com <i>Daphnia magna</i>	92
4.2.2	Espécies reativas de oxigênio (EROs) em <i>Daphnia magna</i>	94
4.2.3	Análise microscópica de <i>Daphnia magna</i>	96
4.2.4	Toxicidade crônica com <i>Daphnia magna</i>	100
4.2.5	Teste crônico de recuperação de F1 e F12	104
4.2.6	Toxicidade aguda com <i>Aliivibrio fischeri</i>	109
4.2.7	Citotoxicidade em N2A: Viabilidade celular, determinação da CE50 _(24h) , EROs e LPO	112
4.3	MEMBRANAS: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO	115
4.3.1	Espessura	115
4.3.2	Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)	116
4.3.3	Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (MEV-FEG)	117
4.3.4	Ângulo de contato (AC)	120
4.3.5	Compactação.....	121
4.3.6	Permeabilidade hidráulica (Pm)	122
4.3.7	Fluxo de permeado	123
4.3.8	Retenção de sais	126
4.3.9	Liberação de íons Zn das membranas.....	128
4.3.10	Teste de toxicidade com as membranas.....	129
5.	CONCLUSÕES	133
6.	RECOMENDAÇÕES.....	137
7.	REFERÊNCIAS.....	139
8.	APÊNDICES.....	163
A1	CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO MDA	163
A2	CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, MÉTODO BRADFORD (1976)	164
A3	ESPECTROS DE EDX DAS MEMBRANAS DE PSF,	

MF025, MF050 E MF1	166
9. ANEXO.....	167
A1 CARTA CONTROLE UTILIZANDO DICROMATO DE POTÁSSIO COMO SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA PARA O ORGANISMO <i>D. magna</i>	167
A2 ARTIGO PUBLICADO.....	168

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia (NT) é considerada um dos ramos da ciência que mais se desenvolve atualmente devido a sua vasta aplicabilidade e multidisciplinaridade (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010). Atualmente mais de 1300 produtos utilizam alguma forma de nanomaterial (NM) em sua composição (EPA, 2017), incluindo cosméticos, fármacos, equipamentos médicos, tintas, agroquímicos, membranas de filtração, entre outros.

De acordo com a Comissão Europeia, a produção global de nanomateriais (NM) é de aproximadamente 11,5 milhões de toneladas. Estima-se que o atual mercado global de NM seja de 300.000 até 1,6 milhão de toneladas (FUTURE MARKET INC, 2017).

A ampla produção e utilização dos NM desperta a discussão sobre os potenciais riscos toxicológicos destes materiais aos seres vivos e ao meio ambiente (SELCK et al., 2016). Assim, surge a nanotoxicologia, que é o ramo da ciência que estuda os efeitos dos NM sobre os seres vivos (ZUCOLOTTI, 2010).

O risco associado aos NM provém de suas características específicas. Na escala nanométrica, os materiais apresentam propriedades distintas dos seus equivalentes em escalas maiores, como por exemplo, elevada área superficial e reatividade. Tais propriedades vão interferir também na interação NM-meio e NM-compartimentos biológicos, alterando seu tempo de persistência no meio ambiente, biocompatibilidade e toxicidade (ROSSETTO, 2016; LOPES et al., 2014; SANTO et al., 2014).

Embora os efeitos dos NM, como por exemplo, Ag, TiO₂, SiO₂, Cu, ZnO e Cr₂O₃, sobre os organismos vivos sejam alvo de diversos estudos pela comunidade científica (LALAU et al., 2015; MELEGARI et al., 2013; PERREAULT et al., 2012; PUERARI et al., 2016; ROSSETTO et al., 2014a; VICENTINI et al., 2017), os seus efeitos ainda não são totalmente compreendidos (SELCK et al., 2016). Assim, os esforços para entender, identificar e minimizar o potencial risco dos NM se torna cada vez mais necessário, sobretudo no estágio inicial do processo de inovação e durante todo o ciclo de vida do produto (ROSSETTO, 2016).

Bem como o rápido aumento no desenvolvimento da NT, o

número da população mundial também está em desenvolvimento acelerado. Nos últimos 50 anos, a população passou de 2,5 bilhões no ano de 1950 para 7 bilhões no ano de 2011, havendo a expectativa de atingir 8,9 bilhões de pessoas até o ano de 2050 (UNFPA, 2013). Como consequências, ocorre o aumento no consumo dos recursos naturais, principalmente da água, tanto pela população quanto pelo setor industrial, bem como o aumento da poluição e deterioração dos recursos hídricos (QU; ALVAREZ; LI, 2013).

A poluição aquática é considerada uma das principais preocupações ambientais nas áreas urbanas. Assim, aliada as legislações ambientais já existentes, busca-se cada vez mais o desenvolvimento de tecnologias alternativas para o tratamento da água (ZULARISAM; ISMAIL; SALIM, 2006).

Como tecnologia alternativa aos processos convencionais de tratamento de água, pode-se citar as membranas de filtração. As membranas atuam como uma barreira seletiva na interface entre duas fases (NG et al., 2013) e Ulbricht, (2006) destaca que a possibilidade do baixo custo de operação quando aplica-se baixas pressões e se obtém elevados índices de remoção dos poluentes e a conformidade com as normas ambientais são os principais benefícios que membranas poliméricas têm em relação às tecnologias convencionais.

O desenvolvimento de uma membrana de nanofiltração (NF) com capacidade para reter uma maior quantidade de sais é atrativo pois resultaria em um permeado com qualidade similar a osmose reversa (OR), porém com menor gasto energético devido as menores pressões aplicadas (ULBRICHT, 2006). Um sistema com menor custo torna-se interessante, principalmente quando pensamos que este pode ser utilizado para auxiliar comunidades onde o abastecimento de água é precário, garantindo água de boa qualidade a população (QU; ALVAREZ; LI, 2013).

A incorporação de NM puros ou funcionalizados com diferentes grupos químicos nas membranas poliméricas podem melhorar ainda mais suas propriedades, tais como a permeabilidade, a resistência a incrustação, a estabilidade mecânica e térmica, além de auxílio a degradação de contaminantes e facilidade de limpeza da membrana (BRAME; LI; ALVAREZ, 2011; GHASEAMZADEH et al., 2014).

As membranas de filtração com inserção de NM podem ser empregadas no tratamento de águas que contenham

produtos inorgânicos, águas residuais da indústria têxtil, papel e celulose, pesticidas, óleos e graxas, bem como no tratamento e dessalinização da água, entre outros (GHASEMZADEH et al., 2014).

Muitos tipos de NM vem sendo estudados para melhorar as propriedades das membranas, como por exemplo, SiO₂, nanotubos de carbono, ZnO, Al₂O₃, Ag, ZrO₂, Au, Pd e TiO₂, sendo este último um dos mais estudados (NG et al., 2013).

Dentre os diferentes tipos de NM utilizados, o ZnO vem despertando interesse na aplicação em membranas de filtração devido suas excelentes propriedades óticas, elétricas, mecânicas e químicas, além de ser um material de relativo baixo custo em relação ao TiO₂ e ao Al₂O₃ (NG et al., 2013).

De acordo com o relatório da Future Market, Inc, (2017), a produção global de NM ZnO atingiu 36.000 toneladas no ano de 2014 e as perspectivas são ainda maiores para os próximos anos.

Neste contexto, esta tese de doutorado foi realizada em colaboração entre o Laboratório de Toxicologia Ambiental do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (LABTOX-UFSC), o *Physico-Chemical Treatment Process Lab* e o *Alvarez's Lab* do *Civil and Environmental Engineering Department* da Rice University, Houston, Texas, Estados Unidos da América, com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos tóxicos de nanobastões (NB) de ZnO puros (NBZnO) e amino-funcionalizados (NBZnO@AF) ao microcrustáceo de água doce *Daphnia magna*, à bactéria marinha bioluminescente *Aliivibrio fischeri* e as células de neuroblastomas de rato N2A, bem como desenvolver, caracterizar e avaliar uma membrana polimérica de filme fino incorporando este NM visando a remoção de sais.

1.1 JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento da NT está à frente da avaliação dos seus impactos sobre os seres vivos e ao meio ambiente (ROSSETTO, 2012), fazendo-se assim necessário os constantes estudos sobre a avaliação da toxicidade dos NM e seus possíveis impactos ao meio ambiente.

Apesar da ampla produção de NM ZnO (FUTURE MARKET

INC, 2017), os estudos relacionados ao NM ZnO, em sua maioria, abordam apenas a toxicidade aguda destes NM e são realizados com ZnO na forma de nanopartículas (NP) esféricas (BACCHETTA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2018).

Assim, o estudo crônico de NM ZnO, bem como a avaliação dos possíveis efeitos crônicos sobre diferentes gerações dos organismos-teste e o estudo do NM em diferentes formatos, como NB, se faz necessário, para uma melhor compreensão dos efeitos destes NM sobre os organismos e o meio ambiente.

Os estudos prévios desses efeitos ante sua aplicação em determinado produto, como este trabalho propõe, podem fornecer informações sobre as quantidades de NM que podem ser utilizadas sem fornecer riscos toxicológicos aos organismos e a saúde humana, bem como pode servir de material de auxílio para o desenvolvimento de futuras legislações, específicas sobre os NM.

O desenvolvimento de mecanismos eficientes e economicamente viáveis que permitam a remoção dos poluentes da água se faz cada dia mais necessário, principalmente para a implementação destes sistemas em locais onde a água é escassa e a infraestrutura para o tratamento de água são diversas vezes inexistentes (QU; ALVAREZ; LI, 2013).

Muitas vezes, a utilização de tratamentos de água convencionais não é capaz de remover todos os poluentes da água, sendo limitados pela área superficial, pelos sítios ativos, pela falta de seletividade e pela cinética de adsorção, havendo então a necessidade de métodos mais robustos e o desenvolvimento de membranas com diferentes materiais para serem utilizados na purificação de água (GHASEMZADEH et al., 2014).

Diante disto, o desenvolvimento de novas tecnologias de membranas, entre elas as membranas poliméricas, visam a ampla capacidade de remoção de diferentes sais inorgânicos, utilizando em sua composição NM com diferentes morfologias e baixo custo de produção. A melhora na eficiência de retenção das membranas é de grande importância, pois podem vir a ser mais um produto eficaz para o tratamento de água de abastecimento e de efluentes, contribuindo para a melhoria da qualidade ambiental e da saúde humana.

Em 2009, o LABTOX-UFSC iniciou suas atividades na área de nanotoxicologia quando foi aprovado pela CAPES o projeto de

cooperação internacional intitulado “*Nanotoxicologia: Métodos toxicológicos, genéticos e epigenéticos como uma estratégia para avaliar o risco da exposição humana e ambiental aos nanomateriais*” (PGCI/CAPES nº 017/2010). A partir deste projeto, possibilitou-se a aprovação pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) de uma rede de pesquisas em nanotoxicologia, intitulado “*Rede cooperativa de pesquisas em nanotoxicologia aplicada a nanopartículas de interesse da indústria petrolífera e de tintas*” (Processo CNPq nº. 552112/2011-9) que envolveu instituições nacionais e internacionais.

Os recentes avanços tecnológicos levaram o LABTOX a iniciar pesquisas relacionadas à preparação de membranas poliméricas nanoestruturadas e avaliação do seu potencial toxicológico com a aprovação do projeto “*Nanocompósitos para aplicação em nanofiltração de sais e de metais pesados de águas para abastecimento e efluentes*”, número 473046/2013-0 por meio da Chamada Universal 14/2013 do CNPq. Este projeto, além da formação de recursos humanos em nível de mestrado, doutorado e pós-doutorado e produção de conhecimento por meio da publicação de artigos científicos, visa o desenvolvimento de um produto seguro, economicamente viável e com alta eficiência na remoção de sais mono e bivalentes.

Assim, esta tese se justifica no âmbito científico, legal e social, pois visa garantir um desenvolvimento seguro da NT, baseando-se no estudo toxicológico prévio de NM de ZnO em diferentes níveis tróficos, a fim de compreender os riscos ambientais deste material, para sua posterior possibilidade de aplicação em membranas de filtração de água.

1.2 HIPÓTESES

Considerando o exposto até o momento, as seguintes hipóteses foram formuladas para orientar o desenvolvimento dessa tese:

Hipótese 1: NBZnO e NBZnO@AF podem causar toxicidade aos organismos *Daphnia magna*, *Aliivibrio fischeri* e célula Neuro 2A.

Hipótese 2: Os efeitos tóxicos causados por NBZnO e

NBZnO@AF podem afetar cronicamente futuras gerações de *D. magna* e os parâmetros de ciclo de vida podem ser capazes de detectar estes efeitos.

Hipótese 3: A incorporação de NM no filme fino de poliamida das membranas poliméricas melhoraram suas propriedades, aumentando sua hidrofobicidade a eficiência de retenção de sais, podendo ser aplicadas para nanofiltração ou osmose reversa.

Hipótese 4: O NM incorporado no filme fino polimérico pode lixiviar da membrana, porém a quantidade liberada não é suficiente para causar toxicidade aguda ao organismo *D. magna*.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade de nanobastões de ZnO puro (NBZnO) e amino-funcionalizado (NBZnO@AF) a diferentes organismos-teste, bem como, desenvolver e avaliar o processo de filtração e a toxicidade de membranas nanocompósitas de filme fino de poliamida com diferentes concentrações de NBZnO@AF.

1.3.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização físico-química de NBZnO e NBZnO@AF;
- Determinar a toxicidade aguda e crônica de NBZnO e NBZnO@AF ao microcrustáceo de água doce *Daphnia magna*;
- Avaliar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) pela exposição de NBZnO e NBZnO@AF ao organismo *Daphnia magna*;
- Avaliar o efeito crônico multigeracional de NBZnO e NBZnO@AF ao organismo *Daphnia magna*;
- Determinar a toxicidade de NBZnO e NBZnO@AF à bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*;
- Determinar a citotoxicidade de NBZnO e NBZnO@AF à célula Neuro 2A;

- Desenvolver membranas nanocompósitas de filme fino de poliamida com diferentes concentrações de NBZnO@AF;
- Realizar a caracterização físico-química das membranas;
- Avaliar a eficiência de remoção dos sais NaCl e MgCl₂ pelas membranas;
- Avaliar a lixiviação de íons Zn das membranas;
- Avaliar a toxicidade aguda do lixiviado das membranas utilizando o organismo *Daphnia magna*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 TOXICOLOGIA AMBIENTAL E NANOTOXICOLOGIA

A toxicologia ambiental é a área da ciência que estuda os efeitos adversos causados aos organismos vivos pelas substâncias químicas (naturais ou sintéticas) presentes no ambiente (HODSON, 2010).

Desta forma, a toxicologia ambiental tem como finalidade avaliar a possibilidade de uma substância produzir dano a determinados organismos sob determinadas condições de exposição (HODSON, 2010). Possibilita ainda, proporcionar medidas preventivas, tais como o monitoramento ambiental e biológico e o controle das fontes emittentes de poluição (PASSARELLI, 2003).

Por ser uma ciência ampla, a toxicologia ambiental subdivide-se em áreas conforme a especificidade do estudo requerido (COSTA, 2014). Assim, surge a nanotoxicologia, uma área específica dentro da toxicologia, que visa nortear o desenvolvimento seguro e sustentável da nanotecnologia (ABDI, 2011).

Segundo Zucolotto, (2010) a nanotoxicologia refere-se ao estudo da interação entre NM com sistemas biológicos, compreendendo células e tecidos. Paschoalino; Marcone; Jardim, (2010) sugerem o uso do termo nanoecotoxicologia para estudos que avaliam e/ou determinam os efeitos de NM ao ambiente, demonstrando os caminhos de transferência da substância tóxica, e suas rotas de exposição; e o uso do termo nanotoxicologia para estudos que avaliem a toxicidade de NM e nanodispositivos diretamente em contato com o homem. Porém atualmente usa-se o termo nanotoxicologia para ambos objetivos.

De fato, o aumento na produção e na aplicação dos NM para os diversos fins, despertou a preocupação para os potenciais riscos toxicológicos/ambientais que estes materiais podem causar (SELCK et al., 2016).

As mesmas características que tornam os NM tão atrativos para as diversas aplicações, como formato variado, tamanho reduzido e elevada área superficial, são também responsáveis por causar efeitos nocivos aos organismos (OBERDÖRSTER;

OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER, 2005).

Desta forma, estudos sobre a toxicidade dos NM vêm sendo amplamente realizados com diferentes organismos testes. Os primeiros estudos na área na nanotoxicologia foram publicados na última década do século XX, por Oberdorster et al., (1992) que avaliaram a toxicidade de TiO₂ com diferentes tamanhos (20 e 200 nm) em células pulmonares de ratos.

A Tabela 1 apresenta alguns estudos realizados com NM e seus danos aos organismos expostos.

Tabela 1. Toxicidade de diferentes NM utilizando diversos organismos-teste.

Referência	NM	Organismo	Efeitos observados
Saison et al., (2010)	Core-shell CuO	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Indução do processo de agregação celular; deterioração na clorofila; fotoinibição do fotossistema II
Perreault et al., (2012)	CuO	Célula N2A	Diminuição da viabilidade celular; Indução da fragmentação do DNA; LPO e formação de micronúcleos
Melegari et al., (2013)	CuO	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Inibição celular; aumento de carotenoides; geração de estresse oxidativo
Rossetto et al., (2014a)	CuO/PANI e CuO	<i>D. magna</i> <i>A. fischeri</i>	Toxicidade elevada de CuO quando comparada com CuO/PANI para ambos os organismos. Efeito crônico na reprodução das daphnias
Lalau et al., (2015)	CuO	<i>Landoltia punctata</i>	Alterações morfológicas e nos pigmentos fotossintéticos
El mahdy et al., (2015)	Ag	Ratas albinas	Alterações histopatológicas hepáticas; indução de aberrações cromossômicas nas células da medula óssea
Leung et al., (2015)	CeO ₂	<i>Escherichia coli</i> <i>Skeletonema costatum</i>	Danos na parede celular de ambos os organismos

Tabela 1. Continuação.

Combarros; collado; Díaz, (2016)	TiO ₂	<i>Pseudomonas putida</i>	Absorção do NM; alteração do estado fisiológico das bactérias; inibição total do crescimento em baixas concentrações (0,5 mg.L ⁻¹)
Puerari et al., (2016)	Cr ₂ O ₃	<i>D. magna</i> <i>A. fischeri</i>	Toxicidade aguda em <i>D. magna</i> e <i>A. fischeri</i> . Alterações morfológicas e efeitos crônicos sobre a longevidade, reprodução e crescimento em <i>D. magna</i>
Nasser et al., (2016)	Au	<i>D. magna</i>	NM carregados positivamente muitas ordens de magnitude mais tóxicos que NM negativamente carregados; alteração no padrão de ecdisse das daphnias.
Vicentini et al., (2017)	SiO ₂	<i>D. magna</i> <i>Célula Vero</i>	Materiais com tamanhos menores e/ou funcionalizados foram mais tóxicos; efeitos crônicos sobre a reprodução e crescimento das daphnias
Lv et al., (2017)	C60	<i>D. magna</i>	Redução das taxas de digestão e filtração; deficiência intestinais e inibição da atividade de enzimas digestivas; alteração nos níveis de SOD e LPO
Pitt et al., (2018)	Poliestireno	<i>Danio rerio</i>	O NM foi capaz de atravessar o córion e se acumular em diversos órgãos; ocorrência de bradicardia e hipoatividade
Fan et al., (2018)	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Alteração no padrão do crescimento das raízes; estímulo da fotossíntese e de proteínas relacionadas ao estresse oxidativo
Sarkheil et al., (2018)	ZnO	<i>Artemia franciscana</i>	Toxicidade após 96 h de exposição; acúmulo de NM nos organismos mesmo após período de depuração

2.1.1 Testes de toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda avaliam os efeitos tóxicos e proporcionam respostas rápidas dos organismos a um estímulo que se manifesta, geralmente num intervalo de 0 a 96 horas (esta variação ocorre conforme a espécie utilizada) (RAND; PETROCELLI, 1985). Estes ensaios verificam a manifestação de um efeito em um curto período de tempo após a administração de uma dose única ou repetida de um agente tóxico (OGA, 2003).

De maneira geral, são os primeiros testes realizados quando não há informações toxicológicas básicas sobre determinada substância (AZEVEDO; CHASIN, 2003). Neste tipo de teste os parâmetros avaliados são a mortalidade e/ou comportamento adverso dos espécimes, visto que são facilmente determinados. Apesar da aparente simplicidade, esses critérios são utilizados por possuírem elevado significado biológico e ecológico para o ambiente (ARAGÃO; ARAÚJO, 2008).

Por meio da realização de testes de toxicidade aguda é possível estabelecer uma relação entre a dose/concentração administrada e a intensidade de efeitos adversos observados. É possível assim estabelecer uma comparação da toxicidade de uma substância com outras substâncias na qual a toxicidade é conhecida e determinar as concentrações letais média (CL_{50}) e efetivas média (CE_{50}). Geralmente os valores de CL_{50} e CE_{50} são expressos a 50% dos organismos expostos ao agente intoxicante, pois estas respostas são mais reprodutíveis. Estes resultados podem ser estimados com maior grau de confiabilidade e são mais significativas para serem extrapoladas para uma população (MATIAS, 2009; ZAGATTO; BERTOLETTI, 2008).

Estes testes são úteis, pois fornecem informações básicas para estudos mais criteriosos como os testes de toxicidade crônica e avaliação de risco ecotoxicológico (COSTA et al., 2008).

2.1.2 Teste de toxicidade crônica

Os testes de toxicidade crônica caracterizam-se por submeterem os organismos a concentrações subletais de

determinadas substâncias químicas e/ou misturas complexas por um longo período de tempo, que pode corresponder a todo o seu ciclo de vida ou no mínimo 10% dele (GHERARDI, 1990).

Este tipo de teste permite avaliar os possíveis efeitos tóxicos das substâncias em concentrações que permitam a sobrevivência dos organismos, mas são capazes de afetar suas funções fisiológicas e/ou comportamentais em função do longo tempo de exposição, tais como reprodução, desenvolvimento de ovos, crescimento e maturação, entre outras (ARAGÃO; ARAÚJO, 2008; GHERARDI, 1990).

Os resultados obtidos nos testes crônicos são geralmente expressos como concentração de efeito não observável (CENO) que corresponde a maior concentração da amostra que não causa efeito sobre os organismos expostos e concentração de efeito observável (CEO) que corresponde a menor concentração da amostra que causa efeito sobre os organismos expostos (COSTA et al., 2008; MATIAS, 2009).

Os valores de CEO e CENO permitem estabelecer as concentrações máximas e mínimas das substâncias necessárias para que ocorram efeitos crônicos. Para a realização deste tipo de teste são necessários no mínimo dois níveis de doses ou concentrações sendo que a via de administração deve estar de acordo com a via de exposição mais provável (AZEVEDO; CHASIN, 2003).

Dentro dos testes de toxicidade crônica, com os avanços nas pesquisas pela comunidade científica, surgiram os testes crônicos que avaliam não apenas os efeitos sobre os organismos que iniciaram o teste (F0), como também avaliam cronicamente os filhotes desses organismos, dando origem aos chamados testes multigeracionais (ARNDT et al., 2014).

Assim como nos testes crônicos tradicionais, pode-se utilizar como ferramentas de identificação de toxicidade, os parâmetros de ciclo de vida dos organismos-teste (GONÇALVES et al., 2018; MUYSSSEN; JANSSEN, 2001).

Os testes multigeracionais são versáteis e a forma como serão realizados irá depender dos objetivos do estudo em questão (ARNDT et al., 2014; BACCHETTA et al., 2017; GONÇALVES et al., 2018). Por exemplo, Arndt et al., (2014) investigaram a resposta multigeracional das futuras gerações de *D. magna* após a exposição parental (F0) à NM de carbono com estrutura e modificações superficiais diversas. Já Muysen;

Janssen, (2001) estudaram a habilidade de aclimação de *D. magna* a diferentes concentrações de Zn, expondo as Daphnias ao Zn por cinco gerações consecutivas.

Desta forma, os testes multigeracionais apresentam-se com uma ferramenta importante para melhor compreensão dos efeitos dos NM sobre os organismos.

2.1.3 Testes de toxicidade *in vitro*

Os testes toxicológicos *in vitro* são vantajosos por serem ensaios relativamente rápidos e baratos, possuem boa reprodutibilidade, sensibilidade, sendo que os resultados apresentam uma avaliação quantitativa dos *end-points* de toxicidade avaliados. Podem ainda ser conduzidos utilizando-se diferentes tipos de células possibilitando uma avaliação toxicológica em compartimentos-alvo (BERNAUER et al., 2005)

A citotoxicidade compreende processos de morte celular induzida e a genotoxicidade compreende processos que alteram o DNA (ácido desoxirribonucleico), tanto em sua estrutura físico-química (mutagênese), tanto na alteração do determinismo genético em nível celular (carcinogênese) ou orgânico (teratogênese). A genotoxicidade estuda, sob a visão da genética, o que perturba a vida ou induz à morte tanto no nível celular, como ao nível de organismo (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Melegari, (2010) salienta que os testes de citotoxicidade e genotoxicidade são ferramentas importantes para avaliação dos diferentes mecanismos de ação tóxica e estes testes vem sendo incorporados entre ensaios de rotina em laboratórios de experimentação.

Os danos citotóxicos e genotóxicos podem ser avaliados através de diferentes ensaios, tais como o ensaio utilizando o brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), o ensaio de lipoperoxidação biológica por meio da dosagem do malondialdeído (MDA), entre outros.

O ensaio utilizando o MTT consiste na absorção do sal MTT pelas células sendo reduzido no interior da mitocôndria a um produto denominado formazan. A enzima succinato desidrogenase transforma o MTT que possui cor amarela, em cristais de formazan, que possuem coloração violeta. Somente

células viáveis são capazes de reduzir o MTT a formazan, assim, a quantidade de cristais de formazan produzido, medidos por espectrofotometria, é diretamente proporcional atividade mitocondrial e viabilidade celular (WAN et al., 1994).

A lipoperoxidação (LPO) é caracterizada pelo processo em que os radicais livres atacam os ácidos graxos poliinsaturados da membrana celular. Ocorrendo então, uma reação em cadeia com lipoperóxidos como produtos intermediários e alterações das propriedades da membrana, permeabilidade, respiração celular e produção de ATP, falência dos mecanismos de troca de metabólitos, alterações no DNA e, em condições extremas, a morte celular (BARBER; HARRIS, 1994; MATIAS; CREPPY, 1998).

Este processo é constituído de três fases, a iniciação, a propagação e a terminação, tendo como produto final substâncias citotóxicas como o MDA (CATALÁ, 2006). O MDA está relacionado com danos às proteínas (SUJI; SIVAKAMI, 2008), assim, é utilizado como um biomarcador natural para a avaliação do processo de lipoperoxidação, pois evidencia o desequilíbrio entre o sistema de defesa e ataque nas células.

2.1.4 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

O oxigênio é utilizado pelos organismos aeróbicos como acceptor final de elétrons, pois permite elevada produção de energia na respiração em resultado do seu alto potencial eletroquímico. Entretanto, devido sua configuração eletrônica, o oxigênio sofre alterações parciais e pode levar a formação de radicais livres, levando a produção de EROs (FRIDOVICH, 1989)

Os radicais livres são átomos, grupos de átomos ou moléculas que possuem elétrons livres não pareados em sua camada orbital externa e por isso apresentam instabilidade e elevada reatividade (KIRKHAM; RAHMAN, 2006). Contudo, as EROs incluem as espécies radicais livres e outras que apesar de não possuírem elétrons desemparelhados, são altamente reativos devido sua instabilidade química (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A produção de EROs faz parte do metabolismo de animais e plantas e está presente nos processos fisiológicos envolvidos na produção de energia, regulação do crescimento celular,

fagocitose, sinalização intracelular e síntese de substâncias como hormônios e enzimas (RAHMAN; BISWAS; KODE, 2006). Para regular a sua produção e evitar seus efeitos deletérios, os organismos dispõem de um sistema antioxidante. Contudo, o desequilíbrio neste sistema, pode levar ao estresse oxidativo (RAHMAN; BISWAS; KODE, 2006).

Barata et al., (2005) destacam que os níveis de produção de EROs no interior dos organismos é um indicador de estresse a nível bioquímico que pode assumir a forma de radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, entre outros (BARATA et al., 2005). Uma descrição mais detalhada das formas de EROs observadas nos organismos pode ser observada na Tabela 2.

Tabela 2. Características das principais EROs formadas *in vivo*.

Espécie	Como se forma	Sítios de formação	Ação
Radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Redução parcial do oxigênio por 1 elétron	Reações de autoxidação	Atua como agente redutor nas reações bioquímicas
Radical hidroxila ($OH\cdot$)	Redução do oxigênio molecular por 3 elétrons nas reações de Fenton e Heber-Weiss, catalisada por metais	Reação de H_2O_2 com metais de transição e homólise da água por exposição à radiação ionizante	Danos ao DNA, RNA, às proteínas, lipídios e membranas celulares do núcleo e mitocondrial
Peróxido de hidrogênio (H_2O_2)	Redução parcial do oxigênio molecular por 2 elétrons	Vias catalisadas por oxidases e superóxido dismutase	Capaz de transpor as membranas celulares facilmente e gerar radicais hidroxila
Radical alcóxila ($RO\cdot$)	Radical orgânico centrado no oxigênio	Intermediário na lipoperoxidação da membrana	Danos na membrana celular
Radical peróxila ($ROO\cdot$)	Formado a partir de hidroperóxidos orgânicos	Intermediário na lipoperoxidação da membrana	Danos na membrana celular

Tabela 2. Continuação.

Oxigênio singlete (¹ O ₂)	Primeiro estado exitado de oxigênio moleular	É a causa ou o intermediário da toxicidade fotoinduzida do oxigênio	Reage com algumas classes de biomoléculas
---	---	---	---

Fonte: Adaptado de Ribeiro et al., (2005) e Barreiros; David; David, (2006).

2.1.5 Toxicidade de nanomateriais de ZnO

Os NM ZnO possuem ampla aplicabilidade. Assim, a produção deste NM vem aumentando e atingiu uma produção global de quase 40 mil toneladas no ano de 2014 com perspectivas de produção ainda maiores para os próximos anos (FUTURE MARKET INC, 2017).

Junto com o aumento da produção deste NM emerge também a preocupação sobre os possíveis efeitos e impactos do NM ZnO para os organismos vivos e a saúde humana.

Sabe-se que o Zn é um microelemento essencial para todas as formas de vida conhecidas. Ele age como cofator de diversas proteínas e funciona como uma substância de sinalização paracelular e intracelular, entre outras funções. Porém quando em concentrações elevadas, torna-se tóxico para os seres vivos (HOGSTRAND, 2011).

A preocupação a respeito da poluição do meio aquático é evidente, visto que os corpos hídricos são os receptores finais de toda a poluição gerada pelos seres humanos (BERTOLETTI, 2013). E o tema qualidade da água/acesso a água potável, é um dos maiores desafios da atualidade, na questão de se garantir água de qualidade para todos, especialmente para regiões onde o recurso é escasso (QU; ALVAREZ; LI, 2013).

Assim, o estudo dos efeitos dos NM sobre os organismos é de fundamental importância pois, elucida tais efeitos e auxiliam no desenvolvimento de legislações ambientais específicas, bem como no manejo da produção e descarte destes NM, que exige cautela (ROSSETTO, 2012).

Estudos relacionados a compreensão destes efeitos vem sendo realizados pela comunidade científica com diferentes organismos. A Tabela 3 apresenta alguns estudos realizados sobre a toxicidade de NM ZnO à diversos organismos.

Tabela 3. Toxicidade de NM ZnO a diferentes organismos.

Organismo	Efeitos observados	Referência
<i>Bacillus subtilis</i> <i>Escherichia coli</i>	Inibição bacteriana Geração de EROS	Adams; Lyon; Alvarez, (2006)
<i>A. fischeri</i> <i>D. magna</i> <i>Thamnocephalus</i> <i>platyurus</i>	Efeitos agudos em baixas concentrações de exposição Efeitos associados a liberação de íons	Heinlaan et al., (2008)
<i>D. magna</i> <i>T. platyurus</i> <i>Tetrahymena</i> <i>thermophila</i>	Efeitos agudos em baixas concentrações de exposição Efeitos associados a liberação de íons	Blinova et al., (2010)
<i>D. magna</i>	Efeitos na expressão de genes envolvidos no transporte citoesquelético, na respiração celular e na reprodução	Poynton et al., (2011)
<i>Xenopus laevis</i>	Internalização do NM Aumento de LPO	Bacchetta et al., (2013)
<i>D. magna</i>	Efeitos agudos Danos ultraestruturais	Santo et al., (2014)
<i>D. magna</i>	Efeitos agudos Efeitos sobre alimentação Efeitos crônicos sobre a reprodução	Lopes et al., (2014)
<i>D. magna</i>	Efeitos crônicos sobre o crescimento e a reprodução Internalização de NM	Adam et al., (2014)
Células fibroblásticas de rato L929	Redução da viabilidade celular	Ann et al., (2015)
<i>D. magna</i>	Danos a nível celular	Bacchetta et al., (2016)
<i>Microcystis</i> <i>aeruginosa</i>	Danos na membrana celular	Hou et al., (2017)
Macrófagos celulares RAW 264.7	Redução da viabilidade celular Inflamação celular	Uski et al., (2017)
<i>D. magna</i>	Internalização de NM Danos mitocondriais	Bacchetta et al., (2017)

Tabela 3. Continuação.

Larvas de <i>Danio rerio</i>	Alterações nas regilações gênicas que induziram ligeiramente a diferenciação celular e as vias associadas ao sistema imunológico e ativaram vários genes-chave envolvidos na sinalização das células cancerígenas	Kim et al., (2017)
------------------------------	---	--------------------

2.2 ORGANISMOS TESTES

Para maior confiabilidade dos resultados e como modo de padronização, os organismos utilizados nos testes de toxicidade devem exibir características específicas. Entre estas incluem-se disponibilidade e abundância, características genéticas uniformes e estáveis, grande potencial reprodutivo, fácil aquisição e manutenção em laboratório. Precisam também pertencer a certos grupos taxonômicos representativos dos ecossistemas e possuir sensibilidade à exposição de agentes químicos (DOMINGUES; BERTOLETTI, 2008).

2.2.1 *Daphnia magna*

O microcrustáceo de água doce *D. magna* STRAUS (1920) vive em ambientes lênticos, típico de regiões temperadas e possui hábitos planctônicos.

Estes organismos possuem comprimento médio de 0,5 mm (juvenis) a 5 mm (adultos) e alimentam-se por meio de filtração, principalmente de algas unicelulares (KNIE; LOPES, 2004).

D. magna apresentam ciclo de vida relativamente curto, com duração variável de 40 a 60 dias, dependendo da temperatura do meio. Quando em condições ambientais favoráveis, reproduzem-se por partenogênese, gerando filhotes idênticos aos originais (clones) dando origem a apenas organismos fêmeas (ARAGÃO; ARAÚJO, 2008). Do contrário, em condições ambientais desfavoráveis, como por exemplo, temperatura e alta densidade populacional, há a ocorrência de organismos machos, levando a reprodução sexuada e o aparecimento de efípios. Estes efípios irão eclodir quando as condições ambientais se tornarem novamente favoráveis

produzindo fêmeas que se reproduzirão por partenogênese (RUPPERT; BARNES, 2005).

De maneira geral, sua morfologia caracteriza-se por possuir o corpo envolvido por uma carapaça bivalve transparente e um espinho apical (RUPPERT; BARNES, 2005).

Estes organismos são padronizados internacionalmente (ISO, DIN, OECD) para realização de testes de toxicidade de diferentes substâncias tais como NP metálicas (MWAANGA; CARRAWAY; VAN DEN HURK, 2014; ROSSETTO et al., 2014b), entre outros.

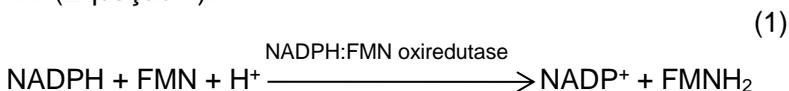
2.2.2 *Aliivibrio fischeri*

O organismo *A. fischeri* é uma bactéria marinha luminescente, gram-negativa, anaeróbia facultativa com formato de bastão, flagelada e comprimento médio de 3 µm (NEALSON; HASTINGS, 1979).

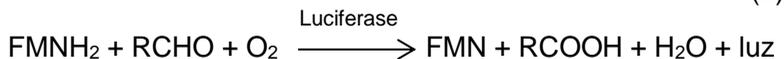
Estas bactérias podem ser encontradas como simbioses em diferentes espécies, como patógenos em invertebrados ou como saprófitos de vida livre, sendo cosmopolitas, habitando preferencialmente águas de regiões temperadas e subtropicais (NEALSON; HASTINGS, 1979).

Em condições ambientais favoráveis, concentrações de oxigênio acima de 0,5 mg.L⁻¹ e alta densidade celular as bactérias *A. fischeri* emitem luz de coloração azul-esverdeada, naturalmente (KNIE; LOPES, 2004; MA et al., 2014).

Segundo Mortimer et al., (2008), a bioluminescência produzida pela bactéria marinha *A. fischeri* é resultado de uma complexa cadeia de reações bioquímicas. Assim, Inouye, (1994) explica que a luz emitida pelas bactérias luminescentes se baseia principalmente num sistema de enzimas bioluminescentes, que consiste de uma NADPH:FMN oxidoreductase e uma luciferase. Neste sistema, primeiro FMN é reduzido a FMNH₂, na reação catalisada pela enzima NADPH:FMN oxidoreductase na presença de NADPH reduzido e um H⁺ (Equação 1):



Em seguida, a enzima luciferase catalisa a oxidação do FMNH₂ para produzir FMN na presença de um aldeído de cadeia longa (RCHO) e O₂ com a emissão de luz (Equação 2):



Nesta reação, o comprimento de onda da luz emitida varia de 420 a 660 nm (INOUYE, 1994; MA et al., 2014).

Esta via que utiliza NADH como cofator está intrinsecamente ligada ao metabolismo do microrganismo. Assim, a diminuição da bioluminescência é um reflexo da inibição da atividade metabólica bacteriana, sendo proporcional a toxicidade da amostra testada (INOUYE, 1994; MA et al., 2014; PARVEZ; VENKATARAMAN; MUKHERJI, 2006).

Desta forma, *A. fischeri* vem sendo utilizada para verificar os efeitos tóxicos de distintos compostos químicos como, por exemplo, hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (LEE; KANG; KWON, 2013), nanopartículas metálicas, efluentes farmacêuticos (YU et al., 2014), líquidos iônicos (COSTA et al., 2015) entre outros.

2.2.3 Células Neuro 2A

A linhagem celular de neuroblastoma murinho, Neuro 2A (N2A) estabelecida por Klebe; Ruddle, (1969), é proveniente da crista neural de camundongos albinos. Estas células apresentam morfologia arredondada a alongada (JEON et al., 2012).

Uma das vantagens desta linhagem celular é a sua capacidade de diferenciação em neurônios dentro de poucos dias (TREMBLAY et al., 2010).

Por serem neuroblastomas, células N2A são vastamente empregadas em estudos de diferenciação neuronal, crescimento axonal, nos efeitos na neurogênese e neurofisiologia, além de serem utilizadas em estudos de propriedades neurotóxicas de diversas substâncias, estudos de neuroproteção e mecanismos associados à plasticidade e regeneração nervosa (TREMBLAY et al., 2010).

Quanto aos estudos relacionados a nanotoxicologia, as células N2A vem sendo empregadas para estudar NP de prata (HUANG et al., 2015; LIN et al., 2017), NP de sílica (YANG et al.,

2014), NP de magnésio/alumínio (LU et al., 2015), entre outras.

2.3 PROCESSOS DE SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS (PSM)

O avanço significativo do uso de membranas sintéticas em aplicações industriais teve início na década de 1960, ainda que o primeiro estudo registrado sobre membranas seja datado de meados do século XVIII (BAKER, 2012).

Devido ao rápido desenvolvimento desta tecnologia, atualmente os PSM encontraram inúmeras aplicações industriais, que abrangem a purificação de água e produtos lácteos, dessalinização de água salgada e marinha, recuperação de águas residuais, produção de alimentos e bebidas, separação de gás e vapor, conversão e armazenamento de energia, controle de poluição do ar e tratamento de resíduos industriais perigosos, hemodiálise, proteção e separação de microorganismos, etc (FANE; WANG; JIA, 2011).

Segundo Fane; Wang; Jia, (2011), a tecnologia de membrana aumentou consideravelmente nossas capacidades para reestruturar processos de produção, proteger o meio ambiente e a saúde pública, além de fornecer novas tecnologias para o crescimento sustentável. Ainda neste contexto, Qu; Alvarez; Li, (2013) ressalta que a tecnologia de membranas é uma componente chave no paradigma de tratamento e reutilização de água.

Todos os PSM são caracterizados pelo uso de uma membrana (ULBRICHT, 2006). Uma membrana pode ser definida como uma interface entre duas fases agindo como uma barreira seletiva (NG et al., 2013).

Os PSM consistem em uma moderna técnica de separação físico-química que utiliza a diferença de permeabilidade entre os componentes da solução como mecanismo de separação (MULDER, 1996; QU; ALVAREZ; LI, 2013), ou seja, caracterizam-se pela passagem de uma suspensão ou solução através de uma membrana ocorrendo separação seletiva dos componentes. A fração da alimentação que permeia pela membrana é denominada de permeado e a fração retida, de concentrado ou não permeado (MULDER, 1996).

Para que se realize o transporte de uma substância através da membrana, é necessário que seja desempenhada uma força

impulsora sobre a solução de alimentação. Para isso existem diferentes forças motrizes capazes de exercer esta função como gradiente de pressão (ΔP), concentração (ΔC), temperatura (ΔT) e de potencial elétrico (ΔV) (MULDER, 1996).

Entre os processos que utilizam a pressão como força motriz está a microfiltração (MF), a ultrafiltração (UF), a nanofiltração (NF) e a osmose reversa (OR). As principais características de cada um destes processos estão apresentadas na Tabela 4.

Tabela 4. Características dos PSM.

Processo	Tipo de membrana	Força motriz	Mecanismo de ação	Material retido	Material que permeia
MF	Microporosa	ΔP 0,1 – 1 bar	Exclusão	Material em suspensão Bactérias Material com massa molar > 500 kDa	Água Sólidos dissolvidos
UF	Microporosa	ΔP 0,5 – 5 bar	Exclusão	Colóides Macromoléculas Material com massa molar 5000 Da	Água Sais
NF	Assimétrica	ΔP 5 – 40 bar	Exclusão Difusão	Material com massa molar entre 500 e 2000 Da	Água Sais
OR	Assimétrica Filme denso	ΔP 40 – 100 bar	Difusão	Todo material solúvel ou em suspensão	Água

Fonte: Adaptado de Habert; Borges; Nobrega, (2006).

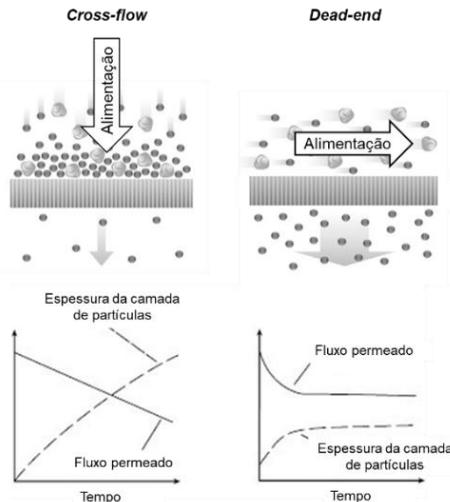
Segundo Baker, (2012) e Mulder, (1996), as membranas podem ser classificadas pelo tipo de material pelo qual são constituídas, pela sua morfologia e pela capacidade de rejeitar os solutos ou pelos mecanismos envolvidos na rejeição destes solutos.

O desempenho de uma membrana pode ser influenciado por sua composição química, temperatura, pressão, fluxo de alimentação e por interações entre componentes da alimentação

e a superfície das membranas (DE MORAIS COUTINHO et al., 2009). Para que uma membrana seja considerada de alta qualidade, estas devem apresentar fatores como: elevado fluxo a pressões inferiores, boa estabilidade mecânica e boa seletividade para as substâncias que se deseja separar (MOHAMMAD et al., 2015).

Expondo de maneira simplificada, o PSM consiste no bombeamento de uma solução sob pressão através da superfície da membrana (FANE; WANG; JIA, 2011; MULDER, 1996). Os tipos de sistema de filtração existentes são denominados de *Dead-end* ou filtração estática e *Cross-flow* ou filtração tangencial. A Figura 1 apresenta um esquema ilustrativo destes tipos de sistema.

Figura 1. Esquema ilustrativo da filtração tipo *Cross-flow* e *Dead-end*.



Fonte: Adaptado de Fane; Wang; Jia, (2011).

No tipo *Dead-end*, a solução de alimentação é forçada através da membrana pelo gradiente de pressão. Isto faz com que os componentes rejeitados pela membrana concentrem sobre a membrana, diminuindo rapidamente sua eficiência com o passar do tempo (FANE; WANG; JIA, 2011; MULDER, 1996).

Já no tipo *Cross-flow*, a solução de alimentação escoia paralelamente à superfície da membrana, enquanto o permeado

é transportado transversalmente, o que aumenta o tempo de eficiência da membrana (FANE; WANG; JIA, 2011; MULDER, 1996).

As vantagens dos PSM estão associadas principalmente, ao fato desses processos efetuarem separações sem mudança de fase sendo energeticamente vantajosos quando comparados com os processos térmicos tradicionais. Além disto, os equipamentos com membranas são mais compactos que os tradicionais. Com isso, sua estrutura modular lhes confere maior flexibilidade operacional e de projeto e os custos operacionais e de manutenção podem ser menores porque tais sistemas têm menos partes móveis e exigem um menor número de operadores (NG et al., 2013).

2.3.1 Nanofiltração (NF)

A NF é um processo de separação por membranas com propriedades intermediárias entre a UF e a OR, sendo um processo extremamente complexo que depende dos eventos microhidrodinâmicos e interfaciais que ocorrem na superfície da membrana e dentro de seus poros (MOHAMMAD et al., 2015). Os mecanismos de ação de rejeição de membranas NF podem ser atribuídos a uma combinação de efeitos estéricos, efeito de Donnan, efeitos dielétricos e de transporte (MOHAMMAD et al., 2015).

As características específicas das membranas de NF estão relacionadas com as altas rejeições de sais polivalentes (99%), moderadas rejeições de sais monovalentes (0 a 70%) e elevada rejeição de compostos orgânicos com peso molecular superior ao peso molecular de corte da membrana (MWCO), o que corresponde à faixa de 300 a 500 Da (BAKER, 2012; MOHAMMAD et al., 2015).

Geralmente, sistemas de NF requerem pressões de operação menores àquelas requeridas na OR. Por este motivo são economicamente mais vantajosos quando comparados a estes processos. Além disso, apresentam facilidade de operação, não requerem uso de aditivos e permitem a construção modular o que facilita a construção em grande escala (BUONOMENNA et al., 2007; MOHAMMAD et al., 2015).

Tais propriedades possibilitam que o processo de NF seja

utilizado em diferentes áreas, tais como: tratamento de água e efluentes, indústrias farmacêuticas, biotecnologia e engenharia de alimentos (BUONOMENNA et al., 2007; MOHAMMAD et al., 2015).

Independente da finalidade, geralmente a NF, não é vista como um processo alternativo, mas sim como um coadjuvante quando se deseja alcançar uma melhoria na qualidade do tratamento ou ainda uma diminuição de custos de produção (MULDER, 1996).

A evolução no desenvolvimento de tecnologia de membrana de NF está associada à criação de melhores tecnologias de filtração para separar substâncias orgânicas e inorgânicas em solução. Os avanços ocorrem devido à criação de membranas mais eficientes através de métodos como: polimerização interfacial (PI), incorporação de NM, tratamento com ultravioleta, entre outros. Estas modificações podem ser realizadas na superfície da membrana ou em sua estrutura (FANE; WANG; JIA, 2011; NG et al., 2013).

Tais métodos visam o desenvolvimento de membranas com maior seletividade, maior tendência à rejeição e a diminuição da incrustação (*fouling*) (MOHAMMAD et al., 2015; NG et al., 2013; YIN; DENG, 2014).

2.3.2 Membranas poliméricas nanocompósitas

Membranas poliméricas são atualmente o tipo de membrana mais utilizada para o tratamento da água, devido ao seu mecanismo de formação de poros simples, maior flexibilidade e custos relativamente baixos em comparação com equivalentes de membrana inorgânicas (NG et al., 2013).

No entanto, ainda é limitada por vários desafios, como a relação entre a permeabilidade e baixa resistência à incrustação (WU; YU; LI, 2015). O desenvolvimento de membranas com alta permeabilidade e rejeição, e boa propriedade anti-incrustante é necessária para purificação de água sob o contexto de eficiência energética e de custo-benefício (WU; YU; LI, 2015).

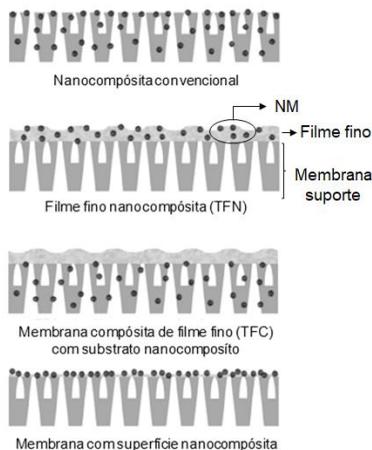
Dentre a ampla gama de polímeros existentes, os mais utilizados no desenvolvimento e preparo de membranas são a polisulfona (PSF), a polietersulfona (PES), a poliamida (PA) e a quitosana (QTS) (BAKER, 2004).

Membranas poliméricas nanocompósitas são membranas

com NM dispersos em suas matrizes poliméricas (YIN; DENG, 2015). Estas membranas podem ser utilizadas para separação gás-gás, líquido-líquido e sólido-líquido (YIN; DENG, 2015).

De acordo com a estrutura da membrana e localização de onde são inseridos os NM, as membranas nanocompósitas podem ser classificadas em quatro categorias segundo (YIN; DENG, 2015): (1) nanocompósita convencional, aonde o NM está inserido na matriz polimérica; (2) nanocompósita de filme fino (TFN), aonde o NM é incorporado apenas no filme fino que recobre a membrana; (3) compósita de filme fino (TFC), aonde o NM está inserido apenas na membrana suporte; e (4) nanocompósitas, aonde os NM estão localizados aderidos à superfície da membrana. As estruturas típicas destas membranas são ilustradas na Figura 2.

Figura 2. Estrutura típica de membranas poliméricas nanocompósitas.



Fonte: Adaptado de Yin e Deng (2015).

Segundo Qu et al., (2013) a incorporação de NM puros ou funcionalizados em membranas é capaz de alterar as propriedades da membrana, proporcionando uma melhora na permeabilidade da membrana, resistência a incrustação e estabilidade mecânica e térmica.

Diversos NM são utilizados no preparo das membranas. Os mais comuns são Ag, TiO₂, SiO₂ e ZnO (QU et al., 2013; MOHAMMAD et al., 2015).

A maioria dos estudos relacionados à incorporação de NM a estrutura das membranas concluiu que a hidrofiliabilidade da superfície da membrana foi melhorada através da incorporação de NM hidrofílicos expostos na superfície da membrana (MOHAMMAD et al., 2015).

De maneira geral, o aumento da hidrofiliabilidade da superfície da membrana acarreta na redução da incrustação, devido a absorção de grupos hidroxila, que poderia impedir a adsorção do *fouling* (ZHAO et al., 2012).

Segundo Yin; Deng, (2015) a hidrofiliabilidade e a rugosidade da superfície da membrana controlam as características de anti-incrustação, enquanto as estabilidades químicas, térmicas e mecânicas, determinam a durabilidade da membrana.

Yin; Deng, (2015) destacam ainda que devido a esta promessa de superar a relação de troca entre a permeabilidade e seletividade bem como mitigar o problema de incrustação durante o processo de tratamento de água, as membranas nanocompósitas ganharam atenção e estão sendo consideradas a vanguarda para criação da próxima geração de membranas de alto desempenho.

2.3.3 Membrana nanocompósita de filme fino (*Thin-film nanocomposite membrane - TFM*)

TFN são constituídas por uma fina camada (aproximadamente entre 50 nm a 100 nm) geralmente feita de PA, acima de uma camada de suporte porosa (MOHAMMAD et al., 2015; YIN; DENG, 2015).

Este tem sido o principal tipo de membrana de NF/OR, desde que foi inicialmente desenvolvido na década de 1970, utilizado para dessalinização de água marinha ou salobra, remoção de metais pesados, micropoluentes orgânicos (como pesticidas), desruptores endócrinos e compostos farmacologicamente ativos (YIN; DENG, 2015).

As diferenças entre os desempenhos de membranas TFN aplicadas a OR e aplicadas a NF são a maior permeabilidade de água das membranas de NF e a sua elevada rejeição de sais multivalentes (por exemplo, Na_2SO_4) e inferior rejeição de sais monovalentes sal (por exemplo, NaCl) quando comparadas as membranas de OR (LAU et al., 2015).

Como forma de barreira seletiva da membrana TFN, a

película de PA controla em grande parte o desempenho da membrana em termos de permeabilidade, seletividade, e resistência a incrustação (LAU et al., 2015; YIN; DENG, 2015).

A incorporação de NM na camada PA pode modificar as propriedades físico-químicas da membrana, tais como a hidrofiliicidade, densidade de carga, a porosidade e a reticulação ou ainda proporcionar canais especiais de água que podem melhorar a relação seletividade/permeabilidade (LAU et al., 2015; MOHAMMAD et al., 2015).

Estas alterações na permeabilidade e seletividade da membrana dependem do tipo, tamanho e quantidade de NM incorporado (QU; ALVAREZ; LI, 2013). Alguns exemplos de NM que vem sendo amplamente utilizados para incorporar os filmes finos incluem zeólitas, Ag, TiO₂ e nanotubos de carbono (QU et al., 2013; QU; ALVAREZ; LI, 2013).

Diante do exposto, a Tabela 5 apresenta alguns exemplos de membranas poliméricas que vem sendo desenvolvidas incorporando NM em sua estrutura.

Tabela 5. Membranas poliméricas nanoestruturadas.

Polímero	NM	Tipo	Propriedades observadas	Referência
PSF	Ag	UF	Aumento da hidrofiliicidade Redução do <i>fouling</i>	Zodrow et al., (2009)
PSF/PA	SiO ₂	UF	Aumento da permeabilidade sem alterar o rendimento de rejeição de sais	Jin et al., (2012)
PSF	Ag	NF	Redução do <i>fouling</i>	Andrade et al., (2015)
PSF	Nanotubos de carbono	UF	Alteração da porosidade Alteração da rugosidade Resistência ao <i>fouling</i>	Khalid et al., (2015)
PES	ZnO	NF	Aumento da hidrofiliicidade Aumento do fluxo Resistência ao <i>fouling</i>	Rajabi et al., (2015)

Tabela 5. Continuação.

PSF	Al ₂ O ₃	MF	Alteração na reologia Aumento da hidrofili- cidade Redução do <i>fouling</i>	Mehrnia et al., (2015)
PSF/PA	SiO ₂	OR	Aumento da hidrofili- cidade Redução do <i>fouling</i>	Peyki et al., (2015)
PSF/PA	TiO ₂	NF	Aumento do fluxo Aumento da remoção de corantes Aumento da capacidade <i>anti-fouling</i>	Ngo et al., (2016)

2.3.4 Processo de preparo de membranas

O preparo de membranas nanocompósitas é realizado principalmente pelo método de inversão de fases (IF) (NG et al., 2013).

No processo de IF a solução polimérica homogênea é separada em duas fases, uma fase sólida rica em polímero, na qual se forma a matriz da membrana e uma fase líquida pobre em polímero, na qual é formada a estrutura porosa (NG et al., 2013; XIE et al., 2012).

Após a imersão do filme polimérico no banho de coagulação contendo o não solvente, este irá difundir para a solução polimérica, enquanto o solvente se difundirá no banho. A força motriz para este processo é a diferença de potencial químico existente entre o filme e o banho. A transferência de massa entre o solvente e o não solvente é um fator determinante na morfologia das membranas e para a compreensão dos fenômenos envolvidos na síntese das mesmas (SCOTT, 1995).

Para a formação do filme fino de PA sobre o suporte polimérico preparado por meio de IF, o método de PI demonstra-se como uma técnica útil e rápida para preparo de membranas de NF e OR. O filme fino sobre a superfície das membranas é formado por meio da reação de copolimerização entre dois monômeros reativos, formando um filme com espessura variável de até 100 nm (LI et al., 2014; MOHAMMAD et al., 2015).

Diferentes tipos de monômeros têm sido utilizados no

processo de PI, tal como bisfenol A, ácido tânico, m-fenilenodiamina (MPD), polivinilamina que reagem com cloreto de trimesol (TMC) ou cloreto de isoftaloílo (JEONG et al., 2007; LI et al., 2014).

O filme fino formado na parte superior do suporte poroso irá determinar a retenção total de soluto e o fluxo de permeado, que pode ser melhorado variando o tipo e a concentração do monômero em cada uma das soluções, às proporções dos monômeros, e o tempo de reação da PI (YIN; DENG, 2015).

Scott, (1995) ressalta que o tempo da reação de PI é extremamente rápido e fatores, tais como tempo de reação, temperatura de reação, condições de cura e concentração de monômero podem afetar a estrutura do filme formado.

2.4 CARACTERÍSTICAS E PROPRIEDADES DOS MATERIAIS UTILIZADOS NA PESQUISA

A escolha dos materiais utilizados no desenvolvimento de membranas é de grande importância sendo preciso considerar características tais como: propriedades hidrofóbicas; propriedades hidrofílicas; resistência mecânica; resistência química; resistência térmica; capacidade de recuperação; estabilidade dimensional, toxicidade e custo (MULDER, 1996).

Assim, uma breve revisão sobre as características e propriedades dos principais materiais utilizados na composição das membranas que foram desenvolvidas nesta pesquisa encontra-se a seguir.

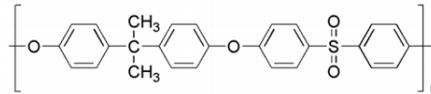
2.4.1 Polissulfona (PSF)

Embora possam ser encontradas na forma alifática ou aromática, as polissulfonas aromáticas apresentam melhores propriedades para a fabricação de membranas (COTTER, 1995).

As polissulfonas aromáticas (Figura 3) são polímeros termoplásticos compostos por grupos sulfona fixando anéis fenólicos na cadeia. Este polímero é obtido a partir da reação entre o bisfenol A e a 4-4'diclorodifenilsulfona (ROBESON; FARNHAM; MCGRATH, 1978) resultando em um polímero com alta resistência ao impacto e flexibilidade. Os anéis fenólicos e a união sulfônica proporcionam rigidez ao polímero, enquanto que

os átomos de oxigênio entre os anéis fenólicos (ligação éter) proporcionam flexibilidade, resistência e estabilidade à oxidação (COTTER, 1995).

Figura 3. Estrutura química da unidade repetitiva da PSF.



Fonte: Bet-moushoul et al., (2016).

Além de tais características, apresentam alta resistência térmica, podendo ser utilizadas a temperaturas mais elevadas (entre 75 °C e 174 °C aproximadamente), alta temperatura de transição vítrea (Tg), boa resistência mecânica, alta dureza (implicando em maior resistência a deformação plástica localizada), solubilidade em solventes polares apróticos, durabilidade química sobre uma ampla faixa de pH (2 a 13) e estabilidade hidrolítica (COTTER, 1995; ROBESON; FARNHAM; MCGRATH, 1978; WANG et al., 2011).

Devido apresentar tais características, a PSF é um dos polímeros amorfos mais utilizados para a preparação de membranas de micro e ultrafiltração, assim como suporte para a fabricação membranas compósitas de nanofiltração e membranas de osmose reversa (TWEDDLE et al., 1983; WANG et al., 2011).

No entanto, devido a sua natureza hidrofóbica as membranas de PSF apresentam baixo fluxo de água em comparação a outras membranas preparadas a partir de polímeros hidrofílicos, resultando na suscetibilidade a incrustação da membrana (KHALID et al., 2015).

Desta forma, a modificação das membranas de PSF através da incorporação de materiais hidrofílicos na matriz polimérica vem sendo amplamente estudada (SONG et al., 2014).

2.4.2 Poliamida (PA)

As poliamidas ou náilons são polímeros termoplásticos semicristalinos obtidos através da interação de um grupo amina e um ácido. São compostos pela repetição de grupos funcionais

amida (-CONH-) ao longo da cadeia polimérica intercalados por sequências de grupos metileno (-CH₂-), podendo ser encontradas na forma alifática ou aromática (BRYDSON, 1985).

Estes polímeros, de maneira geral, apresentam fácil processabilidade, boa resistência mecânica e química e a abrasão, elevada resistência a tensão e à flexão e estabilidade dimensional (BASSANI; PESSAN; HAGE JÚNIOR, 2002; MURASE et al., 2002).

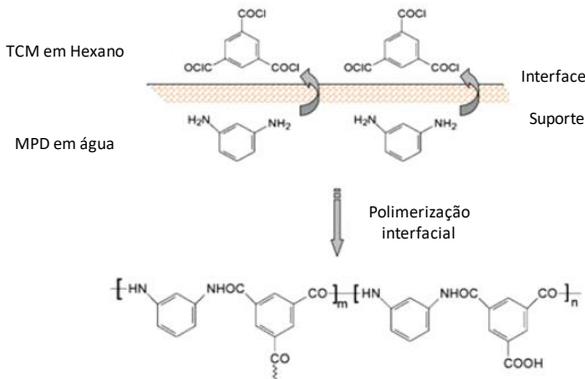
Desta forma, membranas de PA são amplamente utilizadas, pois apresentam características de elevado fluxo permeado e retenção e são capazes de operar numa ampla faixa de pH, porém são muito sensíveis a agentes oxidantes (ADRIAENSENS et al., 2001).

A PA também pode ser formada *in situ* sobre superfícies, através da técnica de PI. A química predominante para a reação de PI para formação do filme fino de PA, baseia-se na policondensação de uma amina e um halogeneto de acilo polifuncional. As aminas polifuncionais comumente utilizadas são a piperazina, o m-fenileno e as diaminas, já os halogenetos de acilo comumente utilizados incluem o cloreto de trimesol e o cloreto isoftaloilo. A amina é dissolvida numa fase aquosa, utilizada para impregnar um suporte poroso, este é então colocado em contato com uma fase orgânica contendo o halogeneto (LI; WANG, 2010)

A reação de polimerização na interface cria uma camada de PA com espessura de aproximadamente 100 nm em cima do suporte poroso (LI; WANG, 2010).

A estrutura química da PA resultante da interação entre a MPD e o TCM componentes utilizados nesta pesquisa, pode ser verificada na Figura 4.

Figura 4. PA derivada do MPD e TMC via polimerização interfacial. Duas estruturas podem ocorrer, uma parte reticulada (*crosslinked*) (m) e uma parte linear (n).



Fonte: Adaptado de Li; Wang (2010).

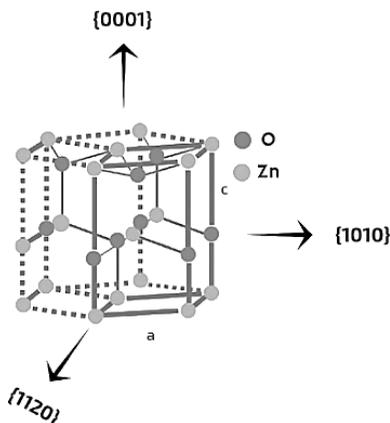
2.4.3 Óxido de Zinco (ZnO)

O ZnO é um metal semicondutor encontrado naturalmente no mineral zincita, caracterizado como um pó fino, amorfo com coloração branca e caráter anfótero (MAYRINCK et al., 2014; ÖZGÜR et al., 2005).

O ZnO existe sob duas formas principais: hexagonal (wurtzite) e blenda de Zn cúbico. A estrutura hexagonal é mais estável nas condições ambientais e, portanto, mais comum. Apresenta parâmetros de rede $a = b = 0,325 \text{ nm}$ e $c = 0,521 \text{ nm}$ e é constituído por átomos de zinco (Zn^{+2}) e oxigênio (O^{-2}) coordenados tetraedricamente e dispostos alternadamente camada por camada ao longo do eixo c, com superfícies polares com cargas iguais e opostas de $+(0001)$ para Zn^{+2} e $-(0001)$ para O^{-2} (WILSON; TANG; BARNARD, 2016). A estrutura hexagonal do ZnO está apresentada na Figura 5.

Em laboratório, os NM ZnO podem ser sintetizados por métodos físicos, químicos e biológicos, utilizando técnicas de evaporação térmica, redução química e síntese com extratos de plantas (KRÓL et al., 2017).

Figura 5. Estrutura hexagonal de ZnO indicando os planos de crescimento.



Fonte: Adaptado de Król et al., (2017).

Estes NM possuem superfícies polares bastante estáveis, fácil cristalização e excelentes propriedades físico-químicas, como por exemplo, propriedades ópticas, magnéticas, semicondutoras, piezoelétricas, e antibacterianas (VASEEM; AHMAD; YOON-BONG, 2010). Desta forma, NM ZnO pode ser sintetizado com diferentes morfologias, tais como, NP, nanofios, nanotubos, NB, nanofitas, entre outras morfologias complexas (ÖZGÜR et al., 2005).

A variedade morfológica do ZnO pode ser atribuída ao controle e adaptação dos parâmetros de síntese, tais como: pressão atmosférica, temperatura, uso de catalisadores e/ou substratos, fluxo de gás de arraste, adição de dopantes e a natureza dos materiais de partida (ÖZGÜR et al., 2005).

Devido as excelentes características físico-químicas e as diversas formas de crescimento, NM ZnO vem sendo utilizados nas mais diversas aplicações. Algumas destas aplicações incluem fornecer propriedades catalíticas (FOROUZANI et al., 2015; LIN et al., 2014), luminescentes (FUJIHARA; NAITO; KIMURA, 2001; ZANG et al., 2011), aplicados em dispositivos eletrônicos (CHEN et al., 2015; KANG et al., 2014), em terapia fotodinâmica contra o câncer (WILLANDER et al., 2011), em cosméticos (BOUTARD et al., 2013; LEWICKA et al., 2013) e para fornecer propriedades biocidas e antibacterianas (CARVALHO et al., 2014; VICENTINI, 2010).

No que diz respeito ao uso de ZnO em membranas de filtração, a alta hidrofilicidade de NP ZnO lhe tornou um dos materiais mais adequados para melhorar a hidrofilicidade de membranas compósitas (HONG; HE, 2012).

Como consequência da elevada área superficial este NM pode facilmente absorver grupos hidroxila (-OH) (SHEN et al., 2012). Já a natureza antibacteriana (CARVALHO et al., 2014) e a capacidade de absorver e/ou dissipar a radiação ultravioleta, pode favorecer o desempenho anti-incrustação e estender a vida útil de utilização das membranas (BALTA et al., 2012).

Hong; He, (2012) também afirmam que as NP ZnO podem ser incorporadas numa matriz sólida (uma membrana) para desenvolver um sistema operacional estável com melhora nas propriedades físicas e químicas da membrana.

Balta et al., (2012) destacam que a incorporação de NM ZnO na matriz da membrana é uma abordagem promissora, pois esta pode resolver o problema de incrustações de membranas, bem como melhorar sua hidrofilicidade, além de ser economicamente viável, pois este NM possui custo mais baixo quando comparado a NM com propriedades semelhantes, tais como o TiO_2 e o Al_2O_3 , tendo aproximadamente 1/4 do valor destes materiais de acordo com as cotações do mercado chinês.

Assim, alguns estudos utilizando NM ZnO em membranas de filtração estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6. Membranas poliméricas com inserção de NM ZnO em sua composição.

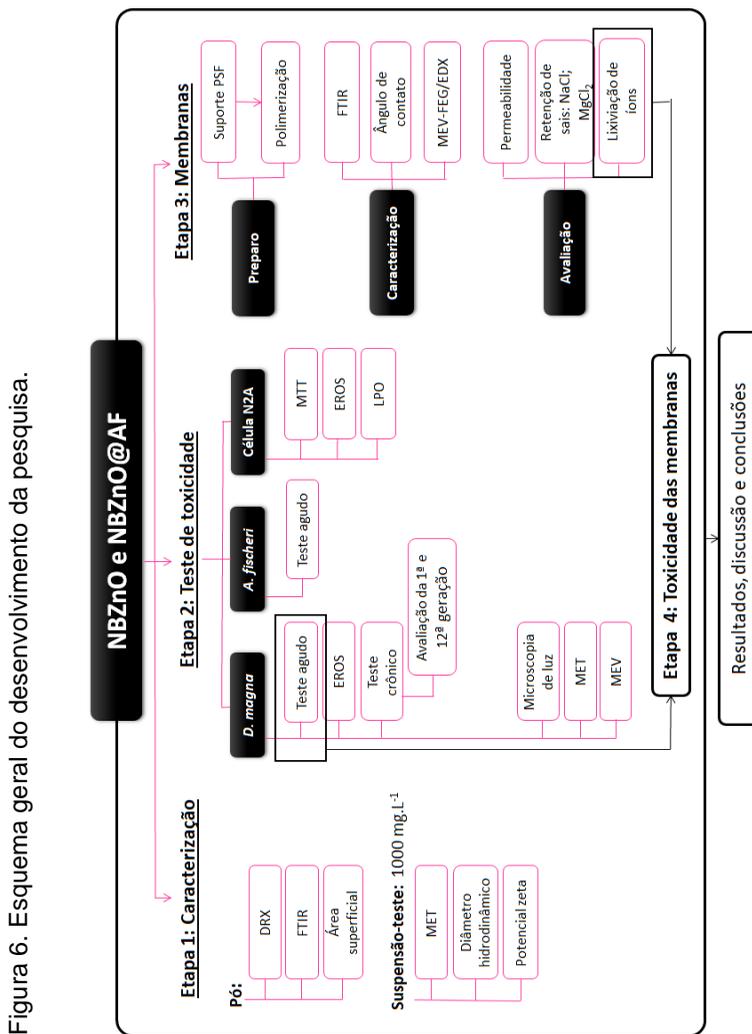
Polímero	Tipo de processo	Características observadas	Referência
PVDF	MF	Aumento da hidrofilicidade Melhora nas propriedades mecânicas Aumento do fluxo	Hong; He, (2012)
PES	NF	Aumento da hidrofilicidade Aumento na porosidade Aumento no fluxo Aumento não significativo na rejeição Aumento na capacidade <i>anti-fouling</i>	Shen et al., (2012)

Tabela 6. Continuação.

PSF	UF	Aumento da hidrofiliicidade Aumento da resistência térmica Aumento da permeabilidade Redução do <i>fouling</i>	Leo et al., (2012)
PVDF	UF	Aumento na hidrofiliicidade Aumento da capacidade <i>anti-fouling</i> Aumento da foça mecânica	Liang et al., (2012)
PSF	UF	Aumento da hidrofiliicidade Alteração da rugosidade Aumento do fluxo Boa rejeição de sais NaCl e MgSO ₄	Alhoshan et al., (2013)
PE	UF	Aumento da capacidade <i>anti-fouling</i> Aumento da permeabilidade Aumento do fluxo Alteração da rugosidade	Jafarzadeh et al, (2015)
PSF/PEI	NF	Alteração da rugosidade Aumento do fluxo e rejeição	Pal et al., (2015)
PSF/PA	NF	Aumento da hidrofiliicidade Aumento do fluxo Aumento retenção de sais	Isawi et al., (2016)
PVDF	UF	Aumento do fluxo Aumento da rejeição	Li et al., (2016)
PP	-	Propriedade fotocatalítica Propriedades bactericidas Prevenção ao <i>fouling</i> Prevenção a formação de biofilme	Bojarska et al., (2017)
PES	UF	Aumento da permeabilidade Aumento da capacidade <i>anti-fouling</i>	Nasrollahi et al., (2018)

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este capítulo apresenta a metodologia utilizada para a realização dos ensaios toxicológicos com os NBZnO e NBZnO@AF, bem como os reagentes e a metodologia empregada para o preparo e análise do processo e eficiência das membranas. A Figura 6 apresenta um panorama geral de cada etapa da pesquisa e os experimentos realizados.



Esta tese foi desenvolvida nas dependências do LABTOX-UFSC e na Rice University nos Estados Unidos, durante o estágio doutoral com bolsa CNPq de doutorado sanduíche.

3.1 SÍNTESE DOS NANOBASTÕES

Os NB utilizados nesta pesquisa foram sintetizados no LABTOX-UFSC pela pós-doutoranda responsável, Dra. Denice Schulz Vicentini, utilizando a metodologia proposta por Yang; Liu (2011) e adaptada conforme Gonçalves et al., (2018).

Para a síntese do NBZnO, solubilizou-se 60 mmol de acetato de zinco diidratado (Sigma Aldrich, USA) e 130 mmol de hidróxido de potássio (JTBaker, MX) em 60 mL e 40 mL de metanol (Synth, BR), respectivamente, sob agitação constante durante 1 h em temperatura ambiente. Após este período, as soluções foram misturadas e mantidas sob refluxo a 60 °C por 72 h. O produto, NBZnO, foi lavado por centrifugação com água e etanol, respectivamente, por 3 vezes e seco em estufa a 40 °C por 24 h.

Para a síntese do NBZnO@AF, suspendeu-se 1 g de NBZnO em 40 mL dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, BR) com auxílio de um ultrassonicador (QSONICA Q500) a 200 W por 5 minutos. Na solução coloidal formada, foram adicionados 25 mmol de 3-[2-(2-aminoetilamina)etilamina]propyltrimetoxisilano (AEAEATPMS) (Acros, USA) e manteve-se sob refluxo por 3 h a 110 °C. Em seguida, o produto, NBZnO@AF, foi lavado por centrifugação com água e etanol, respectivamente e secos em estufa a 50 °C por 24 h.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOBASTÕES

Os NB foram caracterizados por difração de raios-X (DRX), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e área superficial (AS). Já as suspensões-teste de NBZnO e NBZnO@AF foram caracterizadas por microscopia eletrônica de transmissão (TEM), potencial zeta (Pz), diâmetro hidrodinâmico (DH) e por espectrometria de absorção atômica com chama (FASS), em água ultrapura (UP) e nos meios ISO, M4 e NaCl 2%.

3.2.1 Difração de raios-X (DRX)

As análises de DRX foram realizadas no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) do Departamento de Engenharia Mecânica da UFSC, utilizando um difratômetro de raios X (PHILIPS-X'PERT), equipado com um tubo de cobre ($\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$), com o objetivo de identificar a pureza da fase cristalina e o tamanho médio do cristalito dos NB. O tamanho médio do cristalito (d) foi estimado para os NB utilizando a relação de Scherrer (Equação 3):

$$d = 0,91 \lambda / \beta \cos \theta \quad (3)$$

Onde λ é o comprimento da radiação, β é a largura à meia altura do halo principal, em radianos, e θ é o semi-ângulo de difração.

3.2.2 Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Com o objetivo de identificar os grupos funcionais dos NB e seus possíveis deslocamentos, foram realizadas análises por FTIR (Espectrômetro ABB - Bomem, FTLA 2000) na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC. A faixa de comprimento de onda utilizada foi de 1000 a 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} .

3.2.3 Área superficial (AS)

A determinação da AS dos NB foi realizada no Laboratório de Materiais Elétricos (LaMatE) do Departamento de Engenharia Elétrica da UFSC com o auxílio do equipamento NOVA® Surface Area Analyzer (Quantachrome Instruments). As amostras em pó foram preparadas a 150° C , sob vácuo, durante 1 hora no próprio equipamento e submetidas a um ciclo contendo um total de 14 pontos (p/p^0), 7 de adsorção e 7 de dessorção através da injeção de nitrogênio líquido. A área superficial específica foi calculada pelo software do equipamento através da equação BET (Brunauer, Emmett e Teller).

3.2.4 Potencial zeta (Pz) e Diâmetro hidrodinâmico (DH)

O Pz e o DH foram analisados nos meios diluentes do NB (em água UP, meio ISO, meio M4 e em meio NaCL 2%), com concentração de 1000 mg.L⁻¹. As análises foram realizadas no LABTOX-UFSC, utilizando o equipamento NanoBrook 90pluspals (Brook Haven Instruments), com o objetivo de verificar o tamanho dos NB nos meios diluentes a estabilidade dos NB em suspensão.

3.2.5 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

As análises de MET (JEOL, JEM 1011 MET-100 kV) foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, com o objetivo de verificar a morfologia dos NB. Para esta análise as suspensões-testes de NB (1g.L⁻¹), nos diferentes meios estudados, foram gotejadas sobre uma grade de carbono-Cu (300 meshes) e armazenadas em um dessecador à vácuo por 24 h para a secagem, conforme metodologia recomendada pelo LCME.

3.3. TESTES DE TOXICIDADE COM *Daphnia magna*

3.3.1 Cultivo de *Daphnia magna*

Os organismos *D. magna* utilizados na realização desta pesquisa foram provenientes do cultivo do LABTOX-UFSC, que opera de acordo com a norma NBR 12713 (ABNT, 2016).

As condições de cultivo dos organismos estão apresentadas na Tabela 7.

Semanalmente os neonatos foram submetidos ao teste de sensibilidade dos organismos. Utilizou-se como substância de referência o dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇). O objetivo dos testes de sensibilidade é verificar a sensibilidade dos organismos a uma substância conhecida de modo a assegurar a qualificação do cultivo no padrão internacional e garantir a validação dos testes realizados. Para que os organismos estejam aptos a serem utilizados nos testes de toxicidade, os valores de CE50_(24h) devem estar entre 0,6 e 1,7 mg.L⁻¹, conforme a NBR 12713 (ABNT, 2016). A Carta-Control de sensibilidade dos lotes de *D.*

magna utilizados na realização dos testes desta pesquisa pode ser verificada no Anexo 1.

Tabela 7. Condições de cultivo recomendadas para *D. magna*.

Condição de Cultivo	Especificação
Recipiente de cultivo	Becker 2000 mL
Meio de cultivo	Água reconstituída com pH 7,0 a 8,0 e dureza entre 175 e 225 mg CaCO ₃ /L
Renovação do meio de cultivo	3 vezes por semana
Temperatura	19 ± 1 °C
Fotoperíodo	16 horas luz; 8 horas escuro
Alimento	<i>Scenedesmus subspicatus</i>
Alimentação	Diária
Densidade populacional	40 mL/indivíduo
Sistema	Semi-estático

Fonte: ABNT (2016).

3.3.2 Toxicidade aguda

Os testes de toxicidade aguda com *D. magna* seguiram a metodologia descrita na norma NBR 12713 (ABNT, 2016). A toxicidade dos NBZnO e NBZnO@AF foram avaliadas expondo 20 organismos neonatos (10 organismos por réplica) com idade entre 2 a 26 horas, obtidos a partir de fêmeas com idade entre 7 e 28 dias, a diferentes concentrações de amostra, por um período de 48 h de exposição. Os testes foram mantidos em temperatura controlada de 19±1 °C, no escuro e sem alimentação.

Os testes contaram com controle negativo, onde os organismos foram mantidos em M4, tendo como tolerância mortalidade inferior ou igual a 10% para que o teste seja validado, conforme a norma utilizada. Sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO₄.7H₂O) foi utilizado como controle positivo dos testes. Para todas as amostras a concentração inicial da suspensão-teste foi de 1000 mg.L⁻¹. Foram utilizadas as concentrações 1,3, 1,9, 2,6, 3,9 e 5,2 mg.L⁻¹ para NBZnO e NBZnO@AF e, 2,6, 7,8, 10,4, 15,6 e 41,6 mg.L⁻¹ para ZnSO₄.

Os resultados foram expressos através da CE50_(48h), ou seja, concentração de amostra que causa efeito agudo

(imobilidade) a 50% dos organismos expostos após 48 h de exposição. A $CE_{50(48h)}$ foi calculada utilizando o método estatístico não paramétrico Trimmed Spermán-Karber (TKS), através do programa GW Basic.

3.3.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os possíveis efeitos citotóxicos de NBZnO, NBZnO@AF e $ZnSO_4$ foram analisados pela quantificação da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). O corante diacetato de 2'7'-diclorodihidrofluoresceína (H_2DCFDA) foi utilizado para determinar a produção de EROs em *D. magna*.

Os testes foram realizados de acordo com Liu; Wang, (2017) e Lu et al., (2017) com pequenas modificações.

Organismos com 5 dias de idade foram utilizados. Somente os organismos vivos foram utilizados para realização do ensaio de EROS. Após 48 h de exposição ao NBZnO, NBZnO@AF e $ZnSO_4$, 10 organismos foram coletados e depurados em água ultrapura durante 2 minutos. Os organismos foram expostos em 1 mL de H_2DCFDA 10 mM e incubados durante 4 h.

Após o período de incubação, os organismos foram colocados em água UP durante 30 segundos para remoção do excesso de corante que pudesse estar aderido ao seu corpo.

Os organismos foram então acondicionados em 300 μL de água UP em tubos Eppendorff, macerados e centrifugados a 10000 RPM durante 5 minutos. O sobrenadante foi adicionado em placas de 96 poços para leitura da fluorescência.

A fluorescência foi determinada utilizando um leitor de microplacas SpectraMax® Paradigm® (Molecular Device LCC, Califórnia - EUA) com excitação a 485 nm e emissão gravada a 530 nm com uma largura de banda de 20 nm.

As concentrações testadas foram escolhidas com base nos resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda (1,24, 1,87 e 2,81 $mg.L^{-1}$ para NBZnO, 0,98, 1,47 e 2,21 $mg.L^{-1}$ para NBZnO@AF e 2,44, 3,66 e 5,49 $mg.L^{-1}$ para $ZnSO_4$), além do controle. Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram analisados estatisticamente usando uma ANOVA com teste Tukey e $p \leq 0,05$ foi aceito diferença estatisticamente significativa. A análise da fluorescência foi realizada no Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB) do

departamento de Biologia da UFSC.

3.3.4 Toxicidade crônica (F0)

Os testes de toxicidade crônica foram realizados segundo a metodologia descrita pela norma ISO 10706 (ISO, 2000). Foram utilizados organismos neonatos com 2 a 26 horas (obtidos a partir de fêmeas com idade entre 7 e 28 dias).

As concentrações utilizadas nos testes crônico foram definidas a partir das concentrações que não causaram efeito agudo, sendo 0, 0,12, 0,19, 0,29, 0,44, 0,65 e 0,98 mg.L⁻¹ para NBZnO e NBZnO@AF e 0, 0,29, 0,44, 0,65 e 0,98 mg.L⁻¹ para ZnSO₄. A concentração inicial da suspensão-teste foi de 1000 mg.L⁻¹.

Os organismos foram expostos as amostras por um período de 21 dias. O meio diluente foi o M4 (meio de cultivo de *D. magna*). Cada concentração testada contou com 10 réplicas, onde individualmente 10 organismos neonatos foram colocados em béqueres de 50 mL.

Os testes de toxicidade crônica com *D. magna* foram mantidos em condições análogas a do cultivo, sendo os principais parâmetros, a temperatura de 19±1°C, o fotoperíodo de 16 horas luz, 8 horas escuro, a alimentação com a microalga *S. subspicatus*, e renovação do meio/solução-teste três vezes por semana (sistema semi-estático). Durante o teste foi acompanhado e registrado a sobrevivência e o número de jovens gerados por fêmea.

Após 21 dias de exposição, foram analisados os parâmetros, longevidade, reprodução e crescimento. A longevidade foi expressa pelo número de organismos sobreviventes após os 21 dias de teste. A reprodução foi avaliada através da contagem dos filhotes gerados por réplica no período de duração do teste. O crescimento foi avaliado através da variação do comprimento dos organismos em centímetros. Foi considerado a distância entre a base da cabeça até a o fim do espinho apical. O comprimento foi aferido com o auxílio de uma lupa de aumento de 40 vezes e uma lâmina com escala milimétrica de 1 cm.

Os resultados obtidos foram analisados estatisticamente conforme recomendação da EPA 821-R-02-013 (EPA, 2002). Foi

realizada ANOVA, empregando o teste de Dunnett, quando o número de réplicas entre os grupos experimentais (controle e diluições) foram similares, e o teste Dunnett com ajuste de Bonferroni, quando o número de réplicas não foi o mesmo para todos os tratamentos, por meio do *software* Dunnett Program versão 1.5, considerando $p \leq 0,05$. A menor concentração em que a diferença significativa exceda este valor é considerada como a concentração de efeito observado (CEO). Determinada a CEO, foi originada a concentração de efeito não observado (CENO) como sendo a concentração inferior a CEO.

3.3.5 Teste crônico de recuperação de F1 e F12

A primeira (F1) e última (F12) prole de F0 foram utilizadas para avaliar se organismos nascidos de mães expostas as amostras apresentaram efeitos crônicos mesmo quando não expostas aos contaminantes.

Foram considerados como F1 os neonatos nascidos nos dias 11 e 12 de teste (período de ápice para reprodução de *D. magna* conforme o protocolo adotado) e para F12 foram considerados os organismos nascidos no 20º e 21º dia de teste.

Neonatos nascidos de mães expostas as todas as concentrações testadas de NBZnO, NBZnO@AF e ZnSO₄ e controle negativo foram mantidos apenas em M4 durante os 21 dias de teste, não havendo exposição as amostras. Assim, este teste foi chamado de “teste crônico de recuperação”.

As condições de teste foram análogas as do teste crônico, conforme especificado no item anterior. Após os dias 21 de teste, também foram analisados os parâmetros longevidade, reprodução e crescimento, além de tempo para a primeira prole e número total de postura.

Os resultados obtidos foram analisados conforme recomendação da EPA 821-R-02-013 (EPA, 2002). Foi realizada ANOVA, empregando o teste de Dunnett, quando o número de réplicas entre os grupos experimentais (controle e diluições) foi similar, e o teste Dunnett com ajuste de Bonferroni, quando o número de réplicas não foi o mesmo para todos os tratamentos, por meio do *software* Dunnett Program versão 1.5, considerando $p \leq 0,05$.

Paralelamente ao início dos testes crônico de recuperação,

foram realizados testes de sensibilidade dos filhotes de F1 e F12 utilizados para iniciar os ensaios. Foi utilizado com substância de referência o $K_2Cr_2O_7$.

3.4 AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DE *Daphnia magna*

Análises por microscopia de luz, MET e MEV foram realizadas com o objetivo de verificar possíveis alterações morfológicas causadas pela interação dos NB com a *D. magna*. Para ambos os organismos-teste, as análises microscópicas foram realizadas nos valores de CE_{50} de NBZnO, NBZnO@AF e $ZnSO_4$ e controle negativo. Os procedimentos para emblocamento das amostras foram realizados no Laboratório de Biologia Celular (LABCEV) do Departamento de Biologia da UFSC.

Foi realizada primeiramente a microscopia de luz, pois esta técnica demonstra uma análise previa da interação dos NB com as *D. magna*. Desta maneira, foi possível ter uma visão geral dos órgãos e tecidos dos organismos, facilitando o reconhecimento e a compreensão daquilo que seria visualizado pela microscopia eletrônica, uma técnica mais específica.

3.4.1 Procedimentos para microscopia de luz

O emblocamento do organismo-teste *D. magna* foi realizado conforme Ouriques; Schmidt; Bouzon, (2011).

As amostras biológicas foram previamente fixadas em solução de paraformaldeído 2,5% em tampão fosfato 0,2 M, pH 7,2 por 4 horas, à 4 °C. Após a fixação, as amostras foram lavadas com tampão fosfato por 10 minutos a cada troca, por 3 vezes.

Posteriormente, as amostras foram desidratadas em um gradiente crescente de etanol de 30% a 100%, sendo trocadas a cada 10 minutos, exceto o etanol 100%, que foi trocado duas vezes. As amostras foram então pré-infiltradas com uma solução 1:1 de etanol 100% e historesina, por 24 horas e logo após, foram infiltradas em historesina pura, também por 24 horas. A inclusão das amostras foi realizada em moldes poliméricos aonde um polimerizador foi adicionado a historesina. As amostras foram mantidas a 70 °C em estufa a vácuo por 24 horas.

Os blocos de amostras foram cortados em um micrótomo manual (LEICA RM 2135) com navalha de tungstênio a uma espessura de 5 μm . Os cortes foram colocados em lâminas de vidro e, após estarem secos, foram corados com azul de toluidina (AT-O) 0,5 %. Para a colocação da lamínula sobre as amostras, estas foram previamente imersas em bálsamo do Canadá.

A observação dos cortes foi realizada com auxílio de um microscópio de luz (LEICA MD 500) com sistema de captura de imagem com câmera digital (Opticam® LOPT14003 14.0 Mega Pixels, Opticam® Microscopy Technology, *software* OPTHD) do LABCEV-UFSC.

3.4.2 Procedimentos para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para a análise por MET (JEM-1011 MET-100KV), as amostras dos controles e tratamentos de *D. magna* foram fixadas em uma solução de glutaraldeído 4%, glutaraldeído 2,5%, tamponadas com cacodilato (CaCo) 0,1 M (pH 7,2).

As amostras foram lavadas em solução de CaCO 0,1M por 10 minutos a cada troca, por 3 vezes. Estas foram então pós fixadas com solução 1:1 de tetróxido de ósmio e CaCO 0,2M (pH 7.2) e então novamente lavadas em solução CaCO 0,1 M por 10 minutos a cada troca, por 3 vezes. Após a lavagem, as amostras foram desidratadas em uma série de concentrações crescentes de acetona (30% até 100%). Posterior à desidratação, o material foi infiltrado em uma solução sequencial crescente de acetona 100% e resina Spurr. A inclusão das amostras foi realizada em moldes poliméricos com 100% de resina Spurr e foram mantidos em estufa a 70 °C por 24 h.

As seções ultrafinas foram realizadas com o auxílio de um ultramicroton (LEICA EM-UC7) e contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo.

3.4.3 Procedimentos para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

O procedimento para o preparo de *D. magna* para observação no MEV (JEM-1101 MEV-80kV) foram idênticos ao utilizado para MET, com exceção de que as amostras foram

desidratadas em uma série crescente de etanol (de 30% a 70%) e secas sob ponto crítico (LEICA EM-DCP-030). As imagens de MEV e MET foram realizadas no LCME-UFSC.

3.5 TESTES DE TOXICIDADE COM *Aliivibrio fischeri*

Os testes de toxicidade com a bactéria marinha bioluminescente *A. fischeri* foram realizados conforme a norma NBR 15411 – parte 3, para testes de toxicidade utilizando bactérias liofilizadas (ABNT, 2012). Esta metodologia foi desenvolvida para a utilização no equipamento denominado Microtox[®]500. Para a realização dos testes foram utilizadas bactérias dos lotes 14K142F1 e 13F4067F10, provenientes da SDI[®], denominado Microtox Acute Reagent[®].

A temperatura do teste era controlada pelo equipamento, mantendo as diluições testadas em $15 \pm 1^\circ\text{C}$ e o reagente bacteriano em 3°C . A medição da intensidade luminosa emitida pelas bactérias é realizada no tempo zero antes da bactéria entrar em contato com a amostra e 15 minutos após o contato da bactéria com a amostra. As diluições utilizadas foram 80%, 50%, 33,33%, 25%, 16,67%, 12,50%, 8,33% e 6,25%.

Os parâmetros pH, oxigênio dissolvido e salinidade da amostra foram medidos antes do início dos testes para verificar se estão de acordo com o proposto pela NBR 15411 (ABNT, 2012).

A validação dos testes foi realizada por meio da realização prévia do teste sensibilidade com o lote de bactérias que foram utilizadas. Foi utilizada como substância de referência o $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ com concentração de $100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Para ser considerado válido a $\text{CE}_{50(15\text{min})}$ para o ZnSO_4 deve apresentar valores entre 3 e $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Os resultados dos testes foram determinados a partir da $\text{CE}_{50(15\text{min})}$ (valores correspondentes à concentração efetiva que causa inibição de 50% da luminescência das bactérias) sendo os cálculos realizados pelo *software* do próprio equipamento (Microtox Omni 4.0).

3.6 CITOTOXICIDADE COM N2A

3.6.1 Cultura Celular

Para os testes *in vitro* com NBZnO, NBZnO@AF e ZnSO₄ foram utilizadas células N2A provenientes da *American Type Culture* (ATCC® CCL-131™), sendo uma doação do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná e cultivadas no LABTOX-UFSC.

As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de soro de feto bovino (SBF), 2% de L-glutamina (200 mM), 1% de penicilina (50 µg.mL⁻¹) e estreptomicina (50 µg.mL⁻¹) e mantidas em incubadora à temperatura de 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂ (MATIAS; CREPPY, 1998; MELEGARI, 2010).

Os reagentes utilizados no cultivo celular foram todos provenientes da Sigma-Aldrich.

Todos os procedimentos para manutenção das culturas foram realizados em condições de esterilidade em câmara de fluxo laminar classe II, tipo A1, com lâmpada UV (VECO, São Paulo, BRA).

3.6.2 Teste de atividade mitocondrial (MTT)

Os testes de MTT foram realizados seguindo a metodologia proposta por Perreault et al., (2011) com algumas modificações.

A viabilidade celular das células N2A foi avaliada através da atividade mitocondrial pelo ensaio com o [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio] (MTT, Sigma-Aldrich), onde as células reduzem o MTT a cristais de formazan. Esta redução é proporcional a atividade mitocondrial e conseqüentemente a toxicidade.

Uma suspensão com concentração inicial de 1x10⁵ células.mL⁻¹ foi incubada em microplacas de 96 poços por 24 horas com o meio de cultura suplementado nas mesmas condições do cultivo (37 °C e 5% de CO₂).

Após esse período, as células foram expostas ao NBZnO, NBZnO@AF e ZnSO₄, nas concentrações 3,5, 6,25, 12,5, 25, 50 e 100 mg.L⁻¹ diluídos em meio de cultura suplementado por um

período de 24 horas a 37 °C e 5% de CO₂. Os testes foram realizados em triplicata e contou com grupo controle negativo.

Após o tempo de exposição, o meio contaminado foi retirado e foram adicionados 200 µL de solução MTT/RPMI 0,5 mg.mL⁻¹ preparada imediatamente antes do uso. As placas foram recobertas com papel alumínio para proteção contra incidência de luz e foram incubadas por 2 horas nas mesmas condições do cultivo.

Posteriormente, a solução foi removida e 200 µL de DMSO foram adicionados. As microplacas foram novamente envolvidas em papel alumínio e colocadas em uma mesa de agitação por 20 minutos. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância em uma leitora automática de microplacas (BIOTECK ELX-800) no comprimento de onda de 560 nm.

Os valores de absorbância das amostras foram normalizados e os valores serão expressos em porcentagem de viabilidade celular através da Equação (4):

$$VC (\%) = \frac{DO_{amostra} - DO_{max}}{DO_{max} - DO_{min}} \times 100 \quad (4)$$

Onde, DO_{max} é a absorbância do controle negativo; DO_{min} é a absorbância do controle positivo e $DO_{amostra}$ é a absorbância da amostra.

Os valores de CE50_(24h) foram calculados estatisticamente utilizando o programa GraphPad Prism 6.0.

3.6.3 Espécies reativas de oxigênio (EROs)

Os testes foram realizados de acordo com Liu; Wang, (2017) e Lu et al., (2017) com pequenas modificações.

Uma suspensão com concentração inicial de 1x10⁵ células.mL⁻¹ foi incubada em microplacas de 96 poços por 24 horas com o meio de cultura suplementado e mantida em incubadora à 37 °C e atmosfera com 5% de CO₂.

Após o período de incubação, as células expostas por 24 h ao valor de CE50 de NBZnO (32, 3,2 e 0,32 mg.L⁻¹), NBZnO@AF (13, 1,3 e 0,13 mg.L⁻¹) e ZnSO₄ (15, 1,5 e 0,15 mg.L⁻¹), além do controle negativo.

Após o período de exposição, o meio foi removido e as

células foram lavadas com PBS, para então serem suspendidas em 300 μL do corante H_2DCFDA 10 mM e incubadas durante 4h.

As células foram então lavadas novamente com PBS e suspensas em 200 μL de PBS para leitura da fluorescência. A fluorescência foi determinada utilizando um leitor de microplacas SpectraMax® Paradigm® (Molecular Device LCC, Califórnia - EUA) com excitação a 485 nm e emissão gravada a 530 nm com uma largura de banda de 20 nm.

Os testes foram realizados em triplicata. Os resultados foram analisados estatisticamente usando uma ANOVA com teste Tukey e $p \leq 0,05$ foi aceito diferença estatisticamente significativa. A análise da fluorescência foi realizada no Laboratório Multiusuários de Estudos em Biologia (LAMEB) do departamento de Biologia da UFSC.

3.6.4 Lipoperoxidação (MDA)

Os testes de quantificação do MDA foram realizados conforme Matias; Creppy, (1998) e Melegari et al., (2012).

As células foram incubadas com meio de cultura suplementado em microplacas de seis poços por 24h nas mesmas condições do cultivo (37°C e 5% de CO_2).

Após esse período, o meio foi removido e as células foram expostas ao meio RPMI suplementado contaminado com NBZNO, NBZnO@AF e ZnSO_4 . As concentrações utilizadas foram determinadas a partir dos resultados de $\text{CE}_{50(24\text{h})}$, sendo 32, 3,2 e 0,32 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para NBZnO, 13, 1,3 e 0,13 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para NBZnO@AF e 15, 1,5 e 0,15 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ para ZnSO_4 e controle negativo.

Após 24 h de incubação, as células foram recuperadas no meio para a dosagem do MDA. A suspensão celular foi centrifugada durante 5 minutos a 800g e 4 °C para retirada das células mortas. O meio sobrenadante foi eliminado, e as células foram suspendidas em 250 μL de tampão SET (NaCl 0,1M; EDTA 20mM; Tris-HCl 50mM, pH 8) e agitadas vigorosamente.

Uma alíquota de 25 μL da suspensão celular de todas as amostras e réplicas foi separada para dosagem de proteínas pelo método Bradford (BRADFORD, 1976).

Em 25 μL das amostras foram adicionados 975 μL do reativo Biorad® (Bio-Rad) diluído em água UP 1:4 (v/v). Após

homogeneização, a absorbância foi medida a 595 nm em um espectrofotômetro de absorção molecular (UV-Vis, modelo Spectro 3000W, Marte Científica). A curva de calibração foi construída com solução-padrão de albumina bovina (BSA) (Sigma-Aldrich).

Ao restante foram adicionados 25 μL de DSS 7%, 300 μL de HCl 0,1 N, 40 μL de ácido fosfotungstíco 1% e 300 μL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. Os tubos foram agitados em vortex, mantidos no escuro a 90°C durante 1 hora. Após este período, os tubos foram resfriados com banho de gelo durante 10 minutos ao abrigo de luz.

O complexo TBA-MDA formado foi extraído adicionando-se 600 μL de n-butanol. Após centrifugação por 10 minutos a 5000 g e temperatura 4°C, a fase butanólica contendo o complexo TBA-MDA foi retirada e o MDA foi quantificado por HPLC (1220 Infinity II LC, Agilent Technologies) (Coluna C-18, SB-Fenil de 5 μm de porosidade com injeção automática de 40 μL). A fase móvel isocrática utilizada foi uma mistura de metanol:água (4:6 v/v), pH 8,3, ajustado com KOH 0,5 M a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹.

Os resultados obtidos foram expressos em quantidade de MDA por mg de proteína. Os dados das curvas de calibração do MDA e da proteína podem ser verificados no Apêndice A1 e A2.

3.7 QUANTIFICAÇÃO IÔNICA NOS MEIOS-TESTE

A determinação da fração total de íons Zn disponíveis em meio ISO, M4, NaCl 2% e meio RPMI foi realizada por Espectrometria de Absorção com Chama (FAAS) (Varian SpectrAA 50B, Mulgrave Virginia, Australia) no Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA) do Departamento e Engenharia Sanitária e Ambiental da UFSC.

Alíquotas de 50 mL de soluções de amostra nos meios ISO, NaCl 2% e RPMI foram retiradas e acidificadas com HNO₃ (pH \leq 2). As amostras analisadas foram correspondentes aos valores de CE50 nos respectivos meios para tempos inicial e final dos testes.

3.8 PREPARO DAS MEMBRANAS

As membranas poliméricas preparadas e avaliadas nesta

tese foram preparadas na Rice University, no *Physico-Chemical Treatment Process Lab (Civil and Engineering Department)*, durante o período de estágio doutoral, período sanduíche, e no LABTOX-UFSC. Todos os reagentes utilizados possuíam grau de pureza analítica de no mínimo 98% e foram utilizados sem nenhum tratamento prévio. A Tabela 8 apresenta os reagentes utilizados no preparo das membranas. A água UP utilizada foi gerada por um sistema de purificação de água Mili-Q Advantage A10 (Milipore, EUA) e a água de osmose (OR) foi gerada por um sistema de purificação Permutation (RO0420).

Tabela 8. Reagentes utilizados no preparo das membranas.

Reagente	Teor	Sigla	Fórmula linear	Marca
Cloreto trimesol	98%	TMC	$C_6H_3(COCl)_3$	Sigma-Aldrich
m - fenilenodiamina	99%	MPD	$C_6H_4-1,3-(NH_2)_2$	Sigma-Aldrich
Polisulfona	Peso molecular ~35000	PSF	$[C_6H_4-4-C(CH_3)_2C_6H_4-4-OC_6H_4-4-SO_2C_6H_4-4-O]_n$	Sigma-Aldrich
n-Hexano	99%	-	C_6H_{14}	Fischer Chemical
Nanobastões de zinco e Nanobastões de zinco funcionalizados	-	NBZnO NBZnO@AF	-	LABTOX

3.8.1 Preparo da membrana suporte de PSF

As membranas de PSF foram preparadas a partir de soluções com 20% (m/v) do polímero em NMP, através do método de inversão de fases.

Foram adicionadas 1 g de polímero em 5 mL de NMP, deixado sob agitação constante e temperatura de 50 °C por um período de 24 horas. A solução foi vertida sobre uma placa de vidro e espalhada com auxílio um *doctor-blade* de aço inox equipado com escala micrométrica.

Imediatamente após o espalhamento da solução, a placa

de vidro com a solução foi imersa no banho de inversão de fases utilizando água OR, em temperatura ambiente, como não-solvente para a formação da membrana. Após a membrana soltar completamente da placa, elas foram transferidas para novo banho de água OR durante 10 minutos.

Após este período, as membranas foram retiradas da água e colocadas entre papel absorvente. As membranas foram secas em temperatura ambiente. Essas membranas foram utilizadas como suporte para o preparo do filme fino de PA contendo NBZnO@AF, resultando em uma membrana polimérica de filme fino.

3.8.2 Polimerização do filme fino de PA sobre a membrana suporte

O filme fino de PA sobre o suporte de PSF foi preparado pelo método de polimerização interfacial *in situ*, conforme metodologia descrita por Kim et al., (2000) com algumas modificações.

As membranas suportes foram expostas a uma solução aquosa contendo 2% (v/v) de MPD durante 5 minutos. O excesso de reagente foi removido auxílio de papel absorvente seguido por jatos de N₂ comprimido. O suporte foi então exposto, a uma solução orgânica (hexano) contendo 1% (m/v) de TMC (previamente sonicado durante 20 minutos em potência de 200 W) por 2 minutos. Após este período, a membrana foi lavada com hexano puro e deixada para secar a temperatura ambiente, resultando assim em membranas nanocompósitas de filme fino.

As membranas controle (MC) foram preparadas sem a presença de NM. Para as membranas com a presença de NM, o NBZnO@AF foi incorporado na solução aquosa, que foi sonicada a 200 W por 10 minutos, nas concentrações 0,25%, 0,5% e 1% de NBZnO@AF em relação a massa de PSF utilizada para preparar a membrana suporte.

Essas membranas foram denominadas MF025, MF050 e MF1, respectivamente.

Para a composição das membranas, foram utilizados apenas os NBZnO@AF. Esta escolha se deu pelo fato das características do NM. Sabe-se que NP que são comumente hidrofílicas, devem ser modificadas superficialmente para torná-las mais compatíveis com a fase orgânica (LAU et al., 2015).

Assim, a funcionalização de NM com grupos amina, pode melhorar a interação PA-NM (AMINI; JAHANSHAH; RAHIMPOUR, 2013; LAU et al., 2015), além aumentar sua hidrofiliçidade (VICENTINI et al., 2017).

Ou seja, foi escolhido o NM funcionalizado pois este auxilia nas propriedades estruturais da membrana bem como no seu desempenho na filtração, uma vez que o uso de materiais hidrofílicos na composição da membrana, podem melhorar a permeabilidade hidráulica, aumentar o fluxo permeado e auxiliar na redução ao *fouling*, sendo estes os resultados desejados.

3.9 CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

As caracterizações das membranas desenvolvidas foram realizadas nas dependências dos laboratórios da Rice University.

3.9.1 Espessura

A espessura das membranas foi aferida utilizando um micrômetro com precisão de 0,001 mm (DIGIMESS 110.260).

3.9.2 Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (MEV-FEG)

As análises de MEV-FEG foram realizadas utilizando o equipamento FEI QUANTA 400F acoplado com EDX, com o objetivo de verificar a superfície e a fratura das membranas e sua composição elementar. As amostras de membranas foram congeladas e quebradas em nitrogênio líquido. Pequenos pedaços de membranas foram fixados na parte superior e lateral de *stubs* de alumínio com auxílio de fita adesiva dupla face.

3.9.3 Ângulo de contato (AC)

A hidrofiliçidade das membranas foi determinada pela técnica de ângulo de contato, método da gota séssil. As amostras de membrana foram fixadas em lâminas de vidro com auxílio de fita adesiva dupla face. As lâminas foram colocadas na base do equipamento (KRUSS DSA 100) e uma gota de água OR de 0,1 mL foi colocada sobre a superfície das amostras com

auxílio de uma seringa acoplada ao equipamento. As medidas foram efetuadas em três pontos distintos de cada amostra e realizadas em temperatura ambiente. O ângulo foi calculado pelo software do próprio equipamento (*Advanced Drop Shep Software*).

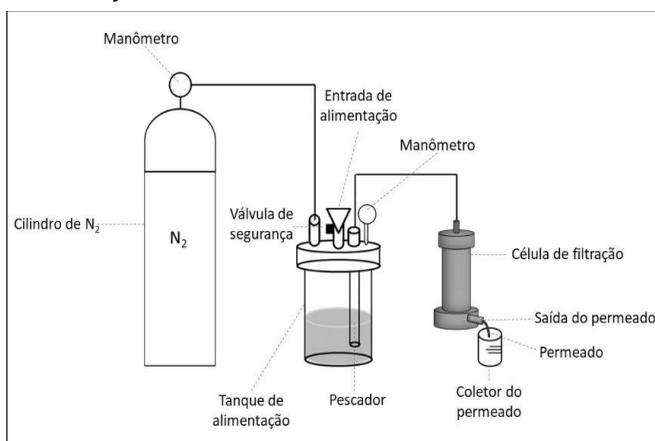
3.9.4 Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Com objetivo de identificar os grupos funcionais presentes nas membranas, as análises de FTIR foram realizados utilizando o equipamento NICOLET IS50-FTIR. A faixa de comprimento de onda utilizada foi de 400 a 4000 cm^{-1} , com uma resolução de 4 cm^{-1} .

3.10 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE FILTRAÇÃO

Previamente ao processo de filtração, as membranas foram imersas em etanol durante 60 minutos e então em água OR durante 24 h. Para as filtrações, em escala de bancada, foi utilizado uma célula de filtração de aço inox do tipo *dead-end*. O diagrama esquemático do processo do aparato experimental utilizado pode ser visualizado na Figura 7.

Figura 7. Diagrama esquemático do aparato experimental utilizado no processo de filtração.



Fonte: A autora.

As filtrações com a solução de alimentação tiveram duração de 60 minutos, avaliadas nas pressões 4, 6 e 8 bar em temperatura ambiente. N₂ gasoso foi utilizado como força motriz. Como solução de alimentação, foram utilizados os sais NaCl e MgCl₂, ambas as soluções com concentração de 2000 mg.L⁻¹. Os experimentos foram realizados em duplicata, em temperatura ambiente e pH neutro.

3.10.1 Compactação

A compactação prévia da membrana foi realizada com água OR a um gradiente de pressão de 10, 8, 6, 4 e 2 bar, até atingir fluxo constante. A etapa de compactação é necessária pois durante o processo de filtração, devido à pressão aplicada, pode ocorrer o adensamento da estrutura dos poros da membrana, resultando no declínio de fluxo, o que poderia ser atribuído erroneamente à polarização por concentração e ao *fouling*, causando discrepância dos resultados.

3.10.2 Permeabilidade hidráulica (P_m)

A P_m ((L.h.m²)/bar) das membranas foi determinada após o procedimento de compactação. A permeabilidade é dada pelo coeficiente angular obtido no ajuste linear dos valores de fluxo de permeado versus a variação da pressão, conforme a Equação 5:

$$P_m = J_w / \Delta P \quad (5)$$

Onde J_w é o fluxo de água pura (L/h.m²) e ΔP é a pressão (bar).

3.10.3 Fluxo do permeado

O fluxo permeado (J) representa a vazão do permeado por unidade de área, podendo ser volumétrica, mássica ou molar. Foram calculados os fluxos pela coleta de permeado com auxílio de um béquer de 50 mL por um determinado tempo (1 minuto) em intervalos de 5 minutos. O béquer foi pesado antes e depois da coleta do permeado em balança analítica (SHIMADZU

AUY220) (método por unidade de massa). O fluxo de permeado foi calculado com a Equação 6:

$$J = \frac{V}{\Delta t} \quad (6)$$

Onde V é o volume permeado obtido no tempo t e Δ é a área da membrana.

3.10.4 Eficiência de retenção

O coeficiente de retenção (R) representa a seletividade da membrana em função da retenção dos componentes das soluções. O coeficiente de retenção foi calculado pela Equação 7:

$$R (\%) = (1 - C_p/C_a) \times 100 \quad (7)$$

Onde C_p é a concentração do permeado e C_a é a concentração da solução de alimentação.

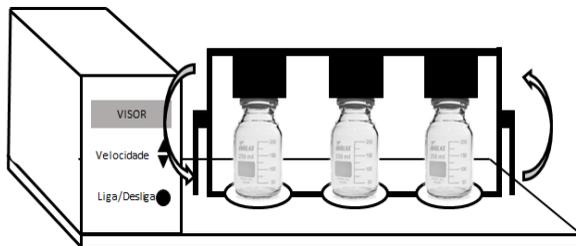
A eficiência quanto à remoção dos sais foi verificada por meio de medidas de condutividade elétrica ($\text{mS}\cdot\text{cm}^{-1}$), com auxílio de um condutivímetro (Thermo Electron Corporation, ORION 4STAR).

3.10.5 Liberação de íons da membrana

Com o objetivo de verificar se ocorreu a liberação de íons Zn das membranas MF025, MF050 e MF1, amostras de membranas de $10 \times 10 \text{ cm}^2$ foram adicionadas em 1000 mL de água UP e agitadas em equipamento lixiviador (Figura 8) durante 72h a 35 RPM (ABNT, 2004).

Alíquotas foram retiradas nos tempos 0, 12, 24, 48 e 72 h e acidificadas com HNO_3 puro até obter-se $\text{pH} \leq 2$ e analisadas por Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-OES) (Perkin Elmer Optima 7000). As análises de ICP-OES foram realizadas no Centro de Estudos do Mar (CEM) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

Figura 8. Representação esquemática do sistema de lixiviação.



Fonte: A autora.

3.10.6 Teste de toxicidade com a água de lixiviação das membranas

Concomitantemente ao teste de liberação de íons, foi realizado o teste de toxicidade aguda com a água de lixiviação das membranas utilizando o organismo *D. magna*, de acordo com a NBR 12713 (ABNT, 2016).

Alíquotas de 150 mL de água foram retiradas nos tempos 0, 12, 24, 48 e 72 h para realização de testes de toxicidade aguda. Os testes realizados contaram com os fatores de diluição da amostra de 0, 2, 4 e 8, sendo realizados em duplicata.

Posteriormente a avaliação dos resultados obtidos para o lixiviado em água UP, optou-se por realizar a lixiviação das membranas em meio ISO, para reavaliar a toxicidade no fator de diluição 0. Amostras de membranas de 10×10 cm² foram adicionadas em 1000 mL de meio ISO e agitadas em equipamento lixiviador durante 72h a 35 RPM (ABNT, 2004). Alíquotas de 150 mL de água de lixiviação foram retiradas nos tempos 0, 12, 24, 48 e 72h para realização de testes de toxicidade aguda. Realizou-se os testes em duplicata.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOBASTÕES

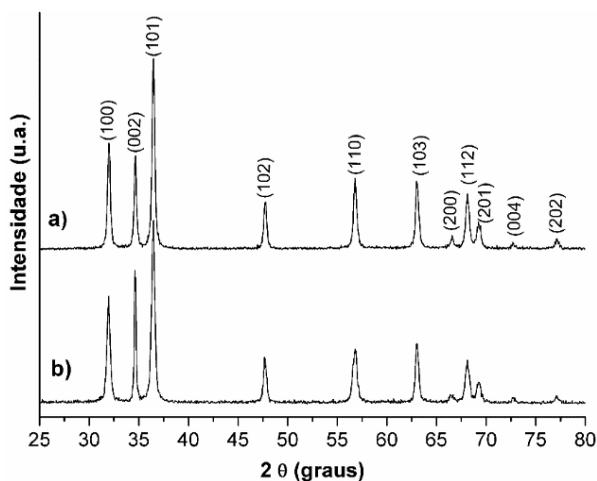
4.1.1 Difração de raios-X (DRX)

As análises de DRX (Figura 9) confirmaram que ambos NB utilizados apresentaram fase cristalina pura. Os picos de difração em 2θ para NB ZnO de $31,93^\circ$; $34,58^\circ$; $36,42^\circ$; $47,67^\circ$; $56,82^\circ$; $63,03^\circ$; $66,56^\circ$; $68,17^\circ$; $69,32^\circ$; $72,72^\circ$ e $77,12^\circ$ podem ser atribuídos aos planos cristalinos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004) e (202), respectivamente, sendo atribuídos a forma cristalina hexagonal (wurtzite) (JCPDS N° 36-1451).

Os NBZnO@AF também apresentaram forma hexagonal (wurtzite) com picos de difração em 2θ de $31,93^\circ$; $34,63^\circ$; $36,48^\circ$; $47,67^\circ$; $56,82^\circ$; $63,03^\circ$; $66,67^\circ$; $68,12^\circ$; $69,22^\circ$; $72,72^\circ$ e $77,07^\circ$ também atribuídos aos planos cristalinos (100), (002), (101), (102), (110), (103), (200), (112), (201), (004) e (202), respectivamente, conforme o banco de dados internacional (JCPDS N° 36-1451). Desta maneira, observa-se que a funcionalização do NB não alterou a estrutura cristalina dos NB.

O diâmetro médio do cristalito de ambos os NB, calculado utilizando a relação de Scherer (Equação 3, p. 61), foi de 33 nm.

Figura 9. Difratogramas de raios-X de (a) NBZnO e (b) NBZnO@AF.



4.1.2 Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

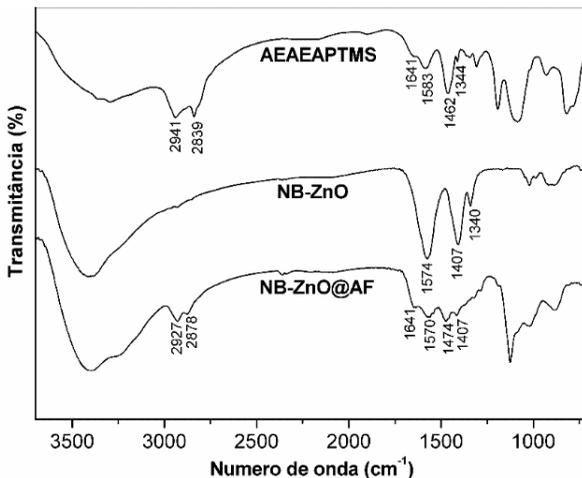
A funcionalização dos NB foi confirmada pela análise de FTIR (Figura 10).

O espectro de NBZnO@AF exibiu bandas características do agente funcionalizante AEAEATPMS e do NBZnO.

As principais bandas de absorção que caracterizam a funcionalização aparecem no número de onda de 2927 cm^{-1} e 2878 cm^{-1} e estão atribuídas aos estiramentos vibracionais assimétricos e simétricos do C-H alifático, o aparecimento do grupo funcional metileno no NBZnO@AF é um forte indicativo de que a molécula funcionalizante está ancorada na superfície da estrutura do NB ZnO, visto que o ZnO não possui carbono em sua estrutura.

As bandas presentes no número de onda 1641 cm^{-1} e 1570 cm^{-1} , bandas atribuídas às vibrações das deformações angulares simétricas no plano de N-H de amina primária indicando que a funcionalização do NM ocorre pelo lado da molécula silano e não pelo lado amina. O ombro na região de sobreposição de 1538 cm^{-1} corresponde à vibração axial de C-N de amina secundária e as bandas em 1474 cm^{-1} e 1407 cm^{-1} são correspondentes às vibrações da deformação angular simétrica C-H (YANG; LIU, 2011).

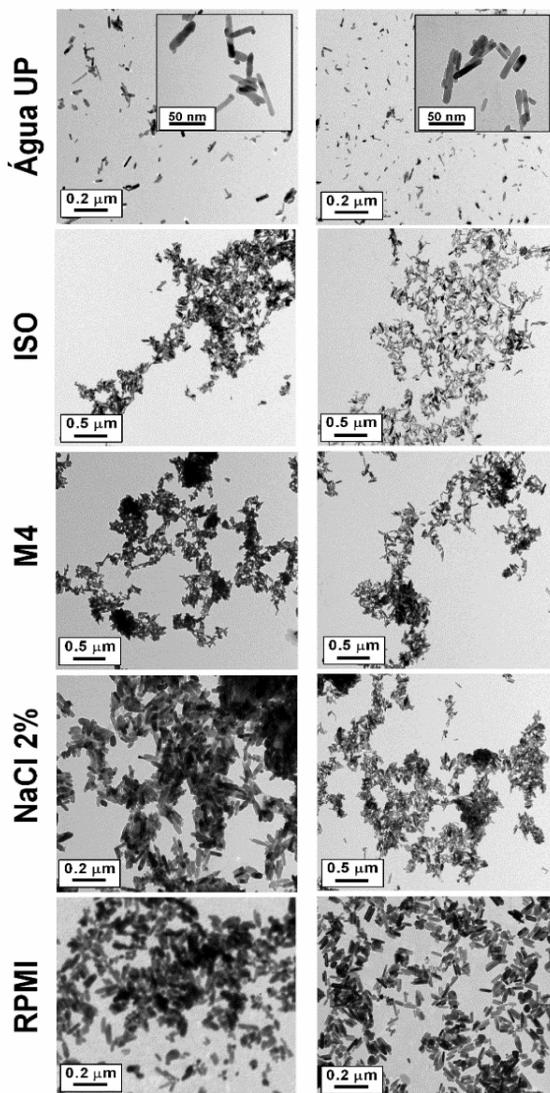
Figura 10. Espectros de FTIR do agente funcionalizante AEAEATPMS, do NBZnO e do NBZnO@AF.



4.1.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A caracterização morfológica dos NB por MET em todos os meios estudados pode ser verificada na Figura 11.

Figura 11. Imagens de MET de NBZnO (a esquerda) e NBZnO@AF (a direita) em todos os meios estudados.



As imagens de TEM confirmaram que os NBZnO e os NBZnO@AF estão em nanoescala e apresentam forma característica de bastão em sua maioria (Figura 10, Tabela 9).

Os diâmetros médios obtidos foram de 25 nm para NBZnO e 32 nm NBZnO@AF e comprimentos variando entre 40 e 200 nm. Valores similares de diâmetro e comprimento foram observados por Rajabi et al., (2015) que sintetizaram NB ZnO em seus estudos e obtiveram NM com diâmetro médio igual a 32 nm e comprimento médio de 200 nm.

As imagens de MET também permitiram visualizar um leve aumento no diâmetro de NBZnO@AF. Este aumento pode estar relacionado a funcionalização do NB. Comparando os NB dispersos em água UP e dispersos no meio ISO, M4, NaCl 2% e RPMI, observou-se a dispersão mais homogênea dos NB em água UP do que nos respectivos meios, havendo a formação de aglomerados micrométricos devido ao aumento da força iônica do meio M4 e NaCl 2% e a presença de aminoácidos, vitaminas e fosfatos no meio RPMI.

4.1.4 Área superficial (AS)

A AS de NBZnO foi de $13,98 \pm 3,53 \text{ m}^2/\text{g}$ e de $20,06 \pm 2,46 \text{ m}^2/\text{g}$ para NBZnO@AF (Tabela 9). Pode-se verificar que houve o aumento da área superficial dos NB após a funcionalização do material. Este aumento pode estar associado a funcionalização do NB, devido a uma alteração morfológica, aumentando sua porosidade.

Este aumento na área superficial de NP ZnO também foi observado por Chia; Leong, (2016) onde, na presença de revestimento de sílica, o tamanho NP ZnO aumentou 2,4 vezes em comparação com o ZnO NP sem o revestimento. Os autores associaram o aumento ao revestimento de sílica que seria capaz de revestir a NP e agrega-la em aglomerados ao invés de formar um revestimento individual específico. Nas imagens de MET (Figura 10) obtidas nessa pesquisa não foi possível observar mudanças superficiais visíveis no NBZnO@AF.

Resultados de AS similares aos obtidos nesta pesquisa foram observados por Mwaanga; Carraway; Van den Hurk, (2014), os autores verificaram que NP ZnO comercial com tamanho inferior a 100 nm possuem valor de área superficial igual a $19,1 \text{ m}^2/\text{g}$, e por Zeininger et al., (2015) que sintetizaram

NP ZnO em seus estudos e obtiveram valor de área superficial igual a 19,71 m²/g.

Tabela 9. Resumo das características físico-químicas de NBZnO e NBZnO@AF. Resultados expressos pela média ± desvio padrão (DP).

Amostra	% NM no formato de bastão ± DP	Área superficial (m ² /g) ± DP	Meio	pH ± DP	DH ± DP (nm)	Pz ± DP (mV)
NBZnO	51,42 ± 11,85	13,98 ± 3,53	UP H ₂ O	7,27 ± 0,12	267,87 ± 3,01	27,04 ± 2,52
			ISO	7,39 ± 0,21	351,78 ± 1,15	13,59 ± 1,98
			M4	7,30 ± 0,30	419,61 ± 9,58	8,46 ± 0,93
			NaCl 2%	7,58 ± 0,19	1017,15 ± 16,04	-10,68 ± 1,98
			RPMI	7,39 ± 0,02	350,45 ± 0,65	-13,33 ± 1,34
NBZnO@AF	69,26 ± 13,57	20,06 ± 2,46	UP H ₂ O	7,43 ± 0,03	244,49 ± 1,47	29,55 ± 2,86
			ISO	7,47 ± 0,25	3144,74 ± 8,44	20,80 ± 2,79
			M4	7,52 ± 0,17	943,85 ± 8,73	21,04 ± 2,97
			NaCl 2%	7,86 ± 0,03	2873,42 ± 14,58	-10,11 ± 3,16
			RPMI	7,54 ± 0,07	380,13 ± 7,47	-11,83 ± 3,63

4.1.5 Potencial zeta (Pz) e Diâmetro hidrodinâmico (DH)

De modo geral, ambos os NB possuem maior estabilidade na água UP, 27,04 ± 2,52 mV e 29,55 ± 2,86 mV para NBZnO e NBZnO@AF respectivamente e tendem a perder estabilidade em contato com os diferentes meios estudados (Tabela 9). De acordo com Malvern, (2004) as partículas são consideradas estáveis quando apresentam Pz próximos a +/- 30 mV.

NBZnO@AF demonstrou ser mais estável em todos os meios estudados do que NBZnO, exceto quando os NB foram dispersos em meio NaCl 2%. Já o DH aumentou para ambos os NB conforme o aumento da força iônica do meio em que foram dispersos. O valor de pH dos NB diluídos em água UP aumentou. Este comportamento pode ser atribuído à amino-funcionalização na superfície do NM que promove uma maior interação entre as superfícies NM e o meio (VICENTINI et al., 2017).

Foi observada a mudança da carga de Pz para uma carga negativa quando ambos os NB são dissolvidos no meio de NaCl 2% e RPMI. A mesma característica foi observada por Seo et al., (2014) que verificaram a alteração da carga de Pz de NP ZnO de +1,7 ± 0,03 em água moderadamente dura para -8,1 ± 0,02 em meios de água dura, associando essa mudança à aumento da

força iônica do meio. Para o meio RPMI, a mudança de carga foi observada por Hsiao; Huang, (2013) após a exposição das NP ao meio DMEM suplementado com 5% de SFB, chegando próximo ao ponto zero (de 22 mV para -10 mV), valores similares aos obtidos nesta pesquisa.

Zhang et al., (2008), estudaram NP óxidos metálicos e concluíram que a mudança de carga ocorre devido aos grupos aniônicos funcionais com carga negativa, que podem adsorver na superfície da NP e fornecer carga negativa para a partícula, independentemente de as partículas terem, originalmente, superfícies de carga positivas ou negativas.

Han et al., (2014) e Bian et al., (2011) também observaram redução do Pz com o aumento da força iônica. Bian et al., (2011) aplicaram a teoria de Derjaguin, Landau, Verveij e Overbeek (DLVO) aos resultados obtidos e observaram que a energia elétrica repelente de dupla camada (EDL) de NP ZnO diminuiu com a concentração crescente de NaCl resultando em uma força de interação do ponto zero acima de 0,04 M. Nestas condições, as NP ZnO começam a sedimentar e alta força iônica resulta na compressão da EDL e, posteriormente, diminui as forças repulsivas de EDL, de modo que diminui a barreira de energia repulsiva entre partículas de ZnO.

Baalousha et al., (2013) mostraram que a presença de cátions bivalentes, como Ca^{2+} e Mg^{2+} , em meios aquosos, ambos presentes no meio ISO e M4, causam maior aglomeração de NP do que cátions monovalentes, ambos corroborando com este estudo.

4.1.6 Quantificação iônica

A quantificação da fração livre de íons Zn (Tabela 10) foi avaliada meios ISO, NaCl 2% e RPMI. Estes valores correspondem a quantidade de íons Zn presentes em uma solução com a concentração equivalente a CE50 obtidas nos testes de toxicidade, para os respectivos meios-teste.

De maneira geral, todas as amostras apresentaram valores similares de fração livre de íons Zn em meio ISO. No entanto, NBZnO@AF liberou mais íons Zn do que NBZnO.

Também pode-se observar que em todas as amostras houve a diminuição da liberação íons Zn após 48h. Esta

diminuição não foi significativamente diferente ($p < 0,05$) exceto para $ZnSO_4$.

Tabela 10. Quantificação da fração livre de íons Zn em relação aos valores obtidos de CE_{50} nos meios estudados.

Meio	Amostra	Fração livre íons Zn (mg/L)		Valores de CE_{50} ($mg \cdot L^{-1}$)
		0 h	48 h	48 h
ISO	NBZnO	0,49 ± 0,01	0,38 ± 0,03	2,81 ± 0,95
	NBZnO@AF	0,62 ± 0,02	0,55 ± 0,01	2,21 ± 0,50
	ZnSO ₄	0,72 ± 0,01	0,59 ± 0,02	5,49 ± 1,70
NaCl2%		0 h	15 min	15 min
	NBZnO	0,32 ± 0,03	0,28 ± 0,01	14,90 ± 3,20
	NBZnO@AF	0,40 ± 0,05	0,33 ± 0,01	34,13 ± 5,07
	ZnSO ₄	0,29 ± 0,02	0,22 ± 0,08	4,90 ± 1,29
RPMI		0 min	24 h	24 h
	NBZnO	0,40 ± 0,06	0,35 ± 0,02	32,04 ± 2,50
	NBZnO@AF	0,45 ± 0,03	0,39 ± 0,01	13,09 ± 1,35
	ZnSO ₄	0,32 ± 0,02	0,21 ± 0,05	15,44 ± 0,98

Esta ligeira variação dos resultados obtidos nos tempos iniciais e finais, bem como entre os meios estudados ocorre pois a dissolução e a aglomeração dos NM são influenciadas pelas características do NM (forma, tamanho, revestimentos) e também pela característica do meio (pH, força iônica, dureza, matéria orgânica dissolvida, teor de oxigênio na água, temperatura e luminosidade) (ADAM et al., 2015; CUPI; HARTMANN; BAUN, 2016; HAN et al., 2014; HEINLAAN et al., 2008; ODZAK; KISTLER; SIGG, 2017; SEO et al., 2017; WANG et al., 2016).

Seo et al., (2014) compararam o comportamento de NP ZnO em diferentes meios de teste para *D. magna* e observaram que a quantidade íons Zn^{+2} dissolvidos foi mais elevada em meio ISO, corroborando com os resultados obtidos.

De acordo com Wang et al., (2016), as taxas de dissolução de NP ZnO aumentam significativamente na presença de agentes quelantes fortes, sugerindo que a toxicidade deve estar

relacionada principalmente com os íons Zn liberados do que com a NP em si.

Leung et al., (2012) estudaram a atividade antibacteriana da NP ZnO funcionalizadas com diferentes reagentes à base de moléculas silano e observaram um aumento significativo na liberação de íons Zn^{+2} das NP revestidas com dodeciltriclorosilano e a redução na liberação de íons Zn^{+2} nas NP ZnO modificadas com a molécula (3-aminopropil) trimetoxisilano. Os autores concluíram que a NP ZnO não teve um papel específico na liberação de íons em meio aquoso e essa característica é dependente da interação das propriedades da partícula e das propriedades do meio (HUYNH; CHEN, 2011; LEUNG et al., 2012; ODZAK; KISTLER; SIGG, 2017; WANG et al., 2016), corroborando com os resultados obtidos.

A dissolução de NP ZnO em meio de cultura celular está associada com a presença de proteínas e outros ligantes menores no meio (SOBEL; THEOPHALL, 2010). Os valores da fração de íons Zn livres no meio de cultura celular obtidos nesta pesquisa, corroboram com os valores obtidos por Uski et al., (2017) que obteve valores de 0,5 a 5 mg.L⁻¹.

4.2 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS NANOBASTÕES

4.2.1 Toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Os resultados dos testes de toxicidade aguda com *D. magna* estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11. Resultados dos testes de toxicidade aguda do NBZnO, NBZnO@AF e ZnSO₄ utilizando o organismo-teste *D. magna* (n = 16).

Amostra	pH	CE50 _(48h) (mg.L ⁻¹)
Controle negativo (Meio ISO)	7,15 ± 0,25	NT
NBZnO	7,39 ± 0,21	2,81 ± 0,95
NBZnO@AF	7,47 ± 0,25	2,21 ± 0,50*
ZnSO ₄	6,95 ± 0,59	5,49 ± 1,70

NT = não tóxico. * = diferente significativamente em relação ao NBZnO.

Para o controle negativo, em todos os testes realizados, a mortalidade permaneceu dentro do ideal ($\leq 10\%$) preconizado

pela norma seguida e validando o resultado dos testes. A confiabilidade dos resultados pode ser verificada por meio da carta-controle de sensibilidade (Anexo 1).

O pH (Tabela 11) de todas as amostras mantiveram-se dentro dos valores aceitáveis para *D. magna* de acordo com a NBR 12713 (ABNT, 2016).

NBZnO@AF demonstrou-se mais tóxico para *D. magna* do que NBZnO ($p \leq 0,05$), entretanto, ambos foram mais tóxicos quando comparados ao $ZnSO_4$. Estes resultados indicam que a toxicidade dos NB ZnO não se limita à liberação de íons Zn no meio, mas pode estar associada a outros mecanismos do NM devido ao seu tamanho reduzido, como o tamanho hidrodinâmico e a área superficial.

O tamanho reduzido dos NM aumenta sua área superficial, sua reatividade e a presença de íons positivos em sua superfície. Estas alterações afetam a interação e o comportamento entre os NM e as biomoléculas permitindo estes que sejam capazes de penetrar nas células (LOPES et al., 2014; SANTO et al., 2014).

O aumento da concentração local de íons Zn^{2+} , proveniente da liberação pelos NM, interrompe a homeostase de cátions metálicos no interior das células, resultando em citotoxicidade devido à interação com organelas oxidativas que estimulam a produção de EROs (NEL et al., 2006), dano mitocondrial (BACCHETTA et al., 2016) e morte celular (SANTO et al., 2014) mesmo em exposições agudas a NP ZnO (BACCHETTA et al., 2016; NEL et al., 2006; SANTO et al., 2014).

A maior toxicidade de NBZNO@AF para *D. magna* em comparação com o NBZnO, pode estar associado às características físico-químicas do NBZnO@AF que apresentou maior área superficial, estabilidade no meio ISO e menor diâmetro hidrodinâmico, além de maior liberação de íons Zn (Tabela 9) do que NBZnO, e como já visto, estas características podem facilitar a sua interação com o organismo e aumento da toxicidade (LOPES et al., 2014; SANTO et al., 2014).

Sabella et al., (2014) explicam que a adição de uma molécula orgânica na superfície do NM, além de aumentar a sua área superficial, pode facilitar a absorção e internalização do NM na célula através o "efeito cavalo de Tróia".

A presença de grupos amina (a molécula utilizada na funcionalização superficial da NB utilizado nesta pesquisa possui aminas primárias e secundárias) no NB facilita a internalização

do NM nas células devido ao caráter mais hidrofílico da molécula, contribuindo para o aumento dos efeitos tóxicos do NM funcionalizado (VICENTINI et al., 2017).

O estudo de Blinova et al., (2010) obtiveram $CE50_{(48h)}$ igual a $2,6 \text{ mg.L}^{-1}$ para *D. magna* para NP ZnO com tamanho de 70 nm. Santo et al., (2014), estudando a toxicidade ZnO NP menores que 100 nm no organismo *D. magna* obteve uma $CE50_{(48h)}$ de $3,1 \text{ mg.L}^{-1}$. Em Heinlaan et al., (2008) a $CE50_{(48h)}$ de NP ZnO com tamanhos entre 50 a 70 nm foi igual a $3,1 \text{ mg.L}^{-1}$ para *D. magna*. Já Seo et al., (2014) obtiveram $CE50_{(48h)}$ de $3,12 \text{ mg.L}^{-1}$, estudando NP ZnO em *D. magna* com testes realizados em meio ISO.

Estes estudos obtiveram valores de CE50 semelhantes obtidos nesta pesquisa, corroborando com os resultados encontrados. Contudo, a forma de bastão de ZnO apresentou-se mais tóxica do que a forma NP, demonstrando a importância de estudar as diferentes formas de NM ZnO para uma melhor compreensão das interações e os efeitos destes materiais *in vivo*.

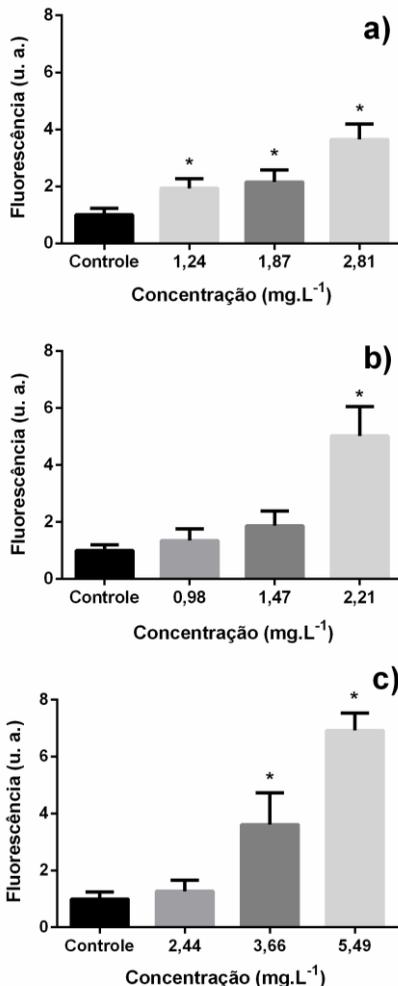
A maior toxicidade de NM ZnO na forma de NB pode estar relacionada ao fato de que os NM estudados nesta pesquisa, apresentaram maior área superficial quando comparados as NP ZnO citados na literatura, assim, devido a maior área superficial, os NB tornam-se mais reativos e suscetíveis a causar toxicidade aos organismos (SANTO et al., 2014).

4.2.2 Espécies reativas de oxigênio (EROs) em *Daphnia magna*

A geração de EROs foi analisada em *D. magna* expostas aos NBZnO, NBZnO@AF e ZnSO_4 e controle negativo por 48 h utilizando o corante H_2DCFDA . As concentrações testadas foram baseadas no $CE50_{(48h)}$ de cada material. A maior concentração testada corresponde à $CE50_{(48h)}$.

Todos os materiais foram capazes de causar a geração de EROs em *D. magna* (Figura 12) e foi observado o aumento na geração de EROS com o aumento da concentração testada. Os resultados na concentração da $CE50_{(48h)}$ de NBZnO, NBZnO@AF e ZnSO_4 foram significativamente diferentes do controle ($p < 0,05$).

Figura 12. Geração de EROs em *D. magna* para (a) NBZnO, (b) NBZnO@AF e (c) ZnSO₄. As maiores concentrações correspondem aos valores de CE50_(48h) obtidas nos testes agudos para cada amostra. * = diferente significativamente em comparação ao controle ($p < 0,05$).



D. magna expostas ao NBZnO@AF (Figura 12b) demonstraram maior geração de EROs na concentração correspondente a CE50_(48h) do que os organismos expostos ao NBZnO ($p < 0,05$). Este resultado se deve ao aumento da área

superficial do NM, originando mais sítios ativos para a produção de EROs (SHU et al., 2017) e também pela carga positiva da superfície do material, pois esta propriedade também influencia na geração de EROs (NASSER et al., 2016).

Nasser et al., (2016) investigaram a geração EROs de formas esféricas e bastões de NM de ouro, positivamente e negativamente carregadas. Os autores observaram que os bastões carregados positivamente induziram um alto grau de geração de EROs em *D. magna* quando comparado a esferas com carga negativa devido a maior interação do NM com as biomoléculas. Além disso, os organismos não conseguiram se recuperar completamente do estresse quando expostos aos bastões carregados positivamente. A incapacidade de recuperação foi atribuída ao aumento área superficial do NM e a superficial carga positiva dos NM induzindo geração de EROs, elevando sua toxicidade (NASSER et al., 2016).

Dominguez et al., (2015) também observaram a maior produção de EROs em *D. magna* expostas a NP de ouro carregadas positivamente, corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Desta maneira, é possível observar que a geração de EROs e alterações bioquímicas no organismo *D. magna* expostos a NP ZnO podem ocorrer mesmo quando estes organismos são expostos a concentrações subletais (MWAANGA; CARRAWAY; VAN DEN HURK, 2014).

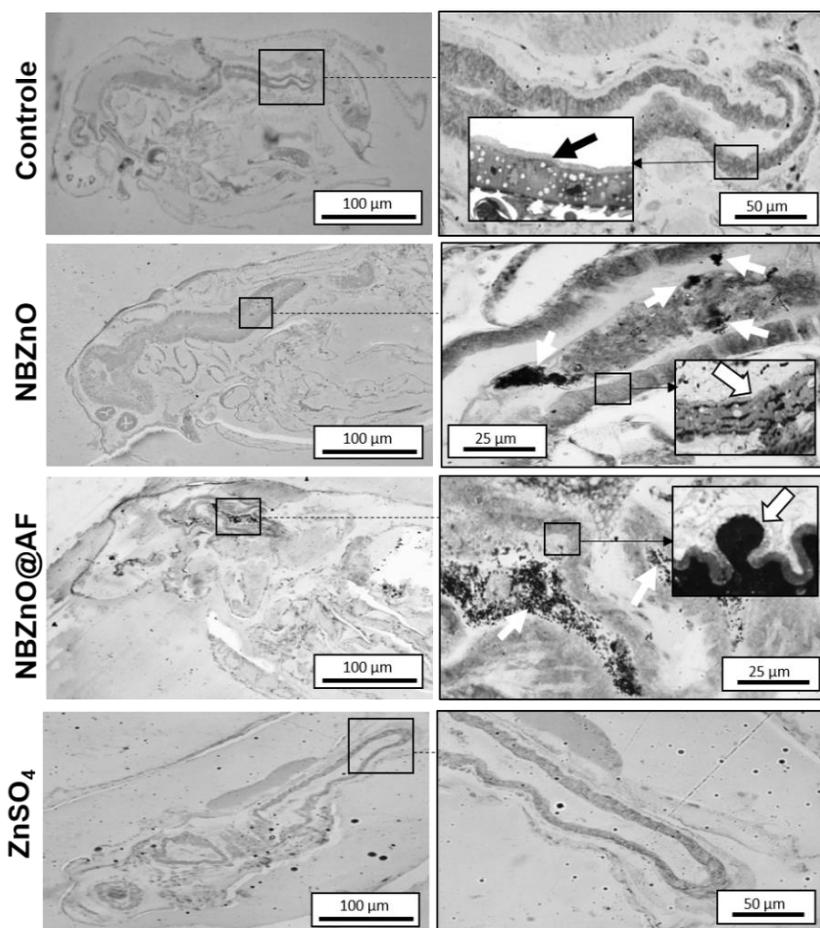
O equilíbrio entre EROs e os antioxidantes é essencial para a sobrevivência e a saúde dos organismos. Altos níveis EROs indicam a ocorrência de estresse oxidativo no interior celular que podem levar ao dano celular, afetando os lipídios, os carboidratos, as proteínas, a transcrição de genes do DNA, entre outros, levando à morte celular por necrose ou apoptose (FLORA, 2009), podendo, em última instancia, afetar a estabilidade do ecossistema (MWAANGA; CARRAWAY; VAN DEN HURK, 2014).

4.2.3 Análise microscópica de *Daphnia magna*

As imagens por microscopia de luz apresentam o corte transversal de *D. magna* após 48 horas de exposição à CE50 das amostras e o controle negativo (Figura 13). As micrografias

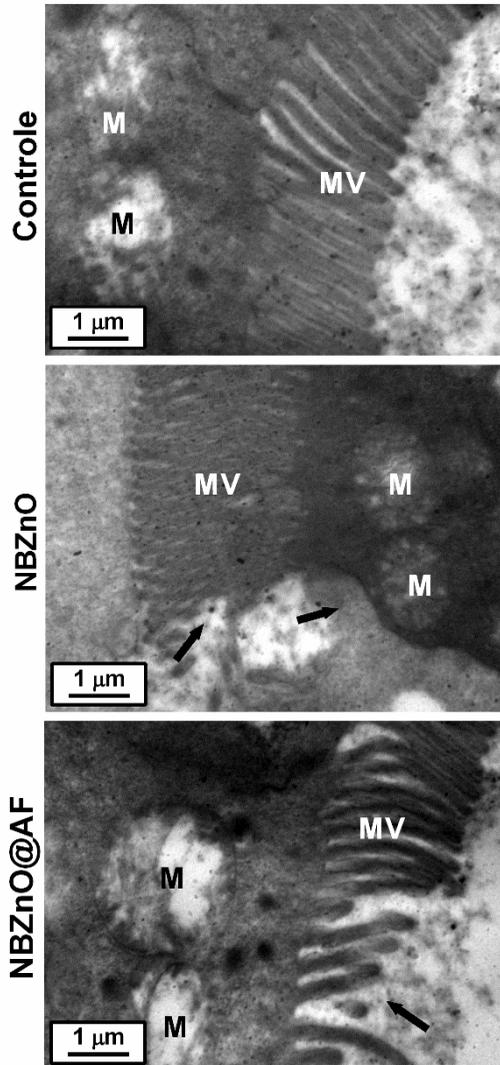
demonstram a presença de ambos os NB no do interior do intestino de *D. magna* e a ausência de alimento no interior do intestino dos organismos do controle negativo e expostos ao $ZnSO_4$.

Figura 13. Cortes transversais de *D. magna* do controle e expostas a $CE50_{(48h)}$ de NBZnO, NBZnO@AF e $ZnSO_4$ por microscopia de luz. As setas pretas indicam as microvilosidades do intestino em condições normais. Setas brancas com bordas pretas indicam as microvilosidades do intestino danificadas. Setas brancas indicam NM no interior do intestino.



As micrografias de MET apresentam o corte transversal de *D. magna* após 48 h de exposição à CE50 das amostras e o controle negativo (Figura 14).

Figura 14. Cortes transversais do intestino de *D. magna* do controle e expostas a CE50_(48h) de NBZnO e NBZnO@AF analisados por MET. MV = microvilosidades; M= mitocôndria. As setas pretas indicam danos nas microvilosidades do intestino.



Na análise por MET não foi possível observar a presença do NM no interior do intestino de *D. magna* ou sua internalização em organelas. Porém, foi possível observar a deformação das microvilosidades intestinais dos organismos expostos aos NB quando comparados ao controle e aos organismos expostos ao $ZnSO_4$, corroborando com os resultados obtidos na microscopia de luz.

A não visualização de NM no interior do intestino e/ou possíveis alterações morfológicas nas organelas celulares, não necessariamente significa que estes danos não ocorreram pois, não foi possível uma análise minuciosa dos cortes, uma vez que houveram problemas técnicos no preparo das amostras. Os blocos tornaram-se quebradiços exatamente no local aonde encontrava-se os organismos, formando dentes na navalha e prejudicando a visualização dos cortes. Este problema pode ter ocorrido devido a alguns fatores, tais como, a presença da carapaça de quitina do organismo, a presença de material metálico nas amostras, o uso de uma resina não tão adequada ao material processado e/ou tempo de infiltração na resina. A observação de NM no interior do intestino de *D. magna* e dano mitocondrial foram observados nos estudos de Rossetto et al., (2014b) e Puerari et al., (2016) que avaliaram a toxicidade de NP CuO e NP Cr_3O_2 , respectivamente. E também nos estudos de Santo et al., (2014) Bacchetta et al., (2016) e Bacchetta et al., (2017) que estudaram a toxicidade de NP ZnO em *D. magna*.

O dano ocorrido nas microvilosidades intestinais pode ser ocasionado pelo acúmulo de NM no interior do intestino dos organismos e/ou por um aumento no tempo de contato entre as NP e as células epiteliais intestinais. Essas microvilosidades são estruturas especializadas da membrana celular que tem como função o aumento da absorção de nutrientes.

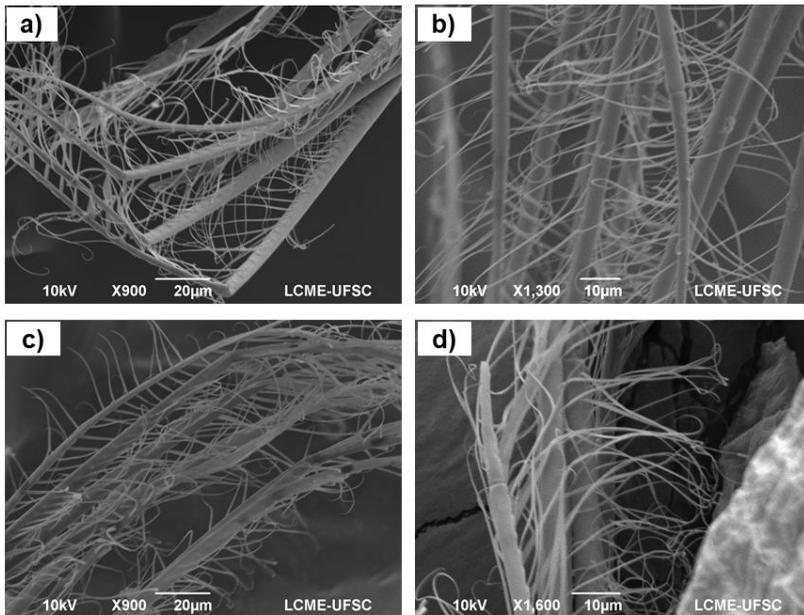
Assim, as alterações nesta estrutura podem levar a uma deficiência na quantidade de micronutrientes absorvida pelo organismo, interferindo no seu metabolismo (YANG, X.Y.; EDELMANN, R.E.; ORIS, 2010), contribuindo na toxicidade do NM.

A análise realizada por MEV (Figura 15) para as *D. magna* expostas as amostras não apresentaram alterações morfológicas externas visuais após 48 h de exposição a CE50, quando comparadas ao controle.

As daphnias expostas as amostras foram analisadas por

EDS, porém, não foi observado a presença de Zn na superfície dos organismos. Estes resultados indicam que a toxicidade aguda do NM, além da liberação de íons pelo NM no meio, tem decorrência na sua ingestão, quando estes NM passam a ter maior contato com órgãos internos dos organismos, podendo haver a liberação de íons diretamente no interior do organismo.

Figura 15. Micrografias por MEV de *D. magna* do (a) controle e expostas à CE50_(48h) de (b) ZnSO₄, (c) NBZnO e (d) NBZnO@AF. As imagens referem-se aos filamentos das antenas de *D. magna*.



4.2.4 Toxicidade crônica com *Daphnia magna*

Para o teste crônico F0, as concentrações avaliadas tiveram base nos valores de CE50 de NBZnO, NBZnO@AF e ZnSO₄ após 48h de exposição de *D. magna*, além do controle negativo.

Após 21 dias de exposição, os parâmetros de reprodução, crescimento e longevidade foram analisados e foram comparados com o grupo controle (Tabela 12).

A tabela completa com os dados do teste crônico pode ser observada no Apêndice 1.

Tabela 12. Resultados de toxicidade crônica (F0) para *D. magna* expostas ao NBZnO, ao NBZnO@AF e ao ZnSO₄ (n=10).

Amostra	Concentração (mg.L ⁻¹)	Reprodução	Crescimento (mm)	Longevidade (%)
NBZnO	Controle	8,46 ± 1,57	5,04 ± 0,18	90
	0,12	8,66 ± 1,87	5,06 ± 0,08	70
	0,19	9,63 ± 1,57	5,06 ± 0,09	80* ^b
	0,29	8,49 ± 1,49	5,03 ± 0,06	30* ^a
	0,44	9,45 ± 2,27	5,03 ± 0,06	30*
	0,65	9,90 ± 1,40	5,00 ± 0,00	10*
	0,98	8,50 ± 1,90	5,12 ± 0,08	50
NBZnO@AF	Controle	8,46 ± 1,57	5,04 ± 0,18	90
	0,12	7,97 ± 1,17	5,08 ± 0,10	60 ^b
	0,19	7,54 ± 0,59	5,02 ± 0,22	40* ^a
	0,29	7,72 ± 0,69	5,05 ± 0,06	40*
	0,44	7,57 ± 1,54* ^b	5,05 ± 0,07* ^b	20*
	0,65	6,78 ± 0,19*	0	0
	0,98	5,30 ± 1,25* ^a	3,18 ± 0,21* ^a	40*
ZnSO ₄	Controle	8,46 ± 1,57	5,04 ± 0,18	90
	0,29	7,12 ± 0,64* ^b	4,70 ± 0,37* ^a	90
	0,44	5,20 ± 1,20* ^a	4,71 ± 0,35*	80
	0,65	6,23 ± 1,29*	4,88 ± 0,20* ^b	100
	0,98	5,04 ± 1,42*	4,16 ± 0,22*	80

* = diferença significativa (p < 0,05) em relação controle. a = CEO. b = CENO.

Durante os 21 dias de teste, houve a mortalidade de apenas um organismo no grupo controle, este valor está dentro do limite de 10% de mortalidade para o controle aceitos de acordo com a norma utilizada, validando os resultados obtidos.

Para o parâmetro reprodução, o início do período reprodutivo dos organismos expostos as amostras estudadas não diferiram do grupo controle, ocorrendo a primeira postura no 10^o dia de teste, indicando que não houveram efeitos sob o início da reprodução.

O número médio de neonatos nascidos de daphnias expostas ao NBZnO não apresentou diferença significativa em relação ao controle (p > 0,05). Já para NBZnO@AF foi observado uma diminuição significativa na reprodução nas maiores

concentrações testadas (0,65 e 0,98 mg.L⁻¹), sendo a CEO igual a 0,98 mg.L⁻¹ e a CENO igual a 0,44 mg.L⁻¹. Pode ser observado a diminuição do número de neonatos conforme o aumento da concentração testada.

Para o controle positivo (ZnSO₄) houve uma diminuição significativa na reprodução nas concentrações 0,44, 0,65 e 0,98 mg.L⁻¹, sendo a CEO igual a 0,44 mg.L⁻¹ e a CENO igual a 0,29 mg.L⁻¹, indicando que os íons Zn são mais tóxicos do que ambos NB para o parâmetro reprodução em *D. magna*. O número médio de neonatos também diminuiu conforme o aumento da concentração de exposição de ZnSO₄.

Estes resultados diferem dos resultados obtidos por Bacchetta et al., (2017). Os autores observaram, para o parâmetro de reprodução, que as NP ZnO foram mais tóxicas para *D. magna* do que ZnSO₄, mesmo havendo uma maior concentração de íons Zn em solução na amostra ZnSO₄.

A diferença na toxicidade dos NM podem estar relacionadas ao procedimento de síntese dos NM, visto que o método de síntese influencia nas propriedades superficiais do NM, alterando sua toxicidade (HAN et al., 2014), e também pela diferença nas concentrações de cátions do meio de teste (LOPES et al., 2014).

De acordo com Poynton et al., (2011), o ZnSO₄ afeta a expressão de genes relacionados à reprodução, bem como as NP ZnO, havendo potencial de causar deficiência reprodutiva nas daphnias. No entanto, ZnSO₄ e NP ZnO afetam diferentes perfis de expressão gênica, sugerindo um mecanismo distinto de toxicidade para ZnO NP e íons Zn.

Em relação ao parâmetro crescimento, para todas as concentrações testadas de NBZnO, não houve diferença significativa em relação ao controle após 21 dias de exposição ($p > 0,05$). Já para NBZnO@AF, a CEO foi de 0,98 mg.L⁻¹ e a CENO foi de 0,44 mg.L⁻¹. Para ambos os NB não foram observadas alterações morfológicas visuais na carapaça dos organismos.

Os efeitos de NP ZnO para *D. magna* estão relacionados a possibilidade do NM transportar uma quantidade elevada de íons para dentro célula. Esta exposição é capaz de causar danos mitocondriais e conseqüentemente afetar a reprodução e o crescimento dos organismos *D. magna* (BACCHETTA et al., 2017). NP ZnO também podem expressar efeitos nos genes

envolvidos na respiração celular e na reprodução como demonstrado por Poynton et al., (2011). Poynton et al., (2012) observaram que NP ZnO desregulam genes envolvidos no metabolismo celular, como a arginina quinase e o citocromo oxidase, impedindo a capacidade celular de responder às mudanças energéticas necessárias, levando ao estresse do organismo, além de causar a repressão de genes envolvidos na reprodução levando a uma deficiência reprodutiva.

Para ZnSO₄, foi observada uma redução significativa no crescimento nas concentrações de 0,29, 0,44 e 0,98 mg.L⁻¹. A CEO foi de 0,29 mg.L⁻¹ e a CENO foi de 0,65 mg.L⁻¹ e foram observadas deformações na carapaça e encurtamento do espinho apical dos organismos para todas as concentrações testadas. Estes resultados indicam que os íons Zn são mais tóxicos também para o parâmetro crescimento em *D. magna*.

Essa redução do crescimento dos organismos quando expostos ao ZnSO₄ relaciona-se as interações dos íons Zn com o organismo. De acordo com Muysen; Janssen, (2001), o organismo *D. magna* é capaz de regular concentrações de Zn até 0,6 mg Zn.L⁻¹. Em concentrações mais elevadas, o Zn inibe a absorção de Ca, resultando em hipocalcemia e morte dos organismos. No entanto, em concentrações subletais de Zn, a depleção de Ca⁺ diminuem os movimentos e as taxas de filtração das daphnias, levando a uma diminuição na absorção de alimentos. Desta forma, há menos energia disponível para permitir taxas normais de crescimento e reprodução, causando alteração nestes parâmetros (MUYSEN; JANSSEN, 2001).

Em relação ao parâmetro de longevidade, foi observada uma redução significativa da longevidade dos organismos expostos ao NBZnO nas concentrações de 0,29, 0,44 e 0,65 mg.L⁻¹ em comparação ao controle. Para NBZnO a CEO foi de 0,29 mg.L⁻¹ e a CENO foi de 0,19 mg.L⁻¹. Já para o NBZnO@AF, foi observada uma diminuição significativa da longevidade aos organismos expostos as concentrações de 0,19, 0,29 e 0,44 mg.L⁻¹ e a CEO foi de 0,19 mg.L⁻¹ e a CENO foi de 0,12 mg.L⁻¹.

Para NBZnO, os organismos começaram a morrer após 2 semanas de exposição, atingindo taxas de mortalidade de $\geq 50\%$ nos organismos adultos. Esta mortalidade pode ser causada pela dificuldade de ecdise após a exposição ao NM ZnO como observado por Lopes et al., (2014). Os autores observaram a mortalidade de *D. magna* no mesmo período de exposição ao

observado nesta pesquisa.

O $ZnSO_4$ não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$) em comparação ao controle para o parâmetro longevidade após 21 dias. A longevidade dos organismos foi $\geq 80\%$.

Os resultados obtidos no teste crônico F0 demonstram que o NBZnO@AF é mais tóxico do que o NBZnO para *D. magna* também quando os organismos são expostos a concentrações subletais. Assim como nos testes agudos, este efeito pode estar relacionado devido às características específicas do NM. O NBZnO@AF apresentou uma maior área superficial, além da presença de moléculas polares em sua superfície que podem facilitar a interação entre o NM e as biomoléculas, permitindo a captação e penetração do NM na célula pelo "efeito cavalo de Tróia" (LOPES et al., 2014; SABELLA et al., 2014; VICENTINI et al., 2017).

4.2.5 Teste crônico de recuperação de F1 e F12

Os resultados dos testes de sensibilidade com neonatos de F1 e F12 ($CE50_{(24h)}$ ao $K_2Cr_2O_7$) demonstraram que a sensibilidade dos organismos utilizados para iniciar o teste de recuperação estavam de acordo com os critérios de validação do protocolo adotado. A tabela completa com os resultados dos testes de sensibilidade pode ser verificada na Tabela 13.

Tabela 13. Resultados dos testes de sensibilidade de F1 e F12 utilizando como substância de referência o $K_2Cr_2O_7$.

Amostra	Filhotes nascidos de mães expostas a ($mg.L^{-1}$):	CE50 _(24h) ($mg.L^{-1}$)	
		F1	F12
	Controle	0,81	0,79
NBZnO	0,98	0,90	0,67
	0,65	0,89	0,86
	0,44	0,64	0,69
	0,29	0,64	0,63
	0,19	0,72	0,85
	0,12	0,78	0,91
NBZnO@AF	0,98	0,83	0,59
	0,65	0,87	0,87
	0,44	0,80	0,94
	0,29	0,79	0,99
	0,19	0,85	0,93
	0,12	0,77	0,92

Nota: As concentrações testadas variaram entre 0,5 a 2 $mg.L^{-1}$.

Estes resultados podem indicar que os neonatos que nasceram de mãe expostas aos contaminantes não tiveram sua sensibilidade afetada, estando assim, saudáveis. Porém, embora a sensibilidade dos organismos ter apresentado valores normais, efeitos crônicos foram observados (Tabela 14).

Sabe-se que as NP ZnO podem causar danos epigenéticos em *D. magna* (POYNTON et al., 2011) e quando a exposição ao NM resulta em alterações epigenéticas nas células germinativas, os efeitos da exposição materna podem ser observados nas gerações futuras, mesmo após a exposição ao material ser removido (ARNDT et al., 2014).

Após 21 dias de teste, foram analisadas a reprodução, o tempo para a primeira prole, o número de filhotes, o crescimento, a longevidade. Os resultados obtidos podem ser observados na Tabela 14.

Os organismos nascidos de mães expostas a diferentes concentrações de $ZnSO_4$ (F1) sofreram efeitos crônicos e não conseguiram se recuperar após a exposição de F0. Esses organismos não foram capazes de se reproduzir durante os 21 dias de teste (levando em consideração que uma ninhada é considerada quando há a postura de ≥ 5 filhotes por *Daphnia*, de

acordo com o protocolo seguido). Quando puderam se reproduzir, os organismos tiveram um máximo de 3 filhotes por organismo. Desta forma não foi possível avaliar os possíveis efeitos sobre F12.

O crescimento foi significativamente menor quando comparado ao controle ($p < 0,05$) exceto para organismos nascidos em F0 expostos a $0,29 \text{ mg.L}^{-1}$ de ZnSO_4 .

A longevidade foi significativamente diferente do controle ($p < 0,05$) quando os organismos nascidos em F0 foram expostos à maior concentração testada de ZnSO_4 , atingindo 70% de mortalidade após 3 dias de teste.

Estes resultados sugerem que quando as mães são afetadas pela exposição à ZnSO_4 , os efeitos causados sobre as mães interferem na saúde das próximas gerações de *D. magna*.

A mortalidade de organismos expostos a concentrações subletais de ZnSO_4 também foi observada por Sánchez-ortíz; Sarma; Nandini, (2010). Os autores observaram a mortalidade de *D. pulex* após uma semana de exposição e verificaram que os organismos não foram capazes de se reproduzir nas maiores concentrações testadas, corroborando com os resultados obtidos nesta pesquisa.

O consumo das fontes de energia lipídicas devido às condições estressantes sofridas pelas *D. magna* pode ser o motivo pelo qual não houve a reprodução dos organismos nos testes realizados.

Sabe-se que reserva energética de *D. magna* é constituída por mais de 50% de lipídios, e esta é a fração de reserva energética mais sensível, pois são a primeira fonte de energia a ser consumida pelos cladóceros sob condições de estresse. Uma vez que a fração lipídica está envolvida no desenvolvimento de embriões e são os maiores responsáveis pela produção de ovos, seu consumo, devido a condições estressantes, interferem na reprodução dos organismos (COWGILL; WILLIAMS; ESQUIVEL, 1984; MUYSSSEN; JANSSEN, 2001).

Tabela 14. Resultado do teste crônico de recuperação para o controle, o NBZnO, o NBZnO@AF e o ZnSO₄ após 21 dias de exposição. Organismos cultivados apenas em M4. NO = dados não obtidos. * = diferente significativamente em relação ao controle.

	Filhotes nascidos de mães expostas a (mg.L ⁻¹)	Reprodução		Número total de posturas		Tempo para 1ª prole (dias)		Crescimento (mm)		Longevidade (%)	
		F1	F12	F1	F12	F1	F12	F1	F12	F1	F12
NBZnO	Controle	6,88 ± 1,07	6,78 ± 1,01	48	46	10,80 ± 0,79	10,60 ± 0,70	5,02 ± 0,08	5,04 ± 0,10	100	100
	0,12	5,88 ± 0,63	6,65 ± 1,29	4	18	16,80 ± 2,86*	14,80 ± 0,92*	4,81 ± 0,19*	4,97 ± 0,19	100	100
	0,19	5,88 ± 0,85	6,27 ± 1,18	4	26	10,75 ± 0,56	15,20 ± 2,25*	4,88 ± 0,16	5,02 ± 0,16	80	100
	0,29	5,60 ± 1,22	6,72 ± 1,40	6	25	11,67 ± 2,94	15,56 ± 2,88*	4,90 ± 0,09	5,03 ± 0,09	100	90
	0,44	5,50 ± 0,71	7,27 ± 1,62	2	22	11,50 ± 0,71	14,50 ± 2,51*	4,90 ± 0,09*	5,04 ± 0,09	80	100
	0,65	5,33 ± 0,58	6,49 ± 0,98	3	23	11,67 ± 6,35	16,67 ± 2,83*	4,78 ± 0,21*	5,02 ± 0,21	100	100
	0,98	5,86 ± 1,46	7,33 ± 1,84	6	17	11,33 ± 2,94	15,25 ± 1,39*	4,73 ± 0,23*	4,97 ± 0,23	90	100
NBZnO@AF	Controle	6,88 ± 1,07	6,78 ± 1,01	48	46	10,80 ± 0,79	10,60 ± 0,70	5,02 ± 0,08	5,04 ± 0,10	100	100
	0,12	6,00 ± 0,00	7,70 ± 1,00	1	19	9,50 ± 0,71	12,33 ± 0,82*	3,81 ± 0,06*	4,98 ± 0,09	100	80
	0,19	6,13 ± 2,01	7,37 ± 1,14	8	20	8,50 ± 0,76	14,50 ± 2,39*	3,86 ± 0,10*	4,96 ± 0,08	100	90
	0,29	6,20 ± 0,84*	5,40 ± 0,57	6	20	9,50 ± 0,84	16,50 ± 3,54*	3,71 ± 0,15*	5,05 ± 0,07	100	100
	0,44	5,33 ± 0,58*	6,54 ± 1,39	3	26	8,50 ± 0,50	13,13 ± 2,47*	3,62 ± 0,15*	5,00 ± 0,08	90	100
	0,65	5,90 ± 0,83	NO	4	NO	9,50 ± 0,59	NO	3,71 ± 0,15*	NO	80*	NO
	0,98	6,00 ± 1,73	NO	3	NO	19,75 ± 0,50*	NO	3,94 ± 0,05*	NO	50*	NO
ZnSO ₄	Controle	6,88 ± 1,07	6,78 ± 1,01	48	46	10,80 ± 0,79	10,60 ± 0,70	5,02 ± 0,08	5,04 ± 0,10	100	100
	0,29	NO	NO	NO	NO	NO	NO	4,75 ± 0,42	NO	80	NO
	0,44	NO	NO	NO	NO	NO	NO	4,41 ± 0,37*	NO	80	NO
	0,65	NO	NO	NO	NO	NO	NO	4,66 ± 0,23*	NO	80	NO
	0,98	NO	NO	NO	NO	NO	NO	4,63 ± 0,23*	NO	30*	NO

Para o parâmetro reprodução, os organismos de F1 nascidos de mães expostas aos NBZnO@AF apresentaram diferença significativa em relação ao controle apenas os organismos nascidos nas concentrações 0,29 e 0,44 mg.L⁻¹ ($p < 0,05$). No entanto, quando se observou o número total de filhotes nascidos após 21 dias de teste (Tabela 15), a diferença entre os resultados obtidos fica mais evidente.

Tabela 15. Número total de filhotes do teste crônico de recuperação após 21 dias de teste. NO = dados não observados.

Filhotes nascidos de mães expostas a (mg.L ⁻¹):	NBZnO		NBZNO@AF		ZnSO ₄
	F1	F12	F1	F12	F1
Controle	330	326	330	326	330
0,12	29	115	6	163	NO
0,19	23	160	84	144	NO
0,29	28	158	44	150	46
0,44	16	176	44	198	45
0,65	16	150	16	NO	70
0,98	41	135	35	NO	28

Os organismos de F1 nascidos de mães expostas em ambos os NB tiveram sua reprodução afetada, quase não se reproduzindo durante os 21 dias de teste. Quando a reprodução ocorreu, esta teve um intervalo de 4 a 5 dias até que a próxima ninhada ocorresse, sendo que em condições normais, a reprodução acontece em um intervalo de 48 h.

O tempo para a primeira prole foi diferente significativamente ($p < 0,05$) quando comparado ao controle, apenas nos organismos nascidos de mães expostas à concentração de 0,12 mg.L⁻¹ para NBZnO e 0,98 mg.L⁻¹ para NBZnO@AF.

Bacchetta et al., (2017) observaram a presença de NP ZnO nos ovos de *D. magna* e concluíram que a toxicidade do NM pode ser o resultado da toxicidade indireta proveniente das mães, sendo o risco associado à exposição materna à prole, evidente, corroborando com os resultados obtidos.

De maneira geral, a geração F12 de ambos os NB apresentaram um ligeiro aumento no número médio de filhotes e um aumento do número de posturas. Porém o tempo para primeira prole foi significativamente diferente ($p < 0,05$) em relação ao controle. A reprodução de F12 começou após $\pm 12,33$

dias de teste. No entanto, as daphnias apresentaram reprodução homogênea e um aumento no número de posturas e filhotes, indicando uma possível recuperação dos organismos após 12 gerações não expostas ao NM.

A longevidade de F1 e F12 não foi afetada nos organismos nascidos de mães expostas ao NBZnO, contudo para NBZnO@AF, foram observados efeitos, tanto para F1 como para F12, apenas nos organismos nascidos de mães expostas as maiores concentrações testadas.

Em relação ao crescimento, apenas F1 apresentaram diferenças significativas em relação ao controle para ambos os NB. Para estes organismos, foi observado alterações morfológicas através do encurtamento do espinho apical.

Os resultados obtidos demonstram que os filhotes apresentaram efeitos crônicos devido a exposição materna, tanto para o NBZnO e o NBZnO@AF, como para o controle positivo (ZnSO₄). Estes efeitos puderam ser observados mesmo quando os filhotes recém-nascidos foram retirados do meio contaminado e transferidos para meio de cultivo.

Pode-se observar que a primeira geração (F1) foi mais afetada pela exposição materna aos NB e ZnSO₄. No entanto, após 12 gerações (F12), apesar do tempo de ter ocorrido a reprodução tardia, os organismos começaram a se recuperar dos efeitos pela exposição materna para ambos NB.

Em condições ambientais reais aonde os organismos aquáticos estão constantemente expostos a xenobióticos durante diversas gerações, esta pesquisa destaca a cautela necessária no uso de NM ZnO, uma vez que a exposição permanente a este material pode interferir na dinâmica populacional dos organismos, levando a danos para o ecossistema aquático, uma vez que as daphnias desempenham um papel crucial na cadeia alimentar de ambientes aquáticos (ARNDT et al., 2014).

4.2.6 Toxicidade aguda com *Aliivibrio fischeri*

A toxicidade de NBZnO, NBZnO@AF e ZnSO₄ foi analisada para a bactéria marinha bioluminescente *A. fischeri* em termos de CE50_(15min) (Tabela 16). Os lotes de bactérias utilizados para realização dos testes de toxicidade (13F067F10 e 14K4142F1) apresentaram sensibilidade adequada, garantindo a

confiabilidade dos resultados dos testes realizados conforme o protocolo adotado.

Tabela 16. Resultados dos testes de toxicidade aguda com NBZnO, NBZnO@AF e ZnSO₄ para *A. fischeri* (n = 6). Resultados expressos em CE50_(15 min).

Amostra	pH	CE50 _(15 min) mg.L ⁻¹
NBZnO	7,41 ± 0,02	14,90 ± 3,20
NBZnO@AF	7,69 ± 0,19	34,13 ± 5,07
ZnSO ₄	7,31 ± 0,98	4,90 ± 1,29

Todas as amostras estudadas foram capazes de reduzir a emissão de bioluminescência pela bactéria *A. fischeri*, ou seja, conferiram toxicidade ao organismo-teste.

Segundo Zhang et al., (2002), a redução da emissão de bioluminescência decorre da diminuição da atividade metabólica e/ou de danos à parede celular. A bioluminescência é resultado de complexas reações bioquímicas e a redução sua redução é um reflexo da inibição da atividade metabólica bacteriana e proporcional à toxicidade da amostra testada (BULICH; ISENBERG, 1981; MORTIMER et al., 2008).

Analisando os resultados da CE50 de ambos os NB testados em *A. fischeri* com os resultados dos testes com *D. magna*, podemos observar que as bactérias marinhas foram menos sensíveis do que o microcrustáceo de água doce aos NB. A menor toxicidade dos NB ao *A. fischeri* pode estar relacionada ao comportamento do NM no meio salino (NaCl 2%).

A adição de sal ao diluente aumenta a força iônica do meio leva ao aumentando da interação entre os NM, o que afeta sua aglomeração e sua toxicidade (BIAN et al., 2011; ROSSETTO et al., 2014b; SEO et al., 2017). Nesta pesquisa este comportamento foi observado pela avaliação do DH de ambos os NB que apresentaram elevada aglomeração e baixa estabilidade no meio NaCl 2% (Tabela 9) e confirmados pelas imagens de MET (Figura 10).

Na água do mar, os diâmetros dos NM aumentam rapidamente devido às interações entre as NP e água do mar, tornando-os mais instável devido à diminuição do potencial zeta, alterando a sua área superficial e sua reatividade e,

consequentemente, alterando sua toxicidade (BUFFET et al., 2011).

De acordo com Park et al., (2014) a alta salinidade do meio resultou na menor toxicidade das NP ZnO para o copépode marinho *Tigriopus japonicus*, devido às menores concentrações de Zn^{+2} dissolvido liberadas pelas NP ZnO em salinidades mais elevadas. Nesta condição, os íons Zn^{+2} liberados podem formar complexos com os ânions (por exemplo, Cl^-) na água do mar, reduzindo a concentração de Zn^{+2} livre (POWELL et al., 2013).

Yung et al., (2017) estudaram a influência da temperatura (de 10 a 30 °C) e a salinidade (12 a 32) sobre a toxicidade de NP ZnO para a diatomácea marinha *Thalassiosira pseudonana* e concluíram que esses parâmetros podem alterar o comportamento físico-químico das NP ZnO na água do mar, alterando a toxicidade do NM para organismos marinhos. Os autores observaram a agregação das NP ZnO com o aumento da temperatura e salinidade. Além disso, a diminuição das concentrações de Zn^{+2} nos gradientes de salinidade foi mais evidente a temperaturas mais baixas.

Essas características físico-químicas podem contribuir para uma diminuição da interação entre o NM e as bactérias, reduzindo a toxicidade dos NB. No entanto, NM ZnO é capaz de causar danos às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido às propriedades antibacterianas do ZnO (ADAMS; LYON; ALVAREZ, 2006; SARWAR et al., 2016).

De acordo com Sarwar et al., (2016), a interação de *Vibrio cholera* com NP ZnO resultou em deformação da arquitetura celular do organismo e aumentou a fluidez e despolarização da membrana celular causada pela interação entre o NP e a membrana através da atração eletrostática, devido à carga positiva do NM. Os autores também observaram que as NP ZnO foram capazes de interagir com DNA de *V. cholera* causando abrasão no DNA e induziu a produção de EROs. Assim, os autores concluem que o mecanismo de ação das NP ZnO é causado devido à geração de EROs e à ruptura da membrana bacteriana.

Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstram que ambos os NB ZnO foram capazes de causar toxicidade aguda em *A. fischeri*, confirmando que a bactéria é um bom modelo para avaliar a toxicidade de NB ZnO em ambientes marinhos.

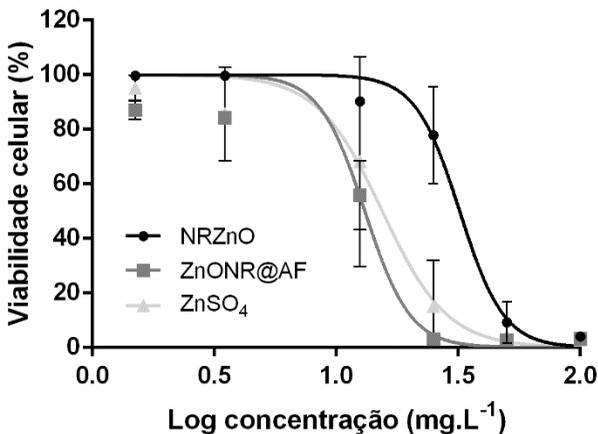
Embora o teste de toxicidade tenha sido realizado apenas

a nível agudo, os resultados obtidos despertam a preocupação com a eliminação discriminatória de NM ZnO em ecossistemas marinhos, uma vez que os NB ZnO podem afetar *A. fischeri* em concentrações relativamente baixas.

4.2.7 Citotoxicidade em N2A: Viabilidade celular, determinação da CE50_(24h), EROs e LPO

A viabilidade celular de N2A após 24 h de exposição ao NBZnO, ao NBZnO@AF e ao ZnSO₄ estão apresentados na Figura 16.

Figura 16. Curva de viabilidade celular de células N2A expostas ao NBZnO, ao NBZnO@AF e ao ZnSO₄.



Os resultados do teste de MTT demonstram que a exposição de células de N2A às diferentes concentrações de NBZnO, NBZnO@AF e ZnSO₄ conduz a uma redução dose-dependente da atividade metabólica mitocondrial, levando a morte celular.

A CE50_(24h) obtida foi igual a 32,04 mg.L⁻¹, 13,09 mg.L⁻¹ e 15,44 mg.L⁻¹ para NBZnO, NBZnO@AF e ZnSO₄, respectivamente.

Observando os resultados de CE50 dos organismos aquáticos com os resultados obtidos para as células, verificou-se que ambos os NB apresentaram maior toxicidade para a *D.*

magna e para *A. fischeri*. Estes resultados corroboram com a literatura, pois sabe-se que os invertebrados aquáticos são geralmente mais sensíveis a quaisquer agentes tóxicos do que os mamíferos (DELISTRATY; TAYLOR; ANDERSON, 1998).

Esta menor toxicidade as células também pode estar associada as características do meio teste. Nesta pesquisa foi utilizado o meio RPMI completo, ou seja, o meio com a presença de soro bovino fetal (SBF). O soro é comumente utilizado como suplemento nos meios de cultura celular, ele contém proteínas essenciais e nutrientes para o sistema *in vitro*. Contudo, ele pode agir como agente estabilizador para NP (CRONHOLM et al., 2011).

A presença de SBF no meio altera a estabilidade coloidal, a dissolução do NM e conseqüentemente a toxicidade de NP ZnO devido a interações eletrostáticas entre o NM e as proteínas do meio (HSIAO; HUANG, 2013; KWON et al., 2014). Kwon et al., (2014) observaram que na presença de SBF, a citotoxicidade de NP ZnO às células HeLa foi significativamente reduzida em comparação com meio livre de soro, independentemente das modificações superficiais e carga do NM.

Assim como nos resultados obtidos nos testes de toxicidade com *D. magna*, os NBZnO@AF também foram mais tóxicos para as células N2A. No entanto, a toxicidade apresentada NBZnO@AF ficou mais próximo ao valor de CE50_(24h) do controle positivo (ZnSO₄). Este resultado demonstra que a toxicidade dos NB ZnO está relacionada com a liberação de íons Zn (no meio e no interior celular) e com as características intrínsecas ao NM (FERNÁNDEZ; GARCÍA-GÓMEZ; BABÍN, 2013).

A citotoxicidade dos NB ZnO e ZnSO₄ pode ser proveniente da geração de EROs e LPO, como é possível verificar na Figura 17 e Figura 18. As concentrações da CE50_(24h) (correspondente as maiores concentrações testadas para todas as amostras) foram capazes de gerar EROs e alterações nos níveis de MDA significativamente diferente em comparação ao controle. E assim como a viabilidade celular, EROs e LPO também mostraram efeitos dose-dependente.

A indução da geração de EROs pode ser oriunda da característica da superfície da partícula como resultado de suas propriedades semicondutoras ou eletrônicas do NM, bem como pela capacidade de alguns materiais para perturbar os processos

de transferência de elétrons intracelulares (membrana interna mitocondrial) (USKI et al., 2017).

Figura 17. Geração de EROs em células N2A expostas ao NBZnO, ao NBZnO@AF e ao ZnSO₄. * = diferença significativa em relação ao controle (p < 0,05).

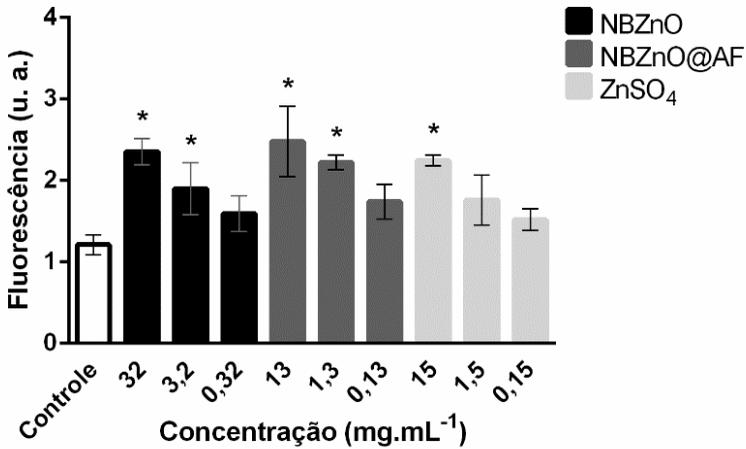
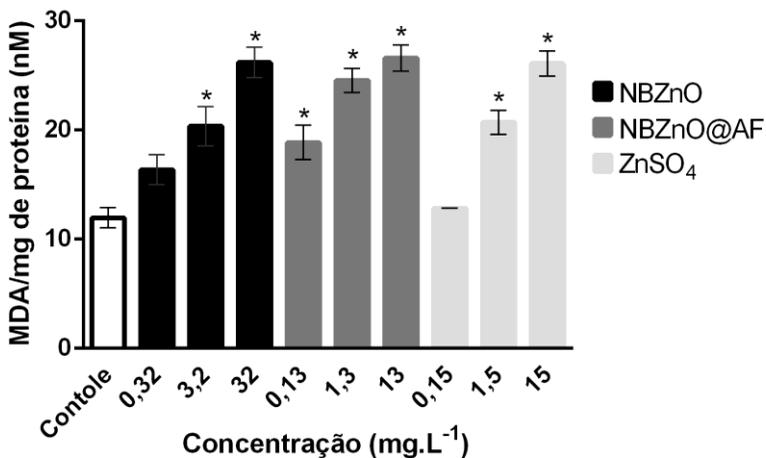


Figura 18. LPO de células N2A expostas ao NBZnO, ao NBZnO@AF e ao ZnSO₄. * = diferença significativa em relação ao controle (p < 0,05).



A geração de EROs por NP ZnO foi observada também por Zijno et al., (2015) em células de carcinoma humano Cacco-2 e por Uski et al., (2017) em células macrófagas de rato RWA 264.7.

Senapati et al., (2015) notaram que as NP ZnO são capazes de alcançar o interior celular e induzir danos na membrana mitocondrial. Neste contexto, Zhang et al., (2012) destacam que as mitocôndrias são os principais sítios celulares da produção de EROs, levando ao estresse oxidativo.

O estudo de Ramasamy et al., (2014) demonstra que as EROs geradas por NP ZnO em células fibroblásticas dérmicas humanas HDFn, induziram a LPO, o que pode ser associado a outro fator na indução de estresse oxidativo em células.

Nel et al., (2006) e Hanley et al., (2008) também citam a LPO e o estresse oxidativo como mecanismos importantes na citotoxicidade de NP ZnO à diversos tipos de células de mamíferos.

Os resultados obtidos nesta tese corroboram com a literatura pois, os NB foram capazes de produzir EROs intracelulares com níveis aumentados de LPO em células N2A.

A LPO pode produzir mais radicais livres, o que poderia danificar biomoléculas, como DNA, proteínas e lipídios em combinação com as EROs. Assim a LPO também pode causar danos irreversíveis à membrana celular (RAMASAMY et al., 2014)

De acordo com Ramasamy et al., (2014) a diminuição da viabilidade celular em combinação com o aumento do nível de LPO pode ser mecanismo de ação primário para a citotoxicidade.

4.3 MEMBRANAS: CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO

Os resultados de caracterização das membranas e os resultados de desempenho das membranas utilizando NaCl foram obtidos no período sanduíche na Rice University, já os resultados de desempenho das membranas utilizando MgCl₂ foram obtidos no LABTOX-UFSC.

4.3.1 Espessura

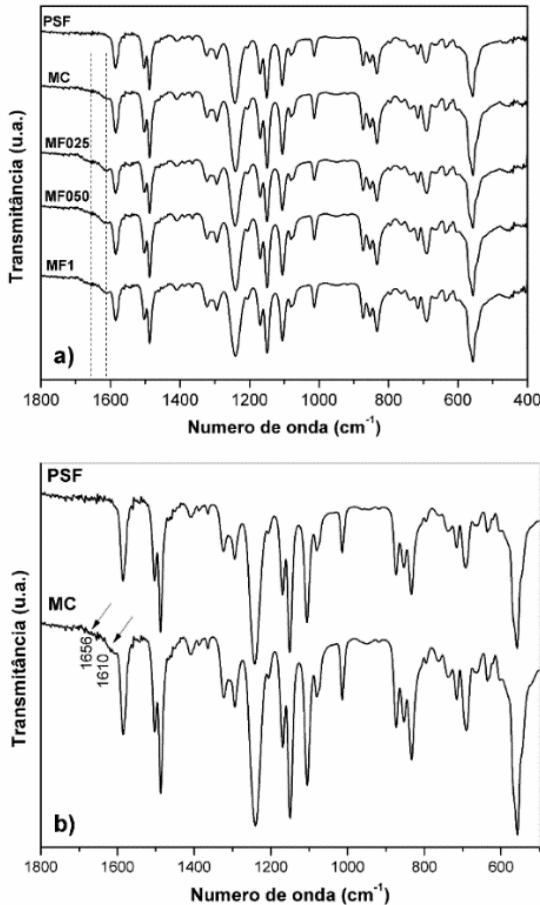
As membranas de PSF preparadas apresentaram espessura média de aproximadamente $90 \pm 15 \mu\text{m}$, e o filme fino de PA preparado sobre as membranas suporte de PSF,

apresentaram espessura média de 350 ± 50 nm.

4.3.2 Espectrometria de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Todos os espectros das composições de membranas estão apresentados na Figura 19.

Figura 19. Espectros de FTIR das membranas (a) e detalhe dos de PSF e MC (b). PSF = membrana de PSF pura (suporte). MC = membrana com filme fino de PA sem NB. MF = correspondem as membranas com filme fino de PA com 0,25, 0,5 e 1% de NBZnO@AF.



Na comparação entre os espectros, verifica-se que todos apresentam as bandas características da membrana de PSF, e nas membranas contendo o filme fino de PA foram identificados também dois ombros (Figura 19 a e b) atribuídos a bandas específicas de PA.

O espectro de FTIR da membrana de PSF mostrou as bandas características dos grupos funcionais presentes na PSF (Figura 18a). As principais bandas de absorção identificadas foram em 1585, 1504 e 1486 cm^{-1} , referentes às vibrações de deformações axiais de C=C de anéis aromáticos; em 1240 cm^{-1} devido ao estiramento vibracional de C-O-C; em 1321 e 1150 cm^{-1} correspondem às vibrações dos estiramentos assimétrico e simétricos do S-O, respectivamente (LEO et al., 2012).

No espectro da membrana com o filme fino de PA (MC) (Figura 18b) foram identificadas as bandas da PSF, porém apareceram dois ombros característicos da PA na região de 1656 cm^{-1} atribuído ao estiramento vibracional da C=O da amida I e em 1610 cm^{-1} correspondente às vibrações do núcleo do anel aromático. Na região de aproximadamente 1560 cm^{-1} , também deveria aparecer a banda de absorção fraca referente ao estiramento vibracional de C-N e amida II (JIN et al., 2012; KHORSHIDI et al., 2016). Esta banda fraca ficou sobreposta pela banda de 1585 cm^{-1} da deformação axial de C=C de anéis aromáticos da PSF. Os ombros da PA apresentam pouca intensidade e não chegam a formar uma banda definida devido à espessura reduzida do filme fino visualizada nas micrografias de MEV (≈ 300 nm) em relação à espessura da membrana de PSF (≈ 100 μm).

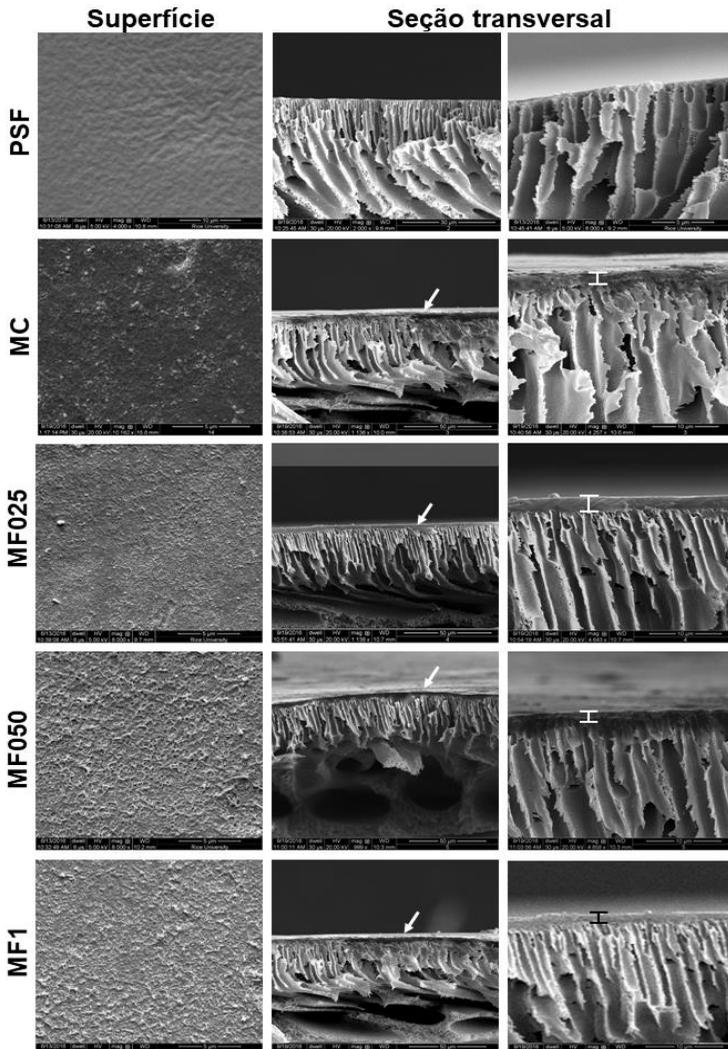
Os espectros das membranas não mostraram alterações visíveis após a adição de 0,25, 0,50 e 1% de NBZnO@AF no filme de PA. O mesmo comportamento foi observado nos estudos de Leo et al., (2012) que incorporaram de 1 a 4% de NP ZnO em membranas de PSF.

4.3.3 Microscopia eletrônica de varredura com fonte de emissão de campo (MEV-FEG)

A Figura 20 apresenta as imagens de MEV-FEG da superfície e da seção transversal das membranas produzidas. A partir das imagens da superfície das membranas, observar-se

que o suporte de PSF apresentou poros de tamanhos nanométricos.

Figura 20. Imagens de MEV das membranas produzidas. PSF = membrana de PSF pura (suporte). MC = membrana com filme fino de PA sem NB. MF = correspondem as membranas com filme fino de PA com 0,25, 0,5 e 1% de NBZnO@AF. As setas brancas e as barras indicam o filme fino de PA sobre a membrana suporte.



A alteração da morfologia da superfície (rugosidade) da membrana com formação do filme fino de PA sobre as membranas MC, MF025, MF050 e MF1 é evidente. A superfície apresentou-se áspera com glóbulos fortemente entrelaçados. Esta morfologia é conhecida como estrutura “*ridge-and-valley*”, que é a morfologia típica apresentada por membranas de PA formadas a partir de MPD/TMC (XU; WANG; LI, 2013).

As superfícies das membranas apresentaram morfologia semelhante para MC, MF025, MF050 e MF1, porém as membranas se tornaram mais ásperas (rugosas) conforme o aumento na concentração do NB adicionado no filme fino de PA.

Esta característica no aumento da rugosidade da superfície conforme o aumento da inserção de NM no filme de PA também foi observada por Jeong et al., (2007), que estudaram a inserção de zeólitas (0, 0,0004%, 0,01%, 0,04%, 0,1% e 0,04%) no filme fino de PA, formado a partir de MPD/TMC sobre suporte de PSF.

Nas imagens das seções transversais, observa-se que todas as membranas produzidas apresentaram típica estrutura assimétrica para o suporte de PSF, apresentado longos poros longitudinais (“*finger-like pores*”).

É possível visualizar facilmente que houve a formação do filme fino de PA sobre a membrana suporte para todas as amostras (MC, MF025, MF050 e MF1), confirmando que as membranas produzidas são membranas nanocompósitas de filme fino, corroborando com os dados de FTIR. A espessura do filme formado foi de aproximadamente 350 nm. É importante ressaltar que devido morfologia irregular, característica do filme de PA, não é possível dar uma medida exata da espessura do filme, conforme explicam Misdan et al., (2013).

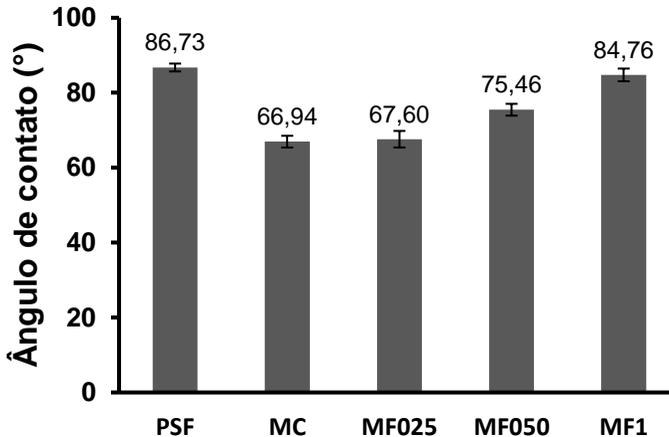
A espessura do filme de PA que será formado está relacionada com as propriedades estruturais da membrana suporte. De modo geral, membranas que apresentam tamanho de poros menores em sua superfície, tendem a formar filmes mais espessos, devido a maior regularidade da superfície da membrana (MISDAN et al., 2013).

As análises por EDX realizada no momento da captura das imagens por MEV-FEG confirmaram a presença do Zn nas membranas produzidas (Apêndice 3), demonstrando que o NBZnO@AF foi incorporado na membrana com êxito.

4.3.4 Ângulo de contato (AC)

A hidrofiliicidade das membranas foi determinada pela análise de AC (Figura 21).

Figura 21. Ângulo de contato das membranas.



Os dados demonstram que houve o aumento do AC, conforme o aumento da concentração de NBZnO@AF no filme de PA. Contudo quando, se compara a membrana suporte de PSF com as membranas de filme fino, observa-se a diminuição do AC.

Ou seja, as membranas apresentaram caráter hidrofílico, porém houve a diminuição da hidrofiliicidade das membranas conforme o aumento da concentração do NM. Esta afirmação é possível pois sabe-se que se o ângulo for igual a zero, as membranas são consideradas superhidrofílicas; se o ângulo for menor que 90°, a superfície é hidrofílica; se o ângulo for maior ou igual a 90°, a membrana é hidrofóbica e as membranas que apresentam ângulo maior que 150° são consideradas superhidrofóbicas (FURMIDGE, 1962).

O aumento da hidrofiliicidade pode ocorrer por dois motivos: (1) os NM podem hidratar e liberar calor ao entrar em contato com a solução aquosa MPD. Este processo pode afetar a reação de PI entre MPD e TMC, e posteriormente a estrutura química do filme fino de PA. Se mais número de grupos de

cloreto de acilo em TMC permaneceram na superfície sem reagir com grupos de amina, a hidrólise do cloreto de acilo poderia gerar grupos funcionais de ácido carboxílico; assim, a hidrofiliabilidade da superfície aumentaria. E (2), os NM com características hidrofílicas incorporados podem ser expostos na superfície da membrana, proporcionando mais grupos funcionais hidrofílicos em sua superfície (KIM et al., 2000; WU; TANG; WU, 2013; YIN; DENG, 2015).

Isto é, o AC depende da composição química na superfície e da interação sólido-líquido. Assim, com a adição de maiores concentrações de NM podem ocorrer mais interações químicas com os solventes utilizados, reduzindo o número de sítios ativos da membrana.

De acordo com Vieira et al., (2011) se a interação entre o sólido e o líquido estiver alta, o ângulo de contato será menor e a presença de grupos polares superficiais provoca uma diminuição no ângulo de contato devido à maior interação entre a superfície sólida e o solvente polar.

Dipheko et al., (2017), estudaram a incorporação de diferentes concentrações NP ZnO em membranas de PES. Os autores verificaram o aumento do AC quando 2% de NP ZnO foram incorporados nas membranas. Este aumento no AC na maior concentração testada foi atribuído a aglomeração e agregação de NP na matriz da membrana, levando à não homogeneidade da superfície, conforme também observado por Damodar et al., (2009).

4.3.5 Compactação

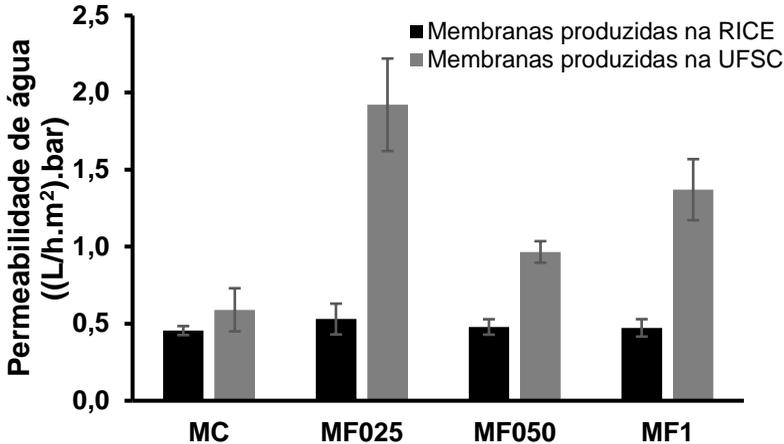
Antes de iniciar os ensaios com NaCl e MgCl₂, foi realizada a compactação das membranas, pela medida de fluxo de água OR (J), variando-se a pressão do sistema de 10 a 2 bar em intervalos de 2 bar.

Após 4 h de compactação (tempo total para o gradiente de pressão), houve o adensamento da estrutura dos poros e as membranas atingiram fluxo em estado estacionário. O fluxo de água aumentou linearmente com o aumento da pressão, demonstrando que o procedimento utilizado para compactação foi eficiente e preciso e as membranas estavam apropriadas para serem utilizadas nos ensaios subsequentes. As membranas utilizadas para os ensaios apresentaram R² entre 0,80 a 0,999.

4.3.6 Permeabilidade hidráulica (P_m)

A determinação da P_m foi realizada utilizando água OR. A permeabilidade hidráulica apresentada pelas membranas produzidas na Rice University e no LABTOX-UFSC pode ser observada na Figura 22.

Figura 22. Permeabilidade hidráulica das membranas.



As membranas preparadas na Rice University apresentaram permeabilidade semelhantes de $\pm 0,50$ L/h.m².bar, enquanto que as membranas produzidas no LABTOX-UFSC, apresentaram permeabilidade variada.

Esta variação na permeabilidade apresentada pelas membranas produzidas no LABTOX-UFSC pode estar relacionada aos parâmetros que influenciam na produção das membranas, como temperatura e umidade. Na Rice University estes parâmetros eram melhor controlados, devido ao laboratório possuir sistema de refrigeração constante, garantindo que não houvessem variações bruscas de temperatura e umidade no interior do laboratório tanto no verão quanto no inverno, bem como a capela de exaustão de gases, possui ventilação com fluxo de ar controlado que é aferido semanalmente pelos técnicos responsáveis.

Observa-se uma leve tendência na redução da permeabilidade conforme a adição do NM. Contudo, as membranas preparadas no LABTOX-UFSC apresentaram maior

permeabilidade ($\pm 1,5$ L/h.m².bar) quando comparadas com as membranas produzidas na Rice ($\pm 0,4$ L/h.m².bar).

Novamente esta diferença pode estar associada com a diferença interlaboratorial nas condições de preparo das membranas, resultando em membranas com diferente porosidade, tamanho de poro e espessura do filme fino; parâmetros que alteram suas propriedades (ALHOSHAN et al., 2013).

4.3.7 Fluxo de permeado

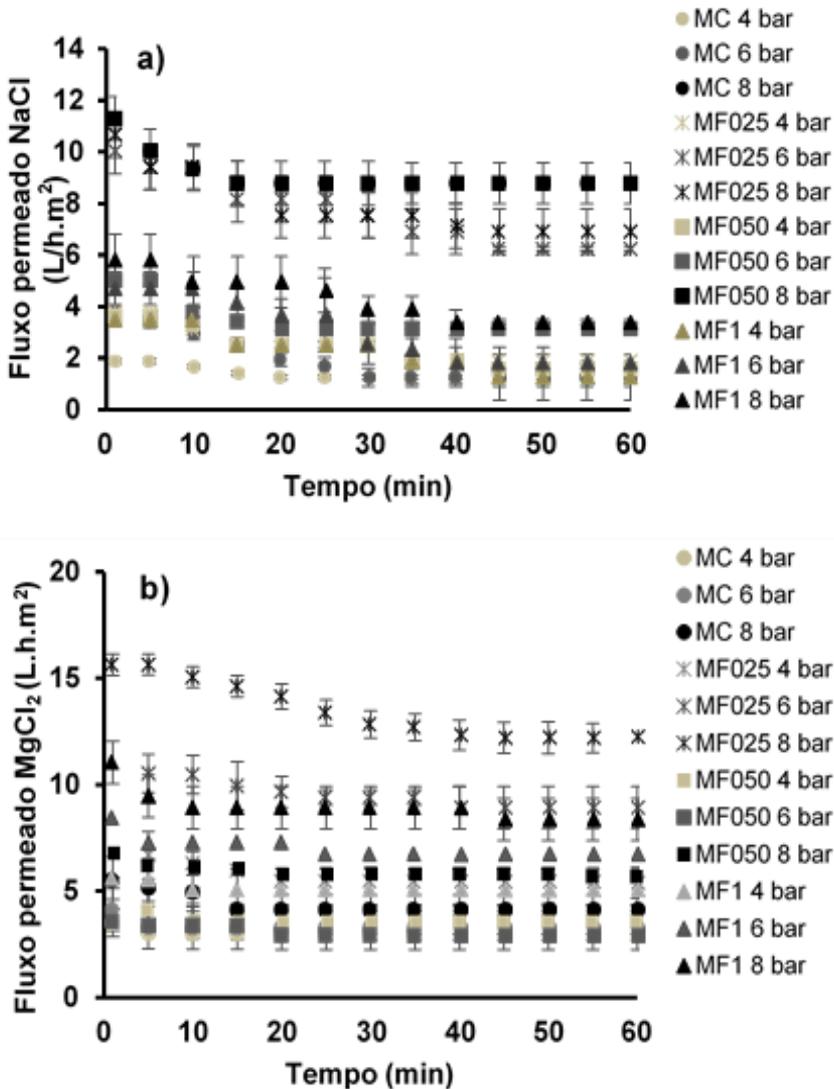
Após a compactação das membranas ao gradiente de pressão (10 a 2 bar), as membranas passaram a permear solução salina de NaCl e MgCl₂ (concentração das soluções igual a 2000 mg.L⁻¹) em função da pressão aplicada (4, 6 e 8 bar).

A Figura 23 apresenta o fluxo de permeado das soluções salinas de NaCl e MgCl₂. O fluxo de permeado tendeu a aumentar em função do aumento da pressão (SCOTT, 1995), do mesmo modo em que ocorreu na compactação, este resultado novamente demonstra que as membranas utilizadas nos ensaios foram preparadas com êxito.

O fluxo de permeado de NaCl (Figura 23a) foi menor quando comparado com o fluxo de permeado de MgCl₂ (Figura 23b), corroborando com os resultados de permeabilidade hidráulica (Figura 23), onde as membranas preparadas na Rice University (utilizadas para filtrar a solução de NaCl) apresentaram menor permeabilidade.

As membranas MF025 e MF050 apresentaram os maiores fluxos NaCl nas maiores pressões. Para MF050 a 8 bar, o fluxo de permeado foi de aproximadamente 9 L/h.m².bar e para MF025 este foi de 7 L/h.m².

Para o fluxo permeado de NaCl, as membranas MF1 exibiram os menores fluxos em todas as pressões testadas.

Figura 23. Fluxo permeado de (a) NaCl e (b) MgCl₂ em função da pressão.

Estes resultados demonstram que apesar da característica hidrofílica do ZnO, o aumento da concentração de NBZnO@AF nas TFN, reduziram o fluxo de permeado de NaCl, corroborando com os resultados de AC e permeabilidade hidráulica.

Para o fluxo permeado de MgCl₂, a membrana MF025

apresentou maior fluxo para todas as pressões testadas em comparação as demais membranas, corroborando com os resultados de AC e permeabilidade hidráulica.

A membrana MF050 apresentou menor fluxo de permeado de $MgCl_2$ para todas as pressões testadas quando comparada a MF025 e MF1, corroborando com os resultados de permeabilidade, aonde esta membrana também apresentou menor permeabilidade do que MF025 e MF1.

Sabe-se que o fluxo de uma membrana está relacionado as propriedades das membranas, tais como a porosidade, tipo e tamanho de poro, espessura da superfície da membrana e hidrofobicidade (BAKER, 2012), assim, alterações nestes parâmetros, na hora de sua produção, levam a alterações na sua estrutura e conseqüentemente, no fluxo de permeado das membranas.

A aglomeração do NM em algumas partes da membrana pode ocorrer durante o processo de preparo das membranas e isto também pode contribuir para a alteração da eficiência de operação da membrana (DAMODAR et al., 2009).

No início da filtração, para ambas as soluções salinas, foi observado um maior fluxo e este decaiu em função do tempo até atingir um estado quase estacionário. Este comportamento pode estar relacionado aos efeitos da polarização por concentração, na fase inicial, e posterior incrustação da membrana (*fouling*) na fase estacionária (MULDER, 1996; ZIN, 2014).

Ao comparar os valores de fluxo de permeado de NaCl e $MgCl_2$ das membranas MF (025, 050 e 1) com as membranas controle (MC), constata-se que o fluxo de permeado de todas as MF foi superior em relação a MC, demonstrando que a inserção do NM aumenta o fluxo das soluções.

O aumento do fluxo de permeado após a incorporação de NB ZnO em membranas TFN (PSF/PA), também foi observado nos estudos de Isawi et al., (2016). Pal et al., (2015) também obtiveram resultados de fluxo de permeado elevados quando NP ZnO foram incorporados nas membranas TFN de PSF/PEI.

Segundo Lind et al., (2009) a melhora do fluxo esta atribuída à presença de NM na zona de reação interfacial, o que incide na cinética da reação de PI por fatores como mudança na miscibilidade das fases aquosa e orgânica através do calor de hidratação liberado dos NM, mudança na taxa de difusão dos monômeros que, conseqüentemente, altera a densidade de

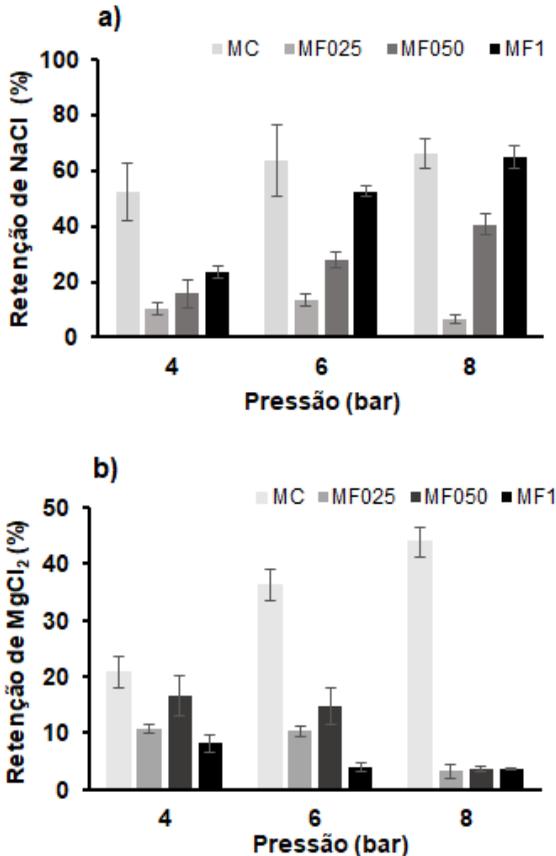
reticulação da rede de polímeros e a natureza hidrofílica/hidrofóbica das superfícies de membrana.

4.3.8 Retenção de sais

Os ensaios de retenção foram realizados com solução de alimentação de NaCl e $MgCl_2$ na concentração de 2000 mg.L^{-1} para ambas as soluções. A retenção dos sais foi avaliada nas pressões 4, 6 e 8 bar.

Os resultados obtidos nos ensaios de retenção de sais podem ser observados na Figura 24.

Figura 24. Retenção de sais (a) NaCl e (b) $MgCl_2$ para MC, MF025, MF050 e MF1. Tempo de filtração = 1 h. Concentração: 2000 mg.L^{-1} .



As membranas MF utilizadas nas filtrações de NaCl (Figura 24a), apresentaram aumento na retenção do sal conforme o aumento da concentração de NBZnO@AF inserido no filme fino de PA e conforme a pressão aplicada. MF1 apresentou a maior retenção, atingindo aproximadamente 45% e 64% nas pressões 4 e 6 bar, respectivamente.

O mesmo comportamento foi observado por Mehdipour et al., (2015). Os autores estudaram a retenção de Pb^{+2} em membranas de comerciais de filme fino de PA aplicadas a NF e verificaram que nas maiores concentrações testadas (200 e 400 $mg.L^{-1}$) houve o aumento da retenção de Pb^{+2} conforme ao aumento da pressão utilizada (de 10 a 40 bar).

De acordo com Al-rashdi et al., (2013) e Gherasim et al., (2013), quando a pressão transmembrana aumenta, dois fenômenos ocorrem, simultaneamente: 1) ao aumentar a pressão, mais o soluto é forçado na superfície da membrana levando à polarização da concentração e conseqüentemente, a diminuição da rejeição do soluto; 2) aumentando a pressão, o fluxo de solvente será aumentado, mas o transporte de soluto através da membrana é dificultado por efeitos estéricos e elétricos. Como resultado, um aumento na rejeição de soluto é obtido à medida que a permeação da água se torna maior a pressões mais altas. No entanto, a difusão de soluto não é afetada pela pressão, uma vez que esta é controlada pela concentração de soluto (AL-RASHDI et al., 2013; GHERASIM et al., 2013).

Embora tenha ocorrido o aumento da rejeição de NaCl conforme o aumento da concentração de NBZnO@AF, este aumento não foi maior do que os resultados de retenção obtidos pela MC. O mesmo comportamento também foi observado nas membranas utilizadas para filtrar a solução de $MgCl_2$. MC obteve até 45% de retenção de $MgCl_2$ (pressão 8 bar), enquanto que a maior retenção nas membranas MF, ocorreu para MF50 na pressão 4 bar, atingindo 15% de retenção.

Ficou evidente que as membranas produzidas foram mais eficientes para a remoção de sais monovalentes (NaCl), atingindo até 64% de retenção para a MF1, do que para a retenção de sais bivalentes ($MgCl_2$).

A faixa de retenção de sais monovalentes por NF está entre 0 e 70% (MOHAMMAD et al., 2015). Desta forma, o valor de retenção obtido pra MF1 é um resultado interessante, uma

vez que a incorporação de 1% de NM é uma quantidade relativamente baixa e que as membranas apresentaram aumento da retenção conforme aumento na concentração de NBZnO@AF. Este resultado pode ser um indício de que se fossem utilizadas concentrações mais elevadas de NBZnO@AF no filme fino de PA, a retenção de NaCl poderia ser ainda mais elevada. Contudo, para afirmar esta hipótese, mais estudos se fazem necessários.

Alhoshan et al., (2013) estudaram a adição de NP ZnO (0,1 e 0,2%) em membranas de PSF e obtiveram resultados semelhantes de rejeição de NaCl e MgSO₄ entre as membranas controle de PSF e as membranas com NM. Segundo os autores a membrana de PSF apresentou retenção de 76% de NaCl e 93% de MgSO₄, enquanto que as membranas com 0,1 e 0,2% de NP ZnO apresentaram 77 e 93% de retenção de NaCl e MgSO₄, respectivamente, demonstrando que adição do NM não aumentou a eficiência de retenção das membranas.

Emadzadeh et al., (2015) estudaram a incorporação de diferentes concentrações nanotubos de titanato amino-funcionalizados (-NH₂) (0, 0,01, 0,05 e 0,1%) no filme fino de PA de TFN aplicadas a OR. Segundo os autores, para a maior concentração de NM testada (0,1%) a retenção de NaCl foi menor quando comparada a membrana controle e as demais concentrações utilizadas. A retenção diminuiu de 94% na membrana controle para 85% na TFN 0,1%. De acordo com os autores, o excesso de adição de nanotubos de titanato amino-funcionalizados tende a diminuir o grau de reticulação de PA e/ou aumentar os microvazios entre o NM e matriz polimérica, o que pode afetar negativamente a rejeição do sal.

4.3.9 Liberação de íons Zn das membranas

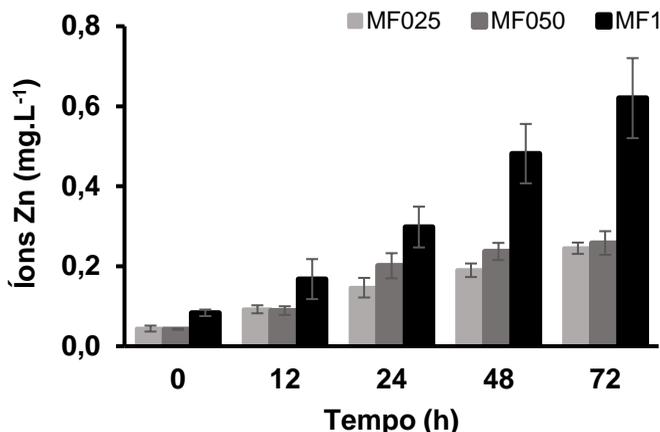
A cinética da liberação de íons Zn das membranas MF025, MF050 e MF1 foram realizados ensaios em escala de bancada durante 72 h e as amostras foram analisadas por ICP-OES.

Os resultados dos ensaios de liberação de íons podem ser vistos na Figura 25. Houve o aumento da liberação de íons Zn, conforme o tempo de lixiviação, bem como o aumento da concentração de NBZnO@AF nas membranas.

A liberação de íons pelas membranas, bem como sua liberação gradativa, pode favorecer a prevenção a incrustação

biológica (*biofouling*), ampliando a vida útil da membrana, porém, são necessários mais estudos para comprovar esta hipótese.

Figura 25. Liberação de íons das membranas após 72 h de lixiviação.



A liberação de íons por membranas nanocompósitas também foi observada nos estudos de Isawi et al., (2016) que verificaram a liberação de NP ZnO de membranas TFN por 10 dias e concluíram que 85% dos íons Zn lixiviaram da membrana nos primeiros quatro dias de teste, contudo o total lixiviado após 10 dias de teste, representou apenas 3,37% do total de íons incorporados na membrana. Os autores observaram ainda que a lixiviação dos íons atingiu estado estacionário no sexto dia de teste e que o montante lixiviado nos quatro primeiros dias pode estar relacionado a dissolução de NP ZnO que não reagiram completamente com a superfície da membrana.

Já Shahmohammadi Jebel; Almasi, (2016), avaliaram a liberação de NP ZnO de membranas celulósicas bacterianas e verificaram que a NP ZnO liberaram íons gradativamente, atingindo 23% de liberação após 96 h de teste.

4.3.10 Teste de toxicidade com as membranas

A potencial toxicidade aguda das membranas foi avaliada utilizando o organismo *D. magna*. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 17.

Tabela 17. Resultados dos testes de toxicidade aguda com *D. magna* utilizando a água de lixiviação das membranas. Parâmetro = mortalidade. Tempo de teste = 48 h. n = 10.

Tempo de lixiviação (h)	Amostra em H ₂ O UP											
	MF025				MF050				MF1			
	Fator de diluição											
	0	2	4	8	0	2	4	8	0	2	4	8
0	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	0
12	10	0	0	0	10	0	0	1	10	0	0	0
24	10	0	0	0	10	1	0	0	10	1	0	0
48	10	0	0	0	10	0	0	0	10	0	0	1
72	10	0	0	1	10	0	0	0	10	0	0	0
Amostra em meio ISO												
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
24	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0
48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
72	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
Mortalidade no controle = 0												

Primeiramente as membranas foram lixiviadas em água UP por 72 h. As alíquotas de água foram removidas nos tempos 0, 12, 42 e 72 h e testadas nos fatores de diluição (FD) 0, 2, 4 e 8. Nesses ensaios, a mortalidade das daphnias foi de 100% no fator de diluição 0. Isto ocorreu devido à falta de nutrientes na água utilizada. Nas demais diluições ocorreram mortes ocasionais, permanecendo dentro do limite de 10% aceitável segundo a NBR 12713 (ABNT, 2016), não apresentando assim toxicidade.

Devido ao FD 0 ter apresentado 100% de mortalidade, decidiu-se realizar os ensaios nas mesmas condições, porém adicionando as membranas em meio ISO, para se ter certeza que a mortalidade dos organismos-teste ocorreu devido à falta de nutrientes no meio.

Os resultados demonstraram que não houve mortalidade em FD 0 quando as membranas foram lixiviadas em meio ISO. Ocorreram mortes esporádicas das daphnias nos demais FD, permanecendo dentro do limite de 10%, não caracterizando

toxicidade.

Estes resultados demonstram que apesar de ter ocorrido a liberação de íons Zn das membranas para o meio (Figura 24), estas concentrações não foram suficientes para causar efeitos agudos nos organismos *D. magna*. Desta forma, as membranas preparadas podem apresentar propriedades anti-incrustação biológica, devido a característica biocida do ZnO, sem comprometer os demais organismos aquáticos.

A toxicidade aguda de membranas poliméricas também foi avaliada por Nogueira, (2012) utilizando o organismo *Daphnia similis*. A autora avaliou a toxicidade de membranas de PSF/QTS reticuladas ou não com diferentes concentrações gluteraldeído. Os resultados encontrados por Nogueira (2012) demonstram que nenhuma das membranas produzidas apresentou toxicidade aguda.

Já a toxicidade de membranas poliméricas utilizando o organismo *D. magna* foi investigada por Oliveira, (2016). A autora realizou testes com membranas de PSF, membranas de PSF com incorporação de nanotubos de SiO₂ e membranas de quitosana com nanotubos de SiO₂ amino-funcionalizados. De todas as membranas testadas, apenas a membrana de quitosana com nanotubos de SiO₂ amino-funcionalizados apresentaram baixa toxicidade (CE50_(24h) = 3250 mg.L⁻¹) para as daphnias.

5. CONCLUSÕES

Este estudo apresentou como principal objetivo avaliar a toxicidade de NBZnO e NBZnO@AF e aplicar os NB em uma membrana polimérica nanocompósita de filme fino. Diante dos resultados obtidos e das hipóteses levantadas, é possível concluir que:

- O NM utilizado estava na escala nanométrica, apresentando formato de bastão e cristalinidade hexagonal. Bem como foi possível confirmar que ocorreu a amino-funcionalização dos mesmos.
- Os NBZnO e NBZnO@AF foram capazes de causar efeitos agudos em *D. magna* em baixas concentrações ($< 3 \text{ mg.L}^{-1}$), induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio.
- A amino-funcionalização do NB o tornou mais tóxico, devido a adição de uma molécula orgânica em sua composição, facilitando a interação NM-sistema biológico.
- As micrografias revelaram que os NB foram internalizados pelos organismos-teste *D. magna*, encontrando-se acumulados no interior do intestino do organismo. Este contato do NB com o interior do intestino foi capaz de alterar a morfologia das células intestinais.
- Os NB foram capazes de causar efeitos crônicos sobre o crescimento, a reprodução e a longevidade dos organismos *D. magna*.
- Os testes multigeracionais de recuperação com *D. magna* demonstraram que a exposição parental aos NB afeta as futuras gerações das mesmas, causando efeitos crônicos sobre a longevidade, reprodução, tempo para primeira prole e número de posturas. F1 apresentou ter sido mais afetada pela exposição parental aos NB do que F12, contudo os filhotes da 12ª geração demonstraram um indício de recuperação apenas após 15º dia de teste.
- Nos testes multigeracionais de recuperação, os parâmetros de ciclo de vida foram capazes de detectar os efeitos crônicos em F1 e F12 mesmo após a remoção da fonte de contaminação; apresentaram-se assim, como ferramentas práticas e simples que podem elucidar possíveis danos na ecologia dos organismos estudados.

- Os NB causaram toxicidade aguda ao organismo *A. fischeri*, porém em concentrações elevadas ($> 14 \text{ mg.L}^{-1}$). Estando a menor toxicidade associada as características do meio teste.
- Os NB diminuíram a viabilidade celular de N2A após 24 h de exposição, sendo capazes de induzir a geração de espécies reativas de oxigênio e alterações nos níveis de lipoperoxidação.
- Comparando a toxicidade dos NB com o controle positivo de ZnSO_4 , é possível afirmar que a toxicidade dos NB não está associada apenas a liberação de íons Zn no meio, mas também com as características do NM, como tamanho diminuto e elevada área superficial, que podem acabar facilitando o transporte transmembrana e levar a liberação de íons no interior das células dos organismos, potencializando seus efeitos.
- Baseado nos resultados obtidos, se faz necessário estudar as diferentes formas de NM ZnO, uma vez que a forma do NM influencia na sua toxicidade, para uma melhor compreensão das interações e efeitos desses materiais com os organismos.
- A caracterização das membranas por MEV-FEG e FTIR demonstraram que as membranas preparadas apresentaram características específicas de TFN, comprovando que foram produzidas de maneira correta.
- A incorporação de NBZnO@AF no filme fino das membranas diminuiu sua a hidrofiliicidade e permeabilidade hidráulica. Este fenômeno pode estar associado as concentrações utilizadas que podem ter sido elevadas.
- Apesar da leve redução da hidrofiliicidade e da permeabilidade hidráulica, as membranas com incorporação de NBZnO@AF, apresentaram maior fluxo quando comparando as membranas controle.
- Nos ensaios de retenção de sais NaCl e MgCl_2 , as membranas apresentaram moderada e baixa e retenção de sais. As membranas utilizadas nos ensaios de filtração com NaCl demonstraram maior rejeição atingindo até 64% de retenção.
- As diferenças apresentadas pelas membranas estão também relacionadas ao fato delas terem sido preparadas em laboratórios diferentes, o que leva a uma interferência na estrutura das membranas, uma vez que, condições como temperatura e umidade interferem em suas características finais.
- Houve a liberação de íons Zn pelas membranas. A

liberação de íons aumentou conforme o aumento na concentração de NBZnO@AF nas membranas e conforme o tempo de lixiviação. A liberação gradual de íons pela membrana auxilia na prevenção ao *biofouling*, podendo aumentar a vida útil da membrana.

- Apesar de haver a liberação de íons da membrana para o meio, a quantidade liberada não foi capaz de causar efeitos agudos em *D. magna*.

6. RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados obtidos, algumas recomendações para pesquisas futuras baseadas neste estudo são:

- Realizar teste crônico multigeracional, com e sem exposição aos NM, com *D. magna* acompanhando todo o seu ciclo de vida (aproximadamente 60 dias).
- Realizar testes crônicos com os filhotes de *D. magna* dos testes multigeracionais, com e sem exposição aos NM.
- Avaliar os efeitos dos NM a nível bioquímico em todos os organismos estudados.
- Testar um gradiente maior de concentrações de NBZnO@AF no filme fino de PA.
- Realizar testes anti-incrustação biológica com as membranas.
- Inserir o NM no filme fino de PA utilizando outra técnica de preparação.
- Preparar, caracterizar e avaliar membranas TFN com diferentes concentrações de NBZnO.
- Realizar os ensaios de retenção com outros sais além de NaCl e MgCl₂.
- Ao ser desenvolvido um produto que contenha NM em sua composição, recomenda-se testar a toxicidade dos NM e a toxicidade dos produtos aonde os NM foram inseridos.

7 REFERÊNCIAS

ABDI. **Nanotecnologias: subsídios para a problemática dos riscos e regulação.** Brasília: 2011. Disponível em: <[http://www.abdi.com.br/Estudo/Relatório Nano-Riscos_FINALreduzido.pdf](http://www.abdi.com.br/Estudo/Relatório_Nano-Riscos_FINALreduzido.pdf)>. Acesso em: 3 fev. 2018.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 10005: Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos.** Rio de Janeiro, 2004.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 15411: Ecotoxicologia aquática — Determinação do efeito inibitório de amostras aquosas sobre a emissão da bioluminescência de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente) Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas.** Rio de Janeiro, 2012.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12713: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera).** Rio de Janeiro, 2016.

ADAM, N. et al. The chronic toxicity of ZnO nanoparticles and ZnCl₂ to *Daphnia magna* and the use of different methods to assess nanoparticle aggregation and dissolution. **Nanotoxicology**, v. 8, n. November, p. 709–717, 2014.

ADAM, N. et al. The uptake and elimination of ZnO and CuO nanoparticles in *Daphnia magna* under chronic exposure scenarios. **Water Research**, v. 68, p. 249–261, 2015.

ADAMS, L. K.; LYON, D. Y.; ALVAREZ, P. J. J. Comparative ecotoxicity of nanoscale TiO₂, SiO₂, and ZnO water suspensions. **Water Research**, v. 40, n. 19, p. 3527–3532, 2006.

ADRIAENSENS, P. et al. Quantitative magnetic resonance imaging study of water uptake by polyamide 4,6. **Polymer**, v. 42, n. 19, p. 7943–7952, 1 set. 2001.

AL-RASHDI, B. A. M.; JOHNSON, D. J.; HILAL, N. Removal of heavy metal ions by nanofiltration. **Desalination**, v. 315, p. 2–17,

2013.

ALHOSHAN, M. et al. Fabrication of polysulfone/ZnO membrane: Influence of ZnO nanoparticles on membrane characteristics. **Advances in Polymer Technology**, v. 32, n. 4, 2013.

AMINI, M.; JAHANSHAH, M.; RAHIMPOUR, A. Synthesis of novel thin film nanocomposite (TFN) forward osmosis membranes using functionalized multi-walled carbon nanotubes. **Journal of Membrane Science**, v. 435, p. 233–241, 2013.

ANDRADE, P. F. et al. Improved antibacterial activity of nanofiltration polysulfone membranes modified with silver nanoparticles. **Water Research**, v. 81, p. 333–342, 2015.

ANN, L. C. et al. Structural morphology and in vitro toxicity studies of nano- and micro-sized zinc oxide structures. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 3, n. 1, p. 436–444, 2015.

ARAGÃO, M. A.; ARAÚJO, R. P. Métodos de ensaios ecotoxicológicos. In: **Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: Rima. p. 472. 2008.

ARNDT, D. A. et al. Multigeneration impacts on *Daphnia magna* of carbon nanomaterials with differing core structures and functionalizations. **Environmental toxicology and chemistry**, v. 33, n. 3, p. 541–7, 2014.

AZEVEDO, F. A.; CHASIN, A. A. M. **As bases toxicológicas da ecotoxicologia**. 1. ed. São Paulo: Rima Intertox, 2003.

BAALOUSHA, M. et al. Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles. **Science of The Total Environment**, v. 454–455, p. 119–131, 2013.

BACCHETTA, R. et al. Evidence and uptake routes for Zinc oxide nanoparticles through the gastrointestinal barrier in *Xenopus laevis*. **Nanotoxicology**, p. 1–17, 2013.

BACCHETTA, R. et al. Role of soluble zinc in ZnO nanoparticle cytotoxicity in *Daphnia magna*: A morphological approach.

Environmental Research, v. 148, p. 376–385, jul. 2016.

BACCHETTA, R. et al. Chronic toxicity effects of ZnSO₄ and ZnO nanoparticles in *Daphnia magna*. **Environmental Research**, v. 152, p. 128–140, 2017.

BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications**. 2nd. ed. Chichester, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2004.

BAKER, R. W. Overview of Membrane Science and Technology. In: **Membrane Technology and Applications**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2012. p. 1–14, 2012.

BALTA, S. et al. A new outlook on membrane enhancement with nanoparticles: The alternative of ZnO. **Journal of Membrane Science**, v. 389, p. 155–161, 2012.

BARATA, C. et al. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 140, n. 2, p. 175–186, 2005.

BARBER, D. A.; HARRIS, S. R. Oxygen free radicals and antioxidants: A Review: The use of antioxidant vitamin supplements to scavenge free radicals could decrease the risk of disease. **American Pharmacy**, v. 34, n. 9, p. 26–35, 1994.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BASSANI, A.; PESSAN, L. A.; HAGE JÚNIOR, E. Propriedades Mecânicas de Blendas de Nylon-6/ Acrilonitrila-EPDM-Estireno (AES) Compatibilizadas com Copolímero Acrílico Reativo (MMA-MA). **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v. 12, n. 2, p. 102–108, 2002.

BERNAUER, U. et al. The use of in vitro data in risk assessment. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 96, n. 3, p. 176–181, 2005.

BERTOLETTI, E. **Controle ecotoxicológico de efluentes líquidos**

no estado de São Paulo. **Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB)**. São Paulo: CETESB, , 2013. Disponível em: <<http://cetesb.sp.gov.br/wp-content/uploads/2015/06/manual-controle-ecotoxicologico-2013.pdf>>. Acesso em: 3 fev. 2018

BET-MOUSHOUL, E. et al. TiO₂ nanocomposite based polymeric membranes: A review on performance improvement for various applications in chemical engineering processes. **Chemical Engineering Journal**, v. 283, p. 29–46, 2016.

BIAN, S.-W. et al. Aggregation and dissolution of 4 nm ZnO nanoparticles in aqueous environments: Influence of pH, ionic strength, size, and adsorption of humic acid. **Langmuir**, v. 27, n. 10, p. 6059–6068, 2011.

BLINOVA, I. et al. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. **Environmental Pollution**, v. 158, n. 1, p. 41–47, 2010.

BOJARSKA, M. et al. Growth of ZnO nanowires on polypropylene membrane surface—Characterization and reactivity. **Applied Surface Science**, v. 391, p. 457–467, 2017.

BOUTARD, T. et al. Comparison of photoprotection efficiency and antiproliferative activity of ZnO commercial sunscreens and CeO₂. **Materials Letters**, v. 108, p. 13–16, 2013.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, 1976.

BRAME, J.; LI, Q.; ALVAREZ, P. J. J. Nanotechnology-enabled water treatment and reuse: emerging opportunities and challenges for developing countries. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 11, p. 618–624, 2011.

BRYDSON, J. A. **Plastic materials**. 6. ed. Oxford: Butterworth Heinemann, 1985.

BUFFET et al. Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles. *Chemosphere*, v. 86, n. 1, p. 166–174, 2011.

BULICH, A. A.; ISENBERG, D. L. Use of the luminescent bacterial system for the rapid assessment of aquatic toxicity. **ISA transactions**, v. 20, n. 1, p. 29–33, 1981.

BUONOMENNA, M. G. et al. New PVDF membranes: The effect of plasma surface modification on retention in nanofiltration of aqueous solution containing organic compounds. **Water Research**, v. 41, n. 19, p. 4309–4316, 1 nov. 2007.

CARVALHO, A. L. et al. Tetracarboxyphenylporphyrin--kaolinite hybrid materials as efficient catalysts and antibacterial agents. **J Phys Chem B**, v. 118, 2014.

CATALÁ, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 38, n. 9, p. 1482–1495, 2006.

CHEN, Y. et al. Multimorphologies nano-ZnO preparing through a simple solvothermal method for photocatalytic application. **Materials Letters**, v. 141, p. 294–297, 2015.

CHIA, S. L.; LEONG, D. T. Reducing ZnO nanoparticles toxicity through silica coating. **Heliyon**, v. 2, n. 10, p. e00177, out. 2016.

COMBARROS, R. G.; COLLADO, S.; DÍAZ, M. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles on *Pseudomonas putida*. **Water Research**, v. 90, p. 378–386, 2016.

COSTA, C. H. **Avaliação toxicológica da nanopartícula de óxido de cromo III através de ensaios in vivo e in vitro**. Pós-Graduação em Engenharia Ambiental. Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

COSTA, R. C. et al. A toxicidade em ambientes aquáticos: discussão e métodos de avaliação. **Quim. Nova**, v. 31, n. 7, p. 1820–1830, 2008.

COSTA, S. P. F. et al. Toxicity assessment of ionic liquids with *Vibrio fischeri*: An alternative fully automated methodology. **Journal of Hazardous Materials**, v. 284, p. 136–142, 2 mar. 2015.

COTTER, R. J. **Engineering Plastics: A Handbook of Polyarylethers**. London: Gordon and Breach, 1995.

COWGILL, U. M.; WILLIAMS, D. M.; ESQUIVEL, J. B. Effects of maternal nutrition on fat content and longevity of neonates of *Daphnia magna*. **Journal of Crustacean Biology**, v. 4, n. 2, p. 173–190, 1984.

CRONHOLM, P. et al. Effect of sonication and serum proteins on copper release from copper nanoparticles and the toxicity towards lung epithelial cells. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 2, p. 269–281, 2011.

CUPI, D.; HARTMANN, N. B.; BAUN, A. Influence of pH and media composition on suspension stability of silver, zinc oxide, and titanium dioxide nanoparticles and immobilization of *Daphnia magna* under guideline testing conditions. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 127, p. 144–152, 2016.

DAMODAR, R. A.; YOU, S.-J.; CHOU, H.-H. Study the self cleaning, antibacterial and photocatalytic properties of TiO₂ entrapped PVDF membranes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 172, n. 2–3, p. 1321–1328, 2009.

DE MORAIS COUTINHO, C. et al. State of art of the application of membrane technology to vegetable oils: A review. **Food Research International**, v. 42, n. 5–6, p. 536–550, 2009.

DELISTRATY, D.; TAYLOR, B.; ANDERSON, R. Comparisons of acute toxicity of selected chemicals to rainbow trout and rats. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 39, n. 3, p. 195–200, 1998.

DIPHEKO, T. D. et al. Fabrication and assessment of ZnO modified polyethersulfone membranes for fouling reduction of bovine serum albumin. **International Journal of Polymer Science**, v. 2017, 2017.

DOMINGUES, D. F.; BERTOLETTI, E. Seleção, manutenção e cultivo de organismos aquáticos. In: **Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2008. p. 153–184.

DOMINGUEZ, G. A. et al. Effects of charge and surface ligand properties of nanoparticles on oxidative stress and gene expression

within the gut of *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 162, p. 1–9, 2015.

EL MAHDY, M. M. et al. Evaluation of hepatotoxic and genotoxic potential of silver nanoparticles in albino rats. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, n. 1, p. 21–29, 2015.

EMADZADEH, D. et al. A novel thin film nanocomposite reverse osmosis membrane with superior anti-organic fouling affinity for water desalination. **Desalination**, v. 368, p. 106–113, 2015.

EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Guide: **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms**, 4^a ed. 2002.

EPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Research on Nanomaterials**. 2017. Disponível em: <https://www.epa.gov/chemical-research/research-nanomaterials>, Acesso em: 25 ago. 2017.

FAN, X. et al. Multiwall carbon nanotubes modulate paraquat toxicity in *Arabidopsis thaliana*. **Environmental Pollution**, v. 233, p. 633–641, 2018.

FANE, A. G.; WANG, R.; JIA, Y. Membrane technology: Past, present and future. In: **Membrane and Desalination Technologies**. Totowa, NJ: Humana Press, p. 1–45, 2011.

FERNÁNDEZ, D.; GARCÍA-GÓMEZ, C.; BABÍN, M. *In vitro* evaluation of cellular responses induced by ZnO nanoparticles, zinc ions and bulk ZnO in fish cells. **Science of The Total Environment**, v. 452–453, p. 262–274, 2013.

FLORA, S. J. S. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for strategies against metal and metalloid exposure. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2, n. 4, p. 191–206, 2009.

FOROUZANI, M. et al. Comparative study of oxidation of benzyl alcohol: Influence of Cu-doped metal cation on nano ZnO catalytic activity. **Chemical Engineering Journal**, v. 275, p. 220–226, 2015.

FRIDOVICH, I. Superoxide Dismutase: An adaptation to a paramagnetic gas. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 15, p. 7761–7764, 1989.

FUJIHARA, S.; NAITO, H.; KIMURA, T. Visible photoluminescence of ZnO nanoparticles dispersed in highly transparent MgF₂ thin-films via sol–gel process. **Thin Solid Films**, v. 389, n. 1–2, p. 227–232, 2001.

FURMIDGE, C. G. L. Studies at phase interfaces i. the sliding of liquid drops on solid surfaces and a theory for spray retention. **Journal of Colloid Science**, v. 17, p. 309–324, 1962.

FUTURE MARKET INC. **The global market for nanomaterials 2010-2027**. Edinburgh, 2017.

GHASEMZADEH, G. et al. Applications of nanomaterials in water treatment and environmental remediation. **Frontiers of Environmental Science & Engineering**, v. 8, n. 4, p. 471–482, 2014.

GHERARDI, G. **Procedimentos para utilização de testes de toxicidade no controle de efluentes líquidos**. São Paulo: CETESB, 1990.

GHERASIM, C.-V.; CUHORKA, J.; MIKULÁŠEK, P. Analysis of lead(II) retention from single salt and binary aqueous solutions by a polyamide nanofiltration membrane: Experimental results and modelling. **Journal of Membrane Science**, v. 436, p. 132–144, 2013.

GONÇALVES, R. A. et al. Comparative assessment of toxicity of ZnO and amine-functionalized ZnO nanorods toward *Daphnia magna* in acute and chronic multigenerational tests. **Aquatic Toxicology**, v. 197, p. 32–40, 2018.

HABERT, A. C.; BORGES, C. P.; NOBREGA, R. **Processo de separação com membranas**. 1^a ed. Rio de Janeiro: E-papers Serviços Editoriais Ltda, 2006.

HAN, Y. et al. Aggregation and dissolution of ZnO nanoparticles synthesized by different methods: Influence of ionic strength and humic acid. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and**

Engineering Aspects, v. 451, n. 1, p. 7–15, 2014.

HANLEY, C. et al. Preferential killing of cancer cells and activated human T cells using ZnO nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 19, n. 29, 2008.

HEINLAAN, M. et al. Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*. **Chemosphere**, v. 71, n. 7, p. 1308–1316, 2008.

HODSON, E. **A textbook of modern toxicology**. 4. ed. Raleigh: Wiley, 2010.

HOGSTRAND, C. Zinc. **Fish Physiology**, v. 31, p. 135–200, 2011.

HONG, J.; HE, Y. Effects of nano sized zinc oxide on the performance of PVDF microfiltration membranes. **Desalination**, v. 302, p. 71–79, 2012.

HOU, J. et al. Effects of CeO₂, CuO, and ZnO nanoparticles on physiological features of *Microcystis aeruginosa* and the production and composition of extracellular polymeric substances. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 24, n. 1, p. 226–235, 2017.

HSIAO, I.-L.; HUANG, Y.-J. Effects of serum on cytotoxicity of nano- and micro-sized ZnO particles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 15, p. 1829, 2013.

HUANG, C.-L. et al. Silver nanoparticles affect on gene expression of inflammatory and neurodegenerative responses in mouse brain neural cells. **Environmental Research**, v. 136, p. 253–263, 2015.

HUYNH, K. A.; CHEN, K. L. Aggregation kinetics of citrate and polyvinylpyrrolidone coated silver nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 13, p. 5564–5571, 2011.

INOUE, S. NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein. **FEBS Letters**, v. 347, n. 2–3, p. 163–168, 1994.

ISAWI, H. et al. Surface nanostructuring of thin film composite membranes via grafting polymerization and incorporation of ZnO nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 385, p. 268–281, 2016.

ISO. INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10706:2000(E) Water quality - Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea)**. 1^a ed., 2000.

JAFARZADEH, Y.; YEGANI, R.; SEDAGHAT, M. Preparation, characterization and fouling analysis of ZnO/polyethylene hybrid membranes for collagen separation. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 94, p. 417–427, 2015.

JEON, W. et al. Functional enhancement of neuronal cell behaviors and differentiation by elastin-mimetic recombinant protein presenting Arg-Gly-Asp peptides. **BMC Biotechnology**, v. 12, n. 1, 2012.

JEONG, B-H. et al. Interfacial polymerization of thin film nanocomposites: A new concept for reverse osmosis membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 294, n. 1–2, p. 1–7, 2007.

JIN, L. et al. Preparation and characterization of a novel PA-SiO₂ nanofiltration membrane for raw water treatment. **Desalination**, v. 298, p. 34–41, 2012.

KANG, J.-W. et al. Ultraviolet emission from a multi-layer graphene/MgZnO/ZnO light-emitting diode. **Applied Physics Letters**, v. 104, n. 5, p. 51120, 2014.

KHALID, A. et al. Preparation and properties of nanocomposite polysulfone/multi-walled carbon nanotubes membranes for desalination. **Desalination**, v. 367, p. 134–144, 2015.

KHORSHIDI, B. et al. Developing high throughput thin film composite polyamide membranes for forward osmosis treatment of SAGD produced water. **Journal of Membrane Science**, v. 511, p. 29–39, 2016.

KIM, C. K. et al. The changes of membrane performance with polyamide molecular structure in the reverse osmosis process. **Journal of Membrane Science**, v. 165, n. 2, p. 189–199, 2000.

KIM, R.-O. et al. Comparative analysis of transcriptional profile changes in larval Zebrafish exposed to zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 98, n. 2, 2017.

KIRKHAM, P.; RAHMAN, I. Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, n. 2, p. 476–494, 2006.

KLEBE, R. J.; RUDDLE, F. H. Neuroblastoma: cell culture analysis of a differentiating stem cell system. **Journal of Cell Biology**, v. 43, n. 69a, 1969.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes toxicológicos: métodos, técnicas e aplicações**. 1. ed. Florianópolis: FATMA/GTZ, 2004.

KRÓL, A. et al. Zinc oxide nanoparticles: Synthesis, antiseptic activity and toxicity mechanism. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 249, p. 37–52, 2017.

KWON, D. et al. Effects of surface-modifying ligands on the colloidal stability of ZnO nanoparticle dispersions in in vitro cytotoxicity test media. **International journal of nanomedicine**, v. 9 Suppl 2, n. Suppl 2, p. 57–65, 2014.

LALAU, C. M. et al. Toxicological effects of copper oxide nanoparticles on the growth rate, photosynthetic pigment content, and cell morphology of the duckweed *Landoltia punctata*. **Protoplasma**, v. 252, n. 1, p. 221–229, 2015.

LAU, W. J. et al. A review on polyamide thin film nanocomposite (TFN) membranes: History, applications, challenges and approaches. **Water Research**, v. 80, p. 306–324, 2015.

LEE, S.-Y.; KANG, H.-J.; KWON, J.-H. Toxicity cutoff of aromatic hydrocarbons for luminescence inhibition of *Vibrio fischeri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 94, p. 116–122, 2013.

LEO, C. P. et al. Polysulfone membranes blended with ZnO nanoparticles for reducing fouling by oleic acid. **Separation and Purification Technology**, v. 89, p. 51–56, 2012.

LEUNG, Y. H. et al. Antibacterial activity of ZnO nanoparticles with a modified surface under ambient illumination. **Nanotechnology**, v. 23, n. 47, p. 475, 2012.

LEUNG, Y. H. et al. Toxicity of CeO₂ nanoparticles – The effect of nanoparticle properties. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 145, p. 48–59, 2015.

LEWICKA, Z. A. et al. Photochemical behavior of nanoscale TiO₂ and ZnO sunscreen ingredients. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 263, p. 24–33, 2013.

LI, D.; WANG, H. Recent developments in reverse osmosis desalination membranes. **Journal of Materials Chemistry**, v. 20, n. 22, p. 4551, 2010.

LI, N. et al. Hydrophilic modification of polyvinylidene fluoride membranes by ZnO atomic layer deposition using nitrogen dioxide/diethylzinc functionalization. **Journal of Membrane Science**, v. 514, p. 241–249, 2016.

LI, Y. et al. Separation performance of thin-film composite nanofiltration membrane through interfacial polymerization using different amine monomers. **Desalination**, v. 333, n. 1, p. 59–65, 2014.

LIANG, S. et al. A novel ZnO nanoparticle blended polyvinylidene fluoride membrane for anti-irreversible fouling. **Journal of Membrane Science**, v. 394–395, p. 184–192, 2012.

LIN, H.-C. et al. Comparative proteomics reveals silver nanoparticles alter fatty acid metabolism and amyloid Beta clearance for neuronal apoptosis in a triple cell coculture model of the blood–brain barrier. **Toxicological Sciences**, v. 158, n. 1, p. 151–163, 2017.

LIN, X. et al. Catalytic properties of ZnO-modified copper ferrite catalysts in water-gas shift reaction. **Journal of Fuel Chemistry and Technology**, v. 42, n. 11, p. 1351–1356, 2014.

LIND, M. L. et al. Effect of mobile cation on zeolite-polyamide thin film nanocomposite membranes. **Journal of Materials Research**, v. 24, n. 5, p. 1624–1631, 2009.

LIU, J.; WANG, W.-X. The protective roles of TiO₂ nanoparticles against UV-B toxicity in *Daphnia magna*. **Science of The Total Environment**, v. 593, p. 47–53, 2017.

LOPES, S. et al. Zinc oxide nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*: size-dependent effects and dissolution. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 33, n. 1, p. 190–198, 2014.

LU, H. et al. Dependence of the irradiation conditions and crystalline phases of TiO₂ nanoparticles on their toxicity to *Daphnia magna*. **Environmental Science Nanotechnology**, v. 4, n. 2, p. 406–414, 2017.

LU, Y. et al. Comparative study of oxidative stress induced by sand flower and schistose nanosized layered double hydroxides in N2a cells. **Frontiers in Biology**, v. 10, n. 3, p. 279–286, 2015.

LV, X. et al. Mechanisms underlying the acute toxicity of fullerene to *Daphnia magna*: Energy acquisition restriction and oxidative stress. **Water Research**, v. 123, p. 696–703, 2017.

MA, X. Y. et al. Bioassay based luminescent bacteria: Interferences, improvements, and applications. **Science of The Total Environment**, v. 468–469, p. 1–11, 2014.

MALVERN. **Zeta size nanoseries: User manual MAN0317**. Malvern Instruments Ltd, 2004.

MATIAS, W. G. **Apostila de toxicologia ambiental**. Pós Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MATIAS, W. G.; CREPPY, E. E. 5-Methyldeoxycytosine as a biological marker of DNA damage induced by okadaic acid in vero cells. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v. 13, n. 1, p. 83–88, 1998.

MAYRINCK, C. et al. Synthesis, Properties and applications of nanostructured zinc oxide. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 5, 2014.

MEHDIPOUR, S.; VATANPOUR, V.; KARIMINIA, H.-R. Influence of ion interaction on lead removal by a polyamide nanofiltration

membrane. **Desalination**, v. 362, p. 84–92, 2015.

MEHRNIA, M. R.; MOJTAHEDI, Y. M.; HOMAYOONFAL, M. What is the concentration threshold of nanoparticles within the membrane structure? A case study of Al₂O₃/PSf nanocomposite membrane. **Desalination**, v. 372, p. 75–88, 2015.

MELEGARI, S. P. **Estudo do mecanismo de ação tóxica da saxotoxina e avaliação de sua absorção em materiais alternativos para aplicação em sistemas de monitoramento de água**. Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, 2010.

MELEGARI, S. P. et al. Induction to oxidative stress by saxitoxin investigated through lipid peroxidation in Neuro 2A cells and *Chlamydomonas reinhardtii* alga. **Chemosphere**, v. 89, n. 1, p. 38–43, 2012.

MELEGARI, S. P. et al. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 142–143, p. 431–440, 2013.

MISDAN, N. et al. Formation of thin film composite nanofiltration membrane: Effect of polysulfone substrate characteristics. **Desalination**, v. 329, p. 9–18, 2013.

MOHAMMAD, A. W. et al. Nanofiltration membranes review: Recent advances and future prospects. **Desalination**, v. 356, p. 226–254, 2015.

MORTIMER, M. et al. High throughput kinetic *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for study of toxic effects of nanoparticles. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 5, p. 1412–1417, 2008.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. 2. ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996.

MURASE, S. et al. Structural characteristics and moisture sorption behavior of nylon-6/clay hybrid films. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 40, n. 6, p. 479–487, 2002.

MUYSSSEN, B. T. A.; JANSSEN, C. R. Multigeneration zinc

acclimation and tolerance in *Daphnia Magna*: Implications for water-quality guidelines and ecological risk assessment. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 20, n. 9, p. 2053–2060, 2001.

MWAANGA, P.; CARRAWAY, E. R.; VAN DEN HURK, P. The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles. **Aquatic Toxicology**, v. 150, p. 201–209, 2014.

NASROLLAHI, N. et al. Preparation and characterization of a novel polyethersulfone (PES) ultrafiltration membrane modified with a CuO/ZnO nanocomposite to improve permeability and antifouling properties. **Separation and Purification Technology**, v. 192, p. 369–382, 2018.

NASSER, F. et al. Shape and charge of gold nanomaterials influence survivorship, oxidative stress and moulting of *Daphnia magna*. **Nanomaterials**, v. 6, n. 22, 2016.

NEALSON, K. H.; HASTINGS, J. W. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. **Microbiological reviews**, v. 43, n. 4, p. 496–518, 1979.

NEL, A. et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622-627, 2006.

NG, L. Y. et al. Polymeric membranes incorporated with metal/metal oxide nanoparticles: A comprehensive review. **Desalination**, v. 308, p. 15–33, 2013.

NGO, T. H. A. et al. Surface modification of polyamide thin film composite membrane by coating of titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Science: Advanced Materials and Devices**, v. 1, n. 4, p. 468–475, 2016.

NOGUEIRA, F. T. **Síntese e caracterização de membranas de filme fino composto de polissulfona/uitosana reticulada com glutaraldeído**. Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2012.

OBERDORSTER, G. et al. Role of the alveolar macrophage in lung injury: Studies with ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**, v. 97, p. 193–199, 1992.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental health perspectives**, v. 113, n. 7, p. 823–39, 2005.

ODZAK, N.; KISTLER, D.; SIGG, L. Influence of daylight on the fate of silver and zinc oxide nanoparticles in natural aquatic environments. **Environmental Pollution**, v. 226, p. 1–11, 2017.

OGA, S. **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

OLIVEIRA, K. G. DE. **Preparação, caracterização e avaliação toxicológica de membranas de nanofiltração**. Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

OURIQUES, L. C.; SCHMIDT, É. C.; BOUZON, Z. L. Cytochemical study of spore germination in nemalio helminthoidea (Nemaliales, Rhodophyta). **Journal of Advanced Microscopy Research**, v. 6, n. 2, p. 81–88, 2011.

ÖZGÜR, Ü. et al. A comprehensive review of ZnO materials and devices. **Journal of Applied Physics**, v. 98, n. 4, p. 41301, 2005.

PAL, A. et al. Nano-ZnO impregnated inorganic–polymer hybrid thinfilm nanocomposite nanofiltration membranes: an investigation of variation in structure, morphology and transport properties. **RSC Advances**, v. 5, n. 43, p. 34134–34151, 2015.

PARK, J. et al. Effect of salinity on acute copper and zinc toxicity to *Tigriopus japonicus*: The difference between metal ions and nanoparticles. **Marine Pollution Bulletin**, v. 85, n. 2, p. 526–531, 2014.

PARVEZ, S.; VENKATARAMAN, C.; MUKHERJI, S. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. **Environment International**, v. 32, n. 2, p. 265–268, 2006.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE, G. P. S.; JARDIM, W. F. OS Nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421–430, 2010.

PASSARELLI, M. M. Toxicologia Ambiental. In: OGA, S. (Ed.). **Fundamentos de toxicologia**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

PERREAULT, F. et al. Investigation of animal and algal bioassays for reliable saxitoxin ecotoxicity and cytotoxicity risk evaluation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 1021–1026, 2011.

PERREAULT, F. et al. Genotoxic effects of copper oxide nanoparticles in Neuro 2A cell cultures. **Science of The Total Environment**, v. 441, p. 117–124, 2012.

PEYKI, A.; RAHIMPOUR, A.; JAHANSHAHI, M. Preparation and characterization of thin film composite reverse osmosis membranes incorporated with hydrophilic SiO₂ nanoparticles. **Desalination**, v. 368, p. 152–158, 2015.

PITT, J. A. et al. Uptake, tissue distribution, and toxicity of polystyrene nanoparticles in developing zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 194, p. 185–194, 2018.

POWELL, K. J. et al. Chemical speciation of environmentally significant metals with inorganic ligands. IUPAC Technical Report. **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 12, p. 2249–2311, 2013.

POYNTON, H. C. et al. Differential gene expression in *Daphnia magna* suggests distinct modes of action and bioavailability for ZnO nanoparticles and Zn ions. **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 762–768, 2011.

PUERARI, R. C. et al. Synthesis, characterization and toxicological evaluation of Cr₂O₃ nanoparticles using *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 36–43, 2016.

QU, X. et al. Nanotechnology for a safe and sustainable water supply: enabling integrated water treatment and reuse. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 834–843, 2013.

QU, X.; ALVAREZ, P. J. J.; LI, Q. Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. **Water Research**, v. 47, n. 12, p. 3931–3946, 2013.

RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, n. 1–3, p. 222–239, 2006.

RAJABI, H. et al. Nano-ZnO embedded mixed matrix polyethersulfone (PES) membrane: Influence of nanofiller shape on characterization and fouling resistance. **Applied Surface Science**, v. 349, p. 66–77, 2015.

RAMASAMY, M. et al. Role of surface modification in zinc oxide nanoparticles and its toxicity assessment toward human dermal fibroblast cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 3707–3718, 2014.

RAND, G. M.; PETROCELLI, S. R. **Fundamentals of aquatic toxicology: Methods and applications**. Washington: Hemisphere Publishing, 1985.

RIBEIRO, S. M. R. et al. A formação e os efeitos das espécies reativas de oxigênio no meio biológico. **Bioscience Journal**, v. 21, n. 3, p. 133–149, 2005.

ROBESON, L. M.; FARNHAM, A. G.; MCGRATH, J. E. Dynamic mechanical characteristics of polysulfone and other polyarylethers. In: MEIER, D. J. (Ed.). **Molecular basis for transportation and relaxations**. Midland Macromolecular Institute Monographs, p. 405, 1978.

ROSSETTO, A. L. DE O. F. **Estudo comparativo entre os efeitos tóxicos agudos e crônicos do óxido de cobre na forma de nanopartícula e micropartícula**. Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.

ROSSETTO, A. L. DE O. F. et al. Synthesis, characterization and toxicological evaluation of a core–shell copper oxide/polyaniline nanocomposite. **Chemosphere**, v. 108, p. 107–114, 2014a.

ROSSETTO, A. L. DE O. F. et al. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. **Science of The Total Environment**, v. 490, p. 807–814, ago. 2014b.

ROSSETTO, A. L. DE O. F. **Avaliação dos efeitos tóxicos da**

nanopartícula e micropartícula de óxido de cobre em diferentes organismos aquáticos. Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

RUPPERT, E. B.; BARNES, R. D. **Zoologia dos invertebrados: Uma abordagem funcional evolutiva.** São Paulo: ROCA, 2005.

SABELLA, S. et al. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-containing nanoparticles. **Nanoscale**, v. 6, n. 12, p. 7052–61, 2014.

SAISON, C. et al. Effect of core–shell copper oxide nanoparticles on cell culture morphology and photosynthesis (photosystem II energy distribution) in the green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 96, n. 2, p. 109–114, 2010.

SÁNCHEZ-ORTÍZ, J. R.; SARMA, S. S. S.; NANDINI, S. Comparative population growth of *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia pulex* (Cladocera) exposed to zinc toxicity. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, v. 45, n. 1, p. 37–41, 2010.

SANTO, N. et al. Toxic effects and ultrastructural damages to *Daphnia magna* of two differently sized ZnO nanoparticles: Does size matter? **Water Research**, v. 53, p. 339–350, 2014.

SARKHEIL, M. et al. Acute toxicity, uptake, and elimination of zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) using saltwater microcrustacean, *Artemia franciscana*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 57, p. 181–188, 2018.

SARWAR, S. et al. The antimicrobial activity of ZnO nanoparticles against *Vibrio cholerae*: Variation in response depends on biotype. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 6, p. 1499–1509, 2016.

SCOTT, K. **Handbook of industrial membranes.** Elsevier Advanced Technology, 1995.

SELCK, H. et al. Nanomaterials in the aquatic environment: A European Union-United States perspective on the status of ecotoxicity testing, research priorities, and challenges ahead. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 35, n. 5, p. 1055–

1067, 2016.

SENAPATI, V. A. et al. ZnO nanoparticles induced inflammatory response and genotoxicity in human blood cells: A mechanistic approach. **Food and Chemical Toxicology**, v. 85, p. 61–70, 2015.

SEO, J. et al. Effects of Physiochemical Properties of Test Media on Nanoparticle Toxicity to *Daphnia magna* Straus. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, n. 3, p. 257–262, 2017.

SHAHMOHAMMADI JEBEL, F.; ALMASI, H. Morphological, physical, antimicrobial and release properties of ZnO nanoparticles-loaded bacterial cellulose films. **Carbohydrate Polymers**, v. 149, p. 8–19, 2016.

SHEN, L. et al. Preparation and characterization of ZnO/polyethersulfone (PES) hybrid membranes. **Desalination**, v. 293, p. 21–29, 2012.

SHU, Z. et al. Halloysite nanotubes supported Ag and ZnO nanoparticles with synergistically enhanced antibacterial activity. **Nanoscale Research Letters**, v. 12, p. 135, 2017.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SOBEL, S.; THEOPHALL, G. The complexation of aqueous metal ions relevant to biological applications: 2. Evaluation of simultaneous equilibria of poorly soluble zinc salts with select amino acids. **Chemical Speciation & Bioavailability**, v. 22, n. 3, p. 201–205, 2010.

SONG, H. J. et al. Characteristics of ultrafiltration membranes fabricated from polysulfone and polymer-grafted silica nanoparticles: Effects of the particle size and grafted polymer on the membrane performance. **Journal of Membrane Science**, v. 466, p. 173–182, 2014.

SUJI, G.; SIVAKAMI, S. Malondialdehyde, a lipid-derived aldehyde alters the reactivity of Cys34 and the esterase activity of serum albumin. **Toxicology in Vitro**, v. 22, n. 3, p. 618–624, abr. 2008.

TREMBLAY, R. G. et al. Differentiation of mouse Neuro 2A cells into dopamine neurons. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 186, n. 1, p. 60–67, 2010.

TWEDDLE, T. A. et al. Polysulfone ultrafiltration membranes. **Industrial & Engineering Chemistry Product Research and Development**, v. 22, n. 2, p. 320–326, 1983.

ULBRICHT, M. Advanced functional polymer membranes. **Polymer**, v. 47, n. 7, p. 2217–2262, 2006.

UNFPA. United States Population Found. **Situação da População Mundial 2013**. Relatório, 2013. Disponível em: <<http://www.unfpa.org.br/Arquivos/swop2013.pdf>>. Acesso em: 20 maio. 2015.

USKI, O. et al. In vitro toxicological effects of zinc containing nanoparticles with different physico-chemical properties. **Toxicology in Vitro**, v. 42, p. 105–113, 2017.

VASEEM, M.; AHMAD, U.; YOON-BONG, H. ZnO Nanoparticles: growth, properties, and applications. In: UMAR, A.; HAHN, Y.-B. (Eds.). **Metal Oxide Nanostructures and Their Applications**. American Scientific Publishers, v. 5p. 1–36, 2010.

VICENTINI, D. S. Efeitos da incorporação de peneiras moleculares 3a, 4a, 5a e 13x em membranas compósitas de quitosana/poli(vinil álcool). **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 249–254, 2010.

VICENTINI, D. S. et al. Toxicological impact of morphology and surface functionalization of amorphous SiO₂ nanomaterials. **NanoImpact**, v. 5, p. 6–12, 2017.

VIEIRA, A. C. et al. Mechanical study of PLA–PCL fibers during in vitro degradation. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 4, n. 3, p. 451–460, 2011.

WAN, H. et al. The cytotoxicity evaluation of Kevlar and silicon carbide by MTT assay. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 5, n. 6–7, p. 441–445, 1994.

WANG, D. et al. Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: The nanoparticles, the ions, or a combination of both?

Journal of Hazardous Materials, v. 308, p. 328–334, 2016.

WANG, L. K. et al. **Handbook of environmental engineering: Membrane and desalination technologies**. 13. ed, Humam Press, 2011.

WILLANDER, M. et al. Applications of zinc oxide nanowires for biophotonics and bio-electronics. p. 79400F, 2011.

WILSON, H. F.; TANG, C.; BARNARD, A. S. Morphology of zinc oxide nanoparticles and nanowires: role of surface and edge energies. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 17, p. 9498–9505, 2016.

WU, H.; TANG, B.; WU, P. Optimizing polyamide thin film composite membrane covalently bonded with modified mesoporous silica nanoparticles. **Journal of Membrane Science**, v. 428, p. 341–348, 2013.

WU, J.; YU, C.; LI, Q. Regenerable antimicrobial activity in polyamide thin film nanocomposite membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 476, p. 119–127, 2015.

XIE, W. et al. Polyamide interfacial composite membranes prepared from m-phenylene diamine, trimesoyl chloride and a new disulfonated diamine. **Journal of Membrane Science**, v. 403–404, p. 152–161, 2012.

XU, G.-R.; WANG, J.-N.; LI, C.-J. Strategies for improving the performance of the polyamide thin film composite (PA-TFC) reverse osmosis (RO) membranes: Surface modifications and nanoparticles incorporations. **Desalination**, v. 328, p. 83–100, 2013.

YANG, X.Y.; EDELMANN, R.E.; ORIS, J. T. Suspended C60 nanoparticles protect against short-term UV and fluoranthene photo-induced toxicity, but cause long-term cellular damage in *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 100, p. 202–210, 2010.

YANG, X. et al. Uptake of silica nanoparticles: Neurotoxicity and Alzheimer-like pathology in human SK-N-SH and mouse Neuro 2a neuroblastoma cells. **Toxicology Letters**, v. 229, n. 1, p. 240–249, 2014.

- YANG, Y.; LIU, T. Fabrication and characterization of graphene oxide/zinc oxide nanorods hybrid. **Applied Surface Science**, v. 257, n. 21, p. 8950–8954, 2011.
- YIN, J.; DENG, B. Polymer-matrix nanocomposite membranes for water treatment. **Journal of Membrane Science**, v. 479, p. 256–275, 2014.
- YIN, J.; DENG, B. Polymer-matrix nanocomposite membranes for water treatment. **Journal of Membrane Science**, v. 479, p. 256–275, 2015.
- YU, X. et al. Toxicity evaluation of pharmaceutical wastewaters using the alga *Scenedesmus obliquus* and the bacterium *Vibrio fischeri*. **Journal of Hazardous Materials**, v. 266, p. 68–74, 2014.
- YUNG, M. M. N. et al. Influences of temperature and salinity on physicochemical properties and toxicity of zinc oxide nanoparticles to the marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3662, 2017.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia aquática - princípios e aplicações**. 2. ed. São Carlos: Rima, 2008.
- ZANG, C. H. et al. Photoluminescence of ZnO:Sb nanobelts fabricated by thermal evaporation method. **Journal of Luminescence**, v. 131, n. 8, p. 1817–1820, 2011.
- ZEININGER, L. et al. Surface Modification of ZnO Nanorods with Hamilton Receptors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 4, p. 8186–8200, 2015.
- ZHANG, H.-B. et al. Genetic control of quorum-sensing signal turnover in *Agrobacterium tumefaciens*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 7, p. 4638–4643, 2002.
- ZHANG, J. et al. Toxic effect of different ZnO particles on mouse alveolar macrophages. **Journal of Hazardous Materials**, v. 219–220, p. 148–155, 2012.
- ZHANG, Y. et al. Stability of commercial metal oxide nanoparticles in water. **Water Research**, v. 42, n. 8–9, p. 2204–2212, 2008.

ZHAO, X. et al. Hyperbranched-polymer functionalized multi-walled carbon nanotubes for poly (vinylidene fluoride) membranes: From dispersion to blended fouling-control membrane. **Desalination**, v. 303, p. 29–38, 1 out. 2012.

ZIJNO, A. et al. Different mechanisms are involved in oxidative DNA damage and genotoxicity induction by ZnO and TiO₂ nanoparticles in human colon carcinoma cells. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1503–1512, 2015.

ZIN, G. **Efeito de campo magnético no desempenho da ultrafiltração de soluções proteicas utilizando membrana polimérica**. Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

ZODROW, K. et al. Polysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal. **Water Research**, v. 43, n. 3, p. 715–723, 2009.

ZUCOLOTTO, V. **Nanotoxicidade**. 2010. Disponível em: <<http://www.nanomedicina.com.br/>>. Acesso em: 30 nov 2015.

ZULARISAM, A. W.; ISMAIL, A. F.; SALIM, R. Behaviours of natural organic matter in membrane filtration for surface water treatment — a review. **Desalination**, v. 194, n. 1–3, p. 211–231, 2006.

8 APÊNDICES

A1 CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DO MDA

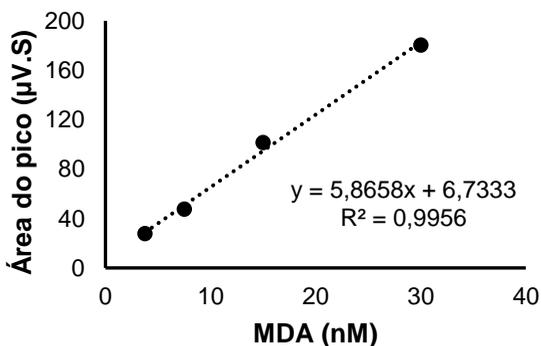
Foram realizadas 8 diluições do padrão 1,1,3,3 – Tetramethoxypropano, mas apenas 4 diluições foram utilizadas para a construção da curva de calibração do MDA.

As análises foram realizadas por HPLC e os valores das áreas dos picos de injeção estão apresentados na Tabela A1. A partir do cálculo das médias das áreas dos picos, foi possível construir a curva de calibração (Figura A1) que foi empregada para a quantificação do MDA nas amostras de células.

Tabela A1. Dados para a construção da curva de calibração do MDA.

MDA (nM)	Área do pico ($\mu\text{V.S}$)
3,75	27,70
7,5	47,50
15	101,40
30	180,31

Figura A1. Curva de calibração utilizada para a quantificação do MDA.



A2 CURVA DE CALIBRAÇÃO PARA A QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS, MÉTODO BRADFORD (1976)

Para a construção da curva de calibração de dosagem da proteína para as células foram definidos 5 pontos correspondentes a uma gama de concentrações do padrão albumina bovina (BSA). A leitura foi realizada através de espectrometria de ultravioleta (UV), com comprimento de onda de 595nm (Tabela A2) A partir dos valores de absorbância foi possível construir a curva de calibração (Figura A2) que foi empregada na quantificação da proteína nas amostras celulares para o ensaio de LPO. O resumo dos dados da quantificação de proteína e de MDA está apresentado na Tabela A3.

Tabela A2. Dados para a construção da curva de calibração BSA.

BSA (mg.mL⁻¹)	ABS em 595 nm
3,125	0,56
6,25	0,57
12,5	0,62
25	0,72
50	0,89

Figura A2. Curva de calibração da proteína.

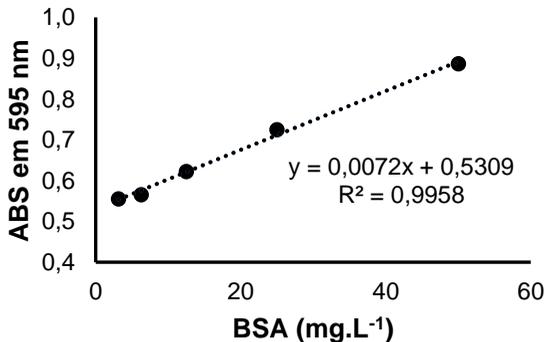


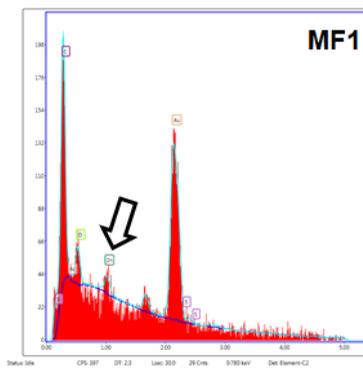
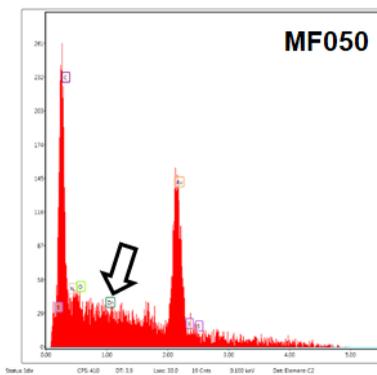
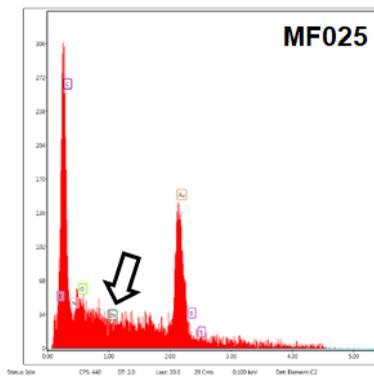
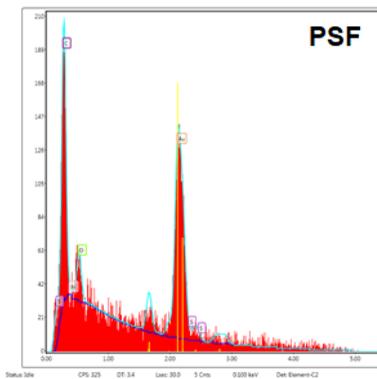
Tabela A 3. Dados de MDA e quantificação de proteínas do controle negativo (CN), do ZnSO₄ (CP), do NBZnO@AF e do NBZnO. Os valores ao lado dos nomes das amostras correspondem as concentrações em mg.L⁻¹ utilizadas nos testes de citotoxicidade para verificação dos níveis de LPO.

Amostra	Área do pico (µV.S)	MDA (nM)	Proteína em 595 nm (mg.L ⁻¹)	Correção da proteína (mg.L ⁻¹)	MDA (nM/mg de proteína)	Média	DP
CN	127,16	20,53	141,56	1627,94	12,61	11,96	0,93
CN	113,16	18,14	139,60	1605,40	11,30		
CP 0,15	121,62	19,59	132,39	1522,49	12,86	12,85	0,01
CP 0,15	117,11	18,82	127,38	1464,87	12,85		
CP 1,5	154,79	25,24	137,79	1584,59	15,93	18,70	3,92
CP 1,5	195,65	32,21	130,42	1499,83	21,47		
CP 15	250,17	41,50	134,17	1542,96	26,90	26,10	1,13
CP 15	256,10	42,51	146,10	1680,15	25,30		
NBZnO@AF 0,13	222,47	36,78	145,49	1673,14	21,98	22,91	1,31
NBZnO@AF 0,13	223,09	36,88	134,55	1547,33	23,84		
NBZnO@AF 1,3	116,40	18,70	64,21	738,42	25,32	24,56	1,08
NBZnO@AF 1,3	110,45	17,68	64,62	743,13	23,79		
NBZnO@AF 13	256,48	42,58	143,73	1652,90	25,76	26,61	1,21
NBZnO@AF 13	267,14	44,39	140,56	1616,44	27,46		
NBZnO 0,32	146,64	23,85	134,55	1547,33	15,41	16,37	1,36
NBZnO 0,32	164,96	26,97	135,32	1556,18	17,33		
NBZnO 3,2	213,07	35,18	141,56	1627,94	21,61	20,35	1,78
NBZnO 3,2	183,65	30,16	137,36	1579,64	19,09		
NBZnO 32	243,99	40,45	139,60	1605,40	25,19	26,18	1,40
NBZnO 32	253,37	42,05	134,55	1547,33	27,17		

Para a correção da diluição da dosagem de proteínas utilizou-se a seguinte Fórmula (1A):

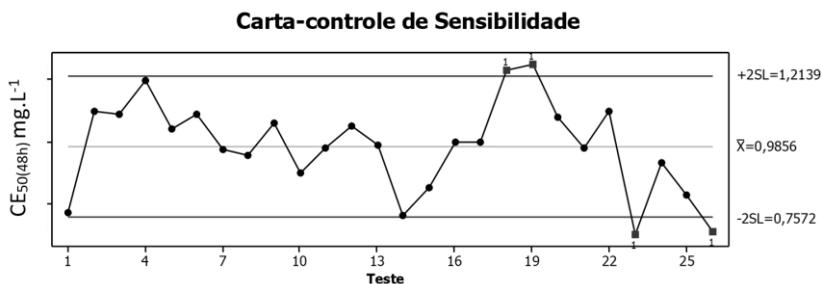
$$\text{Quantidade de protepinas} \times 0,50 \times 0,23 \quad (1A)$$

A3 ESPRECTROS DE EDX DAS MEMBRANAS DE PSF, MF025, MF050 E MF1. AS SETAS INDICAM A POSIÇÃO DO Zn



9. ANEXO

A1 CARTA CONTROLE UTILIZANDO DICROMATO DE POTÁSSIO COMO SUBSTÂNCIA DE REFERÊNCIA PARA O ORGANISMO *D. magna*



Fonte: A autora.

A linha central representa a média.

As linhas superior e inferior representam de desvio da média de 2 δ .

Para que os testes sejam considerados válidos os valores de CE_{50(48h)} para K₂Cr₂O₇ devem estar dentro do intervalo de $\pm 2 \delta$, não ultrapassando o limite de 6 testes para cada lado do desvio. Caso apresentem valores de sensibilidade aos intervalos superior ou inferior os testes devem ser descartados.

A2 ARTIGO PUBLICADO

Aquatic Toxicology 197 (2018) 32–40



Contents lists available at ScienceDirect

Aquatic Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqtox

Comparative assessment of toxicity of ZnO and amine-functionalized ZnO nanorods toward *Daphnia magna* in acute and chronic multigenerational tests



Renata Amanda Gonçalves, Ana Letícia de Oliveira Franco Rossetto, Diego José Nogueira, Denice Schulz Vicentini, William Gerson Matias*

Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, CEP: 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Nanotechnology
Zinc oxide
Nanorods
Amine-functionalization
Daphnia magna
ROS generation
Multigenerational effects

ABSTRACT

Zinc oxide nanomaterials (ZnO NM) have been used in a large number of applications due to their interesting physicochemical properties. However, the increasing use of ZnO NM has led to concerns regarding their environmental impacts. In this study, the acute and chronic toxicity of ZnO nanorods (NR) bare (ZnONR) and amine-functionalized (ZnONR@AF) toward the freshwater microcrustacean *Daphnia magna* was evaluated. The ZnO NR were characterized by transmission electron microscopy (TEM), X-Ray diffraction (XRD), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and the zeta potential and hydrodynamic diameter (HD). The acute EC50(48h) values for *D. magna* revealed that the ZnONR@AF were more toxic than the ZnONR. The generation of reactive oxygen species (ROS) was observed in both NM. Regarding the chronic toxicity, the ZnONR@AF were again found to be more toxic than the ZnONR toward *D. magna*. An effect on longevity was observed for ZnONR, while ZnONR@AF affected the reproduction, growth and longevity. In the multigenerational recovery test, we observed that maternal exposure can affect the offspring even when these organisms are not directly exposed to the ZnO NR.

1. Introduction

Due to the fast growth of the nanotechnology domain, nanomaterials (NM) are being used in a wide variety of applications in the industrial, domestic and health sectors (Nel et al., 2006). These NM can be applied in their pure form or following surface functionalization with NM, polymers, surfactants or ligands, which modify the physicochemical properties and enhance the performance of the material (Kango et al., 2013). However, the surface modification of NM can also alter their toxicological properties, resulting in an increase of the toxicity (Perreault et al., 2012; Vicentini et al., 2017), reduction of the toxicity (Božić et al., 2017; Rossetto et al., 2014b) or in some cases, it does not influence in the toxicity of the NM (Wallin et al., 2017).

At the nanoscale, the properties of materials may differ significantly from those of the respective bulk materials (Rossetto et al., 2014a). The same particular characteristics of NM that permit their application in many products, such as small size, high surface area and capacity for agglomeration or dispersion, can facilitate their translocation between environmental compartments, biological transport, and cellular

interactions, highlighting the importance of researching the bioavailability, degradability, reactivity and toxicity of NM (Khanna et al., 2015).

The toxicity effects of NM are associated with several factors, including: (a) the NM themselves, which can be toxic when taken up by organisms (Griffitt et al., 2009); (b) the enhanced solubility of NM into toxic metal ions in the case of metal and metal oxide NM (Bilnova et al., 2014; Melegari et al., 2013; Rossetto et al., 2014a); (c) the combined effects of the NM and the released ions, enhancing the toxicity (Paynton et al., 2011); and (d) a "Trojan horse effect", due to the possibility of the nanoparticles (NP) entering the cell through mechanisms of internalization and causing damage inside the cell (Limbach et al., 2007; Sabella et al., 2014).

Due to its specific optical, magnetic, semiconducting, piezoelectric, antibacterial properties and diverse growth morphologies (Vaseem et al., 2010), ZnO is one of the most commonly used metal oxide NM in industry and in everyday products, such as personal care products, polymeric membranes for water treatment, coatings and antifouling paints (Vaseem et al., 2010), with an estimated production of 30,000

*Corresponding author at: Laboratório de Toxicologia Ambiental, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, Caixa Postal 476, CEP 88010-970, Florianópolis, SC, Brazil.
E-mail address: william.g.matias@ufsc.br (W.G. Matias).

<https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2018.02.002>

Received 20 September 2017; Received in revised form 1 February 2018; Accepted 2 February 2018
Available online 05 February 2018
0166-445X/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

metric tons per year (BOC Research, 2015). The rapid increase in the application of ZnO NM has led to this material being released and dispersed in the environment and bioavailable forms are thus present in ever greater amounts (Niel et al., 2006; Selck et al., 2016). Nevertheless, the environmental effects of these NM are still not fully understood (Selck et al., 2016).

The toxicity of ZnO NM has been widely studied and reported in the literature toward different types of test organisms. Ann et al. (2015) observed that ZnO NP with size between 20 and 40 nm were more toxic to the 1929 fibroblast mouse cell lines than the particles with size between 50 and 80 nm. According to Kumar et al. (2017) the surface functionalization of ZnO NP with polar groups can enhance the interaction between the NM and the bacterial cell wall, improving the antibacterial property of ZnO. In larval *Danio rerio*, ZnO NP were more toxic than ZnSO₄, however, ZnO NP did not involve transcript alterations but occurred a slight induced cell differentiation and pathways related with the immune system and activated divers key genes involved in cancer cell signaling compared to the zinc salt (Kim et al., 2017).

Regarding to the acute toxicity of ZnO NP toward the freshwater microcrustacean *D. magna*, Bilnova et al. (2010) reported an EC50_(48h) value of 2.6 mg/L testing NP with 70 nm. Santos et al. (2014) obtained an EC50_(48h) value of 3.1 mg/L for NP > 100 nm and EC50_(48h) of 1.9 mg/L for NP < 50 nm. In a study by Heinlaan et al. (2008) the EC50_(48h) of ZnO NP in the range of 50–70 nm toward *D. magna* was of 3.2 mg/L. Mwaanga et al. (2014) observed the oxidative stress associated to biochemical changes due to the exposition of *D. magna* to ZnO NP for 72 h. Bacchetta et al. (2016), observed morphological alterations caused by ZnO NP in *D. magna*, however, the cytotoxicity of ZnO NP was mainly attributed to the dissolved ions from the NP.

In contrast to the acute toxicity, the chronic effects of ZnO NP toward *D. magna* are poorly investigated. Only a few studies reported the chronic toxicity to this NM. Zhao et al. (2012) observed effects on growth and reproduction of *D. magna* with a very low no observed effect (NOEC) and lowest observed concentration (LOEC) values to the reproduction parameter (0.0008 and 0.004 mg Zn/L, respectively), comparing to the study of Adams et al. (2014) (0.0058 and 0.131 mg/L) and Lopes et al. (2014) (0.125 mg Zn/L). Bacchetta et al. (2017) reported a significant inhibition of the reproduction and ultrastructural damages on *D. magna* after the chronic exposition to ZnO NP.

Studies involving the multigenerational and recovery phase approach of NM toward *D. magna* are less investigated than the chronic toxicity. Thus, despite the efforts of the scientific community to understand the mechanisms and impacts of these NM to the environment, there is still a gap on the understanding in how the NM can affect the organisms after the exposure was removed and if the effects of the maternal exposure will be evident in the future generations; and how the continuous exposure for several generations can affect the organisms. Bacchetta et al. (2017), analyzed the recovery of *D. magna* after chronic exposure to NP ZnO (21 days) until the end of the life cycle of the daphnids (around 60 days) and observed a significant reduction in longevity while the reproduction did not show significant difference from the control. Concerning to the multigenerational toxicity tests with NM, Arndt et al. (2014) observed that some carbon NM did not induce multigenerational toxicity on *D. magna* while others can affect the survival and reproduction of the organisms. These studies demonstrate that the ZnO NP can affect the whole life cycle of *D. magna* and their future generations, highlighting the importance of conducting multigenerational toxicity tests.

Considering that most of the studies about ZnO NM are carried out with NP, thus, we studied the ZnO in a rod shape. In the present study, we evaluated the acute, chronic and multigenerational effects of ZnONR and ZnONR@AF in comparison with zinc sulfate (ZnSO₄) by exposing the freshwater microcrustacean *Daphnia magna* to these materials. *Daphnia* are widely used as bioindicators in toxicology studies with NM due to their parthenogenetic reproductive strategy, good

responses to environmental stressors and their well knowledge biology. How *D. magna* are genetic clones, these organisms are ideal for multigenerational tests. The consequences of the maternal exposure (P0) to future generations of daphnids (F1 and F2) were evaluated using the effects in the life cycle parameters. The main questions of this study were (a) Does the samples cause acute effects and the acute concentrations can induce the generation of reactive oxygen species? (b) Does the chronic exposure affect the life cycle parameters of *D. magna*? (c) Can the samples affect the future generations of *D. magna* even when the offspring was not directly exposure to the samples (after the maternal exposure)? And (d) are the life cycle parameters able to detect these effects on a multigenerational recovery test?

2. Material and methods

2.1. Chemicals

All chemical products employed in the experiments were obtained from Sigma-Aldrich, Acros Organics, ThermoFisher Scientific and Vetec Química. They were of A.C.S reagent grade and used without prior treatment. Ultrapure (UP) water was generated by a Mill-Q Advantage A10 water purification system (Millipore, USA).

2.2. Synthesis of ZnONR

ZnONR were synthesized as described by Yang and Liu, (2011) with minor modifications. Briefly, zinc acetate (60 mmol) and potassium hydroxide (130 mmol) were solubilized in 40 and 60 mL of methanol, respectively, and the solutions was stirred under reflux for 72 h at 60 °C. The solid precipitate was isolated from the solution by centrifugation and washed three times with water and then ethanol. It was then dried for 48 h at 50 °C.

2.2.1. Amine functionalization of ZnO NR

The ZnONR surface was amine-functionalized according to Vicentini et al. (2017) with minor modifications. Briefly, ZnONR (1 g) and 3-[2-(2-aminoethylamino)ethylamino]propyltrimethoxysilane (AEAEAPTMS) (25 mmol) were added to 80 mL of anhydrous toluene and the solution was stirred under an argon atmosphere at room temperature for 24 h. ZnONR@AF was isolated from the solution by centrifugation, rinsed twice with ethanol and dried for 2 h at 100 °C. The ZnONR@AF were then washed with water and dried for 48 h at 50 °C.

2.3. Characterization of ZnO NR

The crystalline structure of ZnO NR was determined by X-ray diffraction (XRD). The diffraction angle was recorded in the angular range of 2θ = 0°–80° at room temperature using a Philips XPert diffractometer equipped with a copper tube (CuKα, λ = 1.54056 Å). The crystallite diameter (D) of both ZnO NR was estimated using the Scherrer equation according to Rossetto et al. (2014a). The amine-functionalization of ZnO NR was verified by Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) (Bruker FT-IR alfa spectrophotometer). Samples were blended with KBr and then pressed into disks for analysis in the range of 4000 and 400 cm⁻¹. The size and shape of the ZnO NR were determined by transmission electron microscopy (TEM) (JEM-1011 TEM, 100 kV). The samples for TEM analysis were prepared by dropping the solutions on a C-Cu grid (300 mesh) and dried in a desiccator under vacuum for 24 h. The surface area was determined by the Brunauer-Emmett-Teller (BET) method using a NOVA[®] surface area analyzer (Quantachrome Instruments). The zeta potential (ζ) was determined by the electrophoretic mobility approach using a ZetaPlus system (NanoBrook 90 Plus Zeta, Brookhaven Instruments Corporation, USA). The stability of the particles, in the different media, was determined by the hydrodynamic diameter (HD) using a dynamic light scattering system (NanoBrook 90Plus Zeta, Brookhaven Instruments

Corporation, USA). ZnONR and NR@AF suspensions were characterized at a concentration of 12 mM in UP water and ISO medium. The concentration of free fraction Zn ions in the medium was determined by atomic absorption spectrometry (FAAS) (Varian SpectrAA 50B, Mulgrave Virginia, Australia). This analysis was done using the values of EC50 previously determined in the acute toxicity tests, however only the total mass of Zn was considered to calculate the molar values. The NR and the positive control ($ZnSO_4$) solutions were acidified with HNO_3 ($pH > 2$).

2.4. Toxicity tests

2.4.1. *D. magna* culture

The freshwater crustacean *D. magna* Straus, 1820 (Crustacea: Cladocera), were grown according to ISO 6341 (ISO, 2012) protocol. The adult specimens (30 individuals/L) were cultured in M4 culture medium under diffuse luminosity (photoperiod 16 h light: 8 h dark) with a controlled temperature of $20 \pm 2^\circ C$. The daphnids were fed with a suspension of the unicellular green alga *Scenedesmus subspicatus*, which was cultured in CHU growth medium (Chu, 1942). The culture medium was renewed every 48 h.

2.4.2. Acute toxicity test with *D. magna*

Acute toxicity experiments were performed according to ISO 6341 (ISO, 2000) with the exposure of 20 neonates (2–26 h) per concentration at a controlled temperature of $20 \pm 2^\circ C$, without luminosity and feeding, for 48 h. The samples were diluted in ISO medium. Immobilization of the organisms was used as the acute toxicological endpoint. The stock solutions of both ZnO NR were prepared at a concentration of 12 mM and sonicated (Q500 sonicator, 500W, Q-Sonica – Newtown, CT) at 300 W for 5 min. The dilutions of ZnO NR were prepared in the range of 64–16 μM . $ZnSO_4$ in a concentration range of 257–12 μM was used as a positive control and ISO medium was used as a negative control. The pH was measured with a potentiometer (Consort C535, Belgium), and was monitored during the course of the experiments to minimize any interference in the results of the toxicity tests. The $EC50_{(48h)}$ was calculated using the Trimmed Spearman-Kärber statistical method as recommended by EPA-21/R02-013 (EPA, 2002).

2.4.3. Reactive oxygen species in *D. magna*

The role of free radicals in the cytotoxicity was analyzed by quantifying the generation of reactive oxygen species (ROS). The dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H_2DCFDA) was used to determine the ROS production in the daphnids. The tests were performed as described by Liu and Wang, (2017) and Lu et al. (2017) with minor modifications. Briefly, 5-day-old daphnids were exposed to the $EC50_{(48h)}$ assay. Only live organisms were used in this test. After 48 h of exposure, 10 *D. magna* were collected and deparaffinized in ultrapure water for 2 min and 1 mL of 50 μM H_2DCFDA was added to each well in the cluster plate followed by incubation for 4 h. After this period, the *D. magna* were rinsed to remove the adsorbed dye. Fluorescence was determined using a SpectraMax[®] Paradigm[®] multi-mode microplate reader (Molecular Device: LCC, California – USA) with excitation at 485 nm and the emission recorded at 530 nm with a bandwidth of 20 nm. The ROS generation was monitored in the control and all tests were carried out in triplicate. The concentrations were chosen based on the results obtained in the acute toxicity tests (15, 23 and 35 μM for ZnONR, 12, 18 and 27 μM for ZnONR@AF and 15, 23 and 34 μM for $ZnSO_4$). The results were statistically analyzed using one-way ANOVA followed by Bonferroni's test. A confidence level of $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

2.4.4. Chronic toxicity test with *D. magna* and evaluation of the first and last generation of offspring

Chronic toxicity experiments were performed according to ISO 10706 (ISO, 2000). The concentrations were chosen based on the

results obtained in the acute toxicity tests with the samples. Stock solutions of ZnONR were prepared as described in Section 2.4.2. After 21 of exposure, were evaluated the life cycle parameters: reproduction (calculated as the average number of offspring produced per surviving organism), longevity (live organisms in the end of the test) and growth (was considered the length of the organism from the top of the head to the base of the apical). Each test with both types of ZnONR was performed with six concentrations (1.47, 2.33, 3.56, 5.40, 7.98 and 12 μM), plus the negative control (M4 medium). A positive control ($ZnSO_4$) chronic toxicity test was performed with four concentrations (1.80, 2.73, 4.02 and 6.10 μM). Concentrations tested were calculated considering the total molar mass of ZnO and $ZnSO_4$. For each concentration 10 replicates of 1 neonate (< 24 h) were used. Each organism was placed in a glass beaker containing 50 mL of the test media. The tests were maintained under the same conditions as the culture (temperature of $20 \pm 2^\circ C$, diffuse light and photoperiod of 16 h). During the period of the test, the test media (samples and control) were renewed every 2 days and the individuals were fed with *S. subspicatus*. These tests were called F0 (parental generation). The results were statistically analyzed applying one-way ANOVA followed by Dunnett's test. A confidence level of $p < 0.05$ was accepted as statistically significant.

The evaluation of the first (F1) and the last (F12) broods of offspring from F0 were performed. F1 was considered as the organisms born on the first two days of the reproduction period (organisms were born on days 10 and 11 of the test), and F12 was considered as the organisms born on the last two days of the test. Offspring born from maternal exposure at all concentrations of ZnONR, ZnONR@AF and $ZnSO_4$ tested were evaluated. For each concentration tested, 10 replicates of 1 neonate were used. During the test, no exposure to the samples were performed. The organisms were maintained under the conditions described above for 21 days, in M4 medium. The life cycle parameters: reproduction, time to the first brood, number of broods, growth and longevity of the organisms, as well as the time to produce the first offspring, were compared to those for the control. The results were statistically analyzed using one-way ANOVA followed by the Dunnett's test. A confidence level of $p < .05$ was accepted as statistically significant. Prior to the start of the tests with F1 and F12, the sensitivity of the neonates was measured following the ISO 6341 (ISO, 2000) protocol.

3. Results and discussion

3.1. Characterization of ZnONR

The crystalline structure and the crystallite diameter were determined by XRD (Fig. 1A). The diffractograms suggested that both types of ZnO NR synthesized had the typical hexagonal crystalline (wurtzite) structure of ZnO, confirmed by the indexed diffraction peaks (JCPDSN[®] 36-1451). This is in agreement with results reported by Yang and Liu, (2011). The crystalline structure was not modified by the amine-functionalization of NR (Fig. 1A). No additional crystallographic phase was observed. The average crystallite diameter was estimated to be $D = 33$ nm. The amine-functionalization of ZnONR was confirmed by the FTIR spectrum shown in Fig. 1B. The FTIR spectrum of ZnONR@AF exhibited characteristic bands of AEAEAP/MS and ZnONR. The absorption bands present at 2927 and 2878 cm^{-1} correspond to the asymmetric and symmetric stretching vibrations of aliphatic C–H, respectively. The band at 1570 cm^{-1} is attributed to the vibration of the symmetric angular deformation of N–H. The shoulder at 1538 cm^{-1} overlaps the region corresponding to the axial vibration of C–N of the secondary amine and the bands at 1474 and 1407 cm^{-1} are due to the vibrations of the symmetrical angular deformation of C–H (Yang and Liu, 2011).

The morphological characterizations for ZnO NR in all media are showed in Fig. 2. The TEM images confirm that the ZnO particles were

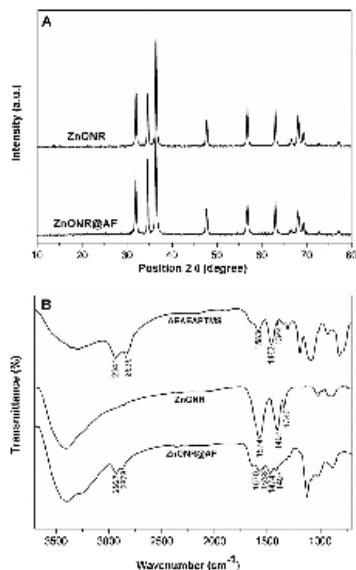


Fig. 1. Analysis of (a) XRD diffractograms for ZnONR and ZnONR@AF and (b) FTIR spectra for AEAAPTMS, ZnONR and ZnONR@AF.

in the nanoscale and presented a characteristic rod shape. The average diameters were 25 nm for ZnONR and 32 nm for ZnONR@AF with lengths ranging between 90 and 160 nm for both types of NR. The increase in the diameter of the ZnONR@AF may be related to the functionalization of the NM. On comparing both types of ZnO NR dispersed in UP water with the NM dispersed in ISO and M4 media, was observed a greater dispersion of both types of NR in UP water and as the increase of the ionic strength, due to the components of the media, occurred the agglomeration of the NM. The surface area of the ZnONR was $13.98 \pm 3.53 \text{ m}^2/\text{g}$ and increased to $20.06 \pm 2.46 \text{ m}^2/\text{g}$ for the ZnONR@AF. This increase on the surface area may be related to the functionalization of the NM that may increase the porosity of the material.

In general, both types of ZnO NR have high stability in UP water and they tend to lose stability when in contact with salts dissolved in the media (Table 1). However, the ZnONR@AF were found to be more stable than the ZnONR in all media studied. Also, an increase in the pH value in UP water was observed. This can be attributed to the amine-functionalization on the surface of the NM promoting greater interaction between the NM surfaces and the medium (Vicentini et al., 2017). The hydrodynamic diameter (Table 1) was lower for both types of NR when dissolved in UP water compared to ISO and M4 medium. Han et al. (2014) observed a reduction in the ZnO NP zeta potential and accelerated sedimentation of ZnO NP with increasing ionic strength of the medium. Baalouha et al. (2013) reported that the presence of divalent cations in aqueous media, such as Ca^{2+} and Mg^{2+} both present in

ISO and M4 media, leads to greater aggregation of the NP than monovalent cations, this finding is consistent with the results of this study.

The quantification of the free fraction Zn ions (Table 2) was carried out at the concentrations corresponding to total Zn mass in the $\text{EC}_{50}(\text{48h})$ values in ISO medium. All samples showed similar values for the free fraction Zn ions in the ISO medium. However, the amount of free fraction Zn ions was higher in the ZnONR@AF than in the ZnONR (9.4 ± 0.31 and $7.49 \pm \mu\text{M}$, respectively). We also observed that all samples showed a decrease in the release of Zn ions after 48 h, however this decrease was not significantly different ($p < .05$) in ZnSO_4 . It is known that the dissolution and agglomeration of NM is influenced by the NM characteristics (e.g. type, size, coating), the water chemistry (e.g. pH, ionic strength, hardness, dissolved organic matter, oxygen content in water, temperature, daylight hours) and the time of exposure to the NM (Adam et al., 2015; Cupi et al., 2016; Han et al., 2014; Heilman et al., 2008; Odrak et al., 2017; Seo et al., 2014; Wang et al., 2016). Seo et al. (2014) compared the behavior of ZnO NP in different test media toward *D. magna* and observed that the dissolved fraction of ZnO NP was higher in the ISO medium. According to Wang et al. (2016), the dissolution rates of ZnO NP significantly increase in the presence of strong chelating agents, suggesting that the ZnO NP are unlikely to persist in natural aqueous media and that the toxicity is primarily related to the release of Zn^{2+} ions rather than effects commonly associated with the presence of nanoparticles. Leung et al. (2012) studied the antibacterial activity of ZnO NP functionalized with different silane-based reagents and observed a significant increase in the release of Zn^{2+} ions when the ZnO NP were coated with dodecyltrichlorosilane. The same authors attributed this finding to the release of Cl^- with the attachment of the dodecyltrichlorosilane molecule to ZnO, resulting in interaction of the ZnO with prolonged exposure to dodecyltrichlorosilane. On the other hand, a reduction in Zn^{2+} ion release was observed for ZnO modified with the molecule (3-aminopropyl)trimethoxysilane (Leung et al., 2012). Therefore, these results confirm that the ZnO NP did not play a specific role in the ion release in aqueous medium and this characteristic is dependent on the interaction between the properties of the particle and the properties of the medium (Leung et al., 2012; Odrak et al., 2017; Wang et al., 2016).

3.2. Toxicological evaluation

3.2.1. Acute toxicity toward *D. magna*

In the acute toxicity tests with *D. magna* the $\text{EC}_{50}(\text{48h})$ values obtained for ZnONR, ZnONR@AF and ZnSO_4 were $34.5 \mu\text{M}$, $27.1 \mu\text{M}$ and $34 \mu\text{M}$, respectively. Resulting values of EC_{50} were calculated considering the molar mass of ZnO and ZnSO_4 . The pH values were determined for all samples and found to be in agreement with those established by the standard ISO 6341 (ISO, 2000). The pH results were 7.26 ± 0.99 for ZnONR, 7.82 ± 0.58 for ZnONR@AF and 7.41 ± 0.59 for ZnSO_4 .

It can be noted that ZnONR@AF was more toxic than ZnONR and the toxicity of both types of NR was higher than that observed for ZnSO_4 ($p < .05$). These results suggest that the toxicity of ZnO NR is not limited to the release of zinc ions in the medium but could be associated with another mechanism related to the reduced size of the NM. The small size increases the specific surface area and reactivity of the NM. In addition, the presence of positive ions on the surface of NM affects the interaction between the NM and biomolecules, since the particles can penetrate the cell membrane and enter the cell (Lopes et al., 2014). Zn^{2+} released by NP increases the local concentration, disrupting the cellular metal cation homeostasis, resulting in cell toxicity, because the interaction with oxidative organelles stimulates ROS production (Nel et al., 2006). Santo et al. (2014) suggested that the ZnO NP can enter tissues and cells and once inside the cell the reactivity of the ZnO NP might increase due to the difference in the pH conditions within cells, causing additional toxic effects. According to Matsuyama

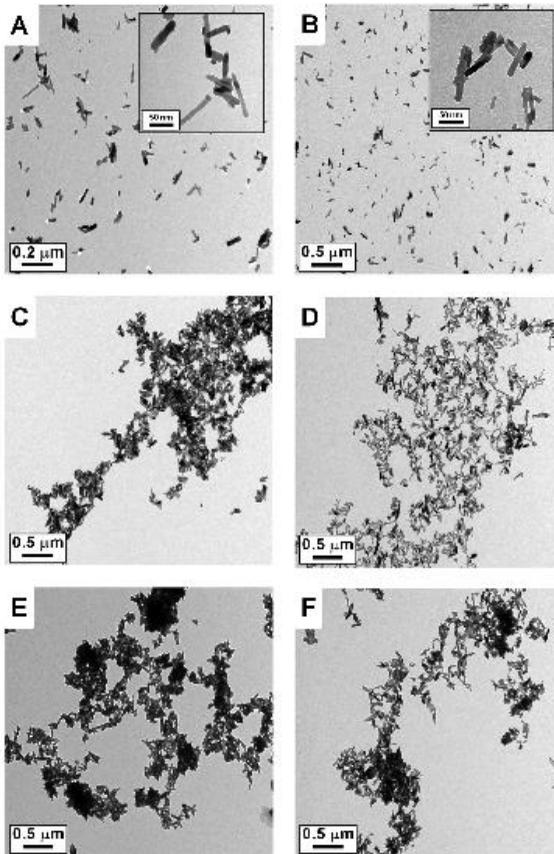


Fig. 2. TEM images for ZnONR and ZnONR@AF in all media studied. A, C, E correspond to ZnONR in UP water, ISO and M4 medium, respectively. B, D, F correspond to ZnONR@AF in UP water, ISO and M4 medium, respectively. Stock solution concentration = 12 mM.

and Reed, (2000), different pH conditions exist inside the cell and the accumulation of H^+ takes place mostly in the inter-membrane space of the mitochondria, in conjunction with electron transport through the respiratory chain, leading to mitochondrial damage in *D. magna* even with acute exposure to ZnO NP (Bacchetta et al., 2016).

The ZnONR@AF were more toxic to *D. magna* in comparison with the ZnONR. This could be associated with the specific physicochemical characteristics of this NM, such as a high surface area ($20.06 \pm 2.46 \text{ m}^2/\text{g}$), stability in ISO medium (zeta potential of $20.80 \pm 2.79 \text{ mV}$) and a smaller hydrodynamic diameter

($244.49 \pm 1.47 \text{ nm}$) than ZnONR, which could facilitate the interaction of the ZnONR@AF with the organism. In addition, the higher toxicity of ZnONR@AF may be associated with the presence of the organic molecule on the surface of the NR since, besides increasing the surface area, this may facilitate the uptake and internalization of the NM in the cell through the "Trojan horse effect" (Sabella et al., 2014). The presence of amine groups (since the molecule used in the surface functionalization of the NR in this study has primary and secondary amines) in the ZnONR@AF may also facilitate the internalization of NM in the cells due to a more hydrophilic character of the molecule,

Table 1
Results of pH, HD and FC with standard deviation (SD) at the stock solution of ZnONR and ZnONR@AF. Stock solution concentration = 12 mM.

Sample	Medium	pH	HD ± SD (nm)	FC ± SD (mV)
ZnONR	UP H ₂ O	7.27 ± 0.12	287.87 ± 3.01	27.04 ± 2.52
	ISO	7.39 ± 0.21	351.78 ± 1.15	13.59 ± 1.98
	M4	7.30 ± 0.30	419.61 ± 9.58	8.46 ± 0.93
ZnONR@AF	UP H ₂ O	7.43 ± 0.03	244.49 ± 1.47	29.55 ± 2.86
	ISO	7.47 ± 0.25	3144.74 ± 8.44	20.80 ± 2.79
	M4	7.52 ± 0.17	943.85 ± 8.73	21.04 ± 2.97

Table 2
Free fraction Zn ions in ISO medium, measured on the EC50 values.

Media	Sample	EC50 _(48h) (µM)	Free fraction Zn ions (µM)		
			0 h	48 h	
ISO	ZnONR	34.5	34.4	7.49 ± 0.13	5.81 ± 0.46
	ZnONR@AF	27.1	27.0	9.40 ± 0.31	8.41 ± 0.13
	ZnSO ₄	34	33.7	11.0 ± 0.15	9.02 ± 0.40

* Molar values considering only the atomic mass of Zn present at EC50 values.

contributing to an increase in the toxic effects of the functionalized NM (Vicentini et al., 2017).

The results of the acute toxicity with ZnO NP obtained by Heinlaan et al. (2008), Blinova et al. (2010) and Santo et al. (2014) were similar to those obtained in this study, thus corroborating our results. However, the rod shaped of ZnO were slightly more toxic than the NP form, highlighting the importance of studying the different shapes of ZnO NM in order to better understand the interactions and effects of these materials *in vivo*.

3.2.2. ROS generation toward *D. magna*

The generation of ROS was measured in *D. magna* exposed to ZnONR, ZnONR@AF, ZnSO₄ and negative control for 48 h using H₂DCFDA. The ROS production in organisms is an excellent indicator of stress at the biochemical level and it can take the form of superoxide anion radicals, hydrogen peroxide and hydroxyl radicals, all of which are known to be produced by *D. magna* (Barata et al., 2005). The concentrations used in this test were based on the EC50_(48h) for each material. For ZnONR, ZnONR@AF and ZnSO₄, the highest concentration tested corresponds to the EC50_(48h). All materials were able to cause ROS generation in *D. magna* (Fig. 3) and an increase in the ROS generation was observed with increase in the concentration tested. The results obtained for the EC50_(48h) of ZnONR, ZnONR@AF and ZnSO₄ were significantly different from the control ($p < .05$). Resulting values of ROS were calculated considering the molar mass of ZnO and ZnSO₄.

According to Shu et al. (2017), an increase in the surface area of ZnO NP causes more active sites to produce ROS, as the superficial charge also influences the level of ROS generation (Nasser et al., 2016), corroborating our results. In this study, ZnONR@AF had positive superficial charge and had a higher surface area and showed higher

($p < .05$) ROS production than ZnONR (Fig. 3). The sublethal exposure to ZnO NP can cause oxidative stress through biochemical changes in *D. magna* (Mwaanga et al., 2014).

A balance between ROS and antioxidants is essential for the survival and health of organisms, since high ROS levels are indicative of oxidative stress and can lead to cell damage, affecting lipids and carbohydrates, altering proteins, disrupting DNA, interfering with the signaling functions and modulating gene transcription, leading to cell death by necrosis or apoptosis (Flora, 2009).

Besides the release of ions from the NM in the media and inside the cells, the monitoring of biomarkers indicates that the toxicity of ZnO NM is also mediated by ROS generation via oxidative stress in *D. magna* (Barata et al., 2005; Mwaanga et al., 2014).

3.2.3. Chronic toxicity toward *D. magna* and evaluation of the first and last generations of offspring

The chronic effects of NP are important in terms of the aquatic environment, since they reflect more realistic exposure scenarios than the acute experiments (Adam et al., 2014). In the chronic test on F0, the concentrations evaluated were based on the EC50_(48h) values obtained in the acute toxicity test with *D. magna*. After 21 days of exposure, the results of the life cycle parameters (reproduction, growth and longevity) obtained from the exposure to ZnONR, ZnONR@AF and ZnSO₄ were compared to the results of the negative control (Table 3).

In relation to reproduction, the onset of birth for the organisms exposed to ZnONR, ZnONR@AF and ZnSO₄ did not differ from the control results and began on the 10th day of the test. The average number of neonates for the daphnids exposed to ZnONR did not show a significant difference from the control ($p < .05$). In the case of ZnONR@AF, a significant decrease in the reproduction was observed at the higher concentrations tested (7.98 and 12 µM). For ZnONR@AF, the observed effect concentration (OEC) was 12 µM and the non-observed effect concentration (NOEC) was 5.4 µM. We observed a decrease in the number of neonates with an increase in the concentration. For the positive control (ZnSO₄), there was a significant decrease in the reproduction at concentrations of 2.73, 4.02 and 6.1 µM. For ZnSO₄, the OEC was 2.73 µM and the NOEC was 1.80 µM, indicating that the ions are more toxic than both forms of ZnO NP based on the *D. magna* reproduction data. The average number of neonates also decreased when the exposure concentration of ZnSO₄ increased. These results differ from those obtained by Barchetta et al. (2017). The same authors observed, based on the reproduction parameter, that the ZnO NP were more toxic toward *D. magna* than ZnSO₄, despite the higher concentration of Zn ions in the ZnSO₄ solution. This difference in toxicity may be due to the synthesis procedure applied, which can influence the surface properties of the NM (Han et al., 2014), as well as the difference in the cation concentrations of the test medium (Lopes et al., 2014). However, our results are consistent with those obtained in a study by Adam et al. (2014), that after 21 days, observed a decrease in the average number of neonates as the exposure concentration of ZnO NP and zinc salts increased.

For the parameter growth, at all concentrations of ZnONR the organism size did not show a significant difference compared to the control after 21 days of exposure ($p < .05$). In the case of ZnONR@AF,

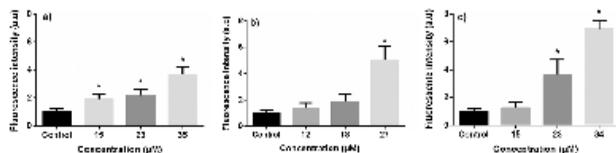


Fig. 3. ROS production in *D. magna* exposed to (a) ZnONR, (b) ZnONR@AF and (c) ZnSO₄. * = significant different from the control ($p < .05$).

Table 3

Results for chronic toxicity toward *D. magna*. Effects on the reproduction, longevity and growth after 21 days of exposure to ZnONR, ZnONR@AF and ZnSO₄. Results expressed as mean (10 replicates) ± standard deviation.

Sample	Chronic			
Concentration (µM)	Reproduction: No. of neonates/brood	Growth: length (mm)	Longevity (%)	
ZnONR	Control	8.46 ± 1.57	5.04 ± 0.18	90
	1.47	8.66 ± 1.87	5.06 ± 0.08	70
	2.33	9.63 ± 1.57	5.06 ± 0.09	80 ^b
	3.56	8.49 ± 1.49	5.03 ± 0.06	30 ^a *
	5.40	9.45 ± 2.27	5.03 ± 0.06	30 ^a *
	7.98	9.90 ± 1.40	5.00 ± 0.00	10 ^a *
	12	8.50 ± 1.90	5.12 ± 0.08	50
ZnONR@AF	Control	8.46 ± 1.57	5.04 ± 0.18	90
	1.47	7.97 ± 1.17	5.08 ± 0.10	60 ^b
	2.33	7.54 ± 0.59	5.02 ± 0.22	40 ^a *
	3.56	7.72 ± 0.69	5.05 ± 0.06	40 ^a *
	5.40	7.57 ± 1.54 ^a	5.05 ± 0.09 ^b	20 ^a *
	7.98	6.78 ± 0.19 ^a	0.00	0
	12	5.30 ± 1.25 ^a *	3.18 ± 0.21 ^a *	40 ^a *
ZnSO ₄	Control	8.46 ± 1.57	5.04 ± 0.18	90
	1.80	7.12 ± 0.64 ^a	4.70 ± 0.29 ^a *	90
	2.73	5.20 ± 1.07 ^a *	4.71 ± 0.35 ^a *	80
ZnSO ₄	4.02	6.23 ± 1.29 ^a	4.88 ± 0.20 ^b	100
	6.10	5.04 ± 1.42 ^a	4.16 ± 0.22 ^a *	80

^a = Values which differ significantly from control ($p < .05$).

^b = OEC - observed effect concentration.

^c = NOEC - no observed effect concentration.

The OEC was 12 µM and the NOEC was 5.40 µM. For both types of ZnO NR tested, no deformation of the morphology of the *D. magna* was observed. Due to the possibility that a high amount of zinc may enter the cell, ZnO NP can cause damage to the mitochondria and, as a consequence, a reduction in the reproduction and growth of *D. magna* (Bacchetta et al., 2017). ZnO NP can also affect the genes involved in cellular respiration, reproduction and cytoskeletal transport in *D. magna*, as demonstrated by Poynton et al. (2011). The ZnO NP were found to downregulate genes involved in cellular metabolism, such as arginine kinase and cytochrome oxidase, impeding the ability of the cell to respond to changing energy needs, which may lead to general stress as a response (Poynton et al., 2011). In addition, they can cause the repression of genes involved in reproduction, such as those associated with egg shell protein, leading to a reproductive impairment (Poynton et al., 2011). For ZnSO₄, a significant reduction in growth was observed at concentrations of 3.56, 5.40 and 12 µM. The OEC was 0.29 mg/L and the NOEC was 7.98 µM and deformations were observed in the carapace along with the reduction of the apical spine of *D. magna*. These results indicate that the ions are also more toxic based on the *D. magna* growth. According to Muiyssen and Janssen, (2002), *D. magna* is able to regulate zinc concentration up to 0.6 mg Zn/L. At higher concentrations Zn inhibits Ca uptake, resulting in hypocalcemia and death of the organisms (Muiyssen et al., 2006). Nevertheless, at sublethal Zn concentrations, the depletion of Ca²⁺ inhibits the movement and filtration rates of daphnids, leading to decreased food uptake. Therefore, less energy will be available to enable normal rates of growth and reproduction (Muiyssen et al., 2006). According to Poynton et al. (2011), ZnSO₄ also affects the expression of genes related to reproduction, potentially leading to reproductive impairment. However, ZnSO₄ and ZnO NP affect different gene expression profiles, suggesting a different mechanism of toxicity to ZnO NP and zinc ions (Poynton et al., 2011).

Regarding the longevity parameter, a significant reduction in longevity was observed for the ZnONR at concentrations of 3.56, 5.40 and 7.98 µM. For the ZnONR, the OEC was 3.56 µM and the NOEC was 2.33 µM. For the ZnONR@AF, a significant decrease in the longevity was observed at concentrations of 2.33, 3.56 and 5.40 µM and the

values obtained for the OEC and NOEC were 2.33 µM and 1.47 µM, respectively. For both types of ZnO NR tested, the organism started to die after 2 weeks of exposure, reaching adult mortality rates of ≥ 50%. The death of *D. magna* may be caused by difficulties associated with molting after the exposure to ZnO NM, as observed by Lopes et al. (2014). The same authors observed *D. magna* mortality after the same time of exposure. ZnSO₄ did not show a significant difference ($p < .05$) from the negative control in terms of the parameter longevity after 21 days, the organism longevity being ≥ 90%.

Our results indicate that the ZnONR@AF was more toxic toward *D. magna* than ZnONR even when the organisms were exposed to sublethal concentrations. As noted in the acute tests, this effect may be related to the specific NM characteristics. ZnONR@AF has a higher surface area and polar molecules on the particle surface, which may facilitate the interaction between the NM and biomolecules, allowing the NM to be taken up by the cell through the "Trojan horse effect" (Sabella et al., 2014; Vicentini et al., 2017).

A multigenerational recovery test, conducted with F1 and F12 generations, was carried out to elucidate the effects of both ZnONR and ZnSO₄, in which the daphnids of these two generation were not directly exposed to the materials tested (organisms in M4 medium, only). ZnO NM can cause epigenetic damage in *D. magna* (Poynton et al., 2011) and when exposure to the NM results in epigenetic changes to germline cells, the effects of maternal exposure would be observed in future generations, even after the exposure source was removed (Arndt et al., 2014). The results of the sensitivity tests on the neonates of F1 and F12 (EC50_(F12) for K₂Cr₂O₇) (Data in brief) indicate that the sensitivity of the neonates used in the recovery test were in agreement with the validation criteria of the protocol adopted and with the average sensitivity value obtained in our lab (EC50_(F12) between 1.9–5.5 µM).

These results suggest that the neonates born following maternal exposure to the contaminants were not affected in terms of the sensitivity of the daphnids. However, despite the normal sensitivity of the offspring, chronic effects were observed. After 21 days, the reproduction, time to produce first offspring, number of broods, growth and longevity were analyzed (Table 4). The organisms born to F0 exposed to ZnSO₄ were adversely affected and were not able to recover after the F0 exposure. No reproduction of F1 was observed, considering a brood of ≥ 5 offspring per daphnia, according to the protocol followed. The daphnids had a maximum of 3 offspring per organism, when they were able to reproduce. Thus, it was not possible to evaluate the recovery of F12 for ZnSO₄ exposure. The growth was significantly smaller compared with the control ($p < .05$), except for organisms born in F0 exposed to 1.80 µM ZnSO₄. The longevity was significantly different from the control ($p < 0.05$) when the daphnids born in F0 were exposed to the higher concentration tested, reaching 70% mortality after 3 days. These results suggest that when F0 is affected by exposure to ZnSO₄, the effects on the mothers interfere with the health of the next generations of *D. magna*. Sánchez-Ortiz et al. (2010) observed the death of the cladocerans *Caridiodaphnia dubia* and *Daphnia pulex* exposed to Zn after 1 week as the concentrations increased and no reproduction at a concentration of 12 mM. According to Muiyssen and Janssen, (2001) the cellular energy allocation by *D. magna* is comprised of more than 50% lipids and this is the most sensitive energy-reserve fraction. Lipids are the first energy source to be consumed by cladocerans under stress conditions. The consumption of lipid energy sources due to the *D. magna* stress conditions may have led to the lack of reproduction of the organisms observed in our results, since the lipid fraction is involved in developing embryos and is the major fraction involved in egg production (Cowgill et al., 1984; Muiyssen and Janssen, 2001).

With regard to the parameter reproduction, ZnONR and ZnONR@AF of F1 showed a significant difference from the control ($p < .05$) only for daphnids born at concentrations of 3.56 and 5.40 µM. However, looking at the number of broods we observed that the control showed a larger total number of brood after 21 days. This difference becomes clearer on observing the total accumulated

Table 4
Recovery test results for F1 and F12 of *D. magna* after 21 days. Results expressed as mean (SD replicates) ± standard deviation.

Offspring born from F0 exposed to (µM):	Reproduction: No. of neonates/brood		Total number of broods		Time to first offspring (day)		Growth: length (mm)		Longevity (%)		
	F1	F12	F1	F12	F1	F12	F1	F12	F1	F12	
	Control	6.88 ± 1.07	6.78 ± 1.01	48	46	10.80 ± 0.79	10.60 ± 0.70	5.02 ± 0.08	5.04 ± 0.10	100	100
ZnONR	1.47	5.88 ± 0.63	6.65 ± 1.29	4	18	16.80 ± 2.86*	14.80 ± 0.92*	4.81 ± 0.19*	4.97 ± 0.19	100	100
	2.33	5.86 ± 0.85	6.27 ± 1.18	4	26	10.75 ± 0.56	15.20 ± 2.25*	4.88 ± 0.16	5.02 ± 0.16	80	100
	3.56	5.80 ± 1.22	6.72 ± 1.40	6	25	11.67 ± 2.94	15.56 ± 2.88*	4.90 ± 0.09	5.03 ± 0.09	100	100
	5.40	5.50 ± 0.71	7.27 ± 1.62	2	22	11.50 ± 0.71	14.50 ± 2.51*	4.90 ± 0.09*	5.04 ± 0.09	80	100
	7.98	5.33 ± 0.58	6.49 ± 0.98	3	23	11.67 ± 6.35	16.67 ± 2.03*	4.78 ± 0.21*	5.02 ± 0.21	100	100
	12	5.86 ± 1.46	7.33 ± 1.84	6	17	11.33 ± 2.94	15.25 ± 1.50*	4.73 ± 0.23*	4.97 ± 0.23	90	100
ZnONR@AF	Control	6.88 ± 1.07	6.78 ± 1.01	48	46	10.80 ± 0.79	10.60 ± 0.70	5.02 ± 0.08	5.04 ± 0.10	100	100
	1.47	6.00 ± 0.00	7.70 ± 1.00	1	19	9.50 ± 0.71	12.33 ± 0.82*	3.81 ± 0.06*	4.96 ± 0.09	100	80
	2.33	6.13 ± 2.01	7.37 ± 1.14	8	20	8.50 ± 0.76	14.50 ± 2.30*	3.86 ± 0.10*	4.96 ± 0.08	100	90
	3.56	6.20 ± 0.84*	5.40 ± 0.57	6	20	9.50 ± 0.84	16.50 ± 3.54*	3.71 ± 0.15*	5.05 ± 0.07	100	100
	5.40	5.33 ± 0.58*	6.54 ± 1.39	3	26	8.50 ± 0.50	13.13 ± 2.47*	3.62 ± 0.15*	5.00 ± 0.08	90	100
	7.98	5.90 ± 0.83	NE	4	NE	9.50 ± 0.59	NE	3.71 ± 0.15*	NE	80*	NE
ZnSO ₄	12	6.00 ± 1.79	NE	3	NE	14.75 ± 0.50	NE	3.94 ± 0.05*	NE	50*	NE
	Control	NE	NE	0	NE	10.80 ± 0.79	NE	5.02 ± 0.08	NE	100	NE
	1.80	NE	NE	0	NE	NE	NE	4.75 ± 0.42	NE	80	NE
	2.73	NE	NE	0	NE	NE	NE	4.41 ± 0.39*	NE	80	NE
	4.02	NE	NE	0	NE	NE	NE	4.66 ± 0.23*	NE	80	NE
	6.10	NE	NE	0	NE	NE	NE	4.63 ± 0.23*	NE	30*	NE

* = Values significantly different from the control ($p < .05$). NE = Not evaluated.

Table 5
Total accumulated offspring for F1 and F12 after 21 days of recovery.

Offspring born to F0 exposed to (µM):	ZnONR		ZnONR@AF		ZnSO ₄
	F1	F12	F1	F12	F1
Control	330	326	330	326	330
1.47	29	135	6	163	NE
2.33	23	150	84	144	NE
3.56	28	158	44	150	46
5.40	16	176	44	198	45
7.98	16	150	16	NE	70
12	41	135	35	NE	28

offspring after 21 days of the test (Table 5). The organisms of F1, for both types of NR, showed almost no reproduction, and when reproduction occurred, there were 4 or 5 days between broods. The onset of birth showed a significant difference ($p < .05$) only for the organisms born from mothers exposed to a concentration of 1.47 µM. Bacchetta et al. (2017) observed the presence of ZnO NP on the eggs of *D. magna* and concluded that the toxicity of the NM may be the result of the indirect toxicity originating from the mothers, evidencing the risk to the offspring associated with maternal exposure. In general, the F12 generation of organism born from mother exposure to ZnONR and ZnONR@AF showed a slight increase in the average reproduction and an increase of the total number of broods, and the time to first brood was significantly retard ($p < .05$). The reproduction started after ± 12.33 days of testing, however, the daphnids showed homogeneous reproduction and an increase in the number of broods, indicating a possible recovery of the organisms after 12 generations not exposed to the NM.

The results of this study indicate that the offspring were affected by the maternal exposure to both ZnO NR and ZnSO₄ and the effects could be observed even when the neonates were cultivated in M4 medium only. The life cycle parameters permitted to detect the effects on F1 and F12, proving to be a good tool to be used in preliminary multi-generational studies with NM. The F1 of daphnids was more affected by the maternal exposure to both ZnO NR and ZnSO₄. However, after 12 generations (F12), despite the retarded time to reproduction, the organisms started to recover from the effects of maternal exposure to both types of ZnO NR. As under real environment conditions, where the aquatic organisms are constantly exposed to xenobiotics over several

generations, our study highlights that caution is required regarding the use of ZnO NM, since permanent exposure to this xenobiotic may interfere with the population dynamics, leading to adverse consequences in the aquatic ecosystem, since daphnids play a crucial role in aquatic food webs (Arndt et al., 2014).

4. Conclusions

This study demonstrates that the rod morphology of ZnO (bare and functionalized) can cause acute and chronic toxicity toward *D. magna*. The effects of this exposition can affect the organisms across several generations, which may lead to impacts on the aquatic environment. The next studies may include the whole life cycle of the daphnids and the investigation at biochemical levels to a better understanding in how the maternal exposure affects the neonates.

Declarations of interest

None.

Acknowledgments

This work was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq – Proc. No 473046/2013-0), Brazil. The authors acknowledge the Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME-UFSC) for TEM images and the Laboratório Multusuários de Estudos em Biologia (LAMEB-UFSC).

References

- Aden, N., Schmitt, C., Galceran, J., Campoy, E., Valente, A., Wallace, R., Knäuper, D., Blau, R., 2014. The chronic toxicity of ZnO nanoparticles and ZnCl₂ to *Daphnia magna* and the use of different methods to assess nanoparticle aggregation and dissolution. *Nanotoxicology* 8, 709–717. <http://dx.doi.org/10.3109/17445019.2013.822594>.
- Aden, N., Lemux, F., Knäuper, D., Bab, S., Blau, R., 2015. The uptake and elimination of ZnO and CuO nanoparticles in *Daphnia magna* under chronic exposure scenarios. *Water Res.* 84, 249–261. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.12.013>.
- Am, L.C., Mohamed, S., Saeed, A., Bakhor, S.K.M., Sullthaban, A., Mohamad, D., Hassan, H., 2015. Structural morphology and in vitro toxicity studies of nano- and micro-sized zinc oxide structures. *J. Environ. Chem. Eng.* 3, 416–444. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jece.2014.12.015>.
- Amh, D.A., Chen, J., Mans, M., Kleper, R.D., 2014. Multi-generational impacts on *Daphnia magna* of carbon nanomaterials with differing core structures and surface functionalities.

- Environ. Toxicol. Chem. 33, 541–547. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2630>.
- Baekshin, M., Nur, Y., Rimek, I., Tojama, M., Lead, J.R., 2013. Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles. Sci. Total Environ. 454–455, 119–131. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.02.029>.
- Bacchetta, R., Maras, B., Marelli, M., Sesto, N., Trombadori, P., 2016. Role of soluble zinc in ZnO nanoparticle cytotoxicity in *Daphnia magna*: a morphological approach. Environ. Res. 148, 276–285. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.04.028>.
- Bacchetta, R., Sesto, N., Marelli, M., Nonesco, G., Trombadori, P., 2017. Chronic toxicity effects of ZnO and ZnO nanoparticles in *Daphnia magna*. Environ. Res. 152, 128–140. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2016.12.006>.
- Berona, C., Vaso, I., Navarro, J.C., Aras, S., Porco, C., 2005. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 140, 175–186. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.01.013>.
- Blinow, I., Ivask, A., Heinmaa, M., Mottomer, M., Kahru, A., 2010. Ecotoxicity of nanoparticles of CuO and ZnO in natural water. Environ. Pollut. 154, 41–47. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2010.08.027>.
- Božić, M., Ban, I., Hrbertnik, S., Fakin, D., Stanić Klinačnik, K., 2017. Surface engineering of TiO₂-MWNT nanocomposites towards tuning of functionalities and minimizing toxicity. J. Sol-Gel Sci. Technol. 83, 133–142. <http://dx.doi.org/10.1007/s10971-017-0369-z>.
- Chu, X.P., 1942. The influence of the mineral composition of the medium on the growth of planktonic algae: part 1. Methods and culture media. Source J. Ecol. 30, 284–325.
- Covello, W.M., Williams, D.M., Esquível, R.J., 1994. Effects of maternal nutrition on fat content and longevity of neonates of *Daphnia magna*. J. Crustacean Biol. 4, 173–190. <http://dx.doi.org/10.2307/1548014>.
- Cragg, D., Hartmann, N.B., Sauer, A., 2016. Influence of pH and media composition on suspension stability of silver, zinc oxide, and titanium dioxide nanoparticles and immobilization of *Daphnia magna* under guideline testing conditions. Ecotoxicol. Environ. Saf. 127, 144–152. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.12.028>.
- EPA, 2002. Short-Term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms, 4th ed. .
- Flora, S.J.S., 2000. Structural, chemical and biological aspects of antioxidants for anti-oxidant agents used in modified systems. Oxid. Med. Cell. Longev. 2, 191–206.
- Goffin, R.J., Hyndman, K., Dunlop, N.D., Barber, D.S., 2009. Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metal oxide nanoparticles. Toxicol. Sci. 107, 404–415.
- Han, Y., Kim, D., Hwang, G., Lee, B., Eom, I., Kim, P.J., Yong, M., Kim, H., 2014. Aggregation and dissolution of ZnO nanoparticles synthesized by different methods: influence of ionic strength and brackish water. Colloids Surface A Physicochem. Eng. Asp. 453, 7–18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2014.03.050>.
- Heinmaa, M., Ivask, A., Blinow, I., Deborjancic, H.-C., Kahru, A., 2008. Toxicity of nano-sized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Daphnophila pulex* (Cladocera) exposed to zinc toxicity. J. Chromatogr. B 876, 39–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chromb.2007.11.047>.
- ISO, 2006. ISO 15706:2006 Water Quality – Determination of Long Term Toxicity of Substances to *Daphnia Magna* Strain (Cladocera, Crustacea).
- ISO, 2012. ISO 6341:2012 Water Quality – Determination of the Inhibition of the Mobility of *Daphnia Magna* Strain (Cladocera, Crustacea) – Acute Toxicity Test.
- Kang, S., Kalia, S., Gelli, A., Njiranga, J., Habibi, V., Kumar, R., 2013. Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic-inorganic nanocomposites – a review. Prog. Polym. Sci. 38, 1253–1268. <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpoly.2013.02.003>.
- Khanlou, P., Ong, C., Bay, B., Ong, G., 2015. Nanotoxicity: an interplay of oxidative stress, inflammation and cell death. Nanomaterials 5, 1163–1180. <http://dx.doi.org/10.3390/nano5031163>.
- Kim, R.-O., Choi, J.S., Kim, B.-C., Kim, W.-K., 2017. Comparative analysis of transcriptional profile changes in larval Zebrafish exposed to zinc oxide nanoparticles and zinc sulfate. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 98, 167–174. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-016-0196-5>.
- Kumar, R., Umar, A., Kumar, G., Nalwa, H.S., 2017. Antimicrobial properties of ZnO nanomaterials: a review. Crit. Rev. Int. J. 43, 3040–3061. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrev.2016.12.062>.
- Leung, Y.H., Chan, C.M., Ng, A.M., Chan, H.T., Chiang, M.W., Djaržević, A.R., Ng, Y.H., Zhu, W.Y., Guo, M.Y., Liming, P.C., Chan, W.K., Au, D.T., 2012. Antibacterial activity of ZnO nanoparticles with a modified surface using amine functionalization. Nanotechnology 23, 475703. <http://dx.doi.org/10.1088/0959-4834/23/47/475703>.
- Linnébach, L.K., Wick, P., Mamer, P., Grass, R.N., Brundin, A., Stark, W.J., 2007. Exposure of engineered nanoparticles to human lung epithelial cells: influence of chemical composition and catalytic activity on oxidative stress. Environ. Sci. Technol. 41, 4158–4163. <http://dx.doi.org/10.1021/es06269e>.
- Liu, J., Wang, W.-X., 2017. The protective roles of TiO₂ nanoparticles against UV-B toxicity in *Daphnia magna*. Sci. Total Environ. 593, 47–53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.155>.
- Lopes, S., Blinow, F., Wojtasiewicz, J., Lojkowska, W., Jurkacz, K., Ciesielski, A., Soares, A.M.V.M., Loureiro, S., 2014. Zinc oxide nanoparticles toxicity to *Daphnia magna*: size-dependent effects and dissolution. Environ. Toxicol. Chem. 33, 190–198. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.2435>.
- Lu, H., Ren, W., Dong, H., Liu, L., Wimmer, M.R., Zek, S., Landshamer, R., Wang, H., Liu, Y., 2017. Dependence of the irradiation conditions and crystalline phases of TiO₂ nanoparticles on their toxicity to *Daphnia magna*. Environ. Sci. Nano 4, 406–414. <http://dx.doi.org/10.1039/C6SN00392E>.
- Matyjaszewski, S., Reed, J.C., 2000. Mitochondria-dependent apoptosis and cellular pH regulation. Cell Death Differ. 7, 1158–1165. <http://dx.doi.org/10.1038/9401>.
- Melagut, S.P., Permalit, F., Costa, R.H.R., Popovic, R., Matias, W.G., 2013. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquat. Toxicol. 142–143, 431–440. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2013.08.012>.
- Moyano, R.T.A., Janssen, C.R., 2001. Multigeneration zinc acclimation and tolerance in *Daphnia magna*: implications for water-quality guidelines and ecological risk assessment. Environ. Toxicol. Chem. 20, 2053–2060. [http://dx.doi.org/10.1016/S1051-5028\(01\)020-2053Z](http://dx.doi.org/10.1016/S1051-5028(01)020-2053Z).
- Moyano, R.T.A., Janssen, C.R., 2002. Accumulation and regulation of zinc in *Daphnia magna*: links with homeostasis and toxicity. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 43, 492–496. <http://dx.doi.org/10.1007/s00143-002-3245-8>.
- Moyano, R.T.A., De Schaepshove, K.A.C., Janssen, C.R., 2006. Mechanisms of chronic waterborne Zn toxicity in *Daphnia magna*. Aquat. Toxicol. 77, 393–408. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2006.01.006>.
- Mwanaga, P., Carroway, E.R., van den Hurk, P., 2014. The induction of biochemical changes in *Daphnia magna* by CuO and ZnO nanoparticles. Aquat. Toxicol. 150, 208–209. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.03.011>.
- Nasser, F., Davis, A., Valentin-Lisovskii, E., Lynch, I., 2016. Shape and charge of gold nano-materials influence arthropod, oxidative stress and a modeling of *Daphnia magna*. Nanomaterials. <http://dx.doi.org/10.3390/nano6120222>.
- Nel, A., Xia, T., Mäder, L., Li, N., 2006. Toxic potential of materials at the nanoscale. Nature 431(7045), 822–827.
- Odzak, N., Knudsen, B., Sjøgg, L., 2017. Influence of daylight on the fate of silver and zinc oxide nanoparticles in natural aquatic environments. Environ. Pollut. 226, 1–11. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2017.04.006>.
- Permalit, F., Oskarov, A., Melagut, S.P., Matias, W.G., Popovic, R., 2012. Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticle uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Aquat. Toxicol. 97, 1308–1304. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2012.02.014>.
- Poynton, C.R., Laczko, H.J., Impellizzeri, C.A., Smith, M.F., Rogers, K., Patra, M., Hammer, K.A., Allen, H.J., Vajpa, C.D., 2011. Differential distribution of copper in *Daphnia magna* suggests distinct modes of action and bioavailability for Zn nanoparticles and Zn ions. Environ. Sci. Technol. 45, 762–768. <http://dx.doi.org/10.1021/es102501z>.
- Research, R., 2015. Nanotechnology in Environmental Application: The Global Market NANO992.
- Rosento, A.L.O.F., Melagut, S.P., Oskarov, L.C., Matias, W.G., 2014a. Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. Sci. Total Environ. 490, 807–814. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.056>.
- Rosento, A.L.O.F., Vicentini, D.S., Costa, C.H., Melagut, S.P., Matias, W.G., 2014b. Pyrolytic, chemical oxidation and toxicological evaluation of a cross-shell copper oxide/polyethylene nanocomposite. Chemosphere 108, 107–114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.038>.
- Sánchez-Otín, J.R., Serra, S.S.S., Nardini, S., 2010. Comparative reproductive growth of *Coriophila dubia* and *Daphnia pulex* (Cladocera) exposed to zinc toxicity. J. Chromatogr. B 876, 39–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chromb.2007.11.047>.
- Sánchez-Otín, J.R., Serra, S.S.S., Nardini, S., 2010. Comparative reproductive growth of *Coriophila dubia* and *Daphnia pulex* (Cladocera) exposed to zinc toxicity. J. Chromatogr. B 876, 39–41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chromb.2007.11.047>.
- Sabido, S., Oskarov, L.P., Brumet, V., Mahdavi, M.A., Al-Jarifi, N., Vozhko, G., Janssen, S.M., Baker, O.M., Cingolani, R., Solazzi, F., Pompa, P.P., 2014. A general mechanism for intracellular toxicity of metal-coated nanoparticles. Nanomaterials 6, 7052–7061. <http://dx.doi.org/10.1039/c4nr01812a>.
- Sesto, N., Fucini, U., Torro, P., Guazzoni, N., Trombadori, P., Bettinetti, R., Mantecosa, P., Bacchetta, R., 2014. Toxic effects of six different metal-oxide nanoparticles to *Daphnia magna* of two differently sized ZnO nanoparticles: does size matter? Water Res. 53, 338–350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2014.01.038>.
- Selck, H., Handy, R.D., Fernandez, T.F., Klaine, S.J., Peterson, E.J., 2016. Nanomaterials in the aquatic environment: a European Union-United States perspective on the status of toxicology testing, research priorities, and challenges ahead. Environ. Toxicol. Chem. 35, 1026–1067. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.3383>.
- Seu, J., Kim, S., Choi, S., Kwon, D., Yoon, T.-H., Kim, W.-K., Park, J.-W., Jung, J., 2014. Effects of physicochemical properties of metal oxides on nanoparticle toxicity to *Daphnia magna* strain. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 93, 257–262. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-014-1337-z>.
- Shu, Z., Zhang, Y., Yang, Q., Wang, H., 2017. Halloysite nanotubes supported Ag and ZnO nanoparticles with synergistically enhanced antibacterial activity. Nanoscale Res. Lett. 12, 128. <http://dx.doi.org/10.1007/s12011-017-0839-8>.
- Vassan, M., Ahmad, U., Yoon-Seung, H., 2010. ZnO Nanoparticles: Growth, Preparation, and Applications. Metal Oxide Nanoparticles and Their Applications.
- Vicentini, D.S., Pauerri, R.C., Oliveira, G.C., Ad, M., Melagut, S.P., Matias, W.G., 2017. Toxicological impact of morphology and surface functionalization of amorphous SiO₂ nanomaterials. Nanomaterials 7, 6–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2016.11.028>.
- Wallin, H., Kyjovska, Z.O., Paulsen, S.S., Jacobson, N.R., Seiber, A.T., Berggren, S., Jackson, P., Vogel, U., 2017. Surface modification does not influence the genotoxic and inflammatory effects of TiO₂ nanoparticles after pulmonary exposure by inhalation in mice. Mutagenesis 32, 47–57. <http://dx.doi.org/10.1093/mutage/gew046>.
- Wang, D., Lin, Z., Wang, T., Yao, Z., Qin, M., Zhong, S., Lu, W., 2016. Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: the nanoparticles, the ions, or a combination of both? J. Hazard. Mater. 308, 328–334. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.01.066>.
- Yang, Y., Liu, T., 2011. Fabrication and characterization of graphene oxide/zinc oxide nanorods hybrid. Appl. Surf. Sci. 257, 8950–8954. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2011.05.070>.
- Zhao, H., Lu, G., Xia, J., Jin, S., 2012. Toxicity of nanoscale CuO and ZnO to *Daphnia magna*. Chem. Res. Chin. Univ. 28, 209–213.