

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA SANITÁRIA E
AMBIENTAL**

BIANCA VICENTE OSCAR

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOESTRUTURAS DE
ÓXIDO DE ZINCO INCORPORADAS EM ARGAMASSA**

**FLORIANÓPOLIS
ABRIL 2018**

Bianca Vicente Oscar

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOESTRUTURAS DE
ÓXIDO DE ZINCO INCORPORADAS EM ARGAMASSA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Ambiental.

Orientador: Prof. William Gerson Matias
Coorientadora: Prof.^a Sílvia Pedroso Melegari

Florianópolis
Abril 2018

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

Oscar, Bianca Vicente
AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOESTRUTURAS DE ÓXIDO
DE ZINCO INCORPORADAS EM ARGAMASSA / Bianca
Vicente Oscar ; orientador, William Gerson Matias,
coorientador, Sílvia Pedroso Melegari, 2018.
114 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis,
2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. nanotoxicologia. 3.
argamassa. 4. Nanobastões de óxido de zinco . 5.
fungicida . I. Matias, William Gerson . II.
Melegari, Sílvia Pedroso . III. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Ambiental. IV. Título.



**“AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOESTRUTURAS DE ÓXIDO DE
ZINCO INCORPORADAS EM ARGAMASSA”**

BIANCA VICENTE OSCAR

Dissertação submetida ao corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

MESTRA EM ENGENHARIA AMBIENTAL

na Área de Engenharia Ambiental.

Aprovado por:

Prof. Dr. William Gerson Matias
(Orientador)

Prof.ª Dr.ª Sílvia Pedroso Megelari
(Coorientadora)

Prof. Dr. Cleton Vaz
(videoconferência)

Prof. Dr. Rodrigo de Almeida Mohedano

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

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço aos meus familiares, namorado e amigos pela compreensão e incentivo durante todo o período do mestrado. À todos que entenderam, e aos que não entenderam também, que minhas ausências eram por um bom motivo.

Agradeço a Universidade Federal de Santa Catarina pela estrutura disponibilizada.

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

À empresa Ceramfix – Argamassas e Rejuntas pela argamassa doada para a realização dessa pesquisa.

Ao professor William Gerson Matias pela oportunidade de fazer parte do grupo LABTOX durante esses sete anos. Serei eternamente grata por todo aprendizado que tive durante todo esse período.

À Sílvia Pedroso Melegari pela orientação, disponibilidade, auxílio e paciência durante a pesquisa.

À Denice Schulz Vicentini por todas as respostas aos meus questionamentos químicos que auxiliaram muito na compreensão dos resultados obtidos nesse trabalho.

À Cristina Moreira Lalau por ter me ensinado o valor da amizade e da fé.

Aos membros da banca, Rodrigo de Almeida Mohedano e Cleiton Vaz pelas contribuições para a melhora deste trabalho.

À toda equipe LABTOX.

Enfim, a todos que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização de mais essa conquista, muito obrigada!

*“We are the ones we’ve been waiting for.
We are the change that we seek.”
(Barack Obama, 2008)*

RESUMO

Embora as estruturas de concreto apresentem vida útil superior a muitos outros materiais construtivos, elas são passíveis de deterioração. A deterioração progressiva proveniente de fontes biológicas se destaca por serem responsáveis por um impacto mais amplo sobre o desempenho a longo prazo do sistema estrutural, gerando grandes consequências econômicas. Os métodos mais utilizados para cessar essa bioincrustação são os métodos de intervenção tais como a utilização de jatos de água e aplicações de biocidas. Porém, essas técnicas vêm sendo deixadas de lado uma vez que são paliativas. Neste trabalho, realizou-se a avaliação toxicológica da incorporação de nanobastões de zinco puros (NB de ZnO) e funcionalizados com a molécula APTMS (NB de ZnO@NH₂) a composições de argamassa comercial. Os resultados de caracterização por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) confirmaram a morfologia em bastão com diâmetros entre 25 e 35 nm e comprimentos variados. O difratograma de raio-x (DRX) confirmou a pureza do NB utilizado no estudo. A funcionalização dos NB foi confirmada por espectroscopia no infravermelho (FTIR) e o potencial zeta (PZ) e o diâmetro hidrodinâmico (D_H) indicaram a variação da estabilidade e dos diâmetros das partículas em diferentes meios diluentes. Ensaio de toxicidade aguda com o microcrustáceo *D. magna*, bactéria marinha *A. fischeri* e a semente de *L. sativa* comprovaram a alta toxicidade tanto para o NB puro quanto para o funcionalizado. Porém, o microcrustáceo e a semente apresentaram maior sensibilidade ao NB funcionalizado enquanto o NB puro apresentou maior toxicidade a bactéria marinha. O ensaio de sensibilidade com *A. niger* mostrou a resistência elevada do fungo a partículas dessa morfologia quando comparado aos valores encontrados na literatura para partículas esféricas. Os elutriados da composição de argamassa e NB apresentaram aumento da toxicidade com o aumento da quantidade NB adicionado a composição, sendo a composição com NB de ZnO@NH₂ mais tóxica para todos os organismos testados. O ensaio de crescimento micelial do fungo *A. niger* nas composições, não foram suficientemente conclusivos para afirmar que a presença do NM inibiu o crescimento do *fungo*.

Palavras-chave: Nanotecnologia, nanotoxicologia, construção civil, argamassa, nanobastão, óxido de zinco, fungicida.

ABSTRACT

Although the concrete structures have a longer life than many other building materials, they are able to deteriorate. The progressive deterioration of biological sources is responsible for an impact on the long-term performance of the structural system, causing significant economic consequences. The most widely used methods for ceasing such biofouling are intervention methods such as the use of water jets and biocide applications. However, these techniques are palliative. In this work, it is proposed the incorporation of pure zinc nanorods (ZnO NR) and functionalized with the APTMS molecule (ZnO@NH₂ NR) to commercial mortar compositions. And the toxicological evaluation of this incorporation was carried out. The characterization results by Electronic Transmission Electron Microscopy (MET) confirmed the morphology in rod with diameters between 25 and 35 nm and varied lengths. The X-ray diffractogram (XRD) confirmed the purity of the NR used in the study. The functionalization of NR was confirmed by infrared spectroscopy (FTIR) and zeta potential (Pz) and hydrodynamic diameter (DH) indicated the variation of the stability and particle diameters in different medium. The acute toxicity test with microcrustacean *D. magna*, the marine bacteria *A. fischeri* and *L. sativa* seed showed high toxicity for pure and functionalized NR. However, microcrustacean and seed showed higher sensitivity to functionalized NR although pure NR showed greater toxicity to marine bacteria. The sensitivity of *A. niger* to NR showed the high resistance of the fungus to particles of this morphology when compared to the values found in the literature for spherical particles. The elutriates of the mortar and NR composition showed increased toxicity by increasing the NR amount added to the composition. The composition with NR of ZnO @NH₂ being more toxic to all organisms tested. The mycelial growth assay of *A. niger* fungus in the compositions was not sufficiently conclusive to claim that the presence of NM inhibited fungus growth.

Keywords: Nanotechnology, nanotoxicology, civil construction, mortar, nanorod, zinc oxide, fungicide.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1- Possíveis mecanismos tóxicos dos NM a nível celular..... | 34 |
| Figura 2- Microcrustáceo <i>D. magna</i> | 37 |
| Figura 3 - Fluxograma de síntese dos NB de ZnO. | 40 |
| Figura 4- Molécula funcionalizante (3-aminopropil) trimetoxisilano (APTMS)..... | 40 |
| Figura 5- Fluxograma de síntese dos NB de ZnO@NH ₂ | 41 |
| Figura 6 – Esquema ilustrativo do crescimento e teste de sensibilidade do tipo diluição em ágar com o fungo <i>A. niger</i> . Placas de Petri com diferentes composições de meio de cultura e NB com 5 mm do fungo inoculado. | 48 |
| Figura 7- Esquema ilustrativo do preparo das amostras sólidas com o meio SPD sob a superfície e 5 mm do micélio do fungo inoculado. | 50 |
| Figura 8- Imagem por MET dos NB de ZnO puros (A e B) e funcionalizados (C e D) em água de osmose..... | 55 |
| Figura 9- Difratoograma de Raio -X do NB de ZnO..... | 57 |
| Figura 10- Espectros de FTIR a) @NH ₂ , b) NB de ZnO e c) NB de ZnO@NH ₂ | 58 |
| Figura 11 - Micrografias obtidas via MET onde, A e B) referem-se à estruturas dos organismos expostos ao controle negativo do ensaio; C e D) ao NB de ZnO; E e F) ao NB de ZnO@NH ₂ e G e H) indicam possível internalização dos NB de ZnO puros nos intestinos das <i>D. magna</i> | 64 |
| Figura 12- Micrografias obtidas via MEV sendo A, D e G) estruturas do controle negativo do ensaio, B, E e H) estruturas correspondentes a organismos expostos ao NB de ZnO e C, F e I) organismos expostos ao NB de ZnO@NH ₂ | 67 |
| Figura 13 - Porcentagem de germinação de sementes de <i>L. sativa</i> expostas a diferentes concentrações de (A) NB de ZnO e (B) NB de ZnO@NH ₂ - (média ± desvio padrão, n=6, * p<0,05 comparado ao controle do teste). | 71 |
| Figura 14- Comparação entre o crescimento das radículas do controle e de um dos tratados evidenciando a atrofia radicular encontrada em organismos expostos nas duas concentrações. | 72 |

| | |
|--|----|
| Figura 15- Comprimento médio das radículas após 7 dias de exposição das sementes a diferentes concentrações de (A) NB de ZnO, (B) NB de ZnO@NH ₂ e (C) ZnSO ₄ (média ± desvio padrão, n=6, * p<0,05 comparado ao controle do teste). | 73 |
| Figura 16- Comparação entre o crescimento e o desenvolvimento das radículas A) do controle e do NB de ZnO, B) do controle e do NB de ZnO@NH ₂ e C) do controle e da solução de ZnSO ₄ após 7 dias de exposição..... | 74 |
| Figura 17 - Micrografias da zona pilífera das radículas do A) controle, B) NB de ZnO (75 mg/L) e C) NB de ZnO@NH ₂ (25 mg/L) após 7 dias de exposição..... | 77 |
| Figura 18 - Micrografias das folhas do A) e B) controle, C) e D) NB de ZnO e E) e F) NB de ZnO@NH ₂ após 7 dias de exposição evidenciando os danos aos tricomas (TR) e a superfície da folha e o aumento do número de estômatos (ES). | 78 |
| Figura 19- Ensaio contendo concentrações variadas de A) NB de ZnO e B) NB de ZnO@NH ₂ que evidenciam o crescimento micelial do fungo <i>A. niger</i> | 82 |
| Figura 20- Comprimento médio das radículas após 7 dias de exposição das sementes a diferentes concentrações de NM adicionado a argamassa (média ± desvio padrão, n=2, quantidade de asterisco indicam grupos estatisticamente semelhantes entre si para p<0,05)..... | 89 |
| Figura 21 - Comparação entre o crescimento e o desenvolvimento das radículas aos elutriados de diferentes quantidades de NB adicionado a argamassa após 7 dias de exposição..... | 90 |
| Figura 22- atividade antifúngica das composições de argamassa com NB..... | 93 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| Quadro 1- Principais fungos encontrados nos estudos sobre bioincrustação..... | 28 |
|---|----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1- Resultados de Pz em diferentes suspensões. | 56 |
| Tabela 2- Área superficial do NB de ZnO puro e funcionalizado..... | 59 |
| Tabela 3- Valores de $CE_{50,48h}$ obtidos nos testes agudos com <i>D. magna</i> para soluções em meio ISO..... | 60 |
| Tabela 4- Resultados dos testes de toxicidade crônica expressos em CEO e CENO para os parâmetros longevidade, reprodução e crescimento de <i>D. magna</i> expostos aos NB de ZnO (puro e funcionalizado), tendo como controle negativo uma solução de $ZnSO_4$ (* $p<0,05$ comparado ao controle do teste)..... | 62 |
| Tabela 5 - Valores de $CE_{50,15min}$ obtidos nos testes agudos com <i>A. fischeri</i> para soluções em meio NaCl..... | 68 |
| Tabela 6- Quantificação de Zn^{+2} , taxa de liberação iônica e taxa de inibição de crescimento para as primeiras e últimas concentrações que apresentaram efeito estatístico significativo em pelo menos um dos parâmetros analisados (germinação e crescimento radicular). | 75 |
| Tabela 7- Diâmetros após 7 dias de exposição aos tratamentos e respectivos ICM de cada concentração tendo como controle negativo o meio PDA. * $p<0,05$ comparado ao controle do teste. | 83 |
| Tabela 8 – Valores de FD obtidos nos testes agudos com <i>D. magna</i> para os elutriatos. | 86 |
| Tabela 9- Valores de FD obtidos nos testes agudos com <i>A. fischeri</i> para os elutriatos com a exposição da bactéria por 15 min aos tratamentos. | 87 |
| Tabela 10- Quantificação de Zn^{+2} , taxa de liberação iônica e taxa de inibição de crescimento para os elutriatos testados..... | 91 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT – Associação Brasileira de Normas Técnica
APTMS – (3-aminopropil) trimetoxisilano
CCB – Centro de Ciências Biológicas
CC – Construção Civil
CEO – Concentração de Efeito Observado
CENO – Concentração de Efeito não Observado
CE₅₀ – Concentração Efetiva que causa efeito em 50% dos organismos expostos
CE_{50, 15min} – Concentração efetiva que causa efeito em 50% dos organismos em 15 minutos de exposição
CE_{50, 30min} – Concentração efetiva que causa efeito em 50% dos organismos em 30 minutos de exposição
CIM - Concentração inibitória mínima
CSH - Silicatos de cálcio hidratados
DH – Diâmetro Hidrodinâmico
DRX – Difração de Raio – X
FD – Fator de diluição
FTIR – Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICC - Indústria da Construção Civil
ICP – OES- Espectrometria de Emissão Ótica com Plasma Indutivamente Acoplado
ICM - Inibição de crescimento micelial
LABCEv – Laboratório de Biologia Celular Vegetal
LABTOX – Laboratório de Toxicologia Ambiental
LaMatE – Laboratório de Materiais Elétricos
LCM - Laboratório de Caracterização Microestrutural
LCME - Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
LIMA – Laboratório Integrado de Meio Ambiente
MET- Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
MgO – Óxido de magnésio
NB – Nanobastão
NB de ZnO – Nanobastão de Óxido de Zinco
NB de Zn@NH₂ – Nanobastão de Óxido de Zinco Funcionalizado
NP – Nanopartícula
NM – Nanomaterial
NT – Nanotecnologia

PDA - Potato Dextrose Agar

Pz - Potencial Zeta

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

UP – Ultra Pura

ZnO – Óxido de Zinco

ZnO@NH₂ – Óxido de Zinco funcionalizado

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 2. OBJETIVOS | 23 |
| 2.1. OBJETIVO GERAL..... | 23 |
| 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 23 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 25 |
| 3.1. CONSTRUÇÃO CIVIL..... | 25 |
| 3.1.1 Biodeterioração na Construção Civil..... | 26 |
| 3.1.1.1 Deterioração por fungos..... | 27 |
| 3.2. NANOTECNOLOGIA..... | 28 |
| 3.2.1 Nanotecnologia na Construção Civil..... | 29 |
| 3.3. ÓXIDO DE ZINCO..... | 31 |
| 3.3.1 ZnO e sua ação biocida..... | 32 |
| 3.4. NANOTOXICOLOGIA..... | 33 |
| 3.4.1. Testes toxicológicos..... | 35 |
| 3.4.2. Organismos-teste..... | 35 |
| 3.4.2.1. Microcrustáceo <i>Daphnia magna</i> | 36 |
| 3.4.2.2. Bactéria marinha bioluminescente <i>Aliivibrio fischeri</i> ... | 37 |
| 3.4.2.3. Semente de alface (<i>Lactuca sativa</i>)..... | 37 |
| 3.4.2.4. Fungos <i>Aspergillus niger</i> | 38 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 39 |
| 4.1. SÍNTESE DOS NANOMATERIAS..... | 39 |
| 4.1.1. NB de ZnO..... | 39 |
| 4.1.2. NB de ZnO@NH ₂ | 40 |
| 4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS NM..... | 41 |
| 4.2.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)..... | 41 |
| 4.2.2. Diâmetro hidrodinâmico (DH) e Potencial Zeta (Pz)..... | 41 |
| 4.2.3. Difração de Raio-X (DRX)..... | 42 |
| 4.2.4. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)..... | 42 |
| 4.2.5. Área Superficial..... | 42 |
| 4.3. TESTES TOXICOLÓGICOS..... | 43 |
| 4.3.1. Preparação das amostras para os ensaios toxicológicos.. | 43 |
| 4.3.2. Análises Toxicológicas..... | 43 |
| 4.3.2.1. Cultivo de <i>D. magna</i> | 43 |
| 4.3.2.2. Teste de toxicidade aguda com <i>D. magna</i> | 44 |
| 4.3.2.3. Teste de toxicidade cônica com <i>D. magna</i> | 44 |
| 4.3.2.4. Teste de toxicidade com <i>A. fischeri</i> | 45 |
| 4.3.2.5. Teste de germinação com <i>L. sativa</i> | 46 |
| 4.3.2.6. Atividade antifúngica com <i>A. niger</i> (ATCC 6275)..... | 46 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 4.4. | ANÁLISE ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO..... | 51 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 55 |
| 5.1. | CARACTERIZAÇÃO DO NM..... | 55 |
| 5.1.1 | Microscopia Eletrônica de Transmissão..... | 55 |
| 5.1.2 | Diâmetro hidrodinâmico (D _H) e Potencial Zeta (Pz)..... | 55 |
| 5.1.3 | Difração de raio – X..... | 56 |
| 5.1.4 | Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)..... | 57 |
| 5.1.5 | Área Superficial..... | 58 |
| 5.2. | TESTES TOXICOLÓGICOS COM NB..... | 59 |
| 5.2.1 | Toxicidade Aguda com <i>D. magna</i> | 59 |
| 5.2.2 | Toxicidade Crônica com <i>D. magna</i> | 61 |
| 5.2.3 | Toxicidade aguda com <i>A. fischeri</i> | 68 |
| 5.2.4 | Fitotoxicidade com <i>L. sativa</i> | 70 |
| 5.2.5 | Efeito antifúngico com <i>A. niger</i> | 81 |
| 5.3. | TESTES TOXICOLÓGICOS COM ARGAMASSA COM NB INCORPORADO..... | 85 |
| 5.3.1 | Toxicidade Aguda com <i>D. magna</i> | 86 |
| 5.3.2 | Toxicidade aguda com <i>A. fischeri</i> | 87 |
| 5.3.3 | Fitotoxicidade com <i>L. sativa</i> | 88 |
| 5.3.4 | Efeito antifúngico com <i>A. niger</i> | 92 |
| 6. | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 95 |
| 6.1. | RECOMENDAÇÕES..... | 95 |
| 7. | CONCLUSÕES..... | 97 |
| 8. | REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 99 |

1. INTRODUÇÃO

Todas as edificações sofrem alterações e mudanças ao longo do tempo. Sejam essas mudanças fruto das necessidades e expectativas de moradores e usuários, seja pelo envelhecimento da estrutura ou ainda devido à exposição à condições adversas.

A deterioração progressiva das estruturas é responsável por um impacto mais amplo sobre o desempenho a longo prazo do sistema estrutural, gerando grandes consequências econômicas (SANCHEZ-SILVA; ROSOWSKY, 2008; WEI et al., 2013). Dentre essas causas, as manifestações patológicas provenientes de fontes biológicas se destacam.

Os estudos das manifestações patológicas em edificações têm levado cada vez mais em consideração a deterioração causada por microrganismos na construção civil (CWALINA, 2008; KONDRATYEVA I. A., 2006; WEI et al., 2013). Uma vez que condições favoráveis, por exemplo, favorecem o crescimento de microrganismos na estrutura, que além de danos estéticos, podem causar danos estruturais, econômicos e à saúde.

Os métodos mais utilizados para cessar essa bioincrustação são os métodos de intervenção tais como a utilização de jatos de água e aplicações de biocidas, que são métodos que em sua maioria envolvem materiais orgânicos. Porém, essas técnicas são paliativas, pois removem os organismos temporariamente. Devido a isso, novas técnicas mais efetivas vêm sendo estudadas. Destacam-se os métodos que envolvem compostos inorgânicos, devido a sua maior estabilidade e maior tempo de vida quando comparado aos materiais orgânicos.

A nanotecnologia é uma das alternativas que surge para amenizar e/ou resolver estes problemas (FONSECA et al., 2010). Através da aplicação de nanomateriais (NM) que combinam a redução da quantidade de material utilizado, propriedades específicas e elevada eficiência. Dentre os NM que possuem propriedades biocidas, destaca-se o óxido de zinco (ZnO) que além da característica desejada, se diferencia devido à sua versatilidade, possibilidade de variadas morfologias, suas propriedades e também pela possibilidade de síntese por métodos químicos relativamente simples e de baixo custo (JO et al., 2012; KLINGSHIRN et al., 2010; MAYRINCK et al., 2014).

Neste contexto, o Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX), do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), vem desenvolvendo estudos relativo a avaliação toxicológica de nanobastões de óxido de

zinco puros (NB de ZnO) e funcionalizados (NB de ZnO@NH₂) adicionados à composições de argamassa comercial. Avaliando a toxicidade do lixiviado da composição e verificando a efetividade da ação fungicida da argamassa com a adição do nanomaterial.

Este trabalho trata-se de uma continuação da pesquisa iniciada no Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) intitulado *Avaliação Toxicológica de Nanoestruturas de Óxido de Zinco Aplicadas em Argamassas*. Com os resultados obtidos, viu-se a necessidade da continuação da pesquisa a fim de esclarecer questões que não foram respondidas e caracterizar melhor o potencial fungicida das argamassas com nanomaterial incorporado.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a toxicidade, em diferentes níveis tróficos, da incorporação de NB de ZnO puros e funcionalizados a composição de argamassa comercial, bem como verificar a obtenção de características fungicidas devido a inserção do nanomaterial.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar o NB de ZnO e o NB de ZnO@NH₂;
- Avaliar a toxicidade dos NB de ZnO e NB de ZnO@NH₂ de forma aguda para os organismos *Daphnia magna* e para a bactéria marinha *Allivibrio fischeri* e de forma crônica para a *Daphnia magna*;
- Determinar o percentual de germinação e avaliar os efeitos nas radículas de sementes de *Lactuca sativa* L. expostas aos dois NM;
- Verificar a eficiência de NB de ZnO puros e funcionalizados na inibição do crescimento do fungo *Aspergillus niger*;
- Determinar a toxicidade aguda do elutriado de amostras sólidas de argamassa comercial pura e com NM incorporado para *Daphnia magna* e *Allivibrio fischeri*;
- Determinar o percentual de germinação e avaliar os efeitos nas radículas de sementes de *Lactuca sativa* L. expostas a elutriados de argamassa pura e com NM incorporada;
- Verificar a eficácia da incorporação de NB de ZnO puros e funcionalizados na argamassa quanto à inibição do crescimento do fungo *Aspergillus niger*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. CONSTRUÇÃO CIVIL

A indústria da construção civil (ICC) é um dos setores estruturais mais importantes para a sociedade. Segundo Barreiro (2003, apud CARVALHO, 2003), este setor participa com de 3 a 5% do PIB nos países em desenvolvimento e de 5 a 10% nos países desenvolvidos. No Brasil, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2016), o PIB do setor da ICC representou, no ano de 2016, cerca de 5% do PIB nacional brasileiro.

Tendo em vista a relevância do setor, é imprescindível a busca por materiais mais resistentes, duráveis, economicamente mais vantajosos e ambientalmente mais sustentáveis em substituição aos materiais já utilizados. Essas inovações impulsionam e valorizam o crescimento do setor da construção civil (CC).

Embora as estruturas de concreto apresentem vida útil superior a muitos outros materiais construtivos, elas são passíveis de deterioração (CWALINA, 2008). Segundo Souza (2010) todas as edificações sofrem alterações e mudanças ao longo do tempo: sejam fruto das necessidades e expectativas de moradores e usuários, seja pelo envelhecimento da estrutura, ou ainda devido à exposição à condições adversas.

O ciclo de vida das arquiteturas de concreto deve considerar todos os fatores que podem causar alterações estruturais inaceitáveis durante qualquer período de sua vida útil (WEI et al., 2013). Isso inclui eventos extremos (ciclones, por exemplo) e a perda progressiva causada por fatores operacionais ou ambientais (SANCHEZ-SILVA; ROSOWSKY, 2008).

Segundo Wei (2013), Sanchez-Silva e Rosowsky (2008), essa deterioração progressiva é responsável por um impacto mais amplo sobre o desempenho a longo prazo do sistema estrutural, gerando grandes consequências econômicas. Dentre essas causas, se destacam as manifestações patológicas provenientes de fontes biológicas. Porém, ainda segundo esses autores, essas patologias não são inteiramente entendidas quando se tratam de estruturas complexas, uma vez que o papel dessa ação em relação a estruturas de concreto seja mais difícil de se avaliar quando comparado, por exemplo, a uma edificação com uma estrutura menos complexa (madeira).

Mesmo assim, em todos os casos, sejam em estruturas complexas ou não, essas patologias acontecem essencialmente devido a estreita associação entre a microflora e a superfície do material (DAWSON; DELONG; PACE, 2006).

3.1.1 Biodeterioração na Construção Civil

Após a construção, as estruturas de concreto estão geralmente imunes a ação de organismos devido ao seu pH extremamente básico (WEI et al., 2013). Isso por que são poucos os organismos que conseguem permanecer e manter suas atividades metabólicas em ambientes com um pH elevado. Essa característica ocorre principalmente devido a formação do hidróxido de cálcio (Ca(OH)_2), componente fundamental das argamassas.

Com o passar do tempo, principalmente devido as características do ambiente como por exemplo ambientes com elevada umidade, longos ciclos de umidificação e secagem, congelamento e descongelamento, e também devido ao atrito das estruturas com outros materiais, essa característica básica vai reduzindo (RIBAS – SILVA 1995). Juntamente a isso, há a formação de rugosidades na superfície da estrutura o que é extremamente favorável a proliferação de micro-organismos.

Além das características citadas anteriormente, o crescimento e desenvolvimento de micro-organismos nas construções são influenciados também pelos seguintes fatores: umidade, a falta de ventilação, utilização que se dá ao cômodo ou edificação, qualidade do ar interno, condições térmicas, ar externo, variações sazonais, temperatura, microclimas internos, projetos de construção, tipos de materiais utilizados na construção, tipo de acabamentos, distribuição geográfica, materiais orgânicos, ocupação, manutenção e gerenciamento, inclinação e orientação da edificação, porosidade e pH. (SANCHEZ-SILVA; ROSOWSKY, 2008; TRAN et al., 2013).

Quando instalados, a atividade microbiana tem um papel importante na questão da durabilidade dos materiais de construção, dando origem então ao termo biodeterioração.

Deterioração é a perda da capacidade estrutural com o tempo como resultado da ação de agentes externos ou ao enfraquecimento do material (SANCHEZ-SILVA; ROSOWSKY, 2008). A definição do termo biodeterioração surgiu em Hueck (1968) como sendo qualquer mudança indesejável nas propriedades de materiais causadas pela atividade metabólica dos organismos. Rose (1981) define o termo como sendo o processo pelos quais agentes biológicos são a causa da redução da qualidade e do valor estrutural. Similar a esses dois conceitos, Dawson et al. (2006) definem de forma simples biodeterioração: a degradação indesejada de materiais por microrganismos.

Diversos microrganismos vêm sendo observados nos materiais de construção, mas os mais frequentemente encontrados e estudados são os

fungos, algas, bactérias (GAYLARDE; RIBAS SILVA; WARSCHEID, 2003). Allsopp et al. (2004) destaca ainda a ação de insetos, roedores, aves, líquens e plantas como microrganismos causadores de biodeterioração. Quanto aos mecanismos de ação, estes variam de organismo para organismo.

O custo da biodeterioração dos materiais de construção é difícil de ser estimado, pois inclui custos econômicos com limpeza, reparos e repinturas; há também o custo cultural pela desfiguração de propriedades históricas, problemas estéticos e estruturais (GAYLARDE; RIBAS SILVA; WARSCHEID, 2003; TRAN et al., 2013).

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

3.1.1.1 Deterioração por fungos

Os materiais de construção expostos tanto à atmosfera interna ou externa são amplamente reconhecidos como ambientes favoráveis para os biofilmes microbianos em geral e para os fungos microscópicos especificamente (KONDRATYEVA; GORBUSHINA; BOIKOVA, 2006).

Segundo Pinheiro (2003) e Dawson et al. (2006), os principais mecanismos de ação dos fungos na biodeterioração das estruturas são a liberação de ácidos orgânicos e inorgânicos que são produzidos durante o metabolismo e a penetração das hifas nas estruturas cristalinas dos materiais.

Além da capacidade de colonizar ambientes hostis e do seu potencial de biodeterioração, proveniente da liberação de produtos metabólicos, os fungos toleram larga faixa de pH e são capazes de resistir a baixos teores de umidade. Outra característica que os favorece é a produção de pigmentos escuros de melanina sintetizada por muitas espécies, e que atua protegendo-os contra a ação dos raios UV (SANTOS, 2011). Todos esses fatores tornam os fungos um importante agente no processo de biodeterioração

Uma série de organismos pode causar a biodeterioração das estruturas de concreto. No Quadro 1 tem-se os principais fungos encontrados e/ou estudados até então na literatura.

Quadro 1- Principais fungos encontrados nos estudos sobre bioincrustação.

| Fungos | Referências |
|-------------------------------------|--|
| <i>Alternaria sp</i> | Ghafoori e Mathis, 1997 |
| <i>Cladosporium cladosporioides</i> | Ghafoori e Mathis, 1997 |
| <i>Epicoccum nigrum</i> | Ghafoori e Mathis, 1997 |
| <i>Fusarium sp</i> | Ghafoori e Mathis, 1997 Giannantonio et al., 2009 |
| <i>Aspergillus niger</i> | Lajili et al., 2008 Sobrinho, 2008 |
| <i>Alternaria alternata</i> | Warscheida e Braamsb, 2000 |
| <i>Penicillium oxalicum</i> | Ghafoori e Mathis, 1997 |
| <i>Penicillium sp</i> | Sobrinho, 2008 |
| <i>Cladosporium sphaerospermum</i> | Pinheiro, 2003 |

Fonte: Adaptado de WEI et al. (2013).

3.2. NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia (NT) é o estudo e a manipulação da matéria em dimensões manométricas. O termo está associado a um grupo multidisciplinar envolvendo áreas da física, química, biologia, engenharia, processos eletrônicos, materiais, aplicações e conceitos em que a característica determinante é o tamanho (ISO, 2008).

O marco da NT foi em 29 de dezembro de 1959, onde Richard Feynman discursou na reunião anual da Sociedade Americana de Física, sobre as vastas oportunidades presentes nos materiais, quando os mesmos possuem dimensões próximas do nível atômico (COSTA, 2014).

Tais pequenas dimensões induzem propriedades específicas, tornando esses materiais muito mais reativos que os mesmos materiais em escalas maiores, permitindo também que passem por certas barreiras biológicas naturais (HOUDY; LAHMANI; MARANO, 2010). Dessa forma, o interesse da NT é trabalhar, aplicar e entender as mudanças nas propriedades químicas e físicas dos materiais nanoestruturados, dando a eles uma ampla aplicabilidade tecnológica.

Em termos tecnológicos, a primeira motivação para o desenvolvimento de NM está associado à redução das dimensões de dispositivos, aumentando sua compactação devido a inserção de material em nanoescala (OSCAR, 2016). No entanto, mais que a procura

pelo simples benefício direto da redução de tamanho, a grande motivação para o desenvolvimento de objetos e dispositivos nanométricos reside no fato que novas e incomuns propriedades físicas e químicas surgem nessa nova escala (MELO & PIMENTA, 2004).

Os setores que mais têm se destacado no lançamento de produtos obtidos por via nanotecnológica, ou contendo nanotecnologia embarcada, são: energético, de iluminação, automobilístico, de embalagens, cosméticos, têxteis, farmacêuticos e esportivos (ABDI, 2011).

3.2.1 Nanotecnologia na Construção Civil

A nanotecnologia pode ter o potencial de aprimorar o concreto com propriedades específicas através da otimização do comportamento do material e melhora significativa no desempenho mecânico, durabilidade e sustentabilidade (BIRGISSON et al., 2012). Porro et al (2010), corroborando com Birgisson et al. (2012), afirmam que a nanotecnologia pode ser aplicada as novas tecnologias relativas a construção civil, desde que estas sejam desenvolvidas com base numa abordagem multidisciplinar.

Dentre as áreas de atuação, Grove et al (2010) e Birgisson et al. (2010) destacam que a NT pode garantir: a) desenvolvimento de materiais de alto desempenho com base nas suas propriedades mecânicas e de durabilidade; b) desenvolvimento de materiais e estruturas de concreto sustentável.

Uma série de pesquisas já realizadas indicaram que o uso de nanomateriais na ICC pode além de potencializar a resistência (CAMPILLO et al., 2007) e a durabilidade (CARDENAS; STRUBLE, 2008) dos materiais, também pode garantir funcionalidade a eles como propriedades fotocatalíticas (auto-limpeza, redução da poluição e capacidade anti-microbiana) (LACKHOFF et al., 2003), anti-embacamento (DIAMANTI; ORMELLESE; PEDEFERRI, 2008).

Gaitero et al., (2010), afirmam que nanopartículas (NP) de SiO_2 tem implicações importantes para a cinética de hidratação do cimento devido a um aumento da quantidade de cristais de CSH na pasta, redução da porosidade e melhoria das propriedades mecânicas. Comprovando isso, Sanchez e Sobolev (2010), através de sua pesquisa verificaram que a inserção de nanopartículas de SiO_2 acelerou o processo de hidratação do cimento devido a uma redução do teor de $\text{Ca}(\text{OH})_2$ e ao aumento do teor de silicato de cálcio hidratado CSH.

Estudos demonstraram que NP de TiO_2 pode acelerar a hidratação precoce do cimento portland (JAYAPALAN et al., 2010), melhorar as resistências à compressão e à flexão (LI, et al., 2007) . Além disso, outros estudos revelaram que a inserção de nanoestruturas de TiO_2 pode ser eficaz para a auto-limpeza de concreto, bem como a conversão de alguns poluentes em formas inócuas, como por exemplo, óxidos de nitrogênio, monóxido de carbono, clorofenóis e aldeídos das emissões veiculares e industriais (VALLEE et al., 2004; MURATA et al., 1999; CHEN, 2009). Em sua pesquisa, Fonseca et al. (2010), analisaram a redução da bioincrustação através de dois experimentos: a inoculação de cianobactérias e espécies clorofiladas em amostras sólidas de argamassa tratadas e a aplicação de soluções aquosas em uma parede externa coberta por organismos. O estudo comparou o potencial biocida de três tipos de tratamento, dois biocidas convencionais (Biotin T e Anios) e a NP de TiO_2 com cerca de 20 nm. A conclusão desse estudo confirmou que a incorporação de NM é uma alternativa para prevenir a bioincrustação nas argamassas, uma vez que os resultados obtidos indicaram um desempenho superior aos biocidas convencionais.

Pesquisas mostraram que as resistências à compressão e à flexão de argamassas de cimento contendo NP de SiO_2 e Fe_2O_3 eram ambas maiores do que aquelas de argamassa simples de cimento (LI et al., 2004; HUI et al., 2004).

Zhenhua et al., (2006), trabalharam com NM de Al_2O_3 e verificaram que a sua inserção na argamassa foi eficaz para o aumento do módulo de elasticidade. Sendo que, com uma adição de 5% do NM, o módulo de elasticidade aumentou em 143% aos 28 dias.

O efeito da adição nanoestruturas de ZrO_2 no cimento foi estudado por Fan et al. (2004). No estudo, foi observado a redução da porosidade e permeabilidade, o aumento da resistência à compressão e melhoria da microestrutura da pasta de cimento.

Há muitas melhorias necessárias nas estruturas de concreto, tanto a nível de eficiência quanto de durabilidade, que podem ser realizadas com a inserção de nanoestruturas na sua composição. Contudo, segundo BITTNAR et al. (2009), essas melhorias são lentas. E esse atraso é justificado pelos autores pela falta de compreensão dos mecanismos químicos e físicos e sua estrutura na escala nanométrica e também pela falta de uma ampla compreensão do que a nanomodificação significa para o concreto.

Klihgshirn et al. (2010) afirmam que o ZnO serve como aditivo para cimento ou concreto, prolonga a vida útil do cimento e melhorando as suas propriedades hidráulicas.

Apesar dos crescentes estudos voltados ao beneficiamento da inserção dos NM na ICC, essas nanoestruturas, mesmo em pequenas quantidades e associadas, têm o potencial de impactar o meio ambiente e saúde humana (KANAREK; POWELL, 2006; O'BRIEN; CUMMINS, 2008).

BITTNAR et al., (2009) afirmam que os principais cenários de exposição dos NM na CC são:

1) Fabricação: as liberações de NM para o ambiente podem ocorrer na fabricação de materiais de construção em processos que envolvam revestimento, composição, e incorporação de NM. A exposição ocupacional dos trabalhadores ocorre por inalação, o que pode causar problemas respiratórios;

2) Demolição: é altamente provável que a demolição, parcial ou completa, resulte em na liberação dos NM para o meio ambiente;

3) Construção: os resíduos que contêm NM são gerados principalmente nas etapas de reparação, renovação e construção;

4) Liberações a longo prazo: durante a vida dos edifícios, danos, desgaste e abrasão das infraestruturas, artificiais ou naturais, podem causar a liberação de nanomateriais para o ambiente. Incêndio e/ou incineração, por exemplo, podem liberar nanomateriais para a atmosfera, chuvas intensas podem promover a dissolução ou lixiviação e drenagem de nanomateriais.

3.3. ÓXIDO DE ZINCO

O óxido de zinco (ZnO) é um material antigo usado desde 2000 a.C. em produtos médicos (MOEZZI; MCDONAGH; CORTIE, 2012). Devido ao seu baixo custo, facilidade de fabricação e relativamente alta disponibilidade (CHUAN, 2012), muitas aplicações foram desenvolvida a partir de ZnO. Tornando o zinco (Zn) o quarto metal mais usado no mundo, ficando apenas atrás do ferro, alumínio e cobre (MOEZZI; MCDONAGH; CORTIE, 2012).

As superfícies polares do ZnO são muito estáveis e tem sido usadas para induzir a formação de novas nanoestruturas (KLINGSHIRN et al., 2010), com diferentes morfologias. Essa variedade de morfologia pode ser atribuída ao controle e ajuste 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 (MAYRINCK et al., 2014).

Para Wang e Phys (2004), Klingshin (2007) e Hong et al., (2006), o ZnO é um material bastante promissor na área de nanotecnologia, devido suas propriedades químicas, ópticas, mecânicas, elétricas e

magnéticas. Ele se destaca dentre outros óxidos devido à sua versatilidade, com variadas morfologias, suas propriedades e também pela possibilidade de síntese por métodos químicos relativamente simples e de baixo custo (MAYRINCK et al., 2014).

Partículas de ZnO com tamanho nanométrico são empregadas há muitos anos na indústria cosmética, por serem amplamente utilizadas como agentes atenuantes (que absorve e/ou dispersa) da radiação ultravioleta (UV) (DJURIIĆ; NG; CHEN, 2010). Além dessa aplicação, o ZnO pode ser utilizado também na indústria farmacêutica (KLINGSHIRN et al., 2010), em eletrônicos (MAJOR; BANERJEE; CHOPRA, 1985; KLINGSHIRN et al., 2010), na indústria cerâmica (CHESLER et al., 2016; REDDY et al., 2016), em sensores de gás (ZHANG; JIANG; SUN, 2017), células solares (SOUZA et al., 2014), como aditivo alimentar (KLINGSHIRN et al., 2010), como catalisadores de reações (FOROUZANI et al., 2015; LACKHOFF et al., 2003; LIN et al., 2014), aplicações que utilizem suas propriedades luminescentes (KLINGSHIRN et al., 2010; MAYRINCK et al., 2014) e na ICC (NOCHAIYA et al., 2015).

3.3.1 ZnO e sua ação biocida

Segundo Carvalho et al. (2014) e Ohira e Yamamoto (2012), o ZnO possui propriedades biocidas. Devido a isto, está atualmente sendo usado como um agente antimicrobiano tanto na formulação de microescala e nanoescala (ZHANG et al., 2010).

A principal razão da utilização do ZnO como agente biocida é devido a estabilidade e a vida mais longa do que os agentes antibacterianos orgânicos ou agentes antimicrobianos usuais (ZHANG et al., 2010). Os agentes antibacterianos orgânicos, por exemplo, são frequentemente menos estáveis em comparação com agentes antibacterianos inorgânicos (SAWAI, 2003).

Vários mecanismos têm sido propostos para explicar a toxicidade do ZnO. Vários relatos sugerem que as suspensões aquosas de ZnO (Equação 1) produzem níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio (ROS), devido principalmente ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que geram estresse oxidativo nas paredes celulares bacterianas (DUTTA et al., 2012; PADMAVATHY; VIJAYARAGHAVAN, 2008). O H_2O_2 é um poderoso agente oxidante (GHULE et al., 2006) e sua ação está relacionada à produção de radicais hidroxilas no meio intracelular que atacam lipídios, proteínas e DNA (PERES, 2005).



Além disso, sabe-se que a liberação de íons de zinco a partir da suspensão de ZnO (BAI et al., 2010) e a interação entre as NP e a membrana da célula contribuem para a morte celular (LEUNG et al., 2012).

Xia et al. (2008) verificaram que o ZnO internalizado pelas células é rapidamente dissociado (conforme equação 1) e os íons Zn^{+2} formados são liberados, prejudicando a atividade mitocondrial.

No estudo de Ramani, Ponnusamy e Muthamizhchelvan (2013) foi avaliada a relação entre a forma e a toxicidade da NP de ZnO sobre diferentes grupos de bactérias. Como resultado, os pesquisadores concluíram que as nanoestruturas de ZnO apresentaram atividade bactericida tanto para bactérias gram-positivas quanto gram-negativas. E que as NP de ZnO apresentaram-se mais tóxicas que os NB, indicando que a toxicidade está diretamente ligada a forma da nanoestrutura. Além disso, com base nas diferenças observadas na toxicidade, a geração de ROS e danos mecânicos à membrana celular são propostos como sendo a principal fonte de toxicidade nas nanoestruturas.

Corroborando com os resultados de Ramani, Ponnusamy e Muthamizhchelvan (2013), o estudo de Yamamoto et al. (2001) verificaram que a atividade biocida é aumentada com a redução do tamanho de partícula do ZnO e que sua atividade biocida é resultado da geração de H_2O_2 a partir da superfície de ZnO.

Sardella et al. (2017) mostraram que as NP de ZnO com um tamanho médio de diâmetro inferior a 50 nm possuem alto potencial biocida induzindo danos físicos as estruturas fungicas. He et al. (2011) também comprovou a ação fungicida das NP de ZnO indicando inibição do crescimento e deformação nas hifas fúngicas. Segundo os autores, esses efeitos aumentaram com o aumento da concentração do NP.

3.4. NANOTOXICOLOGIA

Com o crescente interesse e desenvolvimento na área de nanotecnologia, surge uma ampla discussão sobre os potenciais riscos associados à exposição de organismos e ao meio ambiente como um todo (OSCAR, 2016). Uma vez que, à medida que o aumento da produção e do uso de nanomateriais, aumenta a possibilidade de liberação no ambiente, o que aumenta o potencial de efeitos adversos saúde humana e ambiental (BITTNAR et al., 2009a).

Os efeitos potencialmente nocivos que podem resultar da produção, transporte e utilização desses materiais nanoestruturados constituem a razão da preocupação e dos estudos voltados a área da nanotecnologia (HOUDY; LAHMANI; MARANO, 2010). Dando origem então ao termo nanotoxicologia.

A nanotoxicologia pode ser definida como a ciência que objetiva o estudo da toxicidade dos NM em relação ao homem e ao meio ambiente. Sendo, segundo Donaldson et al. (2004), uma ciência multidisciplinar, incluindo a ciência dos materiais, química, física e medicina. Ela tem por missão nortear o desenvolvimento seguro e sustentável da nanotecnologia (ABDI, 2011).

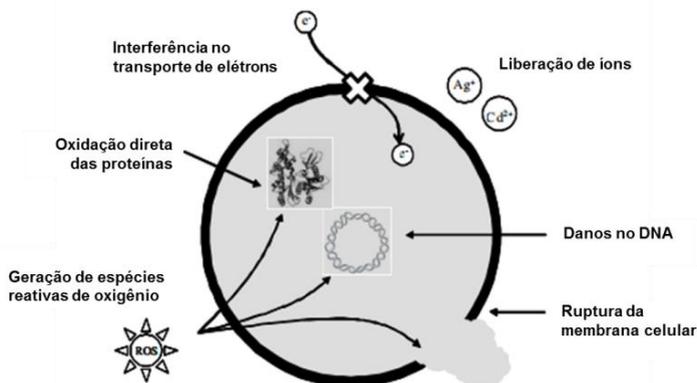
Os primeiros estudos sobre a toxicidade de NM foram realizados na última década do século XX, investigando materiais que em escala micrométrica não apresentavam toxicidade, e que em escala nanométrica, como nanoparticulados, apresentavam algum efeito tóxico (PASCHOALINO et al. 2010).

Os estudos até então realizados na área indicam que os NM podem causar toxicidade (HOUDY; LAHMANI; MARANO, 2010; BITTNER et al., 2009; CLIFT; GEHR; ROTHEN-RUTISHAUSER, 2011), sendo o nível de ação e os efeitos dessa exposição próprios de cada material e de cada organismo.

Bittner et al. (2009) afirmam que, de modo geral, os NM podem causar toxicidade a nível celular através de múltiplos mecanismos (

Figura 1), sendo alguns deles: liberação de íons, interferência do transporte de elétrons, geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), danos no DNA e ruptura da membrana celular.

Figura 1- Possíveis mecanismos tóxicos dos NM a nível celular.



Fonte: Adaptado de BITTNAR et al. (2009)

3.4.1. Testes toxicológicos

Testes de toxicidade são ensaios realizados sob condições experimentais específicas e controladas, que tem como objetivo avaliar os efeitos nocivos das substâncias, bem como o seu grau de toxicidade sobre os organismos vivos (COSTA et al., 2008; MULLER, 2011).

Esses ensaios tornam-se instrumentos importantes na avaliação do potencial de risco ambiental dos contaminantes uma vez que somente as análises físico-químicas não são suficientes. As análises físico-químicas desconsideram efeitos da mistura, tais como efeitos aditivos, sinérgicos e antagônicos.

Basicamente, os organismos vivos são expostos a diferentes concentrações das substâncias de interesse e analisam-se os efeitos adversos causados sobre estes organismos, como por exemplo, imobilidade, morte, alterações físicas, morfológicas e funcionais, entre outros (MATIAS, 2009).

Fenske et al. (2006) afirmam que uma combinação de vários testes, utilizando organismos de diferentes níveis de complexidade, proporcionam resultados confiáveis para a avaliação da toxicidade em diversas partes do ecossistema. As diferentes características biológicas entre as espécies de organismos-teste refletem como estes organismos respondem a exposição de uma substância tóxica a uma dada concentração, apresentando níveis de sensibilidades diferentes (POSTHUMA et al., 2002).

3.4.2. Organismos-teste

Para a escolha dos organismos a serem testados, Rand et. al. (1995) destacam que devem ser observadas questões como a disponibilidade e abundância do organismo desejado, a uniformidade e estabilidade genética nas populações, a representatividade de seu nível trófico, a ampla distribuição e importância comercial e a facilidade de cultivo e de adaptação às condições de laboratório. Além disso, para facilitar a interpretação dos resultados, Costa et al. (2008) salientam que devem ser utilizadas espécies cuja fisiologia, genética e comportamento sejam bem conhecidos.

Os testes de toxicidade podem ser realizados *in situ* ou em laboratório, avaliando efeitos agudos ou crônicos da exposição à determinado xenobiótico. Sendo esses efeitos toxicológicos dependentes da concentração e das propriedades da substância química à qual o organismo é exposto, bem como do tempo de exposição (Rand et. al., 1995).

3.4.2.1. Microcrustáceo *Daphnia magna*

A *D. magna* (Figura 2) é um microcrustáceo de água doce, originária do hemisfério norte, com tamanho médio entre 5 a 6 mm (ALVES e SILVANO, 2006). Segundo Costa et al. (2008) estes organismos são bastante utilizados em testes de toxicidade pois existe um grande número de informações sobre as técnicas de cultivo, os requisitos de temperatura, luz e nutrientes e sobre sua resposta a muitas substâncias tóxicas. Além da sua importância na cadeia trófica atuando como consumidoras primárias, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado, principalmente de algas unicelulares.

Vulgarmente conhecidas como pulgas d'água, as *D. magna* se reproduzem por partenogênese cíclica, por isso, as populações consistem quase que inteiramente de fêmeas. Quando ocorrem condições ambientais desfavoráveis, como baixas temperaturas ou grande densidade e subsequente acumulação de produtos excretados, estas induzem o aparecimento de ovos sexuados, ou efípios (CIMAR, 2011).

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

Figura 2- Microcrustáceo *D. magna*.



Fonte: A autora.

3.4.2.2. Bactéria marinha bioluminescente *Aliivibrio fischeri*

A. fischeri é uma bactéria marinha gram-negativa e anaeróbica que em condições ambientais favoráveis emite luz naturalmente, necessitando somente de condições de oxigênio de 0,5 mg/L (KNIE & LOPES 2004). Possuindo uma distribuição global, essas bactérias podem ser encontradas em pequenas quantidades em vida livre nos oceanos, ou em grandes quantidades em áreas isoladas, ou associadas a outros organismos marinhos.

A emissão de luz se dá utilizando parte da energia obtida no ciclo de Krebs, porém ao entrar em contato com substâncias tóxicas a produção de energia é inibida, fazendo com que a emissão de luz cesse ou diminua (UMBUZEIRO & RODRIGUES, 2004). Assim, nesse teste é medida a redução da luminescência emitida naturalmente pela bactéria quando ela é exposta em contato com um agente tóxico, o qual inibe a atividade da enzima luciferase (COSTA et al., 2008).

Segundo Costa (2014), esse organismo é considerado bom indicador de contaminação em ambientes marinhos e por isso são usualmente utilizadas em ensaios de avaliação toxicológica de xenobióticos ou efluente que possam causar algum efeito nocivo ao meio ambiente. Além disso, os ensaios utilizando esta bactéria marinha são rápidos, sensíveis e fáceis de executar (COSTA et al., 2008).

3.4.2.3. Semente de alface (*Lactuca sativa*)

Souza et al (2005) afirmam que sementes são excelentes organismos para bioensaios. Ferreira (2007) salienta que plantas de ciclo curto, como no caso *L. sativa*, são ideais para estudos toxicológicos laboratoriais, além de terem grande importância para a agricultura e o seu cultivo ser difundido em quase todo o mundo.

Estes ensaios vêm sendo cada vez mais utilizados na avaliação de potenciais danos ambientais devido ao seu custo relativamente baixo, a curta duração dos ensaios e a sensibilidade que estes organismos testes apresentam a substâncias tóxicas (GRANADOS, 2004). Além disso, as sementes mantidas em ambientes secos permanecem dormentes e podem ser estocadas por longos períodos sem perder a viabilidade.

Os ensaios utilizando *L. sativa* avaliam o efeito toxicológico das amostras sobre a germinação e sobre o crescimento das radículas de sementes de alface.

3.4.2.4. Fungos *Aspergillus niger*

Fungos são organismos eucarióticos heterotróficos que ocorrem em associação com outras espécies, como patógenos de animais e plantas ou como espécies de vida livre (LOPES, 2011).

Esses organismos tem importante papel na decomposição de materiais orgânicos (GADD et al., 1986). E devido a isso, a importância ecológica dos fungos em processos como a ciclagem e a decomposição dos nutrientes os torna um grupo taxonômico fundamental para a detecção e monitoramento ambiental de poluentes (WEITZ; CAMPBELL; KILLHAM, 2002).

Os ensaios toxicológicos com fungos, além de serem utilizados para avaliar possíveis alterações no crescimento, biomassa, reprodução e viabilidade dos organismos, são importantes aliados no desenvolvimento de eficientes fungicidas para controlar os agentes patogênicos (GADD, 1993; GADD et al., 1986; HORSWELL et al., 2006; WEITZ; CAMPBELL; KILLHAM, 2002). Além disso, outra importante motivação para a realização dos ensaios toxicológicos com fungos é a perda da eficácia dos compostos utilizados devido ao aumento da resistência microbiana (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Aspergillus niger é um fungo filamentosos, do grupo ascomiceto, onipresente no ambiente, mesofílico, aeróbio, de cultivo fácil, ampla aplicabilidade na biotecnologia e que cresce em uma grande variedade de substratos (BAKER, 2006; MAHESHWARI; BHARADWAJ; BHAT, 2000; PARSHIKOV; SUTHERLAND, 2014). Seu crescimento geralmente está associado a altos níveis de umidade e baixa intensidade de luz, causando problemas de saúde, incluindo alergias, sintomas respiratórios e asma, especialmente durante a exposição prolongada (CHEN; YANG; WU, 2009).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

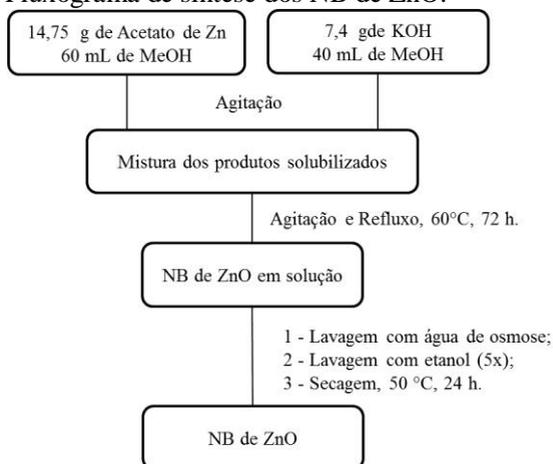
Os ensaios de bancada, a sínteses dos nanomateriais e ensaios toxicológicos foram realizados no Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX). A caracterização dos NM foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) – UFSC, no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) – UFSC e na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC. A preparação das amostras para análise em microscopia eletrônica foi realizada no Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV) e as análises com o fungo foram realizadas no Departamento de Microscopia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas da UFSC.

4.1. SÍNTESE DOS NANOMATERIAS

4.1.1. NB de ZnO

Os NB de Zn puros foram sintetizados conforme a metodologia descrita por Yang et al. (2011) com algumas modificações, conforme Figura 3. Inicialmente, 14,75 g de acetato de zinco e 7,4 g de hidróxido de potássio (KOH) foram solubilizadas em 60 mL e 40 mL de metanol (MeOH), respectivamente. Em seguida, as duas soluções foram misturadas e mantidas por 72 h sob refluxo a 60°C. A fração sólida da solução foi separada por centrifugação, lavada cinco vezes com água de osmose e cinco com etanol e seca em estufa a 50°C por 24 h, obtendo-se então os NB de ZnO.

Figura 3 - Fluxograma de síntese dos NB de ZnO.

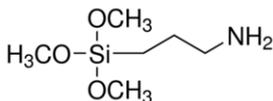


Fonte: A autora.

4.1.2. NB de ZnO@NH₂

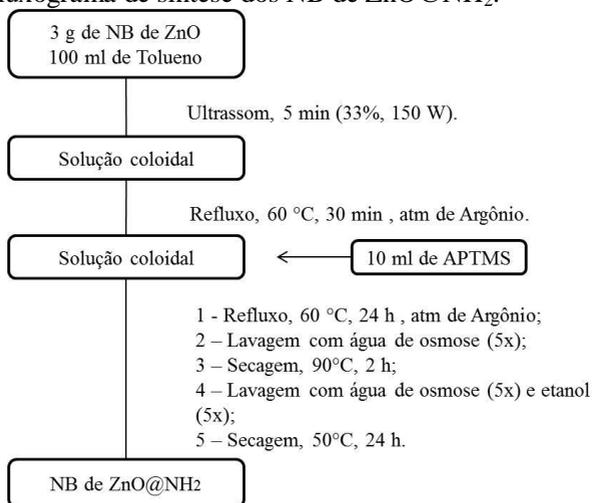
Os NB de ZnO foram sintetizados segundo a metodologia indicada por Oscar (2016) com modificações, conforme fluxograma ilustrado na Figura 5. Três gramas de NB de Zn foram suspensas em 100 mL de tolueno com auxílio do ultrassom. A suspensão coloidal foi mantida sob refluxo e agitação em atmosfera de argônio. Após um período, foi adicionado a solução 10 mL de (3-aminopropil) trimetoxissilano (APTMS) (Figura 4) e mantido ainda sob refluxo e agitação a 60 °C por 24 h. Todo a reação permaneceu sobre atmosfera de argônio. Após as 24 h, os NB de ZnO@NH₂ foram lavados por centrifugação com água de osmose (10x) e secos em estufa a 90 °C por 2 h. Após as 2 h, os NB de ZnO@NH₂ foram secos à temperatura ambiente e em seguidos lavados com água de osmose (5x) e etanol (5x) e secos em estufa a 50 °C por 24 h.

Figura 4- Molécula funcionalizante (3-aminopropil) trimetoxissilano (APTMS).



Fonte: A autora.

Figura 5- Fluxograma de síntese dos NB de ZnO@NH₂.



Fonte: A autora.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DOS NM

4.2.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

A estrutura morfológica, o tamanho e o diâmetro dos NM sintetizados foram analisados via MET. A metodologia de preparo das amostras consistiu inicialmente na suspensão de NB de ZnO puros e funcionalizados em água ultrapura (UP) ou no respectivo meio de cultivo na concentração de 1g/L. Em seguida, depositou-se uma gota da solução, previamente sonicada no ultrassom por 2 min, sobre um filme de carbono amorfo de 3-5 nm de espessura suportado sobre uma grade de cobre de 300-400 mesh e 3 mm de diâmetro. Em seguida, a amostra foi seca a temperatura ambiente por 24 h.

As análises foram realizadas no microscópio modelo TEM JEM 1011 (JEOL Ltd., Tóquio, Japão), localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME-UFSC).

4.2.2. Diâmetro hidrodinâmico (DH) e Potencial Zeta (Pz)

Os diâmetros hidrodinâmicos dos NB foram obtidos através da medição do espalhamento dinâmico de luz. A estabilidade dos NB em suspensão foi avaliada através do Potencial Zeta (Pz).

Para ambas as análises, preparou-se uma solução de 1 g/L de NB diluído em água UP ou em algum meio específico de determinados

organismos teste. Após isso, os NB foram suspensos nos meios com o auxílio de um ultrassom, sendo sonicados por 3 minutos.

Essas análises foram realizadas no equipamento Nanobrook modelo 90Plus PALS (Brookhaven, New York - USA) localizado no LABTOX.

4.2.3. Difração de Raio-X (DRX)

Através do difratograma gerado na análise de DRX é possível identificar os picos característicos da fase cristalina do material puro, e assim, verificar a pureza do NB.

O NB em pó foi prensado para a formação de uma pastilha de aproximadamente 3,4 mm. Esta pastilha foi inserida no compartimento do equipamento X'Pert (Philips), localizado no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM) da UFSC. O ângulo de difração em 2θ foi registrado de 5 a 80° à temperatura ambiente e o tubo utilizado como fonte dos raios-X deve ser o cobre, $\text{CuK}\alpha$, com $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$.

4.2.4. Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Nesta técnica, aplica-se radiação infravermelha à amostra e promove-se a vibração e deformação de ligações químicas. Como cada material possui ligações químicas únicas e absorve ou transmite diferentes espectros do infravermelho é possível verificar a presença de grupos funcionais evidenciando a funcionalização do material. Assim, nos espectros de FTIR é possível identificar as bandas características dos grupos funcionais presentes nas amostras.

Para realizar as análises de FTIR foram preparadas pastilhas das amostras da molécula funcionalizante APTMS e dos NM de ZnO puro e funcionalizado com KBr anidro. As análises foram realizadas na Central de Análises do Departamento de Química da UFSC, no equipamento FTIR modelo ALPHA (Bruker, Billerica, EUA).

4.2.5. Área Superficial

A determinação da área superficial dos NB estudados foram realizada no Laboratório de Materiais Elétricos (LaMatE) da UFSC através do equipamento NOVA Surface Area Analyzer (Quantachrome Instruments, Boynton Beach, EUA), baseado no método de BET (BRUNAUER; EMMETT; TELLER, 1938). Também conhecido como Teoria da Absorção Multimolecular, essa metodologia baseia-se na absorção física de um gás inerte a baixas temperaturas.

Para esta análise, resfriou-se a amostra a 77 K durante uma hora no próprio equipamento. Submeteu-a a ciclos de adsorção e dessorção através da injeção de nitrogênio líquido. A área superficial específica é calculada pelo software do equipamento através da equação do método de BET.

4.3. TESTES TOXICOLÓGICOS

4.3.1. Preparação das amostras para os ensaios toxicológicos

Os ensaios de bancada foram realizados com dois tipos de amostras, os NB de ZnO puros e funcionalizados diluídos nos meios específicos para cada ensaio toxicológico dependendo do organismo a ser exposto, e os elutriatos preparados a partir de composições de argamassa com diferentes porcentagens de NM adicionadas.

Para os testes com os elutriatos, foram seguidas as recomendações da NBR 15.469 (ABNT, 2007). A norma indica a proporção de uma parte de sedimento para 4 partes de água de diluição (1:4). Por isso, optou-se pelo preparo de amostras sólidas de 30g (argamassa + NM ou somente argamassa para o branco) em moldes de 8,0x8,0x0,2 cm. Para a obtenção da composição respeitou-se a proporção líquida recomendada pelo fabricante. Sendo 250 mL para cada 1 kg de argamassa.

Após o preparo, as amostras sólidas permanecem em repouso por 48 h. Em seguida, como indicado na norma, foram submetidas a agitação constante por 30 min em 120 mL (1:4) de meio diluente. Após a agitação, o sistema permaneceu em repouso por 1 h e então se obteve o elutriato.

4.3.2. Análises Toxicológicas

Foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica como o microcrustáceo *D. magna*, toxicidade aguda com a bactéria marinha bioluminescente *A. fischeri*, ensaios de fitotoxicidade com sementes de *L. sativa* e testes antifúngicos com o organismo *A. niger*.

4.3.2.1. Cultivo de *D. magna*

Os neonatos de *D. magna* utilizados nos ensaios toxicológicos são provenientes do LABTOX. O laboratório mantém o cultivo desses organismos seguindo as recomendações da ABNT NBR 12.713/2010.

Os organismos foram cultivados em béqueres de 2 L com cerca de 1,5 L de água de cultivo M4 (NBR 12.713/2016) em temperatura e

luminosidade controlada de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 horas de luz, respectivamente. A manutenção da cultura é realizada três vezes por semana onde a água de cultivo é trocada e uma nova quantidade de alimento, a alga *Scenedesmus subspicatus*, é fornecida. Além disso, é feito o controle de organismos adultos e a higienização das vidrarias utilizadas.

A manutenção do cultivo consiste na troca do meio de cultura, transferindo apenas os organismos adultos ao novo lote. Os filhotes são destinados aos ensaios toxicológicos ou são descartados em recipiente apropriado.

Semanalmente foram realizados testes de sensibilidade com dicromato de potássio, como descreve a ISO 6341/2012, para verificar a qualidade do cultivo e para atestar a viabilidade da utilização dos organismos nos bioensaios. A faixa de sensibilidade recomendada para a utilização dos organismos nos testes é entre 0,6 mg/L e 1,7 mg/L de $\text{CE}_{50,24\text{h}}$ (ISO, 2012).

4.3.2.2. Teste de toxicidade aguda com *D. magna*

A metodologia para a realização dos testes de toxicidade aguda com *D. magna* seguiu orientações da NBR 12.713 (ABNT, 2010). As amostras foram avaliadas através da exposição de neonatos (2 até 26 horas de vida) a diferentes concentrações da substância a ser testada diluída no meio ISO, por um curto intervalo de tempo (48 h) (OSCAR, 2016). Os testes foram realizados em duplicata para cada diluição, sendo colocados 10 neonatos em cada réplica com 25 mL de volume final.

Neste ensaio foi avaliado o efeito sobre a capacidade natatória dos organismos expostos à amostra. Após serem contabilizados os organismos imóveis após 48 h do ensaio, o resultado foi avaliado através do programa estatístico *Trimmed Spearman Karber* e expresso na concentração efetiva que causa imobilidade em 50% dos organismos expostos (CE_{50}).

Trabalhou-se com dois tipos de amostras distintas. NB de ZnO e NB de ZnO@NH_2 diluídos em meio ISO e elutriados das composições de argamassa com e sem NM, sendo estes também extraído em meio ISO.

Para as soluções de NM, optou-se por sempre partir de uma concentração-mãe de 1 g/L, tanto para NB ZnO quanto para NB ZnO@NH_2 .

4.3.2.3. Teste de toxicidade crônica com *D. magna*

No ensaio de toxicidade crônica, neonatos de *D. magna* foram expostos durante 21 dias ao agente tóxico. Ao fim do período de exposição, foram observados os efeitos na reprodução, no crescimento e na longevidade desses organismos.

Os resultados obtidos no ensaio foram tratados estatisticamente no software *Dunnnett*, de modo a obtermos a concentração de efeito observado (CEO) e a concentração de efeito não observado (CENO). Onde a CEO indica a menor concentração da amostra que causa efeito significativo nos organismos e a CENO indica a maior concentração da amostra que não causa efeito significativo nos organismos.

Os testes foram mantidos sob as mesmas condições de temperatura e luminosidade exigidas para o cultivo de *D. magna*. A troca é mantida três vezes por semana e a cada troca é disponibilizado um novo alimento. O meio de diluição do ensaio é a água de cultivo (M4).

Foram realizados dois testes crônicos relativos as soluções de NB ZnO e NB ZnO@NH₂, diluída em meio M4, ambas nas concentrações de 1g/L.

4.3.2.4. Teste de toxicidade com *A. fischeri*

Os testes de toxicidade aguda com a bactéria *A. fischeri* foram realizados conforme as normas ISO 11.348 – 3 e ABNT NBR 15.411-3. O equipamento utilizado foi o MICROTOX® 500 e o lote de bactérias utilizado nos ensaios foi 14M4173 proveniente da SDI® (Newark, DE, USA).

O ensaio consistiu na exposição das bactérias a oito diluições da amostra, sendo a concentração de 80% a máxima. Alguns parâmetros da amostra precisaram ser corrigidos (como salinidade de 20 g/L no mínimo e pH entre 6,5 – 8,0) para manutenção da cepa da bactéria e evitar resultados falsos positivos de toxicidade. A temperatura do ensaio foi controlada pelo próprio equipamento, de modo que as séries de diluições são mantidas a 15 °C e o reagente bacteriano a 3 °C.

Para a validação do ensaio foi realizado um teste de sensibilidade com a solução de controle positivo sulfato de zinco heptahidratado (ZnSO₄.7H₂O) 100 mg/L. Os ensaios com as amostras a serem testadas só podem ser realizados se a sensibilidade do lote estiver entre 2 e 10 mg/L. Caso contrário, o lote deve ser descartado.

A medição da luminescência foi realizada em três momentos: no tempo zero (antes da exposição da bactéria a amostra), 15 e 30 minutos após o contato da bactéria com a amostra. Todos os procedimentos realizados foram indicados e controlados pelo software

Microtox Omni 4.0. E como resultado determinou-se a $CE_{50,15 \text{ min}}$ e o fator de diluição.

Foram realizados testes com soluções de 1 g/L de NB de ZnO e NB de ZnO@NH₂ e ensaios com os elutriados de argamassa pura e diferentes composições de NB adicionado.

4.3.2.5. Teste de germinação com *L. sativa*

Para a realização dos ensaios, foram adquiridas sementes de alface da espécie *L. sativa* da marca Isla Pak. Segundo o fabricante, as sementes não possuem defensivos agrícolas em sua composição, informando um grau de pureza de 99,9%. Como informações adicionais, a empresa afirma que as sementes dessa espécie levam em média 4 dias para germinarem e a temperatura ideal para o cultivo é de 24°C, com mínima de 2 °C e máxima de 29°C.

Os testes foram realizados com base na Regra para Análise de Sementes (RAS) fornecidas pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2009). As sementes foram colocadas sob duas camadas de papel filtro dentro de uma placa de petri e as amostras a serem testadas foram adicionadas a placa apenas no início do ensaio.

Segundo a RAS (2009), a quantidade de água a ser adicionada deve levar em consideração o peso do substrato. Sendo de 2 a 3 vezes o seu peso. Além disso, o teste exigiu um fotoperíodo de 16h, com controle de temperatura entre 15 e 20 °C. A duração do teste foi de 7 dias, sendo a contagem inicial de sementes germinadas realizada no 4º dia. No sétimo dia foi feita a medição da raiz primária a fim de analisar estatisticamente se a exposição a amostra comprometeu o seu desenvolvimento.

4.3.2.6. Atividade antifúngica com *A. niger* (ATCC 6275)

A atividade antifúngica foi avaliada de duas maneiras. Uma analisando a ação biocida dos NB de ZnO através de um teste de sensibilidade ao nanomaterial, e outra através da exposição de fungos a blocos de argamassa contaminados com NB de ZnO.

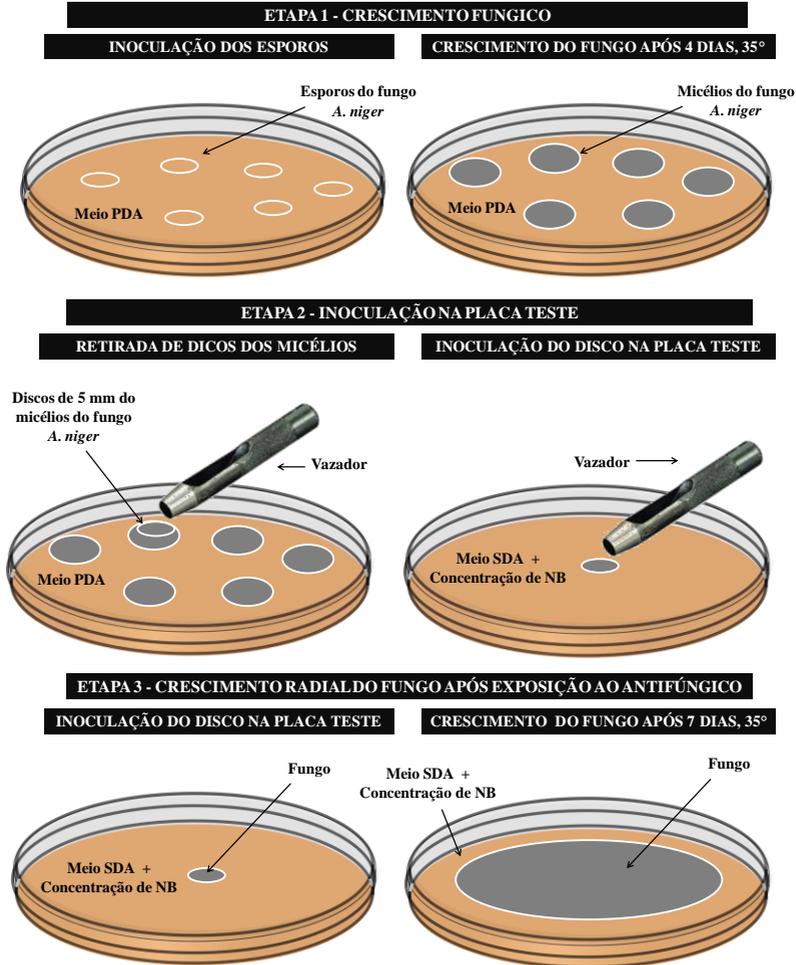
O teste de sensibilidade a antifúngico utilizado foi o método de diluição de ágar. Esse método envolve a incorporação de concentrações desejadas do agente antimicrobiano em um meio ágar seguido da inoculação de um inóculo microbiano definido no centro da superfície do meio solidificado.

Essa técnica é adequada para testar a susceptibilidade de agentes antibacterianos e antifúngicos (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). Segundo Barry (1986), este teste apresenta

vantagens como a capacidade de testar diferentes estirpes ao mesmo tempo, fácil detecção de contaminação e capacidade para testar materiais opacos.

A Figura 6 apresenta um esquema ilustrativo do crescimento fúngico e do teste de sensibilidade realizado com os NB de ZnO. Como ilustrado na ETAPA 1 da figura 6, placas de petri contendo meio de cultura Potato Dextrose Agar (PDA) foram inoculadas com esporos de *A. niger* e incubadas em estufa bacteriológica, a 35°C por 96 horas. Após o 4º dia de crescimento, deu-se início a ETAPA 2, foram retirados discos de 5 mm de diâmetro do micélio desenvolvido na placa com auxílio de um vazador. Novas placas foram preparadas com o meio de teste Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e alíquotas da solução estoque de NM para a obtenção de concentrações de 100, 300, 500 e 700 mg/L para o NB de ZnO e 50, 70, 90 e 110 mg/L para o NB de ZnO@NH₂ (ETAPA 3). O controle do experimento foi preparado com o meio SDA sem adição de NM. As placas de Petri foram incubadas durante 7 dias a 35°C. Ao final do ensaio, com o agente antimicrobiano difundindo no ágar e inibindo a germinação e o crescimento do microrganismo testado, os diâmetros de inibição foram medidos.

Figura 6 – Esquema ilustrativo do crescimento e teste de sensibilidade do tipo diluição em ágar com o fungo *A. niger*.



Fonte: A autora.

Como resultado do teste, foi obtida a inibição do crescimento micelial (ICM) que é calculada pela equação 2, descrita por Edgington, Khew e Barron (1971) e modificada por Menten et al. (1976).

$$\%ICM = \frac{CRTE - CRT}{CRTE} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Onde:

ICM é a inibição do crescimento micelial (%);

CRTE é o crescimento radial do controle (cm)

CRT é o crescimento radial do tratamento (cm)

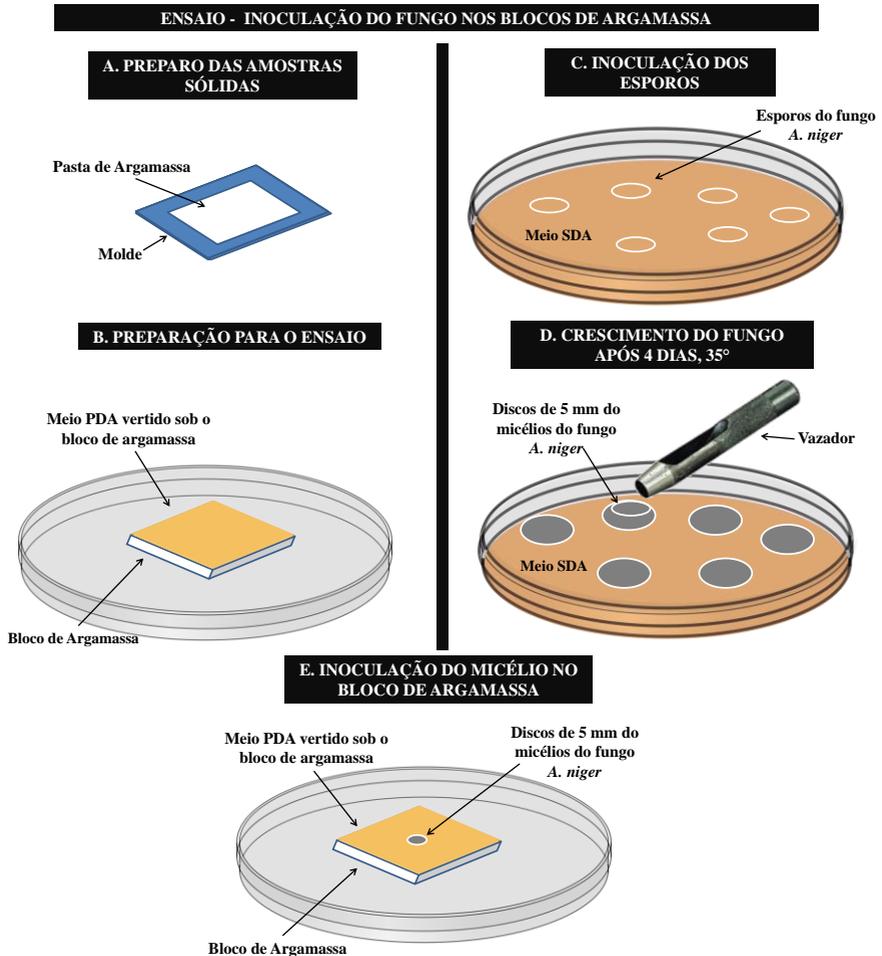
Os resultados de ICM foram avaliados estatisticamente pelo teste de Tukey, adotando um nível de significância de 5%.

No Brasil ainda não existem normas que avaliem as propriedades biocidas diretamente em argamassas. Tem-se apenas a NBR 14941 (ABNT, 2011) referente a "Determinação da resistência de tintas, vernizes e complementos ao crescimento de fungos em placas de Petri". Dessa forma, a metodologia utilizada para avaliar a ação biocida da argamassa com a inserção do NM foi adaptada de Fonseca et al. (2010) e de Luo et al. (2018) e pode ser visualizada na Figura 7.

Foram produzidas amostras sólidas de argamassas com NM adicionado nas concentrações de 0,125, 0,25 e 0,5% para NB de ZnO e 0,5% para NB de ZnO@NH₂ da composição total da amostra. A preparação das amostras de argamassa foi baseada na proporção de preparo indicada pelo próprio fabricante sendo 1Kg de argamassa comum a 250 mL de água. A massa resultante da mistura foi aplicada em moldes de 4x5,5x 0,5 cm (Figura 7A).

Paralelamente, conforme Figura 7C, os esporos do fungo foram inoculados em meio de crescimento SDA e mantidos por 4 dias a uma temperatura de 35°C. Preparou-se o meio ágar PDA, e após os 2 dias de cura das amostras sólidas, o meio foi vertido na superfície dos blocos de argamassa, distribuindo aproximadamente 3 mL do meio em cada bloco (Figura 7B). Após a solidificação do meio sob as amostras sólidas o fungo foi inoculado com o auxílio de um vazador de 5 mm de diâmetro (Figura 7E). As placas foram incubadas durante 14 dias a uma temperatura de 35°C.

Figura 7- Esquema ilustrativo do preparo das amostras sólidas com o meio SPD sob a superfície e 5 mm do micélio do fungo inoculado.



Fonte: A autora.

Após os 14 dias, a avaliação do crescimento sobre o corpo de prova foi visual.

Todos os ensaios com fungos foram realizados no Departamento de Microscopia, Imunologia e Parasitologia (MIP) do Centro de Ciências Biológicas da UFSC.

4.4. ANÁLISE ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO

Os procedimentos relativos ao preparo dos emblocamentos do microcrustáceo *D. magna* foram realizados no Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEv), localizado no CCB da UFSC. Foram emblocados os organismos expostos a CEO e ao controle negativo do ensaio crônico.

Dessa forma, após o período experimental, os organismos foram processados para análise em microscopia eletrônica de transmissão (MET), seguindo a metodologia de Bouzon et al. (2006) com adaptações. Inicialmente, os organismos foram fixados em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2) de 12 a 24 h. Em seguida, foram lavadas (3x) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M durante 30 min. As amostras foram então pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1 M de 2 a 4 h. Em seguida foram realizadas lavagens (3x) em tampão cacodilato de sódio 1% por 30 min cada. Após a lavagem, as amostras foram desidratadas em uma série acetônica crescente (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), 10 min cada etapa. A última série, 100%, foi repetida 2 vezes. O material foi então infiltrado com resina Spurr em séries graduais durante 5 dias. E duas infiltrações em resina pura por 24 h cada. A amostra foi então polimerizada em estufa a 70 °C por 24 h. Os cortes ultrafinos foram realizados com auxílio de uma navalha de diamante e em seguida corados com citrato de chumbo 1%.

Os cortes foram analisados no microscópio eletrônico de transmissão JEM 1011 (JEOL, Tóquio, Japão) do LCME - UFSC.

4.5 ANÁLISE ATRAVÉS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

Os procedimentos relativos ao preparo das amostras do microcrustáceo *D. magna* e das raízes e folhas da semente de *L. sativa* germinada também foram realizados no LABCEv.

Foram preparados as *D. magna* expostas a CEO e ao controle negativo do ensaio crônico. Já com relação as sementes, foram preparadas para análise dos organismos expostos à primeira concentração que causou efeito significativo e ao controle negativo.

Inicialmente as *D. magna* e as *L. sativa* L. foram fixadas durante 1 e 3 dias, respectivamente, em solução de glutaraldeído 2,5%, paraformaldeído 4% e tampão cacodilato de sódio a 0,1 M (pH 7,2). Em

seguida, foram lavadas (3x) em tampão cacodilato de sódio 0,1 M durante 30 min. As amostras foram então pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato 0,1 M de 2 a 4 h. Em seguida foram realizadas lavagens (3x) em tampão cacodilato de sódio 1% por 30 min cada. Após a lavagem, as amostras foram desidratadas em uma série crescente de etanol (30%, 50%, 70%, 90%), 10 min cada concentração. Na sequência, o material foi seco sobre o ponto crítico EM-DPC-030 (Leica, Heidelberg, Alemanha). As amostras foram depositadas sobre suportes metálicos (stubs) e em seguida revestido com ouro-paládio, segundo (SCHMIDT et al., 2012).

As amostras foram examinadas e fotografadas no MEV JSM 6390 LV (JEOL Ltd., Tóquio, Japão, em 10 kV).

4.6 ESPECTROMETRIA DE MASSA COM PLASMA INDUTIVAMENTE ACOPLADO (ICP – MS)

A análise de ICP-MS foi realizada na Central de Análises do Departamento de Química – UFSC, no equipamento Espectrômetro de Massa com Plasma Indutivamente Acoplado ICP-MS, modelo NexION 300 D (Perkin Elmer, Sheltron, USA). Essa análise tem como objetivo quantificar os íons Zn biodisponíveis presentes nas amostras.

As soluções analisadas foram elutriatos de diferentes composições de argamassa e NM. Após a extração da fração líquida, as amostras foram acidificadas com HNO₃ afim de favorecer a liberação dos íons de Zn. Em seguida, esses íons foram quantificados no equipamento.

4.7 QUANTIFICAÇÃO IÔNICA

A quantificação de metais em suspensão de NM foi realizada através do método de espectrometria de absorção atômica de chama (FAAS).

Foram analisadas as CE₅₀ dos testes agudos e CEO dos testes crônicos com *D. magna*, a primeira diluição que apresentou resultado com relevância estatística para a semente *L. sativa* e a CE₅₀ do teste agudo com a bactéria e *A. fischeri*. Sendo cada amostra de NB diluída no meio característico de cada teste e tendo como controle negativo os meios dos ensaios sem a diluição de NB.

Para a quantificação dos íons biodisponíveis, as amostras foram acidificadas com ácido nítrico até adquirirem pH < 2 e foram analisadas de forma integral, considerando seus precipitados. Seguiu-se a metodologia descrita pela APHA (1999).

A quantificação foi realizada nas dependências do Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA) no Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, no equipamento SpectrAA 50 (Varian, Califórnia, EUA).

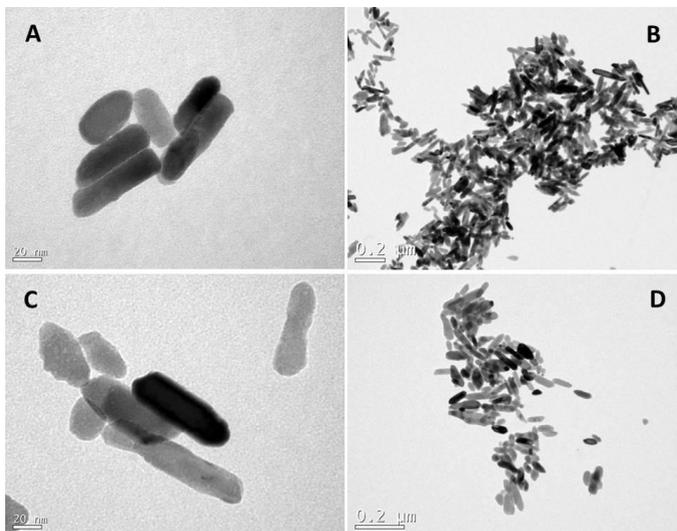
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. CARACTERIZAÇÃO DO NM

5.1.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão

As imagens de MET confirmaram a morfologia alongada do tipo 2D dos NB de ZnO com diâmetro entre 25 e 35 nm e comprimentos variados. Como é possível visualizar na Figura 8, os NB apresentaram domínios aglomerados quando analisados em água de osmose.

Figura 8- Imagem por MET dos NB de ZnO puros (A e B) e funcionalizados (C e D) em água de osmose.



Fonte: A autora.

5.1.2 Diâmetro hidrodinâmico (D_H) e Potencial Zeta (Pz)

O Pz é diretamente influenciado pelo pH (BERG et al., 2009), concentração, tipo de íons presentes (força iônica) e pela concentração de outras moléculas (DOORLEY; PAYNE, 2011) no meio dispersante. Segundo Jo et al. (2012), as suspensões de NM que possuem valores absolutos de Pz próximo a 30 mV são consideradas suspensões mais estáveis.

Com base nos resultados apresentados na Tabela 1 é possível observar que, de modo geral, os NB de ZnO@NH₂ apresentaram maior estabilidade quando comparados os NB de ZnO puros. Isso pode ser atribuído à molécula funcionalizante APTMS na superfície do NB, o que modifica a sua estabilidade em suspensão. Esse aumento da estabilidade devido à molécula APTMS foi também observado por Niu et al. (2014) quando o revestimento recobria NP de carbetto de silício.

As NP de óxido metálicos têm uma forte tendência a sofrer aglomeração devido a suas cargas superficiais (KANGO et al., 2013; MALLAKPOUR; MADANI, 2015) e essa característica fica evidente quando o meio possui complexidade iônica suficiente para favorecer essa característica. Isso pôde ser visto com os diâmetros hidrodinâmicos nos meios NaCl e ISO (grande força iônica) quando comparados ao valores encontrados no meio água de osmose. Ou seja, a força iônica do meio favoreceu a aglomeração das partículas ocasionando um aumento do diâmetro hidrodinâmico na solução.

Em meio NaCl 2%, verifica-se que as duas suspensões apresentaram uma diminuição significativa da estabilidade em relação ao meio água de osmose. Isso pode ser justificado pelo aumento da força iônica devido aos íons de Na⁺ e Cl⁻.

Os maiores diâmetros hidrodinâmicos foram encontrados nas suspensões em meio NaCl 2%. Buffet et al. (2011) verificaram que em água do mar, houve aumento significativo dos diâmetros dos NM e as suspensões tornaram-se mais instáveis devido à diminuição do Pz em comparação ao controle. O sinal negativo indica a reversão da polaridade da partícula devido ao meio.

Tabela 1- Resultados de Pz em diferentes suspensões.

| Amostra | Diluyente | pH | Pz (mV) | DH (nm) |
|---------------------------|----------------|-------------|---------------|-----------------|
| NB de ZnO | Água de Osmose | 7,10 ± 0,21 | 19,80 ± 2,31 | 333,60 ± 9,34 |
| | ISO | 7,02 ± 0,12 | -12,66 ± 1,33 | 1814,90 ± 10,54 |
| | NaCl | 7,21 ± 0,22 | - 6,99 ± 1,32 | 1903,56 ± 6,32 |
| NB de ZnO@NH ₂ | Água de Osmose | 7,31 ± 0,43 | 43,60 ± 4,88 | 430,98 ± 6,43 |
| | ISO | 7,85 ± 0,22 | 14,01 ± 1,65 | 621,00 ± 8,43 |
| | NaCl | 7,44 ± 0,45 | 10,31 ± 3,12 | 2371,82 ± 7,50 |

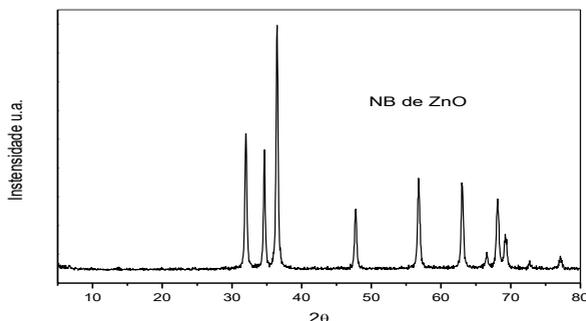
Fonte: A autora.

5.1.3 Difração de raio – X

Com o difratograma obtido com a análise de DRX (Figura 9) é possível comprovar a pureza da fase cristalina dos NB sintetizados

através do aparecimento dos picos característicos do ZnO. A estrutura cristalina hexagonal do NB foi identificada conforme cartão do banco internacional JCPDS N° 36-1451).

Figura 9- Difratoograma de Raio -X do NB de ZnO.



Fonte: A autora.

5.1.4 Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 10, o espectro A corresponde a molécula funcionalizante, o espectro B ao NB de ZnO puro e o C ao NB de ZnO funcionalizado.

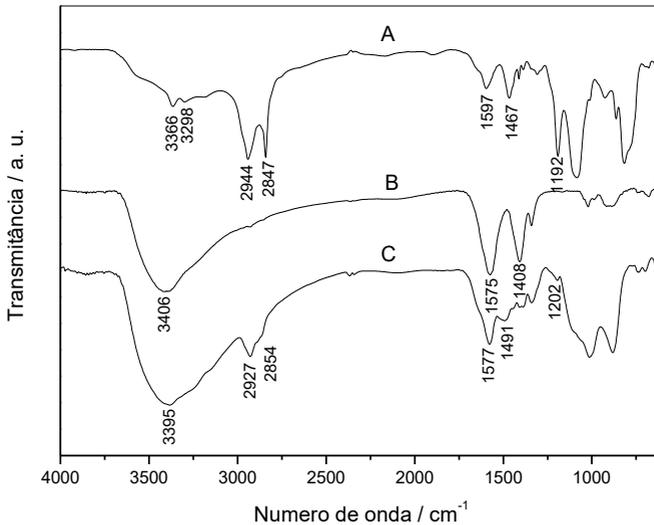
No espectro A é possível observar o aparecimento de bandas características de NH (amina) e de ligações de CH alifáticos que são os principais grupos que caracterizaram a molécula APTMS. Nas bandas 3366 e 3298 cm^{-1} observa-se a região de vibração de estiramento de amina primária, em 2944 e 2847 cm^{-1} as vibrações de estiramento simétricos e assimétricos de ligações de CH alifática e em aproximadamente 1597 cm^{-1} uma banda larga referente à deformação angular do NH_2 .

No Espectro B do NB puro, em 3406 cm^{-1} é possível observar uma banda característica de hidroxilas. Em 1575 cm^{-1} , segundo a literatura, esta banda é atribuída a carbonila do acetato e em torno de 1400 cm^{-1} temos as bandas características de CH alifático (YANG; LIU, 2011). Em aproximadamente 500 cm^{-1} é observado bandas de ligação de Zn-O (SIGOLI et al., 2000).

A funcionalização dos NB de ZnO foi confirmada devido ao aparecimento de bandas dos grupos funcionais específicos no espectro C, referente ao NB de ZnO funcionalizado. Onde na região de 3400 cm^{-1}

temos uma banda de sobreposição de hidroxila e de amina. Em 2927 e 2854 cm^{-1} as bandas correspondentes ao estiramento do CH alifático e em 1577 cm^{-1} à vibração da deformação angular simétrica do NH_2 .

Figura 10- Espectros de FTIR a) @ NH_2 , b) NB de ZnO e c) NB de ZnO@ NH_2 .



Fonte: A autora

5.1.5 Área Superficial

A partir da análise de BET foi possível observar que a funcionalização resultou num aumento da área superficial do NB de ZnO (Tabela 2).

Tabela 2- Área superficial do NB de ZnO puro e funcionalizado.

| Amostra | Área Superficial (m²/g) |
|---------------------------|---|
| NB de ZnO | 4,76 |
| NB de ZnO@NH ₂ | 18,51 |

Fonte: A autora.

Isso pode ser explicado, segundo Babitha et al. (2015), pelo fato das moléculas de APTMS recobrirem os NB de ZnO formando uma camada irregular sobre o material, aumentando assim sua área superficial.

Esse aumento da área superficial pode promover o aumento de reatividade e aumento das interações entre NM e biomoléculas (CHANG et al., 2012).

5.2. TESTES TOXICOLÓGICOS COM NB

5.2.1 Toxicidade Aguda com *D. magna*

Os resultados obtidos nos ensaios de toxicidade aguda são apresentados na Tabela 3. Avaliando os resultados é possível observar que os NB testados apresentaram alta toxicidade, sendo 6,86 e 4,45 mg/L para NB de ZnO puro e funcionalizado respectivamente. Ambos os NM testados foram mais tóxicos que a solução de ZnSO₄ utilizada como controle positivo para o ensaio. Seo et al. (2014) encontraram uma CE_{50,48h} de 1,57 mg/L para NP de ZnO com diâmetros de 20 - 30 nm. Valor próximo ao encontrado por Skjolding et al. (2014) que foi de 1,9 mg/L para NP com 30 nm e por Kim et al. (2017), 1,4 mg/L para partículas de 20 a 30 nm. Heinlaan e colaboradores (2008b) reportaram em sua pesquisa uma CL_{50,48h} para NP de ZnO de 50 a 70 nm de 3,2 mg/L. Santo et al. (2014) encontraram valores de 1,9 mg/L para NP com diâmetro menores que 50 nm e 3,1 mg/L para partículas de diâmetro menores que 100 nm. Os estudos apresentados demonstraram um maior potencial toxicológico no NM de ZnO que os resultados encontrados nessa pesquisa, provavelmente devido à diversos fatores, mas principalmente devido as diferenças morfológicas dos NM estudados e à sensibilidade do cultivo dos organismos empregados.

Tabela 3- Valores de $CE_{50,48h}$ obtidos nos testes agudos com *D. magna* para soluções em meio ISO.

| Amostra | pH | $CE_{50,48h}$ (mg/L) | Zn^{2+} (mg/L) | Taxa de liberação de Zn^{2+} (%) |
|---------------------------|----------------|----------------------|------------------|------------------------------------|
| NB de ZnO | $7,2 \pm 0,03$ | $6,86 \pm 0,24$ | $1,30 \pm 0,23$ | 18,95 |
| NB de ZnO@NH ₂ | $7,5 \pm 0,07$ | $4,45 \pm 0,33$ | $1,91 \pm 0,11$ | 42,92 |
| ZnSO ₄ | $6,7 \pm 0,06$ | $7,70 \pm 0,12$ | $2,34 \pm 0,13$ | 30,38 |

Fonte: A autora.

Sabe-se que quanto menor a partícula, maior a área superficial e maior a reatividade do material, e este pode ter sido um mecanismo importante para a obtenção dos resultados indicados na Tabela 3. O tamanho reduzido dos NB de ZnO, quando comparados ao controle negativo sugerem que boa parte da toxicidade encontrada esteja relacionada ao tamanho das partículas. Isso por que, mesmo possuindo uma taxa de liberação de íons de Zn maior, a solução de ZnSO₄ apresentou menor toxicidade quando comparado ao NB de ZnO.

Santo et al. (2014) realizaram estudos sobre a influência do tamanho das NP de ZnO sobre o microcrustáceo *D. magna* e concluíram que as partículas de menor tamanho apresentaram maior toxicidade, indicando que seu tamanho reduzido era o agente causador da toxicidade do NM. Mesmo assim, os mesmos autores não excluem que, uma vez dentro da célula, a reatividade da NP possa aumentar a liberação de íons causando efeitos adicionais e desregulando o equilíbrio osmótico da célula. Bystrzejska-Piotrowska et al., (2009) e Nowack e Bucheli (2007) evidenciam a importância do tamanho da partícula na sua toxicidade, mas Zhu et al. (2008) indicaram em sua pesquisa que este não é o único mecanismos de toxicidade uma vez que não obtiveram resultados de CE_{50} significativamente distintos quando analisaram partículas de diferentes tamanhos. Gadd e Casey (2007) e Heinlaan et al. (2008a) indicaram que o principal mecanismo toxicológico do Zn é através da liberação de íons.

A quantificação iônica das três soluções nas suas respectivas $CE_{50,48h}$ evidencia que a toxicidade do Zn não está associada apenas a quantidade de íons Zn^{2+} liberados no meio. Isso por que, a solução de ZnSO₄ apresentou uma taxa de liberação intermediária quando comparado aos valores encontrados para as outras soluções. Ou seja, a análise de apenas uma característica do NM não é o bastante para determinar sua toxicidade.

Poynton et al. (2011) demonstraram em seus estudos que a diferença na dissolução de ZnO é devido aos diferentes valores de pH dos meios. E que, dentro do período de exposição, os animais eram submetidos a uma mistura de Zn^{+2} e NM, ambos contribuindo para a toxicidade.

Na comparação dos dois resultados obtidos para os NB estudados, o NB de ZnO@NH₂ apresentou maior taxa de liberação de íons. Este resultado não era o esperado, uma vez que a funcionalização com a molécula APTMS tinha como principal objetivo retardar a liberação de íons. Presume-se que o aumento da liberação esteja associado ao aumento da área superficial e a diminuição do diâmetro hidrodinâmico. Além disso, a modificação superficial do NB devido a funcionalização garantiu a ele uma superfície carregada positivamente, afetando diretamente a interação entre o NM e as biomoléculas, favorecendo sua internalização. De qualquer forma, estudos mais aprofundados devem ser realizados para explicar tal fenômeno.

5.2.2 Toxicidade Crônica com *D. magna*

Os resultados obtidos dos ensaios de toxicidade crônica são apresentados na Tabela 4. Neste teste de toxicidade crônica foram analisados os parâmetros crescimento, reprodução e longevidade dos organismos expostos.

Com relação ao parâmetro longevidade, os NB de ZnO apresentaram maior toxicidade uma vez que indicaram efeito na diluição de 0,98 mg/L enquanto que para os NB de ZnO@NH₂ o efeito foi observado a partir da diluição 1,3 mg/L. Ambos os NM testados mostraram-se mais tóxicos que a solução de ZnSO₄ utilizada como controle positivo do ensaio.

A reprodução dos organismos testados foi analisada levando em consideração o número total de filhotes gerados em relação ao número de posturas por cada réplica ao final de 21 dias. Como resultado, conforme indicado na Tabela 4, o NB de ZnO@NH₂ apresentou maior toxicidade dentre as demais soluções testadas, onde os efeitos já foram estatisticamente significativos a partir da diluição de 0,65 mg/L. Foi observado para esse parâmetro uma diminuição significativa do número de posturas para os dois tratamentos com NB, sendo que para a maior diluição testada do NB funcionalizado, o único organismo vivo após os 21 dias não se reproduziu.

Tabela 4- Resultados dos testes de toxicidade crônica expressos em CEO e CENO para os parâmetros longevidade, reprodução e crescimento de *D. magna* expostos aos NB de ZnO (puro e funcionalizado), tendo como controle negativo uma solução de ZnSO₄ (* p<0,05 comparado ao controle do teste).

| Amostra | Concentração (mg/L) | Longevidade sobreviventes (%) | Reprodução (nascidos/prole) | Crescimento (mm) |
|------------------------|---------------------|-------------------------------|-----------------------------|------------------|
| NB de ZnO | Controle | 100 | 8,54 | 4,55 |
| | 0,44 | 70 | 7,21 | 4,02 |
| | 0,65 | 60 | 7,19 | 3,7 |
| | 0,98 | 50* | 6,15* | 3,38* |
| | 1,3 | 40* | 4,95* | 2,55* |
| | 1,95 | 20* | 3,03* | 2,43* |
| CEO (mg/L) | | 0,98 | 0,98 | 0,98 |
| CENO (mg/L) | | 0,65 | 0,65 | 0,65 |
| NB ZnO@NH ₂ | Controle | 90 | 8,02 | 4,22 |
| | 0,44 | 80 | 7,5 | 3,95 |
| | 0,65 | 60 | 5,08* | 3,66* |
| | 0,98 | 50 | 2,04* | 3,00* |
| | 1,3 | 40* | 3,00* | 2,65* |
| | 1,95 | 10* | 0* | 2,3* |
| CEO (mg/L) | | 1,3 | 0,65 | 0,65 |
| CENO (mg/L) | | 0,98 | 0,44 | 0,44 |
| ZnSO ₄ | Controle | 100 | 9,02 | 4,3 |
| | 0,98 | 80 | 7,5* | 3,24* |
| CEO (mg/L) | | - | 0,98 | 0,98 |
| CENO (mg/L) | | > 0,98 | < 0,98 | < 0,98 |

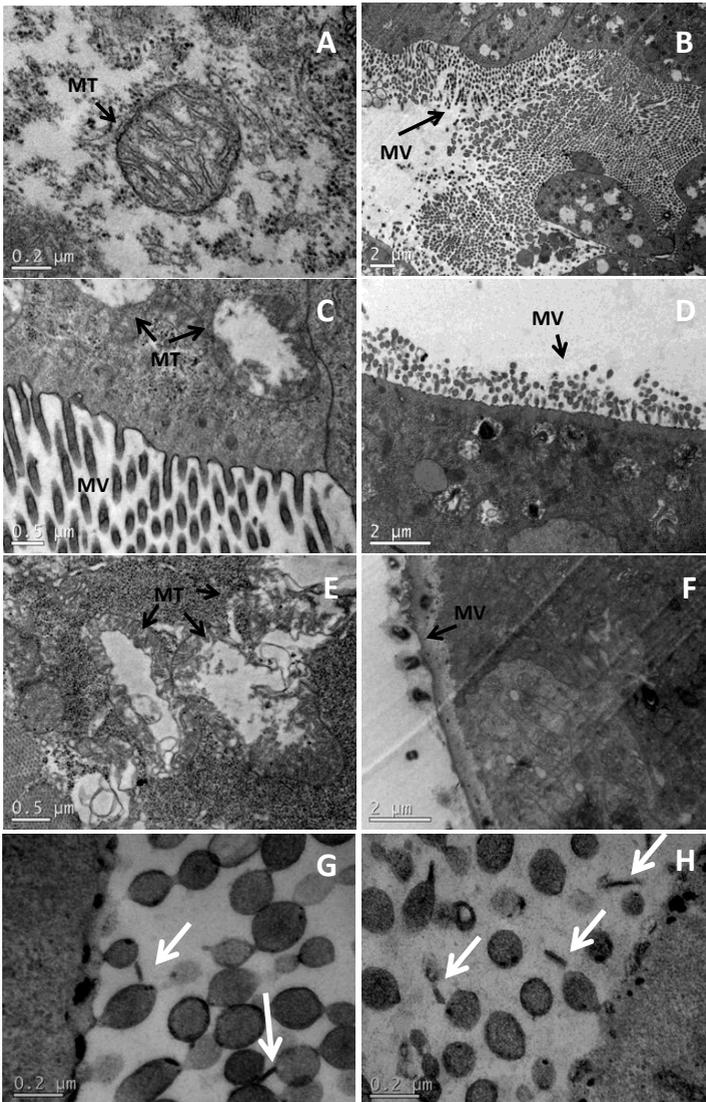
Fonte: A autora.

Ao analisar o parâmetro crescimento dos organismos após 21 dias de exposição foi observada uma redução do comprimento dos organismos nas três soluções testadas. Porém, para o NB de ZnO@NH₂ a CEO foi maior do que para os demais tratamentos, mostrando que a exposição a esse NB foi mais tóxica. Além da ação direta devido a exposição dos organismos aos NB, temos o efeito do NM sobre as microalgas *S. subspicatus*, fornecidas as *D. magna* como alimento a cada troca do meio do ensaio. Além da ação direto do Zn na *D. magna*,

esse efeito no crescimento pode estar associado também à disponibilização de um alimento de má qualidade devido também a sua exposição ao tratamento.

Baseado nos resultados obtidos para os NB estudados, optou-se por analisar através técnicas de imageamento por MET e MEV os organismos expostos à concentração de 0,98 mg/L de NB de ZnO e 1,3 mg/L de NB de ZnO@NH₂, as menores concentrações que indicaram efeito significativo nos três parâmetros analisados para cada NB.

Figura 11 - Micrografias obtidas via MET onde, A e B) referem-se à estruturas dos organismos expostos ao controle negativo do ensaio; C e D) ao NB de ZnO; E e F) ao NB de ZnO@NH₂ e G e H) indicam possível internalização dos NB de ZnO puros nos intestinos das *D. magna*.



Fonte: A autora.

Como indicado na literatura, através das micrografias obtidas foi visível o dano mitocondrial gerado pela exposição dos organismos à soluções de Zn (Figura 11C e 11E) quando comparadas ao controle (Fig 11A e 11B). Foram observadas desorganizações das cristas mitocondriais, inchaços, rupturas das membranas e presença de vazios no interior dessas organelas, indicando perfeito estado de degeneração mitocondrial. As mitocôndrias são estruturas de extrema importância para o metabolismo celular, participando de inúmeros processos bioquímicos da célula. Danos nessas estruturas afetam toda a atividade metabólica da célula. A justificativa mais descrita pelos pesquisadores é que os danos mitocondriais sejam consequência de um estresse oxidativo (PI et al., 2013; POYNTON et al., 2011; ZHU et al., 2008).

Além do dano visível nas mitocôndrias, foi observada a redução das microvilosidades do intestino dos organismos expostos aos tratamentos (Figura 11D e 11F). Os microvilos são projeções da superfície das células intestinais e tem como principal função aumentar a superfície de contato da membrana, aumentando sua área superficial e, conseqüentemente, sua área de absorção. Como possui relação direta com a capacidade de absorção de nutrientes, presume-se que a os danos causados a essas estruturas implicam numa redução na taxa de absorção dos nutrientes.

Dominguez et al. (2015) concluiu em seu estudo que tanto nanoesferas quanto NB de ouro carregados positivamente produzem níveis maiores de estresse oxidativo, observados como geração de ROS no trato gastrointestinal de *D. magna*, quando comparados aos controles e NM carregados negativamente. Os autores ainda indicam que a geração de estresse oxidativo é a principal resposta toxicológica à exposição de partículas carregadas positivamente, o que justificaria o dano no trato intestinal aparentemente maior da exposição ao NB de ZnO@NH₂.

Verificou-se também a possível presença de NB de ZnO puro no trato intestinal, mais precisamente nas microvilosidades (Figura 11

Figura 11G e 11H). O trato gastrointestinal é um dos mais importantes portais de entrada para NP (ELDER; VIDYASAGAR; DELOUISE, 2009) e o aparecimento de NP nessa região já foi relatado na literatura (BACCHETTA et al., 2016; ROSSETTO et al., 2014; SANTO et al., 2014).

Entre os inúmeros NM atualmente produzidos, os metais e óxidos metálicos são considerados os mais perigosos devido à sua capacidade de violação das barreiras epiteliais (ELDER; VIDYASAGAR; DELOUISE, 2009). Segundo a literatura, os NM podem atuar pelo

menos em quatro diferentes maneiras nos organismos: a) por efeito próprio do NM (GRIFFITT et al., 2009); b) por meios de dissolução de NM com a conseqüente liberação de íons (BLINOVA et al., 2010) c) por um efeito combinado de NM e íons liberados, ambos contribuindo para a toxicidade (POYNTON et al., 2011); e d) pelo efeito conhecido como "cavalo de troia"(LIMBACH et al., 2007; PERREAULT et al., 2012).

Entre os fatores reconhecidos nas interações célula-NM, a carga superficial é de grande importância e, portanto, capaz de influenciar o potencial tóxico dos NM. Embora carregado positivamente devido a funcionalização com o grupamento amino, como pôde ser observada no sinal positivo do Pz na Tabela 1, a possível internalização dos NB nos organismos expostos foi evidenciada apenas em organismos expostos ao NB de ZnO puro.

Schleh et al. (2012) observou em seu estudo que partículas carregadas negativamente apresentaram maior acumulação nos organismos de ratos do que as partículas carregadas positivamente. Já Santo et al. (2014) observou efeito contrário, maior internalização das partículas carregadas positivamente no intestino de *D. magna*. O autor firma ainda que a questão é mais complexa pelo fato de que a carga de superfície do NM provavelmente mude *in vivo* como resultado da exposição a gradientes de pH (por exemplo, no trato gastrointestinal) e dos processos de adsorção de proteína.

Nas micrografias obtidas através do MEV (Figura 12) foi possível observar danos nos filamentos das antenas (Figura 12D e 12E) ficando clara a desorganização e redução dessas estruturas quando expostas aos tratamentos. Esses filamentos tem função importante na capacidade natatória dos organismos servindo como “remos” possibilitando a sua locomoção. Também houve redução dos filamentos localizados na base das antenas (Figura 12E e 12H) quando comparados ao controle (Figura 12B).

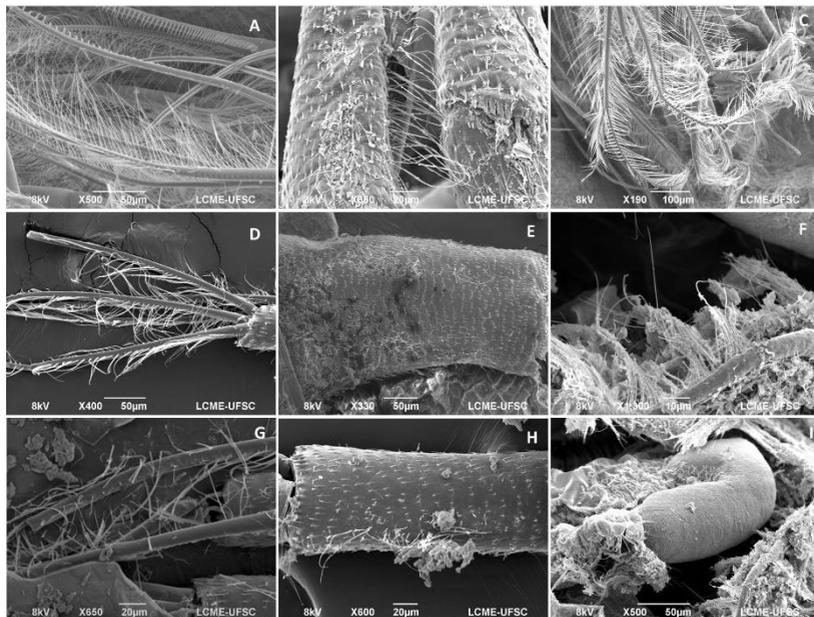
Além dos danos identificados na parte externa dos organismos, foram verificados através de imagens de MEV danos nos cílios internos das *D. magna* expostas aos NB (Figura 12F e 12I). Sendo visível através da FFigura 12I a proximidade desse dano ao intestino do organismo. Esses cílios correspondem as malhas que são responsáveis pelo mecanismo de filtragem das Daphnias.

D. magna são organismos filtradores que se alimentam de pequenas partículas suspensas na coluna de água (SERRA et al., 2018). Os filtros funcionam como peneiras que mantêm suspensos os alimentos maiores que o tamanho da malha dos filtros (GOPHEN; GELLER,

1984). Esses organismos geralmente demonstraram distúrbios na sua atividade de alimentação pelos filtros, quando expostos a condições desfavoráveis (SERRA et al., 2018). Sendo a exposição a altas concentrações de produtos químicos e farmacêuticos (PAN et al., 2017) uma dessas condições desfavoráveis.

No estudo de González-Andrés et al. (2017) foram encontradas NP de óxido de ferro obstruindo o aparelho de filtragem e/ou aderidas ao exoesqueleto, dificultando a natação. Em contrapartida, no presente estudo, através da técnica de análise de raios-x não foi possível identificar o elemento Zn nos organismos, ou devido a inexistência dele nas seções delimitadas para análise, ou devido a sua baixa quantidade de Zn, não permitindo a detecção pelo equipamento, não sendo possível então determinar se o material aparentemente depositado nos aparatos de filtragem são NB de ZnO.

Figura 12- Micrografias obtidas via MEV sendo A, D e G) estruturas do controle negativo do ensaio, B, E e H) estruturas correspondentes a organismos expostos ao NB de ZnO e C, F e I) organismos expostos ao NB de ZnO@NH₂.



Fonte: A autora.

5.2.3 Toxicidade aguda com *A. fischeri*

Tanto o NB puro quanto o funcionalizado apresentaram alta toxicidade para a bactéria marinha *A. fischeri*, resultado este que corrobora com o estudo de Heinlaan et al. (2008) que também relata a alta toxicidade do NP de ZnO para a mesma bactéria.

Tabela 5 - Valores de $CE_{50,15\text{min}}$ obtidos nos testes agudos com *A. fischeri* para soluções em meio NaCl.

| Amostra | pH | $CE_{50,15\text{min}}$ (mg/L) | Zn^{2+} (mg/L) | Taxa de liberação de Zn^{2+} (%) |
|---------------------------|----------------|-------------------------------|------------------|------------------------------------|
| NB de ZnO | $7,2 \pm 0,13$ | $4,66 \pm 0,51$ | $1,43 \pm 0,15$ | 30,69 |
| NB de ZnO@NH ₂ | $7,5 \pm 0,42$ | $7,07 \pm 0,98$ | $1,19 \pm 0,01$ | 16,83 |
| ZnSO ₄ | $7,4 \pm 0,23$ | $3,04 \pm 0,85$ | $1,53 \pm 0,08$ | 50,33 |

Fonte: A autora.

De modo geral, a diminuição da bioluminescência do organismo testado reflete a inibição da atividade metabólica bacteriana devido a exposição aos tratamentos.

Segundo a literatura, o mecanismo antibacteriano propostos para NP de ZnO é a liberação de íons de zinco no meio (HEINLAAN et al., 2008a; LI; ZHU; LIN, 2011; STOIMENOV et al., 2002). A liberação de Zn^{+2} tem efeito significativo na inibição do transporte ativo bem como no metabolismo de aminoácidos e sistema enzimático (SIRELKHATIM; MAHMUD; SEENI, 2015).

Diferente a outras quantificações iônicas realizadas nesse estudo, o NB de ZnO@NH₂ apresentou menor taxa de liberação de íons no meio do ensaio. Consequentemente, apresentou a menor toxicidade quando comparado ao controle negativo e ao NB de ZnO. Corroborando com os estudos citados anteriormente, acredita-se que o efeito bactericida do Zn está associado diretamente a quantidade de íons dissolvidos no meio, uma vez que a solução de ZnSO₄ apresentou maior liberação de íons e maior toxicidade.

Li, Zhu e Lin (2011) também verificaram a ação tóxica de NP de ZnO em diferentes meios e como a maioria da literatura indica, afirmaram que a ação tóxica está ligada a liberação de íons de Zn. Eles ainda verificaram que devido a alta complexidade do meio NaCl, ocorria uma alta aglomeração das partículas quando comparado ao diluente água ultrapura. Essa grande aglomeração resultava numa condição

desfavorável para a interação NP e célula bacteriana, o que justificaria a ação tóxica do Zn devido apenas a liberação de íons.

O aumento do diâmetro hidrodinâmico e a diminuição da estabilidade dos NM no meio NaCl encontrado nesta pesquisa, podem indicar que fato semelhante ao relatado por Li, Zhu e Lin (2011) ocorreu. Deste modo, a alta complexidade do meio que resultou no aumento do diâmetro hidrodinâmico e diminuição da estabilidade favoreceu a aglomeração das partículas e conseqüentemente, desfavoreceu a interação do NM com a bactéria.

Nos seus estudos Pasquet et al. (2014) descobriram que a liberação de Zn^{+2} é afetada por dois principais parâmetros: (a) as propriedades físico-químicas das partículas incluindo porosidade, concentração, tamanho de partícula e morfologia, e (b) A química dos meios, incluindo parâmetros como pH, radiação UV, tempo de exposição e existência de outros elementos.

Dessa forma, as mudanças na superfície do NB de ZnO devido a sua funcionalização com a molécula APTMS foram as responsáveis pela redução da taxa de liberação de íons devido interações com o meio salino. Leung et al. (2012) avaliaram o efeito das modificações superficiais de NP de ZnO sobre a sua atividade antibacteriana utilizando as moléculas dodecil triclorosilano (DDTCS), APTMS e 3-(metacrilóiloxi) propiltrimetoxisilano (MPS) como revestimentos. Ao avaliarem a liberação de íons Zn^{+2} constataram que a funcionalização com a molécula APTMS resultou numa menor taxa de liberação quando comparados as demais NP estudadas. Seguindo a ordem $ZnO@DDTCS > ZnO@MPS > ZnO > ZnO@APTMS$. Além disso, os autores verificaram que a NP de ZnO apresentou maior produção de ROS, seguida pela NP de ZnO@APTMS, ZnO@MPS e ZnO@ DDTCS. Analisando esses dois parâmetros, a NP de Zn apresentou-se mais tóxica que a NP de ZnO@APTMS, corroborando com os resultados obtidos nesse estudo.

Bellanger et al. (2015) verificaram a diminuição da liberação de íons Zn^{+2} de NP de ZnO@APTMS quando comparadas ao controle negativo ZnCl. Os autores justificam esse resultado com uma possível estabilização da dissolução desses íons devido a uma interação NP e bactéria. Indicando que esta estabilidade estaria ligada a algum componente estrutural da bactéria.

Embora alguns autores indiquem que o efeito bactericida das NP de ZnO é devido unicamente aos íons de Zn (WANG et al., 2016), outros autores indicaram a internalização das NP devido à ruptura das membranas causadas pela exposição aos tratamentos. Sirelkhatim et al,

(2015) propuseram dois mecanismos de ação bactericida: a) toxicidade do zinco a membrana celular pela adesão de partículas de ZnO e b) toxicidade devido a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ânions superóxido (O_2^-), e radicais hidroxila (OH) ocasionando estresse oxidativo.

A toxicidade relativa à produção de ROS devido a sua internalização na membrana celular da bactéria tem como resultado a destruição de lipídios, DNA e proteínas (SIRELKHATIM; MAHMUD; SEENI, 2015).

5.2.4 Fitotoxicidade com *L. sativa*

Os resultados referentes à taxa de germinação podem ser observados na

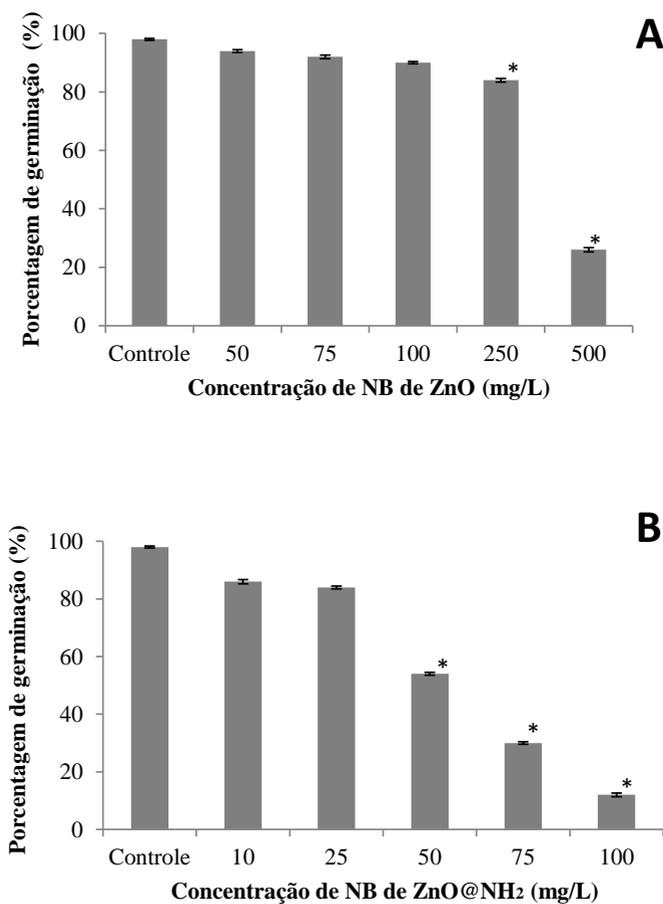
Figura 13, a seguir. O controle negativo do ensaio, a solução de $ZnSO_4$, não apresentou toxicidade para o parâmetro germinação, ou seja, todos os organismos expostos as concentrações do ensaio germinaram.

Avaliando os resultados encontrados podemos verificar que o NB de $ZnO@NH_2$ apresentou maior toxicidade que o NB de ZnO, uma vez que, em concentrações mais baixas ele possui um percentual de inibição de germinação maior.

O aumento da concentração a qual estavam expostas as sementes de *L. sativa* resultou na diminuição do porcentual germinativo ou, quando germinavam, as sementes apresentavam evidente grau de retardo de crescimento e/ou atrofia radicular (Figura 14), para ambos os tratamentos em altas concentrações.

O resultado encontrado corrobora com diversos trabalhos encontrados na literatura. Lin e Xing (2007), por exemplo, analisaram a fitotoxicidade de cinco tipos de NM (nanotubos de carbono, NP de alumínio, óxido de alumínio, zinco e óxido de zinco) para seis espécies de plantas. Em resumo, verificaram que apenas as partículas de Zn e ZnO apresentaram inibição significativa da germinação de sementes. Esse resultado foi também semelhante ao encontrado por Lin e Xing (2008) que nos seus estudos, compararam a toxicidade entre NP de ZnO e íon de Zn^{+2} em sementes de *Lolium perenne*, uma erva da família das gramíneas, nativa da Europa e da Ásia.

Figura 13 - Porcentagem de germinação de sementes de *L. sativa* expostas a diferentes concentrações de (A) NB de ZnO e (B) NB de ZnO@NH₂ - (média ± desvio padrão, n=6, * p<0,05 comparado ao controle do teste).



Fonte: A autora.

Figura 14- Comparação entre o crescimento das radículas do controle e de um dos tratados evidenciando a atrofia radicular encontrada em organismos expostos nas duas concentrações.



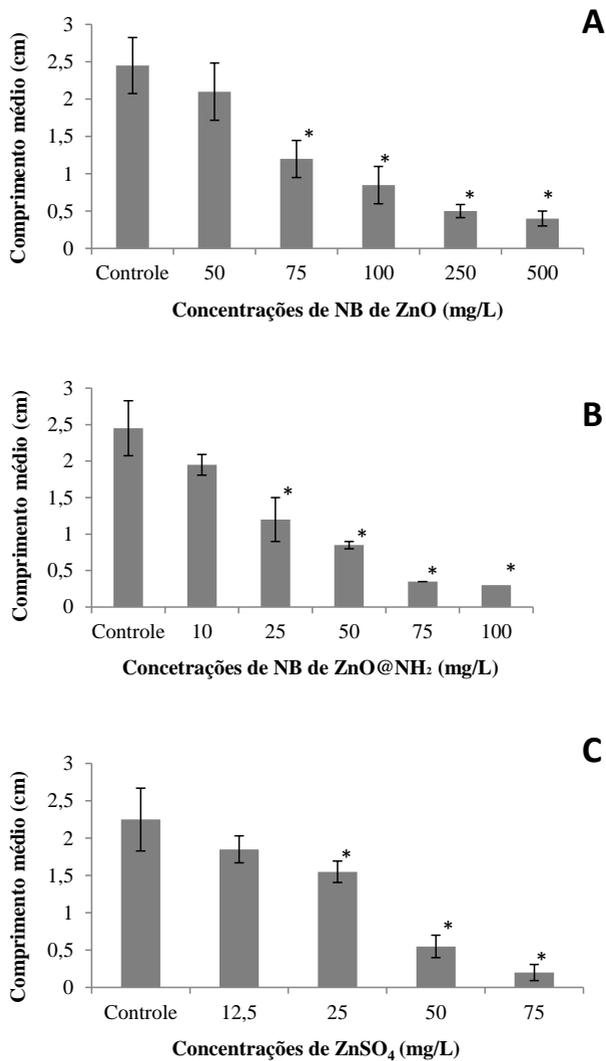
Fonte: A autora.

Além do efeito germinativo, já ilustrado nas imagens apresentadas anteriormente, o desenvolvimento e o crescimento das raízes também foram afetados pela exposição aos três tratamentos testados, como é possível ver na Figura 15.

Igualmente ao resultado obtido na análise germinativa, o NB de ZnO@NH_2 mostrou-se mais tóxico quando comparado ao NB de ZnO e ao controle negativo no parâmetro comprimento médio das radículas.

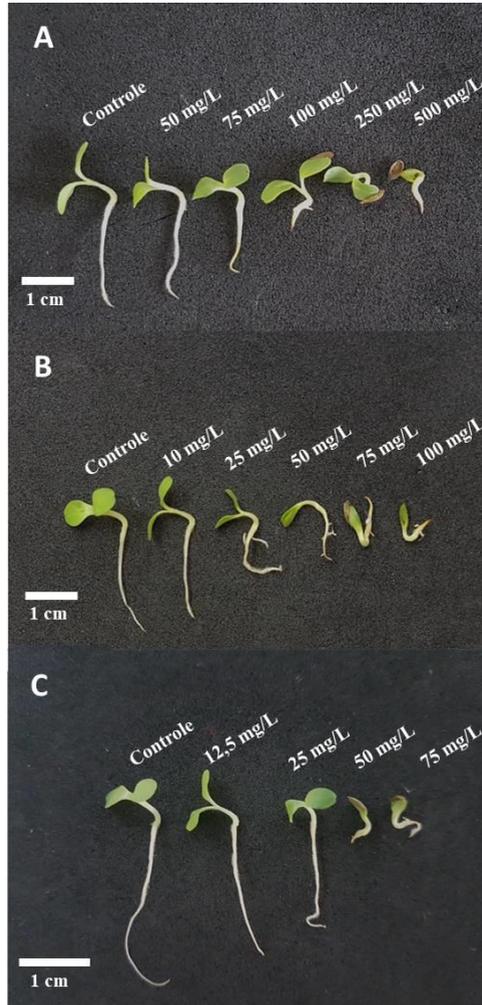
Os resultados numéricos obtidos expostos nas Figura 15, ficam mais evidentes na Figura 16 a seguir, onde é possível observar o encurtamento das radículas dos organismos a medida que a concentração do NM aumenta. Este comportamento pode ser observado tanto para a NB funcionalizada quanto para a NB pura e para a solução de ZnSO_4 . A exposição dos organismos ao NB funcionalizado (Fig 16B) apresentaram maior atrofia radicular quando comparados aos organismos expostos ao NB puro (Fig 16A).

Figura 15- Comprimento médio das radículas após 7 dias de exposição das sementes a diferentes concentrações de (A) NB de ZnO, (B) NB de ZnO@NH₂ e (C) ZnSO₄ (média ± desvio padrão, n=6, * p<0,05 comparado ao controle do teste).



Fonte: A autora.

Figura 16- Comparação entre o crescimento e o desenvolvimento das radículas A) do controle e do NB de ZnO, B) do controle e do NB de ZnO@NH₂ e C) do controle e da solução de ZnSO₄ após 7 dias de exposição.



Fonte: A autora.

Lin e Xing (2007) também verificaram diminuição das radículas em *L. sativa* expostas a uma concentração de 200 mg/L de NP de

ZnO. No estudo, o crescimento das radículas foi praticamente inibido, dando um percentual de inibição de mais de 90% na concentração testada.

Nos testes realizados foram encontrados taxas de inibição semelhantes em 500 mg/L (83%) e 100 mg/L (88%) para NB de ZnO e NB de ZnO@NH₂ respectivamente (Tabela 6). Esses resultados comparados ao de Lin e Xing (2007) demonstram o quanto a NP ZnO é mais tóxica que o NB de ZnO, efeito possivelmente relacionado a sua maior área superficial.

O NB de ZnO@NH₂ apresentou toxicidade semelhante ao controle positivo ZnSO₄, uma vez que a menor concentração que apresentou resultado estatística significativo para a inibição do crescimento radicular foi também de 25 mg/L. Porém, nessa mesma concentração, a taxa de inibição do crescimento radicular para a solução de ZnSO₄ foi de apenas 36,73% enquanto que para o NB funcionalizado foi de 51,02%.

Tabela 6- Quantificação de Zn⁺², taxa de liberação iônica e taxa de inibição de crescimento para as primeiras e últimas concentrações que apresentaram efeito estatístico significativo em pelo menos um dos parâmetros analisados (germinação e crescimento radicular).

| Nanomaterial | Concentração (mg/L) | Zn ²⁺ (mg/L) | Taxa de liberação de Zn ²⁺ (%) | Taxa de inibição de crescimento (%) |
|---------------------------|---------------------|-------------------------|---|-------------------------------------|
| NB de ZnO | 75 | 41,74 ± 0,02 | 55,66 | 51,02 |
| | 500 | 230,00 ± 0,01 | 46,00 | 83,67 |
| NB de ZnO@NH ₂ | 25 | 19,90 ± 0,01 | 79,62 | 51,02 |
| | 100 | 65,08 ± 0,02 | 65,08 | 87,76 |
| ZnSO ₄ | 25 | 12,30 ± 0,24 | 49,20 | 36,73 |

Fonte: A autora.

Ainda conforme a Tabela 6, é possível verificar que o aumento da concentração do NM em solução resultou no aumento da liberação de Zn⁺² e da taxa de inibição de crescimento radicular. Porém, como é possível observar na mesma tabela, a taxa de liberação não é dose dependente quando relacionada a concentração, ou seja, o aumento da concentração não resultou no aumento da taxa de liberação de íons. Esse fenômeno evidencia que os resultados toxicológicos encontrados não estão unicamente ligados a concentração de íons de Zn biodisponíveis, ou seja, a liberação de íons não é o único fator de toxicidade atuante. O

princípio da toxicidade excessiva dos íons de zinco nas plantas é baseado no fato de que esses íons "estão competindo" por locais de ligação destinados a outros íons biologicamente ativos nas células (KRÄMER, 2010).

Com base nas interações metálicas entre NM e plantas descritas na literatura, os NM podem causar uma série de efeitos adversos nas plantas tanto a nível fisiológico (como inibição do comprimento da raiz, diminuição da biomassa e atraso no desenvolvimento da planta) quanto a nível celular (interrupção da síntese de clorofila, dano a membrana celular e aberração cromossômica) (MA et al., 2015). Rajput et al. (2018) relatam ainda que NP afetam o desenvolvimento e o rendimento das culturas e acumulam em tecidos vegetais, incluindo partes comestíveis.

Nos seus estudo, Lin e Xing (2008) indicaram que o principal mecanismo de fitotoxicidade de NP de ZnO vem de suas interferências nas propriedades físicas e químicas do crescimento radicular.

A partir das micrografias obtidas no MEV (Figura 17) é possível verificar que a exposição aos dois tipos de tratamento (NB ZnO e NB ZnO@NH₂) resultou na diminuição do tamanho e da quantidade dos pêlos absorventes existentes na zona pilífera, principal zona de absorção de nutrientes e água nas plantas. Essas evidências podem de certa forma, auxiliar na compreensão da diminuição do comprimento radicular encontrado nos testes toxicológicos.

Lin e Xing (2008), Ma et al. (2015), e Zuverna-Mena et al. (2017) também relataram danos morfológicos às raízes nos seus estudos. Lin e Xing (2008) afirmaram ainda que as NP de ZnO foram capazes de se concentrar na rizosfera da espécie *Lolium perenne*, se inserirem nas células radiculares e inibirem o crescimento de mudas de azevém, vegetal exposto as NP de ZnO.

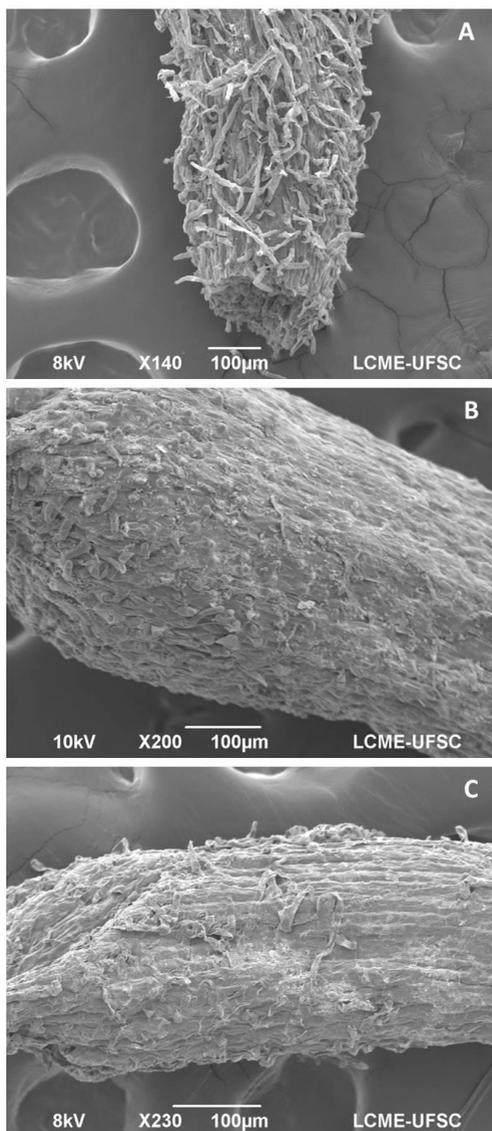
O comportamento das NP de ZnO nas plantas não é inteiramente conhecido na literatura. De acordo com pesquisas analisadas por Arruda et al. (2015), vários mecanismos são sugeridos:

a) Os NM podem se decompor diretamente no solo e produzir íons que podem ser incorporados no sistema da planta;

b) Os NM podem também se decompor no solo e produzir NM menores, que por sua vez podem ser incorporados em tecidos vegetais;

c) Os NM podem penetrar na parede celular e membrana celular de epiderme, córtex de raiz e dando sequência podem entrar no vaso vascular da planta (xilema) e ser distribuído por todo o vegetal.

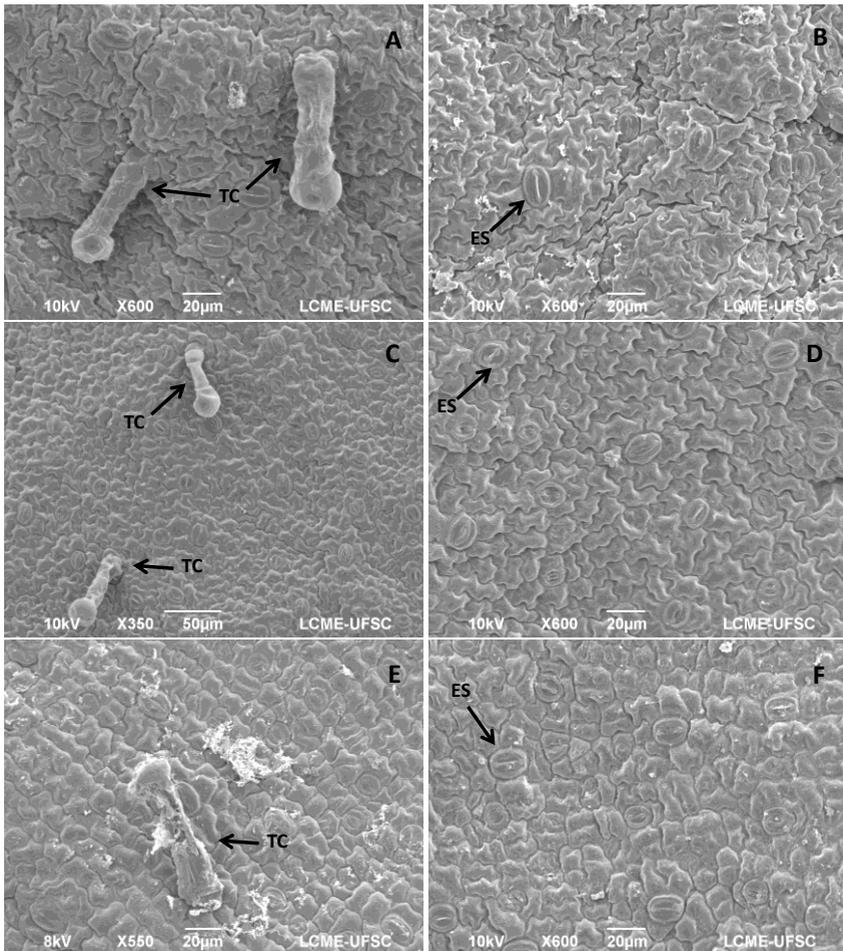
Figura 17 - Micrografias da zona pilífera das radículas do A) controle, B) NB de ZnO (75 mg/L) e C) NB de ZnO@NH₂ (25 mg/L) após 7 dias de exposição.



Fonte: A autora.

Nas micrografias a seguir (Figura 18) é possível observar a diminuição das reentrâncias da folha, danos nos tricomas e aumento na densidade estomática.

Figura 18 - Micrografias das folhas do A) e B) controle, C) e D) NB de ZnO e E) e F) NB de ZnO@NH₂ após 7 dias de exposição evidenciando os danos aos tricomas (TR) e a superfície da folha e o aumento do número de estômatos (ES).



Fonte: A autora.

A topografia da superfície de controle de *L. sativa* apresentou maiores reentrâncias, indicando um aspecto superficial áspero (Figura 18B) quando em comparação com as plantas expostas aos tratamentos (Figura 18D e 18F) cuja superfície parece ter sido influenciado pelo NM resultando numa superfície mais lisa.

Fatores morfológicos, como índice estomático e densidade e comprimento de tricomas, afetam a eficiência das trocas entre atmosfera e vegetal (RAO; DUBEY, 1992). Além disso, Shahid et al. (2017) afirmam que folhas com superfície mais rugosas são capazes de assimilar mais partículas do que folhas com superfícies lisas. Segundo Costa et al. (2001) mudanças na absorção de nutrientes levam a alterações da fisiologia das plantas, dentre outros fatores, à abertura estomática e ao aumento ou diminuição da área foliar, estando esses fatores intimamente ligados com a eficiência fotossintética.

Nas figuras B, C e D é possível verificar o aumento da quantidade de estômatos dos dois tratamentos comparados ao controle do ensaio. Os estômatos são importantes na manutenção do balanço hídrico da planta, bem como para o balanço hídrico dos ecossistemas (NETA; JESUS; MARENCO, 2016). Os estômatos são estruturas vegetais responsáveis pela troca gasosa da planta com o ambiente e devido a sua abertura para a troca gasosa, há perda de água. O aumento da densidade estomática facilita o processo fisiológico da planta, uma vez que estômatos menores e em maior quantidade respondem com maior rapidez as condições adversas. A elevação no número de estômatos na epiderme é regulada primariamente por hormônios vegetais responsáveis pelo crescimento das plantas (FLEXAS et al., 2008). Segundo Fernández e Eichert (2013), as condições de estresse responsáveis pela alteração do funcionamento estomático e dos processos fisiológicos da planta afetarão a taxa de absorção de nutrientes e sua atividade fotossintética.

Os efeitos observados nas folhas de alface podem indicar o transporte do NM ou íons Zn^{+2} através de vasos vasculares. Uma vez que, o xilema é o principal veículo de distribuição e translocação de NP para as folhas (RAJPUT et al., 2018). Quando os NM são aplicados nas superfícies das folhas, eles entram através das aberturas estomáticas ou através das bases dos tricomas e depois translocam-se para vários tecidos (TAYLOR et al., 2013; UZU; SOBANSKA, 2010). Como não houve o contato direto das folhas com as soluções de NB, presume-se que os efeitos observados, sejam oriundos do transporte de NM e/ou de íons metálicos pelos vasos condutores xilema e floema. Zhao et al. (2012) encontraram resultados semelhantes a estes, indicando a presença

de NM de ZnO na epiderme da raiz, no córtex, e na endoderme, de milho cultivados em solo com adição de NP de Zn e ZnO. Além disso, nesse mesmo estudo, foi verificado que os NM foram transportados até os vasos condutores tanto por via simplástica (através das membranas celulares e dos respectivos citoplasmas) quanto via apoplástica (através das paredes de celulose e espaços intercelulares). Após a entrada na endoderme, o NM chega ao cilindro central da planta, tendo acesso aos vasos condutores xilema e ao floema.

Com base nos achados de estudos laboratoriais recentes, os estresses abióticos e oxidativos causados pela exposição de NP nas plantas foram descritos tanto em níveis fisiológicos quanto em níveis bioquímicos (ARRUDA et al., 2015; ASLI; NEUMANN, 2009; BRITT et al., 2012; DHANKHER, 2013; POKHREL; DUBEY, 2013).

Em níveis fisiológicos tem-se as alterações citadas anteriormente tanto nas raízes quanto nas folhas. Em nível bioquímico, muitos autores evidenciam a ocorrência de espécies reativas de oxigênio (ROS) em plantas expostas a NM (BRITT et al., 2012; SHAHID et al., 2017). As ROS são inevitáveis e são os subprodutos naturais de processos aeróbicos que ocorrem em organismos vivos (SHAHID et al., 2017). As plantas são conhecidas por produzir ROS naturalmente em vários órgãos como cloroplastos, mitocôndrias e peroxissomos (SHAHID et al., 2014). O aumento da produção de ROS é geralmente resultado da toxicidade de metais pesados em tecidos vegetais (FLORA, 2011). A exposição da planta a metais pesados causa um desequilíbrio entre a produção de ROS e a eliminação, resultando num estresse oxidativo que pode eventualmente levar a morte celular devido a estresse oxidativo como lipoperoxidação da membrana, danos ao RNA e DNA, inibição de enzimas chave e oxidação de proteínas (FLORA, 2011; SHAHID et al., 2014).

O zinco é um dos micronutrientes essenciais das plantas (LONGNECKER; ROBSON, 1993; NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010). Ele é necessário para a produção de clorofila, função do pólen, fertilização e germinação (CAKMAK, 2007; KAYA; HIGGS, 2002; PANDEY; PATHAK; SHARMA, 2006). Além de desempenhar um papel importante na produção de biomassa vegetal (KAYA; HIGGS, 2002), sua presença é fundamental na proteção e manutenção da estabilidade das membranas celulares sendo necessário para a síntese proteica, funções da membrana, alongamento celular e tolerância a estresses ambientais (CAKMAK, 2000).

Por isso, apesar de muitos estudos apresentarem NP de ZnO como inibidores germinativos e de crescimento, algumas pesquisas não

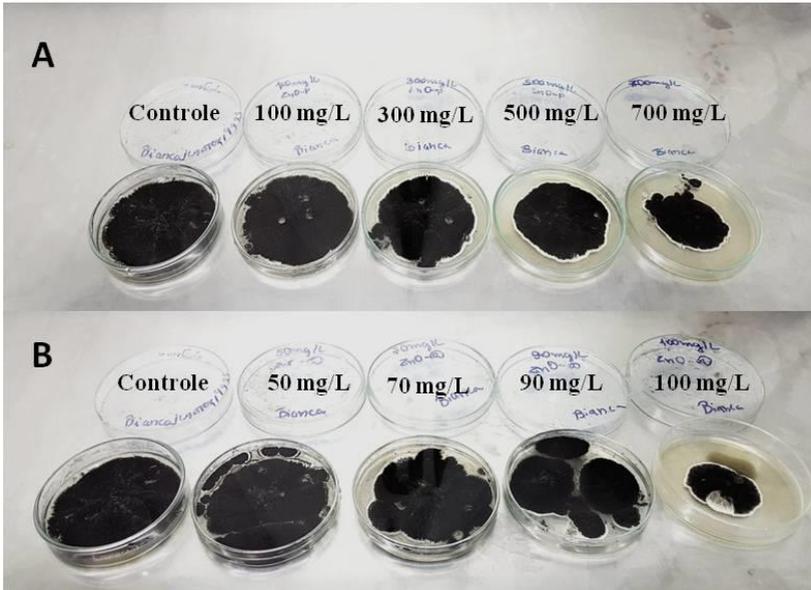
obtiveram os mesmos resultados. Prasad et al., (2012) por exemplo, expuseram amendoim a uma suspensão de 1000 mg/L de NP de ZnO e relataram aumento da germinação e do vigor das mudas. Segundo Longnecker e Robson (1993), a eficiência das etapas de crescimento e desenvolvimento vegetal dependem da quantidade fornecida de zinco e da natureza das espécies de plantas, ou seja, espécies diferentes requerem quantidades diferentes de zinco para seu desenvolvimento.

Com relação à funcionalização, assim como na maioria dos ensaios toxicológicos realizados nesse estudo, os NB de ZnO@NH₂ mostraram-se mais tóxicos que os NB de ZnO. De acordo com a quantificação iônica, verificou-se que os NB funcionalizados liberaram mais íons de Zn em solução. Além disso, Spielman-sun et al. (2017) indicaram em seus estudos que o fator eletrostático é de extrema relevância para a internalização de NM. Os pesquisadores compararam o efeito de absorção de NP de CeO₂ de três formas diferentes, uma como NP de CeO₂ (carga neutra), outra como NP de CeO₂ funcionalizada com grupamento amino (carga positiva) e outra com a NP funcionalizada com grupo carboximetil (carga negativa). Nas análises eles observaram que os NM carregados positivamente, ou seja, os amino funcionalizados se acumularam em maior quantidade a superfície radicular, devido uma interação eletrostática entre a superfície radicular carregada negativamente e as partículas carregadas positivamente. Uma vez que diversos autores reforçam que a parede celular da planta, incluindo células epidérmicas na superfície da raiz, são carregadas negativamente devido à abundância de polissacarídeos (MEYCHIK; YERMAKOV, 2001; WEHR; BLAMEY; MENZIES, 2010).

5.2.5 Efeito antifúngico com *A. niger*

A atividade antifúngica do NB de ZnO foi confirmada através de ensaios de sensibilidade do fungo ao tratamento. A Figura 19A mostra o resultado obtido para a exposição do micélio do fungo *A. niger* a diferentes concentrações de NB de ZnO e a Figura 19B para o NB de ZnO@NH₂.

Figura 19- Ensaios contendo concentrações variadas de A) NB de ZnO e B) NB de ZnO@NH₂ que evidenciam o crescimento micelial do fungo *A. niger*.



Fonte: A autora.

Como é possível verificar nas imagens, a exposição aos dois tratamentos resultou na diminuição do crescimento radial da cultura. Alguns pesquisadores indicam que na presença de metais pode ocorrer a alteração da coloração típica do fungo (EZZOUHRI et al., 2009), porém esse efeito não foi identificado nos ensaios realizados.

Diversos pesquisadores confirmaram a ação fungicida de NM de ZnO (GADD et al., 1986; GONDAL et al., 2012; PALMIERI et al., 2017). He et al. (2011) confirmaram em sua pesquisa que o uso da suspensão de NP ZnO foi efetivo na inibição do crescimento de fungos tanto para *Botrytis cinérea* quanto para *Penicillium expansum*. O crescimento médio de *B. cinérea* foi inibido de 63% a 80% e para *P. expansum* de 61% a 91% quando analisado o diâmetro de crescimento após 12 dias de incubação. Para ambos os fungos foi verificado uma relação dose-resposta do aumento da concentração de NP ZnO e consequente redução percentual de crescimento, ou seja, um aumento da inibição do crescimento.

Sawai e Yoshikawa (2004) reportaram que a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a mínima concentração que causa inibição total do crescimento fúngico, para ZnO de tamanho bulk sobre *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *A. niger*, and *Rhizopus stolonifer* foi de 100 mg/ml.

Vale et al. (2011) avaliaram a toxicidade do Zn na forma $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ (nitrato de zinco hexahidratado) ao fungo *A. niger* e descobriram que o Zn inibiu totalmente o crescimento micelial do fungo na concentração de 500 mg/L.

Os resultados encontrados por Navale, Thripuranthaka e Late (2015) demonstraram que o óxido de zinco pode ser um bom agente antimicótico contra fungos patogênicos, ajudando a evitar a infecção de colheitas de *A. flavus* e *A. fumigatus*. No estudo, os autores verificaram que a partir da concentração de 20 mg/L, as NP de ZnO começaram a provocar atividade inibitória contra fungos patogênicos.

Na tabela 7 estão explicitados os valores de ICM encontrados para cada concentração dos tratamentos.

Tabela 7- Diâmetros após 7 dias de exposição aos tratamentos e respectivos ICM de cada concentração tendo como controle negativo o meio PDA. * $p < 0,05$ comparado ao controle do teste.

| Amostra | Concentração (mg/L) | Diâmetro após 7 dias de exposição (cm) | ICM (%) |
|---------------------------|---------------------|--|----------|
| NB de ZnO | Controle | 7,7 | - |
| | 100 | 7,6 | 1,30 |
| | 300 | 7,3 | 5,19 |
| | 500 | 6,9 | 10,39 |
| | 700 | 5,8 | 24,68 |
| NB de ZnO@NH ₂ | Controle | 7,7 | - |
| | 50 | 7,6 | 1,30 |
| | 70 | 7,5 | 2,60 |
| | 90 | 7,5 | 2,60 |
| | 100 | 5,0 | 35,06 |

Fonte: A autora.

Como é possível verificar na tabela 7, o aumento da concentração de NB adicionado ao meio PDA ocasionou no aumento da toxicidade do meio para o fungo testado, indicando que a ação antifúngica é dose-dependente, corroborando com Yamamoto (2001) que indicou em sua pesquisa que quanto menor o tamanho do ZnO, maior a atividade antimicrobiana dele.

De modo geral, o NB funcionalizado apresentou maior toxicidade que o NB puro uma vez que, em menores concentrações já demonstrou efeito. Em contrapartida, os resultados indicados na tabela 7 e a figura 19, indicam um crescimento irregular do fungo quando exposto ao NB de ZnO@NH₂. Isto pode ser indício de uma possível aglomeração do NM no meio PDA e limitação dos seus efeitos uma vez que o trata-se de um meio sólido.

A pequena redução do crescimento micelial nas concentrações iniciais do ensaio pode indicar que em concentrações mais baixas, ocorre a tolerância do fungo ao metal por consequência do requerimento do Zn como micronutriente essencial ao metabolismo de fungos e também na participação da síntese de enzimas.

O Zn é um importante constituinte das estruturas fúngicas. Ele ajuda a manter a integridade de ribossomos, membranas biológicas e também é requerido para o crescimento de microrganismos. Contudo, em concentrações elevadas, esse metal pode ser inibidor ou tóxico para as atividades celulares e de crescimento, causar inibição da respiração e da germinação dos esporos (BABICH; STOTZKY, 1978).

Zafar, Aqil e Ahmad (2007) verificaram que a variação na tolerância de Zn deve-se a um ou mais tipos de mecanismos de resistência. Alguns mecanismos citados na literatura são: a produção de enzimas, como a redutase (SRIVASTAVA; AHMAD; THAKUR, 2007) e a imobilização de metais por formação de complexo, como os quelatos, bioacumulação ou biossorção, entre outros (AHMAD; ZAFAR; AHMAD, 2005). No presente estudo não foram realizadas análises genéticas e moleculares, uma vez que o objetivo da pesquisa era apenas identificar a ação biocida dos NB de ZnO. Dessa forma, não foi possível determinar o mecanismo de resistência atuante. Vale et al. (2011) afirmaram que fungos de mesma espécie podem apresentar capacidades de resistência e adaptação diferentes quando expostas ao mesmo metal, isso devido à capacidade adaptativa de cada organismo, as diferentes linhagens e organismos isolados de ambientes diferentes.

Nos seus estudos, He et al. (2011) demonstraram através de imagens de MEV efeito nas hifas dos organismos, de modo que essas estruturas apresentaram protuberâncias incomuns na sua superfície

indicando que a exposição ao NM inibiu o crescimento dos fungos *B. cinerea* devido a deformações nas estruturas fúngicas. Para a espécie *P. expansum*, observou-se que os micélios externos foram inibidos e que o desenvolvimento dos conídios, importante estrutura dessa espécie fúngica, foi suprimido.

A interação entre NP ZnO e as células fúngicas podem alterar a morfologia dos organismos (HE et al., 2011; PATRA et al., 2012). Diferentes grupos de pesquisa sugeriram o seguinte mecanismos antimicrobianos: interações eletrostáticas entre ZnO e paredes celulares (BRAYNER et al., 2006; ZHANG et al., 2007); liberação de íons Zn^{2+} (KASEMETS et al., 2009; RAVISHANKAR RAI; JAMUNA BAI, 2011); acumulação de NP de ZnO em células (JONES et al., 2007); e formação de ROS (HWANG et al., 2012; NAVALE; THIRIPURANTHAKA; LATE, 2015; SAWAI; YOSHIKAWA, 2004; XUE et al., 2014).

Hwang et al. (2012) e Xue et al. (2014) afirmam que a formação de ROS é principal causa da atividade antimicrobiana do Zn. No entanto, existe falta de informação sobre os mecanismos moleculares de stress oxidativo induzido por NP subjacente em fungos filamentosos (PALMIERI et al., 2017). Sharma et al. (2010) por sua vez, indicaram que a resistência das NP ao crescimento fúngico é devido à ruptura da membrana celular fúngica, resultando na possível diminuição da atividade enzimática.

Geralmente, a superfície dos fungos é carregada negativamente ao pH biológico devido à disposição dos grupos carboxil e fosfato nas paredes celulares (DUNLAP; BIRESAW; JACKSON, 2005; LEE et al., 2010). Assim, considerando que os NB de ZnO funcionalizados com a molécula APTMS estão carregados positivamente a interação física com células de fungos por adsorção eletrostática direta ocorre com mais força, que pode justificar a maior toxicidade quando comparado ao NB puro.

5.3. TESTES TOXICOLÓGICOS COM ARGAMASSA COM NB INCORPORADO

Nos ensaios realizados por Oscar (2016) verificou-se que parte da toxicidade dos elutriados é atribuída ao pH básico das soluções. Dessa forma, neste trabalho optou-se por ajustar o pH conforme indicado pela norma ou metodologia utilizada para cada ensaio de toxicidade, levando

em conta cada organismo testado. Dessa forma, foram ajustados os pH dos ensaios com os organismos *D. magna* e *A. fisheri*.

Além disso, é importante salientar que as quantidades de NB adicionadas na argamassa foram definidas levando em conta os resultados obtidos no TCC. Como nos ensaios realizados obteve-se resultado significativo para a concentração de 0,5% de NB adicionado a argamassa, optou-se então, neste trabalho, por trabalhar com concentrações menores ou iguais a essa.

Outra importante mudança metodológica deste trabalho é a sonicação dos NB em água de osmose antes de serem incorporados a argamassa, favorecendo assim a sua dispersão no meio líquido e consequentemente favorecendo a dispersão nas amostras sólidas.

5.3.1 Toxicidade Aguda com *D. magna*

Como pode ser visualizado na Tabela 8, os elutriatos das composições de argamassa/NM apresentaram toxicidade reduzida quando comparados aos resultados encontrados com os NB isolados. Logo, a lixiviação das composições resultaria num efluente com menor toxicidade do que a aplicação do NB isolado, por exemplo.

Tabela 8 – Valores de FD obtidos nos testes agudos com *D. magna* para os elutriatos.

| Amostra | pH | FD | Zn ²⁺ (mg/L) |
|--|-----|----|-------------------------|
| Elutriato - Argamassa | 7,0 | 2 | 0,054 ± 0,27 |
| Elutriato - 0,125% NB de ZnO | 7,2 | 7 | 0,062 ± 0,27 |
| Elutriato - 0,25% NB de ZnO | 7,5 | 9 | 0,069 ± 0,33 |
| Elutriato - 0,5% NB de ZnO | 7,0 | 12 | 0,075 ± 0,18 |
| Elutriato - 0,5% NB de ZnO@NH₂ | 7,1 | 24 | 0,096 ± 0,21 |

Fonte: A autora.

Os resultados apresentados na Tabela 8 evidenciam que a toxicidade está diretamente relacionada a quantidade de íons de Zn liberados no meio. Isso por que, o aumento da quantidade de NB adicionado, resultou no aumento da quantidade de íons liberados e no aumento da toxicidade dos elutriatos.

Este resultado difere ao encontrado no TCC que indicavam que o aumento da quantidade de NB incorporado resultava em elutriatos menos tóxicos. Acredita-se que essa mudança nos resultados tenha ocorrido principalmente devido a sonicação dos NB antes de serem incorporados a argamassa. Procedimento este que não foi realizado no

TCC. Com uma dispersão menor, a probabilidade de formação de aglomerados era maior, o que desfavorece a homogeneidade do Zn na amostra sólida e pode justificar os baixos valores de toxicidade encontrados no TCC.

Igualmente ao resultado obtido para os ensaios com os NB isolados, em elutriato o NB de ZnO@NH₂ apresentou maior toxicidade do que os elutriatos da composição argamassa e NB de ZnO. O resultado da quantificação iônica mostra que mesmo incorporado a funcionalização continuou favorecendo a liberação dos íons Zn⁺².

A escolha da concentração de ZnO@NH₂ adicionada a argamassa foi com base nos resultados obtidos no TCC. Na pesquisa obteve-se resultado significativo na concentração de 0,5% de NB de ZnO adicionado a argamassa. Dessa forma, optou-se por trabalhar com essa concentração também para o NB funcionalizado, uma vez que a princípio o revestimento retardaria a ação tóxica num primeiro estágio do NB.

A presença dos íons de Zn²⁺ no elutriato de argamassa pura indica a presença do elemento Zn na composição da massa comercial utilizada nessa pesquisa. O resultado da quantificação é relativo apenas a quantidade de Zn existente na argamassa uma vez que o meio do ensaio do microcrustáceo não possui esse elemento. Mesmo assim, não se pode confirmar que a toxicidade encontrada é relativa a quantidade de íons Zn²⁺ na amostra devido à complexidade da pasta.

5.3.2 Toxicidade aguda com *A. fisheri*

Nos ensaios com os elutriatos verificou-se maior toxicidade na composição de argamassa e NB funcionalizado (Tabela 9). Diferente do que foi observado nos resultados toxicológicos encontrados para os NBs isolados.

Tabela 9- Valores de FD obtidos nos testes agudos com *A. fisheri* para os elutriatos com a exposição da bactéria por 15 min aos tratamentos.

| Amostra | pH | FD | Zn ²⁺ (mg/L) |
|--|-----|----|-------------------------|
| Elutriato - Argamassa | 6,9 | 5 | 0,102 ± 0,27 |
| Elutriato - 0,125% NB de ZnO | 6,9 | 7 | 0,121 ± 0,27 |
| Elutriato - 0,25% NB de ZnO | 7,1 | 12 | 0,138 ± 0,33 |
| Elutriato - 0,5% NB de ZnO | 7,0 | 16 | 0,141 ± 0,18 |
| Elutriato - 0,5% NB de ZnO@NH₂ | 6,9 | 32 | 0,214 ± 0,21 |

Fonte: A autora.

Igualmente ao que ocorreu com os ensaios com o microcrustáceo *D. magna*, os resultados toxicológicos dos ensaios com *A. fischeri* diferem dos encontrados no TCC. Acredita-se que os valores mais baixos encontrados nesse trabalho sejam resultado da sonicação da amostra, favorecendo a dispersão do material no meio do ensaio.

Na literatura é descrito uma menor solubilidade do Zn em condições alcalinas (CAKMAK, 2007), porém Leitner et al., (2018) afirmou (relatou) em sua pesquisa que tanto em soluções ácidas e fortemente alcalinas ou na presença de íons complexantes (NH_4^+ , Cl^- , SO_4^{2-}), a solubilidade de ZnO aumenta dramaticamente.

Presume-se então que o meio básico formado pela lixiviação das amostras sólidas juntamente com a grande quantidade de íons Cl^- tenha favorecido a solubilidade do NM, possivelmente ocasionado a liberação do Zn^{2+} da amostra funcionalizada.

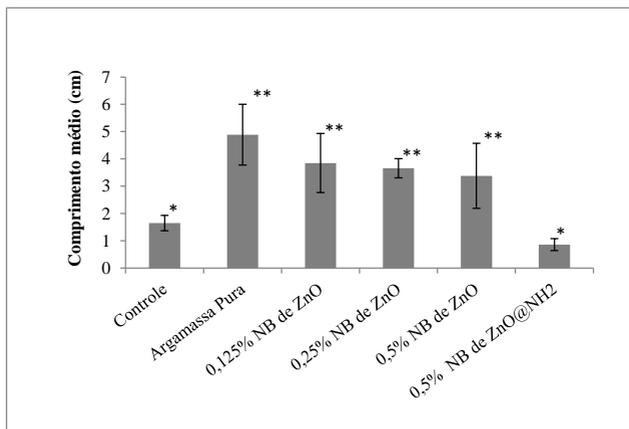
5.3.3 Fitotoxicidade com *L. sativa*

Os resultados obtidos com o ensaio de fitotoxicidade com *L. sativa* para elutriatos indicaram a redução da toxicidade quando comparado aos ensaios com soluções de NBs isolados para a mesma espécie.

Não foram observados efeitos na germinação, uma vez que todos os organismos expostos germinaram. Independente da concentração de NB de ZnO adicionado a argamassa.

Foi observado um aumento significativo do comprimento radicular dos organismos expostos aos elutriatos com adição de NB de ZnO (Figura 20). Seja comparando-os ao controle do ensaio ou aos resultados obtidos no teste de fitotoxicidade com a solução do mesmo NB. Para o elutriato com NB de ZnO@NH₂ obtivemos um aumento do comprimento radicular quando comparados ao ensaio com soluções de NB de ZnO@NH₂, porém uma diminuição do comprimento quando comparado aos elutriatos de argamassa pura e argamassa com adição de NB de ZnO. A composição com o NB funcionalizado mostrou-se estatisticamente semelhante ao controle negativo deste ensaio.

Figura 20- Comprimento médio das radículas após 7 dias de exposição das sementes a diferentes concentrações de NM adicionado a argamassa (média \pm desvio padrão, n=2, quantidade de asterisco indicam grupos estatisticamente semelhantes entre si para $p < 0,05$).

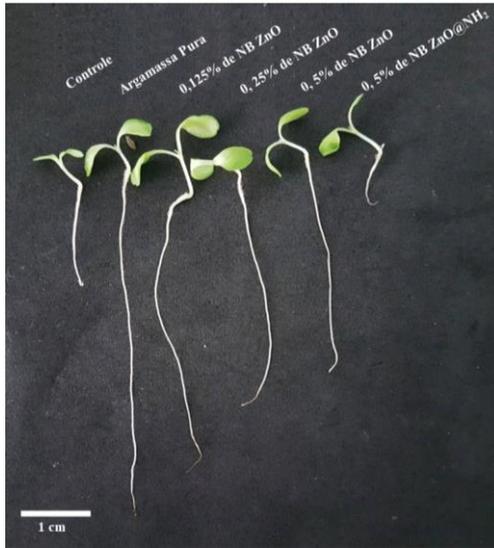


Fonte: A autora.

A diferença de comprimento das radículas fica evidente quando observada a Figura 21. Igualmente a maioria dos ensaios realizados nesse estudo, a solução contendo NB de ZnO@NH₂ apresentou maior toxicidade ao organismo-teste quando comparado aos elutriatos de argamassa pura e argamassa com NB de ZnO. E esses efeitos toxicológicos foram observados no crescimento e no desenvolvimento das radículas.

Os resultados obtidos evidenciam que as propriedades do substrato que a planta é cultivada influenciam na fitotoxicidade do NB. Fang et al. (2009) mostraram que a taxa de agregação de nanopartículas de dióxido de titânio em suspensões de solo estava negativamente correlacionada com as características do solo, como o conteúdo de argila e matéria orgânica dissolvida, e positivamente correlacionada com a força iônica, o potencial zeta e o pH.

Figura 21 - Comparação entre o crescimento e o desenvolvimento das radículas aos elutriatos de diferentes quantidades de NB adicionado a argamassa após 7 dias de exposição.



Fonte: A autora.

Uma importante característica dos produtos cimentícios é o seu pH extremamente alcalino resultando da formação de hidróxidos de cálcio como um subproduto da hidratação do cimento. Essa característica se manteve para a fração líquida extraída das amostras sólidas (Tabela 10). Fazendo com que as sementes de *L. sativa* fossem expostas, independente da concentração de NB adicionado, a soluções alcalinas.

Como é possível verificar na Tabela 10, a taxa de liberação de íons Zn^{+2} foi baixa, quando comparado ao total de NM adicionado as amostras sólidas com NB de ZnO. Em contrapartida, os elutriatos de amostras sólidas com NB de ZnO@NH₂ solubilizaram mais íons de zinco indicando que a funcionalização favoreceu a solubilidade do NB. Unrine et. al (2008) afirmaram que as alterações da carga de superfície podem diminuir ou aumentar a afinidade de partícula para as membranas celulares e, assim, reduzir ou aumentar a sua biodisponibilidade para sorção por plantas e organismos.

Tabela 10- Quantificação de Zn^{2+} , taxa de liberação iônica e taxa de inibição de crescimento para os elutriatos testados.

| Amostra | pH | Zn^{2+} (mg/L) | Taxa de inibição de crescimento (%) |
|--|------|-------------------|-------------------------------------|
| Controle | 7,2 | - | - |
| Elutriato - Argamassa Pura | 11,6 | $0,023 \pm 0,01$ | -196,36 |
| Elutriato - 0,125% NB de ZnO | 11,4 | $0,077 \pm 0,023$ | -133,33 |
| Elutriato - 0,25% NB de ZnO | 10,2 | $0,080 \pm 0,054$ | -121,82 |
| Elutriato - 0,5% NB de ZnO | 9,8 | $0,082 \pm 0,019$ | -104,85 |
| Elutriato - 0,5% NB de ZnO@NH ₂ | 10,4 | $0,101 \pm 0,021$ | 47,88 |

Fonte: A autora.

Watson et al. (2014) compararam os efeitos fitotóxicos a mudas de trigo *Triticum aestivum*, expostas a NP de ZnO em dois solos agrícolas com diferentes pH. Como resultados eles verificaram que, embora a solubilidade das NP de Zn tenha sido menor no meio alcalino do que no solo ácido, uma maior absorção de Zn nos brotos de trigo ocorreu no solo básico. Além disso, apesar dos valores encontrados para crescimento radicular e aéreo da planta não terem sido significativos, em solo alcalino foi observado o crescimento dessas duas partes vegetais quando comparadas ao controle. Ao contrário dos resultados em solos ácidos que indicaram redução tanto da parte aérea quanto da parte radicular. É importante salientar que os controles negativos para o ensaio eram os solos (ácido e alcalino) sem a adição de NM.

Corroborando com os resultados obtidos nesse trabalho, Cakmak (2007) indicou em sua pesquisa que elevado pH e alta quantidade de $CaCO_3$ (importante constituinte do calcário existente no cimento) são fatores que reduzem a solubilidade e a mobilidade no Zn.

O aumento das raízes quando comparadas ao controle negativo possivelmente deve estar associado aos componentes existentes na argamassa testada. Como a sua composição não é minuciosamente descrita pelo fornecedor, não se sabe ao certo quais componentes poderiam favorecer o desenvolvimento das plantas.

Sabe-se que a argamassa consiste numa mistura entre areia, água, cimento e aditivos. Os componentes principais do cimento são: cal (CaO), sílica (SiO_2), alumina (Al_2O_3), óxido de ferro (Fe_2O_3), óxido de magnésio (MgO), álcalis (Na_2O e K_2O) e sulfatos (SO_3). Mesmo não se tratando de uma descrição minuciosa da composição da argamassa, é possível identificar elementos essenciais para o crescimento e

desenvolvimento vegetal como o potássio, ferro, magnésio e cálcio. Dessa forma, presume-se que o aumento das radículas das sementes expostas aos elutriatos, quando comparadas ao controle negativo, foi devido a maior disponibilidade desses nutrientes.

A quantificação iônica indicou presença de íons de Zn no elutriato da argamassa pura, indicando que nesse material já existia certa quantidade de Zn na sua composição. O aumento da concentração de Zn devido a inserção do nanomaterial na argamassa resultou no aumento da quantidade de Zn^{+2} biodisponível e numa diminuição do crescimento das raízes das plantas.

Sabe-se que a nutrição das plantas é, em parte, regida pela biodisponibilidade de minerais e água do solo. A fitotoxicidade geralmente aparece quando as quantidades de Zn são elevadas.

Nesse estudo, o aumento da concentração de Zn através da inserção do NM resultou no aumento da quantidade de Zn^{+2} biodisponível e na redução das raízes das plantas. O sinal negativo presente na Tabela 10 indica que não houve redução das radículas quando comparadas ao controle, indicando uma taxa de inibição de crescimento apenas para o elutriato da composição com $ZnO@NH_2$.

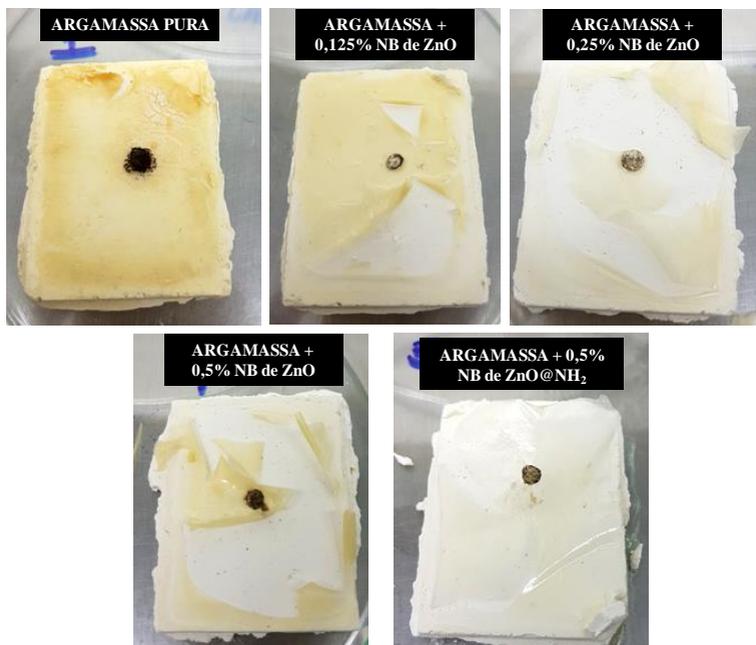
5.3.4 Efeito antifúngico com *A. niger*

A atividade antifúngica das composições de argamassa com NB pode ser visualizada na Figura 22 a seguir.

Na imagem é possível observar o crescimento radial dos micélios dos fungos expostos apenas a argamassa pura, indicando assim que a inserção do NB na argamassa pode garantir a ela propriedades fungicidas. Em contrapartida, não se pode afirmar que o não desenvolvimento dos fungos tenha relação direta com a inserção do NB de ZnO, uma vez que o pH elevado tenha propriedades fungicidas por si só também.

Outra questão a ser levantada é o fato da camada do meio PDA ter aparentemente desidratado e descolado da amostra sólida, o que pode indicar que o fungo pode não ter crescido não necessariamente devido ao pH básico ou pela presença de NB de ZnO, mas sim devido a inexistência do meio de cultivo.

Figura 22- atividade antifúngica das composições de argamassa com NB.



Fonte: A autora.

A presença de cal nas argamassas é responsável pelo aumento na demanda de água. A água adicional, que não é consumida na hidratação do cimento, permanece livre no sistema e, ao evaporar, dá origem a porosidade elevada da argamassa endurecida (QUARCIONI et al., 2009). Se o esporo do fungo for maior que o tamanho dos poros da argamassa, a maioria dos esporos é esmagada devido ao encolhimento de poros durante o processo de hidratação, levando a perda de viabilidade e diminuição da capacidade de formação de minerais pelos fungos (LUO et al., 2018).

Assim, os blocos de argamassa utilizados nesse estudo podem não ter tido o tempo de cura necessária para a sua estabilização, o que inviabilizou o crescimento do fungo na sua superfície. Devido ao tempo de cura insuficiente dos blocos de argamassa, a mesma absorveu a água presente no meio PDA, desidratando-o e causando o aspecto ressecado do meio conforme Figura 22.

Além disso, no preparo das amostras sólidas verificou-se que a presença do NB reduzia a trabalhabilidade da pasta de argamassa

dificultando o manuseio e a aplicação nos moldes. Acredita-se que a inserção de compostos com características diferentes da argamassa pura altera a quantidade de água requerida. Uma vez que, colocando a quantidade de água necessária para a massa total tínhamos uma argamassa visivelmente desagregada levando-a ao esfarelamento. Ao aumentar a quantidade de água a situação era contornada, dando mais fluidez a pasta.

Há relatos na literatura que mostram que os fungicidas têm sua eficiência melhorada quando associados com substâncias alcalinas (COATES; PUBLIC; AVENUE, 1979). Isso por que, os compostos alcalinos são capazes de dissolver a parte externa dos esporos, que é a principal barreira de proteção para os fungicidas convencionais (BLOOMFIELD; ARTHUR, 1994).

Stoimenov et al. (2002) analisaram em seus estudos a eficiência antimicrobiana de NP de MgO associadas a halogênios como cloro e bromo. Como resultado os pesquisadores apresentaram uma excelente atividade antibacteriana dessa associação contra *E. coli*, *Bacillus megaterium* e *Bacillus subtilis* e afirmaram que essa atividade seria melhorada com a criação de um ambiente alcalino oriundo da associação dos grupos halogenados a água ou a outra suspensão aquosa.

Luo et al. (2018) verificou em sua pesquisa que ao expor espécies de fungos a amostras sólidas de concreto o pH do meio aumentou drasticamente, de 6,5 para 13, devido à dissolução de Ca(OH)_2 do concreto. O ensaio realizado pelos autores, base metodológica para os estudos antifúngicos desse trabalho, consistiu na exposição de discos de micélios de fungos à blocos de concreto com meio de cultivo vertido em sua superfície. As análises microscópicas realizadas pelos pesquisadores demonstraram crescimento micelial de fungos *Trichoderma reesei*. Através de outras técnicas de caracterização, eles verificaram a presença de cristais de Ca(OH)_2 nas hifas dos fungos. Indicando esse composto como sendo o principal agente toxicológico contra os organismos.

Embora tenha sido observada uma tendência antifúngica, esse teste não foi suficiente para verificar o potencial tóxico do NB agregado a argamassa. Mais investigações e novas adaptações precisam ser desenvolvidas para comprovar a eficiência fungicida do material.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição de argamassa com NB apresentou resultados significativos na menor concentração testada, 0,125% de NB de ZnO, uma vez que apresentou toxicidade mais próxima ao elutriado de argamassa pura para os organismos testados, e não demonstrou atividade fúngica nos blocos de argamassa. Esse resultado é de grande valia se pensarmos numa produção em larga escala. A menor quantidade de material a ser adicionado na pasta resulta num menor custo de produção e/ou compra do material.

Nos ensaios realizados verificou-se um comportamento semelhante ao encontrado no TCC onde o NB funcionalizado apresentou maior toxicidade aos organismos testados. Tanto isoladamente quanto incorporados a argamassa. A funcionalização potencializou os efeitos tóxicos, num primeiro estágio.

Foi verificada a diminuição da toxicidade dos NB quando comparados aos resultados toxicológicos com NP existentes na literatura. Isso devido principalmente à diminuição da área superficial ocasionada pela morfologia das partículas. O NB de ZnO possui propriedades antifúngicas, mas esse potencial é reduzido quando comprado as partículas esféricas, exigindo concentrações maiores para a obtenção de atividade antifúngica significativa.

6.1. RECOMENDAÇÕES

Sugere-se que novos estudos sejam realizados com uma menor quantidade de NB de ZnO incorporado a argamassa. Além disso, deve-se levar em conta as alterações nas propriedades físicas e mecânicas dessa incorporação. No presente trabalho verificou-se a perda da trabalhabilidade da argamassa. Deixando clara a necessidade da utilização de superplastificantes para garantir a fluidez da massa. Outra questão que deve ser levada em conta nos próximos estudos é a observação da quantidade requerida de água pelos blocos. Sugere-se a utilização de blocos de argamassa com no mínimo 28 dias de cura para evitar que a inviabilização do crescimento do fungo seja relativo a hidratação da cal.

Além disso, sugere-se a utilização de um único equipamento de sensibilidade adequada, para a quantificação da liberação de íons e deve-se levar em conta a relação estequiométrica na interpretação dos resultados, verificando se a quantidade liberada de íons é quimicamente coerente com a quantidade do elemento químico na solução.

7. CONCLUSÕES

Com os resultados encontrados nessa pesquisa conclui-se que:

- As amostras de NB de ZnO e NB de ZnO@NH₂ apresentaram alta toxicidade aos organismos expostos;
- A solução de NB de ZnO@NH₂ apresentou maior toxicidade para os organismos *D. magna*, *L. sativa* e *A. niger*;
- A complexidade do meio afeta diretamente a toxicidade do NB, seja pela liberação de íons ou pelas mudanças nas suas características (Pz, DH);
- A solução de NB de ZnO apresentou maior toxicidade para a bactéria marinha *A. fischeri*;
- A liberação de íons Zn²⁺ mostrou relação direta com a toxicidade para *A. fischeri*. Enquanto que para *D. magna* e *L. sativa*, houve maior relação com a área superficial e o diâmetro hidrodinâmico;
- A funcionalização com a molécula APTMS apresentou-se como um intensificador do potencial toxicológico do NB de ZnO no meio ISO (*D. magna*) e água destilada (*L. sativa*);
- Os danos estruturais observados nas análises de MET e MEV demonstram um padrão de alterações morfológicas e bioquímicas devido a exposição desses organismos aos NB de ZnO;
- Os NB de ZnO apresentam ação antifúngica;
- A incorporação de NB de ZnO a argamassa não permitiu o crescimento e o desenvolvimento de micélios de fungos *A. niger*.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ABNT, A. B. DE N. **NBR 14941 - Resistencia ao crescimento de fungos em tintas (1).pdf**, 2011.

ABNT, A. B. DE N. **NBR 15469 - Ecotoxicologia Aquática – Preservação e preparo de amostra**, 2007.

AHMAD, I.; ZAFAR, S.; AHMAD, F. **Heavy Metal Biosorption potential of Aspergillus and Rhizopus sp . isolated from Wastewater treated soil**. v. 2005, n. 2001, 2005.

ALLSOPP, D. **Introduction to Biodeterioration**. Cambridge University Press, United Kingdom. 2004.

APHA, A. P. H. A. **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater Part 1000 Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 1999.

ARRUDA, S. C. C. et al. **Nanoparticles applied to plant science : A review**. v. 131, p. 693–705, 2015.

ASLI, S.; NEUMANN, P. M. **Colloidal suspensions of clay or titanium dioxide nanoparticles can inhibit leaf growth and transpiration via physical effects on root water transport**. p. 577–584, 2009.

BABICH, H.; STOTZKY, G. **Toxicity of Zinc to Fungi , Bacteria , and Coliphages : Influence of Chloride Ions**. v. 36, n. 6, p. 906–914, 1978.

BABITHA, K. B. et al. **Microwave assisted aqueous synthesis of organosilane treated mesoporous Si@ZnO nano architectures as dual-functional, photocatalysts**. Journal of Environmental Chemical Engineering, v. 3, n. 2, p. 1337–1345, 2015.

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, 2016.

BAI, W. et al. **Toxicity of zinc oxide nanoparticles to zebrafish embryo: A physicochemical study of toxicity mechanism**. Journal of

Nanoparticle Research, v. 12, n. 5, p. 1645–1654, 2010.

BAKER, S. E. **Aspergillus niger genomics: past, present and into the future.** Medical mycology, v. 44 Suppl 1, n. September, p. S17-21, 2006.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review \$. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BELLANGER, X. et al. **Stability and toxicity of ZnO quantum dots : Interplay between nanoparticles and bacteria.** Journal of Hazardous Materials, v. 283, p. 110–116, 2015.

BERG, J. M. et al. **The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations.** Nanotoxicology, v. 3, n. NOVEMBER, p. 276–283, 2009.

BIRGISSON, B. et al. **Nanotechnology in Concrete Materials.** Transportation Research Circular E-C170, Washington, EUA, 2012.

BITTNAR, Z. et al. **Nanotechnology in Construction 3.** Proceedings of the NICOM3, 2009.

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

BLOOMFIELD, S. F.; ARTHUR, M. **Mechanisms of inactivation and resistance of spores to chemical biocides.** p. 91–104, 1994.

BOUZON, Z. L.; OURIQUES, L. C.; OLIVEIRA, E. C. **Spore adhesion and cell wall formation in Gelidium floridanum (Rhodophyta, Gelidiales).** Journal of Applied Phycology, v. 18, n. 3–5, p. 287–294, 2006.

BRASIL. **Regras para Análise de Sementes.** 2009.

BRAYNER, R. et al. **Toxicological Impact Studies Based on Escherichia coli Bacteria in Ultrafine ZnO Nanoparticles Colloidal Medium.** v. 6, p. 2–6, 2006.

BRITT, D. W. et al. **CuO and ZnO nanoparticles : phytotoxicity , metal speciation , and induction of oxidative stress in sand-grown wheat.** Journal of Nanoparticle Research. v 14. 2012.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. **Adsorption of Gases in Multimolecular Layers.** Journal of the American Chemical Society, v. 60, n. 1, p. 309–319, 1938.

BUFFET, P. E. et al. **Behavioural and biochemical responses of two marine invertebrates *Scrobicularia plana* and *Hediste diversicolor* to copper oxide nanoparticles.** Chemosphere, v. 84, n. 1, p. 166–174, 2011.

BYSTRZEJEWSKA-PIOTROWSKA, G.; GOLIMOWSKI, J.; URBAN, P. L. **Nanoparticles: Their potential toxicity, waste and environmental management.** Waste Management, v. 29, n. 9, p. 2587–2595, 2009.

CAKMAK, I. **Possible roles of zinc in protecting plant cells from damage by reactive oxygen species.** n. 111, p. 185–205, 2000.

CAKMAK, I. **Enrichment of cereal grains with zinc : Agronomic or genetic biofortification ?** Plant Soil (2008) 302:1–17, 2007.

CAMPILLO, I. et al. **Improvement of initial mechanical strength by nanoalumina in belite cements.** Materials Letters, v. 61, n. 8–9, p. 1889–1892, 2007.

CARDENAS, H. E.; STRUBLE, L. J. **Modeling Electrokinetic Nanoparticle Penetration for Permeability Reduction of Hardened Cement Paste.** Journal of Materials in Civil Engineering, v. 20, n. 11, p. 683–691, 2008.

CARVALHO, P. et al. **Influence of thickness and coatings morphology in the antimicrobial performance of zinc oxide coatings.** Applied Surface Science, v. 307, p. 548–557, 2014.

CARVALHO, C. L. S. DE. **Inovações Tecnológicas, reciclagem e redução de custos na indústria da construção civil.** Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2003.

CHANG, Y.-N. et al. **The Toxic Effects and Mechanisms of CuO and ZnO Nanoparticles.** Materials, v. 5, n. 12, p. 2850–2871, 2012.

CHEN, F.; YANG, X.; WU, Q. **Antifungal capability of TiO₂ coated film on moist wood.** v. 44, p. 1088–1093, 2009.

CHESLER, P. et al. **Tin–Zinc oxide composite ceramics for selective CO sensing.** Ceramics International, v. 42, n. 15, p. 16677–16684,

2016.

CHUAN, Z. F. **Handbook of Zinc Oxide and Related Materials** - v. 2, Devices and Nano-engineering, 2012.

CLIFT, M. J. D.; GEHR, P.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B. **Nanotoxicology: A perspective and discussion of whether or not in vitro testing is a valid alternative.** Archives of Toxicology, v. 85, n. 7, p. 723–731, 2011.

COATES, D.; PUBLIC, C.; AVENUE, C. **Effect of pH on sporicidal and microbicidal activity of buffered mixtures of alcohol and sodium hypochlorite.** p. 148–153, 1979.

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

COSTA, P. C. et al. **Condutividade elétrica da solução nutritiva e produção de alface em hidroponia.** Scientia Agricola, v. 58, p. 595–597, 2001.

COSTA, C. H. DA. **Avaliação Toxicológica da Nanopartícula de Óxido de Cromo III Através de ensaio in vivo e in vitro.** Universidade Federal de Santa Catarina -UFSC. Florianópolis. p. 197, 2014.

CWALINA, B. **Biodeterioration of Concrete.** Journal of Architecture Civil Engineering Environment, p. 133–140, 2008.

DAWSON, S. C.; DELONG, E. F.; PACE, N. R. **The Prokaryotes.** Pace Pacing And Clinical Electrophysiology , 2006.

DHANKHER, O. P. **Physiological and Molecular Response of Arabidopsis thaliana (L.) to Nanoparticle Cerium and Indium Oxide Exposure.** 2013.

DIAMANTI, M. V.; ORMELLESE, M.; PEDEFERRI, M. **Characterization of photocatalytic and superhydrophilic properties of mortars containing titanium dioxide.** Cement and Concrete Research, v. 38, n. 11, p. 1349–1353, 2008.

DJURIĆ, A. B.; NG, A. M. C.; CHEN, X. Y. **ZnO nanostructures for optoelectronics: Material properties and device applications.** Progress in Quantum Electronics, v. 34, n. 4, p. 191–259, 2010.

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.

DOORLEY, G. W.; PAYNE, C. K. **Cellular binding of nanoparticles in the presence of serum proteins**. *Chemical communications (Cambridge, England)*, v. 47, n. 1, p. 466–468, 2011.

DUNLAP, C. A.; BIRESAW, G.; JACKSON, M. A. **Hydrophobic and electrostatic cell surface properties of blastospores of the entomopathogenic fungus *Paecilomyces fumosoroseus***. v. 46, p. 261–266, 2005.

DUTTA, R. K. et al. **Studies on antibacterial activity of ZnO nanoparticles by ROS induced lipid peroxidation**. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 94, p. 143–150, 2012.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. **Fungitoxic spectrum of benzimidazoles compounds**. *Phytopathology*, v. 61, p. 42–44, 1971.

ELDER, A.; VIDYASAGAR, S.; DELOUISE, L. **Physicochemical factors that affect metal and metal oxide nanoparticle passage across epithelial barriers**. *Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology*, v. 1, n. 4, p. 434–450, 2009.

EZZOUHRI, L. et al. **Heavy metal tolerance of filamentous fungi isolated from polluted sites in Tangier , Morocco**. v. 3, n. February 2009, p. 035–048, 2009.

FANG, J. et al. **Stability of titania nanoparticles in soil suspensions and transport in saturated homogeneous soil columns**. *Environmental Pollution*, v. 157, n. 4, p. 1101–1109, 2009.

FENSKE, C. et al. **Comparison of different biological methods for the assessment of ecotoxicological risks**. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, v. 209, n. 3, p. 275–284, 2006.

FERNÁNDEZ, V.; EICHERT, T. **Uptake of Hydrophilic Solutes Through Plant Leaves: Current State of Knowledge and Perspectives of Foliar Fertilization**, *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2009.

FLEXAS, J. et al. **Mesophyll conductance to CO₂: current knowledge and future prospects.** *Plant, Cell and Environment*, v. 31, p. 602–621, 2008.

FLORA, S. J. S. **Free Radical Biology & Medicine Arsenic-induced oxidative stress and its reversibility.** *Free Radical Biology and Medicine*, v. 51, n. 2, p. 257–281, 2011.

FONSECA, A. J. et al. **Anatase as an alternative application for preventing biodeterioration of mortars: Evaluation and comparison with other biocides.** *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 64, n. 5, p. 388–396, 2010.

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.

GADD, G. . et al. **Methods for Assessment of Heavy Metal Toxicity Towards Fungi and Yeasts.** *Toxicity Assessment: An International Quarterly*, v. 1, n. 2, p. 169–185, 1986.

GADD, G. . **Interactions of fungi with toxic metals.** In: *Interactions*. v. 124 p. 25–60, 1993.

GADD, G. E.; CASEY, P. S. **Comparative toxicity of nanoparticulate ZnO , bulk ZnO and ZnCl₂ to a freshwater microalga (Pseudokirchnerilla subcapitata) the importance of particle solubility.** *Environmental Science and Technology*: v. 41, n. 24, p. 1–27, 2007.

GAYLARDE, C.; RIBAS SILVA, M.; WARSCHEID, T. **Microbial impact on building materials: an overview.** *Materials and Structures*, v. 36, n. 5, p. 342–352, 2003.

GHULE, K. et al. **Preparation and characterization of ZnO nanoparticles coated paper and its antibacterial activity study.** p. 1034–1041, 2006.

GONDAL, M. A. et al. **Morphology and antifungal effect of nano-ZnO and nano-Pd-doped nano-ZnO against Aspergillus and Candida.** *Journal of Environmental Science and Health - Part A Toxic/Hazardous Substances and Environmental Engineering*, v. 47, n. 10, p. 1413–1418, 2012.

GONZÁLEZ-ANDRÉS, V. et al. **Acute ecotoxicity of coated colloidal**

goethite nanoparticles on *Daphnia magna*: Evaluating the influence of exposure approaches. *Science of the Total Environment*, v. 609, p. 172–179, 2017.

GOPHEN, M.; GELLER, W. **Filter mesh size and food particle uptake by *Daphnia*.** *Oecologia*, v. 64, p. 408–412, 1984.

GRIFFITT, R. J. et al. **Comparison of molecular and histological changes in zebrafish gills exposed to metallic nanoparticles.** *Toxicological Sciences*, v. 107, n. 2, p. 404–415, 2009.

HE, L. et al. **Antifungal activity of zinc oxide nanoparticles against *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum*.** *Microbiological Research*, v. 166, n. 3, p. 207–215, 2011.

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, 2008a.

HORSWELL, J. et al. **Impact of heavy metal amended sewage sludge on forest soils as assessed by bacterial and fungal biosensors.** *Biology and Fertility of Soils*, v. 42, n. 6, p. 569–576, 2006.

HOUDY, P.; LAHMANI, M.; MARANO, F. **Nanoethics and Nanotoxicology.** *European M.* 2010.

HWANG, I. S. et al. **Silver nanoparticles induce apoptotic cell death in *Candida albicans* through the increase of hydroxyl radicals.** *FEBS Journal*, v. 279, n. 7, p. 1327–1338, 2012.

IBGE, I. B.; ESTATÍSTICA, DE G. E. **Tabela completa contas nacionais trimestrais.** Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/pib/defaultcnt.shtm>>.

JAYAPALAN, A. R. et al. **Influence of Additions of Anatase TiO₂ Nanoparticles on Early-Age Properties of Cement-Based Materials.** *Transportation Research Record: Journal of the Transportation Research Board*, v. 2141, p. 41–46, 2010.

JO, H. J. et al. **Acute toxicity of Ag and CuO nanoparticle suspensions against *Daphnia magna*: The importance of their dissolved fraction varying with preparation methods.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 227–228, p. 301–308, 2012.

JONES, N. et al. **Antibacterial activity of ZnO nanoparticle suspensions on a broad spectrum of microorganisms.** FEMS Microbiol Lett v. 279, (2008).

KANAREK, S.; POWELL, C. **Nanotechnology Health Risk Assessment.** Epidemiol. 17(6), p. 443, 2006.

KANGO, S. et al. **Surface modification of inorganic nanoparticles for development of organic-inorganic nanocomposites - A review.** Progress in Polymer Science, v. 38, n. 8, p. 1232–1261, 2013.

KASEMETS, K. et al. **Toxicology in Vitro Toxicity of nanoparticles of ZnO , CuO and TiO₂ to yeast Saccharomyces cerevisiae.** Toxicology in Vitro, v. 23, n. 6, p. 1116–1122, 2009.

KAYA, C.; HIGGS, D. **Response of tomato (Lycopersicon esculentum L.) cultivars to foliar application of zinc when grown in sand culture at low zinc.** Scientia Horticulturae v. 93, p. 53 - 64. 2002.

KIM, S. et al. **Time-Dependent Toxicity Responses in Daphnia magna Exposed to CuO and ZnO Nanoparticles.** Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, v. 0, n. 0, p. 0, 2017.

KLINGSHIRN, C. F. et al. **Zinc Oxide - From Fundamental Properties Towards Novel Applications.** Springer Series in Materials Science v. 120, 2010.

KONDRATYEVA, I. A.; GORBUSHINA, A. A.; BOIKOVA, A. I. **Biodeterioration of construction materials.** Glass Physics and Chemistry, v. 32, n. 2, p. 254–256, 2006.

KONDRATYEVA I. A., A. A. G. AND A. I. B. **Biodeterioration of Construction Materials.** ISSN Glass Physics and Chemistry, v. 32, n. 2, p. 1087–6596, 2006.

KRÄMER, U. **Metal Hyperaccumulation in Plants.** Annual Review of Plant Biology, v. 61, n. 1, p. 517–534, 2010.

LACKHOFF, M. et al. **Photocatalytic activity of semiconductor-modified cement - Influence of semiconductor type and cement ageing.** Applied Catalysis B: Environmental, v. 43, n. 3, p. 205–216, 2003.

LEE, S. et al. **Assessment of Electrical Charge on Airborne Microorganisms by a New Bioaerosol Sampling Method.** Journal of

Occupational and Environmental Hygiene, v. 1, n. October 2014, p. 127–138, 2010.

LEITNER, J. et al. **Thermodynamic properties of nanostructured ZnO.** Applied Materials Today, v. 10, p. 1–11, 2018.

LEUNG, Y. H. et al. **Antibacterial activity of ZnO nanoparticles with a modified surface under ambient illumination.** Nanotechnology, v. 23, n. 47, p. 475703, 2012.

LI, M.; ZHU, L.; LIN, D. **Toxicity of ZnO nanoparticles to escherichia Coli: Mechanism and the influence of medium components.** Environmental Science and Technology, v. 45, n. 5, p. 1977–1983, 2011.

LIMBACH, L. K. et al. **Exposure of Engineered Nanoparticles to Human Lung Epithelial Cells: Influence of Chemical Composition and Catalytic Activity on Oxidative Stress.** Environmental Science & Technology, v. 41, n. 11, p. 4158–4163, 2007.

LIN, D.; XING, B. **Phytotoxicity of nanoparticles : Inhibition of seed germination and root growth.** v. 150, 2007.

LIN, D.; XING, B. **Root Uptake and Phytotoxicity of ZnO Nanoparticles.** v. 42, n. 15, p. 5580–5585, 2008.

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.

LONGNECKER, N. E.; ROBSON, A. D. **Distribution and transport of zinc in plants. In: Zinc in Soils and Plants.** Perth, Australia: Dordrecht, the Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993.

LOPES, F. C. **Produção e Análise de Metabólitos Secundários de Fungos Filamentosos.** Microbiologia (Madrid), p. 1–130, 2011.

LUO, J. et al. **Interactions of fungi with concrete: Significant importance for bio-based self-healing concrete.** v. 164, p. 275–285, 2018.

MA, C. et al. **Metal-Based Nanotoxicity and Detoxification Pathways in Higher Plants.** 2015.

MAHESHWARI, R.; BHARADWAJ, G.; BHAT, M. K. **Thermophilic fungi: their physiology and enzymes.** Microbiology and molecular

biology reviews : MMBR, v. 64, n. 3, p. 461–88, 2000.

MAJOR, S.; BANERJEE, A.; CHOPRA, K. L. **Optical and electronic properties of zinc oxide films prepared by spray pyrolysis.** Thin Solid Films, v. 125, n. 1–2, p. 179–185, 1985.

MALLAKPOUR, S.; MADANI, M. **A review of current coupling agents for modification of metal oxide nanoparticles.** Progress in Organic Coatings, v. 86, p. 194–207, 2015.

MAYRINCK, C. et al. **Síntese, propriedades e aplicações de óxido de zinco nanoestruturado.** Revista Virtual de Química, v. 6, n. 5, p. 1185–1204, 2014.

MEYCHIK, N. R.; YERMAKOV, I. P. **Ion exchange properties of plant root cell walls.** p. 181–193, 2001.

MENTEN, J. O. M.; MACHADO, C. C.; MINUSSI, E.; CASTRO, C.; KIMATI, H. **Efeito de Alguns fungicidas no crescimento micelial de Macro-phomina phaseolina (TASS.) GOID. “In vitro”,** Fitopatologia Brasileira, v.1, n.2, p. 57-66, 1976.

MOEZZI, A.; MCDONAGH, A. M.; CORTIE, M. B. **Zinc oxide particles: Synthesis , properties and applications.** Chemical Engineering Journal, v. 185–186, p. 1–22, 2012.

MULLER, J. B. **Avaliação da Toxicidade da Fração Solúvel em Água do Biodiesel, Diesel e da Mistura Binária Diesel/Biodiesel de 5% (B5).** UFSC, 2011.

NAGAJYOTI, P. C.; LEE, K. D.; SREEKANTH, T. V. M. **Heavy metals, occurrence and toxicity for plants: A review.** Environmental Chemistry Letters, v. 8, n. 3, p. 199–216, 2010.

NAVALE, G. R.; THIRIPURANTHAKA, M.; LATE, D. J. **Antimicrobial Activity of ZnO Nanoparticles against Pathogenic Bacteria and Fungi.** 2015.

NETA, MARINA ALVES DE FREITAS; JESUS, S. V. DE; MARENCO, R. A. **Effect of irradiance on size and density of stomata in five tree species of the Amazon.** XIX Jornada de Iniciação Científica PIBIC INPA - CNPq/FAPEAM, 2016.

NIU, Y. et al. **Preparation, characterization and properties of amine-functionalized silicon carbide/polyimide composite films.** RSC

Advances, v. 4, n. 54, p. 28456, 2014.

NOCHAIYA, T. et al. **Microstructure, characterizations, functionality and compressive strength of cement-based materials using zinc oxide nanoparticles as an additive.** Journal of Alloys and Compounds, v. 630, p. 1–10, 2015.

NOWACK, B.; BUCHELI, T. D. **Occurrence, behavior and effects of nanoparticles in the environment.** Environmental Pollution, v. 150, n. 1, p. 5–22, 2007.

O'BRIEN, N.; CUMMINS, E. **Recent developments in nanotechnology and risk assessment strategies for addressing public and environmental health concerns.** Human and Ecological Risk Assessment, v. 14, n. 3, p. 568–592, 2008.

OHIRA, T.; YAMAMOTO, O. **Correlation between antibacterial activity and crystallite size on ceramics.** Chemical Engineering Science, v. 68, n. 1, p. 355–361, 2012.

OSCAR, B. V. **Avaliação Toxicológica de Nanoestruturas de Óxido de Zinco Aplicadas em Argamassas.** Universidade Federal de Santa Catarina, 2016.

PADMAVATHY, N.; VIJAYARAGHAVAN, R. **Enhanced bioactivity of ZnO nanoparticles—an antimicrobial study.** Science and Technology of Advanced Materials, v. 9, n. 3, p. 35004, 2008.

PALMIERI, V. et al. **Antifungal mechanisms of ZnO and Ag nanoparticles to Sclerotinia homoeocarpa.** Nanotechnology v. 28, 2017.

PAN, Y. et al. **Lethal/sublethal responses of Daphnia magna to acute norfloxacin contamination and changes in phytoplankton-zooplankton interactions induced by this antibiotic.** Scientific Reports, v. 7, n. December 2016, p. 1–10, 2017.

PANDEY, N.; PATHAK, G. C.; SHARMA, C. P. **Zinc is critically required for pollen function and fertilisation in lentil.** v. 20, p. 89–96, 2006.

PARSHIKOV, I. A.; SUTHERLAND, J. B. **The use of Aspergillus niger cultures for biotransformation of terpenoids.** Process Biochemistry, v. 49, n. 12, p. 2086–2100, 2014.

PASQUET, J. et al. The contribution of zinc ions to the antimicrobial activity of zinc oxide. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 457, n. 1, p. 263–274, 2014.

PATRA, P. et al. **Biochemical , biophysical and microarray based antifungal evaluation of buffer mediated synthesized nano Zinc Oxide ; in vivo and in vitro toxicity study**. *Langmuir*, v. 28, p. 16966–16978, 2012.

PERREAULT, F. et al. **Polymer coating of copper oxide nanoparticles increases nanoparticles uptake and toxicity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii***. *Chemosphere*, v. 87, n. 11, p. 1388–1394, 2012.

PI, J. et al. **Pathway of cytotoxicity induced by folic acid modified selenium nanoparticles in MCF-7 cells**. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 97, n. 3, p. 1051–1062, 2013.

PICA GRANADOS, Y. **Ensayos Toxicológicos Y Métodos De Evaluación De Calidad De Aguas Estandarización, Intercalibración, Resultados Y Aplicaciones**. 2014.

POKHREL, L. R.; DUBEY, B. **Science of the Total Environment Evaluation of developmental responses of two crop plants exposed to silver and zinc oxide nanoparticles**. *Science of the Total Environment*, The, v. 452–453, p. 321–332, 2013.

POYNTON, H. C. et al. **Differential gene expression in daphnia magna suggests distinct modes of action and bioavailability for Zn nanoparticles and Zn ions**. *Environmental Science and Technology*, v. 45, n. 2, p. 762–768, 2011.

PRASAD, T. N. V. K. V. et al. **Effect of Nanoscale Zinc Oxide Particles on the Germination, Growth and Yield of Peanut Effect of Nanoscale Zinc Oxide Particles**. n. May 2013, p. 37–41, 2012.

QUARCIONI, V. A. et al. **Estimativa da porosidade de argamassas de cimento e cal pelo método de cálculo de volumes**. *Ambiente Construído*, v. c, n. 11, p. 175–187, 2009.

RAJPUT, V. D. et al. **Effects of zinc-oxide nanoparticles on soil , plants , animals and soil organisms : A review**. v. 9, n. October 2017, p. 76–84, 2018.

RAMANI, M.; PONNUSAMY, S.; MUTHAMIZHCHELVAN, C.

Preliminary investigations on the antibacterial activity of zinc oxide nanostructures. Journal of Nanoparticle Research, v. 15, n. 4, 2013.

RAO, M. V.; DUBEY, P. S. **Occurrence of heavy metals in air and their accumulation by tropical plants growing around an industrial area Study area.** v. 126, p. 1–16, 1992.

RAVISHANKAR RAI, V.; JAMUNA BAI, A. **Nanoparticles and their potential application as antimicrobials.** Science against microbial pathogens: Communicating current research and technological advances, n. February 2015, p. 197–209, 2011.

REDDY, A. S. S. et al. **Structural and electrical properties of zinc tantalum borate glass ceramic.** Ceramics International, v. 42, n. 15, p. 17269–17282, 2016.

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, 2014.

SANCHEZ-SILVA, M.; ROSOWSKY, D. V. **Biodeterioration of Construction Materials: State of the Art and Future Challenges.** Journal of Materials in Civil Engineering, v. 20, n. 5, p. 352–365, maio 2008.

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, n. 0, p. 339–350, 2014.

SANTOS, A. B. DOS. **Identificação Biológica E Aplicação De Biocidas Na População Microbiana Que Forma Os Biofilmes De Alguns Monumentos Históricos Da Bahia.** v. 1983, p. 82, 2011.

SARDELLA, D.; GATT, R.; VALDRAMIDIS, V. P. **Physiological effects and mode of action of ZnO nanoparticles against postharvest fungal contaminants.** Food Research International, v. 101, n. August, p. 274–279, 2017.

SAWAI, J.; YOSHIKAWA, T. **Quantitative evaluation of antifungal activity of metallic oxide powders (MgO , CaO and ZnO) by an indirect conductimetric assay.** p. 803–809, 2004.

SCHLEH, C. et al. **Size and surface charge of gold nanoparticles determine absorption across intestinal barriers and accumulation in**

secondary target organs after oral administration. *Nanotoxicology*, v. 6, n. 1, p. 36–46, 2012.

SCHMIDT, É. C. et al. **Alterations in architecture and metabolism induced by ultraviolet radiation-B in the carragenophyte *Chondracanthus teedei* (Rhodophyta, Gigartinales).** v. 900, p. 353–367, 2012.

SEO, J. et al. **Effects of physicochemical properties of test media on nanoparticle toxicity to *daphnia magna* straus.** *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 93, n. 3, p. 257–262, 2014.

SERRA, T. et al. ***Daphnia magna* filtration efficiency and mobility in laminar to turbulent flows.** *Science of the Total Environment*, v. 621, p. 626–633, 2018.

SHAHID, M. et al. **Heavy-Metal-Induced Reactive Oxygen Species: Phytotoxicity and Physicochemical Changes in Plants.** *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 232, p. 1–44, 2014.

SHAHID, M. et al. **Foliar heavy metal uptake, toxicity and detoxification in plants: A comparison of foliar and root metal uptake.** *Journal of Hazardous Materials*, v. 325, p. 36–58, 2017.

SHARMA, D. et al. **Synthesis of ZnO nanoparticles and study of their antibacterial and antifungal properties.** *Thin Solid Films*, v. 519, n. 3, p. 1224–1229, 2010.

SIGOLI, F. A. et al. **Morfologia e cristalinidade de hidroxicarbonato de zinco obtido via precipitação homogênea: Influência dos ânions cloreto e nitrato.** *Química Nova*, v. 23, n. 5, p. 627–631, 2000.

SIRELKHATIM, A.; MAHMUD, S.; SEENI, A. **Review on Zinc Oxide Nanoparticles: Antibacterial Activity and Toxicity Mechanism.** *Nano-Micro Letters*, v. 7, p. 219–242, 2015.

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

SOUZA, J. S. DE. **Evolução da degradação de fachadas - efeitos dos agentes de degradação e dos elementos constituintes.** UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA, 2010.

- SPIELMAN-SUN, E. et al. **Impact of Surface Charge on Cerium Oxide Nanoparticle Uptake and Translocation by Wheat (*Triticum aestivum*)**. 2017.
- SRIVASTAVA, S.; AHMAD, A. H.; THAKUR, I. S. **Removal of chromium and pentachlorophenol from tannery e Zuentis**. v. 98, p. 1128–1132, 2007.
- STOIMENOV, P. K. et al. **Metal oxide nanoparticles as bactericidal agents**. *Langmuir*, v. 18, n. 17, p. 6679–6686, 2002.
- TRAN, T. H. et al. **Avrami's law based kinetic modeling of colonization of mortar surface by alga *Klebsormidium flaccidum***. *International Biodeterioration and Biodegradation*, v. 79, p. 73–80, 2013.
- UNRINE, J.; BERTSCH, P.; HUNYADI, S. **Bioavailability, Trophic Transfer, and Toxicity of Manufactured Metal and Metal Oxide Nanoparticles in Terrestrial Environments**. In: GRASSIAN, V. H. (Ed.). *Nanoscience and Nanotechnology - Environmental and Health Impacts*. Lexington, USA.
- UZU, L. L. E.; SOBANSKA, S. **Foliar Lead Uptake by Lettuce Exposed to Atmospheric Fallouts**. v. 44, n. 3, p. 1036–1042, 2010.
- VALE, M. D. S. et al. **Efeito da toxicidade de Cr (VI) e Zn (II) no crescimento do fungo filamentoso *Aspergillus niger* isolado de efluente industrial**. *Engenharia Sanitaria e Ambiental*, v. 16, n. 3, p. 237–244, 2011.
- 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.
- WATSON, J. et al. **The phytotoxicity of ZnO nanoparticles on wheat varies with soil properties**. 2014.
- WEHR, J. B.; BLAMEY, F. P. C.; MENZIES, N. W. **Comparison between Methods using Copper, Lanthanum, and Colorimetry for the Determination of the Cation Exchange Capacity of Plant Cell Walls**. p. 4554–4559, 2010.
- WEI, S. et al. **Microbiologically induced deterioration of concrete -A Review**. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 44, p. 1001–1007, 2013.

WEITZ, H. J.; CAMPBELL, C. D.; KILLHAM, K. **Development of a novel, bioluminescence-based, fungal bioassay for toxicity testing.** *Environmental Microbiology*, v. 4, n. 7, p. 422–429, 2002.

XUE, J. et al. **A residue-free green synergistic antifungal nanotechnology for pesticide thiram by ZnO nanoparticles.** *Scientific Reports*, v. 4, p. 1–9, 2014.

YAMAMOTO, O. **Influence of particle size on the antibacterial activity of zinc oxide.** v. 3, n. August, p. 643–646, 2001.

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.

ZAFAR, S.; AQIL, F.; AHMAD, I. **Metal tolerance and biosorption potential of filamentous fungi isolated from metal contaminated agricultural soil.** v. 98, p. 2557–2561, 2007.

ZHANG, D.; JIANG, C.; SUN, Y. **Room-temperature high-performance ammonia gas sensor based on layer-by-layer self-assembled molybdenum disulfide/zinc oxide nanocomposite film.** *Journal of Alloys and Compounds*, v. 698, p. 476–483, 2017.

ZHANG, L. et al. **Investigation into the antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles (ZnO nanofluids).** *Journal of Nanoparticle Research*, v. 9, n. 3, p. 479–489, 2007.

ZHANG, L. et al. **Mechanistic investigation into antibacterial behaviour of suspensions of ZnO nanoparticles against E. coli.** *Journal of Nanoparticle Research*, v. 12, n. 5, p. 1625–1636, 2010.

ZHAO, L. et al. **Transport of Zn in a sandy loam soil treated with ZnO NPs and uptake by corn plants: Electron microprobe and confocal microscopy studies.** *Chemical Engineering Journal*, v. 184, p. 1–8, 2012.

ZHENHUA, L. et al. **Investigations on the preparation and mechanical properties of the nano-alumina reinforced cement composite.** *Materials Letters*, v. 60, n. 3, p. 356–359, 2006.

ZHU, X. et al. **Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage.** *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, v. 43, n. 3, p. 278–284, 2008.

ZUVERZA-MENA, N. et al. **Exposure of engineered nanomaterials to plants : Insights into the physiological and biochemical responses- A review.** *Plant Physiology and Biochemistry.* v. 110, 2017.