

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

RODRIGO COSTA PUERARI

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOMATERIAIS DE
SÍLICA AMINO-FUNCIONALIZADOS E APLICAÇÃO EM
MEMBRANAS DE NANOFILTRAÇÃO**

**FLORIANÓPOLIS
MARÇO 2019**

Rodrigo Costa Puerari

**Avaliação Toxicológica de Nanomateriais de Sílica Amino-
Funcionalizados e Aplicação em Membranas de Nanofiltração**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Ambiental.

**Orientador: Prof. William Gerson Matias, Dr.
Coorientadora: Denice Schulz Vicentini, Dra.**

**Florianópolis
Março 2019**

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

Puerari, Rodrigo Costa
Avaliação Toxicológica de Nanomateriais de Sílica
Amino-Funcionalizados e Aplicação em Membranas de
Nanofiltração / Rodrigo Costa Puerari ; orientador,
William Gerson Matias, coorientadora, Denice Schulz
Vicentini, 2019.
189 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós
Graduação em Engenharia Ambiental, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Engenharia Ambiental. 2. Nanofiltração. 3.
Dessalinização. 4. Nanotoxicologia. 5. Sílica amorfa.
I. Gerson Matias, William. II. Schulz Vicentini,
Denice. III. Universidade Federal de Santa
Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Ambiental. IV. Título.



TERMO DE APROVAÇÃO

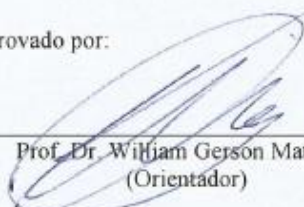
“Avaliação toxicológica de nanomateriais de sílica amino-funcionalizados e aplicação em membranas de nanofiltração”

Rodrigo Costa Puerari

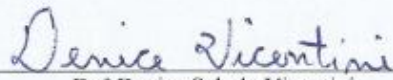
A Tese foi julgada e aprovada pela banca examinadora no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina como parte dos requisitos necessários para obtenção do grau de

DOUTOR(A) EM ENGENHARIA AMBIENTAL

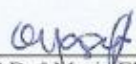
Aprovado por:



Prof. Dr. William Gerson Matias
(Orientador)



Dr.ª Denice Schulz Vicentini
(Coorientadora)



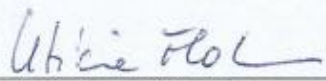
Prof.ª Dr.ª Maria Eliza Nagel Hassemer



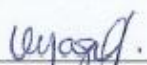
Prof.ª Dr.ª Maria Elisa Magri



Prof.ª Dr.ª Cristiane Funghetto Fuzinato



Prof.ª Dr.ª Leticia Flohr



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

Dedico este trabalho em memória a
minha avó Carmen e a todas as pessoas
dispostas a tornar o mundo um lugar
melhor para todos, independentemente de
classe social, cor, etnia, condição sexual e
identidade de gênero.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível sem a colaboração de diversas pessoas e instituições. Meus agradecimentos são direcionados:

À minha família e em especial aos meus pais por acreditarem na educação e por todo incentivo e compreensão ao longo dos anos.

Ao professor William Gerson Matias pela orientação, pelos conhecimentos repassados desde a graduação, pela confiança depositada e pela oportunidade de poder pesquisar aquilo que gosto.

À minha coorientadora Denice Schulz Vicentini pela paciência, apoio, correções e conselhos para além da tese.

Às membras da banca, professoras Cristiane Funghetto Fuzinato, Letícia Flohr, Maria Elisa Magri e Maria Eliza Nagel Hassemer pela disponibilidade e contribuições para a melhoria da tese.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX) pela ajuda e contribuições ao longo do desenvolvimento da pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo fomento à pesquisa, ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental (PPGEA) pela oportunidade e a todos os funcionários do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental.

Ao Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV) e a Carmen Simioni pela ajuda na preparação das amostras para microscopia, ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) pelo suporte nas análises microscópicas, ao Laboratório de Materiais Vitrocerâmicos (VITROCER) pela ajuda na análise do ângulo de contato e aos demais laboratórios parceiros.

Ao meu noivo Weuler Pereira de Azara por todo o incentivo, paciência, e divertimento, por ouvir meus desabafos e me aconselhar, e, principalmente, pelo amor em tempos em que amar é resistir.

À Bianca Vicente Oscar e à Cristina Moreira Lalau pela amizade dentro e fora do laboratório, pela ajuda em momentos difíceis, pelos inúmeros conselhos e companheirismo.

A todos os meus amigos que de certa forma contribuíram nos momentos além tese e que tornaram essa jornada mais agradável. Em

especial à Lívia Bernardes Roberge pela amizade desde a infância,
incontáveis conselhos e apoio.

“Para criaturas tão pequenas como nós,
a imensidão só é suportável através do
amor.”
(Carl Sagan)

RESUMO

O aumento no consumo e a poluição dos corpos hídricos afetam a disponibilidade de água potável. Assim, estudos que desenvolvem materiais eficientes para tratar esse recurso são necessários, incluindo melhorias em técnicas de tratamento já existentes. Neste contexto, o presente trabalho desenvolveu composições de membranas nanoestruturadas em camadas, sendo suporte de polissulfona (PSU) e polimerização *in situ* de filmes finos de polidopamina (PDA) e polietilenoimina (PEI) com diferentes tipos de nanomateriais de sílica (NM SiO₂) sem (NHS) e com amino-funcionalização com as moléculas (3-aminopropil)trimetóxisilano (APTMS) (NH1) e 3-[2-(2-aminoetilamino) etilamino]propiltrimetóxisilano (AEAEAPTMS) (NH3). As composições de membranas foram denominadas M0 (PSU+PDA+PEI), MS (PSU+PDA+PEI+NHS), M1 (PSU+PDA+PEI+NH1) e M3 (PSU+PDA+PEI+NH3), sendo posteriormente reticuladas com gluteraldeído (GA), caracterizadas e testadas a eficiência na nanofiltração (NF) de íons de sais mono (AgNO₃ e NaCl) e bivalentes (MgCl₂ e ZnSO₄). Os NHS, NH1 e NH3 foram caracterizados por técnicas físico-químicas que comprovaram a funcionalização, o aumento do diâmetro e estabilidade em suspensão após a amino-funcionalização. Os NM SiO₂ foram avaliados quanto suas toxicidades para os organismos *Daphnia magna* e suas citotoxicidades através da exposição de células Vero. A toxicidade das membranas foi avaliada por ensaio agudo com *D. magna* após suas lixiviações. Os testes de toxicidade aguda com NM SiO₂ para *D. magna* resultaram em baixa toxicidade, enquanto que o ensaio crônico mostrou efeito principalmente quanto à reprodução dos organismos e alterações ultra-estruturais nos ovos dos organismos expostos. Também foram observados efeitos nas antenas e brânquias e em mitocôndrias e microvilosidades do intestino dos organismos expostos. Os NM SiO₂ também apresentaram citotoxicidade (maior para menor: NH3 > NH1 >> NHS) a células Vero e as vias de toxicidade foram investigadas, destacando a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e lipoperoxidação (LPO). Houve internalização dos NM SiO₂, efeitos em mitocôndrias, membranas nucleares e em retículos endoplasmáticos rugosos. Para as membranas, foram observadas a melhoria das propriedades quanto à hidrofiliabilidade e eficiência, sendo que MS, M1 e M3 obtiveram maiores rejeições a MgCl₂, NaCl e ZnSO₄ que M0. Já na filtração com AgNO₃, as

membranas M1 e M3 obtiveram rejeições similares a M0. A M1 foi a membrana mais eficiente quando se considera o fluxo de permeação e a rejeição aos sais. A lixiviação das membranas resultou em baixa liberação de Si e os lixiviados não foram tóxicos para *D. magna*. Portanto, foi identificado melhorias na hidrofiliçidade e eficiência das membranas de NF com adição dos NM SiO₂ sem que estas confirmam toxicidade ao meio líquido.

Palavras-chave: Nanofiltração, membranas nanoestruturadas, dessalinização, sílica amorfa, nanotoxicologia, *Daphnia magna*, citotoxicidade.

ABSTRACT

Increased consumption and pollution of water bodies affect the availability of potable water. Thus, studies for the development of efficient materials to treat this resource are necessary, including improvements in existing treatment techniques. In this context, the present work developed layered nanostructured membrane compositions, based on polysulfone (PSU) as the support layer and in situ thin films polymerization of polydopamine (PDA) and polyethyleneimine (PEI) with different types of silicon nanomaterials (NM SiO₂) without (NHS) and with amino-functionalization with (3-aminopropyl) trimethoxysilane (APTMS) (NH1) and 3-[2-(2-aminoethylamino) ethylamino] propyltrimethoxysilane (AEAEAPTMS) (NH3) molecules. The membranes compositions were named as M0 (PSU+PDA+PEI), MS (PSU+PDA+PEI+NHS), M1 (PSU + PDA + PEI + NH1) and M3 (PSU + PDA + PEI + NH3) and were crosslinked with glutaraldehyde (GA), characterized and their efficiency on nanofiltration was tested for the rejection of monovalent salts (AgNO₃ and NaCl) and bivalent salts (MgCl₂ and ZnSO₄). NHS, NH1 and NH3 were characterized by physicochemical techniques that proved functionalization, increase in diameter and stability in suspension after amino-functionalization. The toxicities of the SiO₂ NM were evaluated to *Daphnia magna* and their cytotoxicity through Vero cell exposure. Membranes toxicities were assessed by acute assay with *D. magna* after their leaching. The acute toxicity tests with NM SiO₂ for the organism *D. magna* resulted in low toxicity, while the chronic test showed mainly effect on reproduction and ultrastructural changes in eggs of exposed organisms. Effects on antennae and gills and on mitochondria and microvilli of the intestine of exposed organisms were also observed. The NM SiO₂ also showed cytotoxicity (major to minor: NH3 > NH1 >> NHS) to Vero cells and toxicity pathways were investigated, highlighting the production of reactive oxygen species (ROS) and lipoperoxidation (LPO). There were internalization of NM SiO₂, effects on mitochondria, nuclear membranes and rough endoplasmic reticulum. For the membranes, the properties of hydrophilicity and efficiency were improved, and MS, M1 and M3 obtained higher rejections of MgCl₂, NaCl and ZnSO₄ than M0. In the

filtration of AgNO₃, M1 and M3 membranes obtained rejections similar to M0. M1 was the most efficient membrane when considering permeation flux and salt rejection. The leaching of the membranes resulted in low Si release and the leachates were not toxic to *D. magna*. Therefore, improvements in the hydrophilicity and efficiency of NF membranes with the addition of the NM SiO₂ were identified without these conferring toxicity to the liquid medium.

Keywords: Nanofiltration, nanocomposite membranes, desalination, amorphous silica, nanotoxicology, *Daphnia magna*, cytotoxicity

LISTA DE SIGLAS

APTMS	(3-aminopropil)trimetóxisilano
AEAEAPTMS	3-[2-(2-aminoetiamino)]propiltrimetoxisilano
CA	Acetato de celulose
DE	Diâmetro Efetivo
EPC	Epicloridrina
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
FAAS	Espectroscopia de Absorção Atômica por Chama
GA	Gluteraldeído
GFAAS	Espectroscopia de Absorção Atômica por Forno de Grafite
IPD	Índice de Polidispersão
LPO	Lipoperoxidação
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol il-2,5-difeniltetrazólio)
NB	Nanobastão
NF	Nanofiltração
NH SiO ₂	Nanohank de dióxido de silício
NHS	Nanohank de sílica sem amino-funcionalização
NH1	Nanohank de sílica amino-funcionalizado com APTMS
NH3	Nanohank de sílica amino-funcionalizado com AEAEAPTMS
NM	Nanomaterial
NM SiO ₂	Nanomaterial de dióxido de silício

NP	Nanopartícula
NT	Nanotubo
M0	Membrana PSU/PDA/PEI sem NM SiO ₂
MS	Membrana PSU/PDA/PEI com NHS
M1	Membrana PSU/PDA/PEI com NH1
M3	Membrana PSU/PDA/PEI com NH3
OR	Osmose reversa
PA	Poliamida
PDA	Polidopamina
PEI	Polietilenimina
PES	Poliéster
PPZ	Piperazina
PSU	Polissulfona
PSS	Poli (4-estirenosulfonato de sódio)
PZ	Potencial zeta
QTS	Quitosana
UF	Ultrafiltração

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Tamanho do poro de cada processo de filtração e tamanho relativo dos solutos a serem aplicados.	41
Figura 2 - Principais configurações dos módulos de membrana.	44
Figura 3 - Características das membranas de acordo com o tipo de filtração (1 kPa = 0,01 bar).	46
Figura 4 - Classificação da membrana polimérica de acordo com a localização da incorporação do NM.	49
Figura 5 - Estrutura monomérica da PSU.	57
Figura 6 - Esquema resumido da reação de polimerização da dopamina em polidopamina.	58
Figura 7 - Estrutura em rede da polietilenoimina.	60
Figura 8 - Estruturas químicas da molécula A- AEAEAPTMS e B - APTMS.	69
Figura 9 - Mapa metodológico da tese.	74
Figura 10 - Esquema ilustrativo das camadas da membrana e resumo do preparo.	79
Figura 11 - Esquema do SFP.	84
Figura 12 - Esquema da célula de filtração do tipo dead-end e de detalhe da colocação das membranas.	85
Figura 13 - Esquema ilustrativo do aparelho lixiviador.	87
Figura 14 - Micrografias dos NM SiO ₂ em água UP e nos diferentes meios de cultura.	97
Figura 15 - Micrografias da distribuição dos NM SiO ₂ em água e nos meios de cultura.	98
Figura 16 - Espectros FTIR das moléculas funcionalizantes e dos NM SiO ₂	100
Figura 17 - Difratoogramas dos NM SiO ₂	101
Figura 18 - Micrografias das sessões transversais das membranas.	106
Figura 19 - Detalhe dos poros da membrana de PSU.	107
Figura 20 - Micrografias das superfícies das membranas.	109
Figura 21 - Micrografias de força atômica das membranas.	111
Figura 22 - Espectros FTIR das membranas.	113
Figura 23 - Gráfico dos valores dos ângulos de contato de cada membrana.	114
Figura 24 - Gráfico do fluxo de água UP de cada membrana para as pressões 4, 6, 8 e 10 bar.	116
Figura 25 - Fluxo de permeado de cada solução testada e de água UP para cada membrana (pressão de operação: 6 bar)	118
Figura 26 - Gráfico com a rejeição (%) de cada solução para cada membrana.	119
Figura 27 - Micrografias de varredura das <i>D. magna</i> expostas a NHS, NH1 e NH3.	132
Figura 28 - Micrografias de transmissão das <i>D. magna</i> expostas a NHS, NH1 e NH3.	134
Figura 29 - Internalização de NH1 em vacúolos em <i>D. magna</i>	136

Figura 30 - Micrografias de transmissão dos ovos das <i>D. magna</i> expostas a NHS, NH1 e NH3.	138
Figura 31 - Gráfico das viabilidades celulares das células expostas ao NHS, NH1 e NH3.....	139
Figura 32 - Gráfico da LPO em células Vero através da quantificação do MDA.....	142
Figura 33 - Gráfico da produção de ERO em células Vero quando expostas a NHS, NH1, NH3 e a H ₂ O ₂	143
Figura 34 - Micrografias das células Vero após exposição a NHS, NH1 e NH3.....	145

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Comparação qualitativa das configurações de membrana.	45
Tabela 2 - Rejeição de sais por membranas de NF.	52
Tabela 3 – Composições e resultados de rejeição de metais pesados na NF.	55
Tabela 4 - Concentrações limites de metais pela legislação brasileira.	56
Tabela 5 - Resultados obtidos para ângulo de contato e rejeição dos sais MgCl ₂ e NaCl no estudo de Li et al. (2014).	62
Tabela 6 - Estudos com inserção de NM SiO ₂ em membranas de NF e seus resultados.	65
Tabela 7 - Lista de materiais utilizados na preparação das membranas.	78
Tabela 8 - Resultados de pH, PZ, DE e IPD para cada NM SiO ₂ em água e nos diferentes meios de cultura.	102
Tabela 9 - Porcentagem em massa dos elementos das membranas obtido por MEV-EDS.	110
Tabela 10 - Parâmetros de rugosidade para cada membrana.	111
Tabela 11 - Resultados de rejeição e de fluxo de permeado para AgNO ₃ , MgCl ₂ , NaCl e ZnSO ₄ para as membranas M0, MS, M1 e M3 quando submetidas a 6 bar.	120
Tabela 12 - Resultados da literatura para rejeição e permeação.	121
Tabela 13 – Resultados de CE _{50,48h} para cada NM SiO ₂ do teste agudo com <i>D. magna</i>	124
Tabela 14 - Resultados dos testes agudos realizados com os lixiviados das membranas imersas em água UP e em meio ISO.	126
Tabela 15 - Quantificação de Si nos lixiviados das membranas em água UP.	127
Tabela 16 – Resultados dos ensaios crônicos com <i>D. magna</i> expostas a NHS, NH1 e NH3.	129
Tabela 17 - Porcentagem em massa dos elementos encontrados nas antenas de <i>D. magna</i> obtido pelo EDS.	133
Tabela 18 - Resultado da CE _{50,24h} para exposição de células Vero para cada NM SiO ₂	139

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	27
1.1.	JUSTIFICATIVA	32
2.	HIPÓTESES.....	35
3.	OBJETIVOS	37
3.1.	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	39
4.1.	SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS.....	39
4.2.	NANOFILTRAÇÃO	45
4.3.	DESSALINIZAÇÃO.....	51
4.3.1.	Metais Pesados	53
4.4.	POLISSULFONA	57
4.5.	POLIDOPAMINA	58
4.6.	POLIETILENOIMINA.....	60
4.7.	RETICULAÇÃO	61
4.8.	NANOMATERIAL DE DIÓXIDO DE SILÍCIO	63
4.8.1.	Toxicidade de NM SiO₂.....	66
4.8.2.	Funcionalização.....	68
4.9.	TOXICOLOGIA AMBIENTAL	69
5.	MATERIAIS E MÉTODOS	73
5.1.	CARACTERIZAÇÃO DOS NM SiO ₂	74
5.1.1.	Morfologia	74
5.1.2.	Composição química.....	75
5.1.3.	Estrutura	75

5.1.4.	Área superficial.....	76
5.1.5.	Estabilidade em suspensão e diâmetro efetivo	76
5.2.	PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS	77
5.3.	CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA POLIMÉRICA ..	81
5.3.1.	Análises morfológicas	81
5.3.3.	Hidrofilicidade	82
5.4.	EFICIÊNCIA DAS MEMBRANAS.....	83
5.4.1.	Ensaio de filtração em bancada.....	83
5.4.2.	Ensaio de rejeição	86
5.4.3.	Quantificação de metais	86
5.6.	ENSAIOS TOXICOLÓGICOS	88
5.6.1.	Cultivo de <i>Daphnia magna</i>	88
5.6.2.	Teste agudo com <i>Daphnia magna</i>	89
5.6.3.	Teste crônico com <i>Daphnia magna</i>	90
5.6.4.	Cultura celular	91
5.6.5.	Teste de viabilidade celular (MTT)	91
5.6.6.	Lipoperoxidação (LPO).....	92
5.6.7.	Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)	93
5.6.8.	Emblocamento.....	94
6.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	97
6.1.	CARACTERIZAÇÃO DOS NM SiO ₂	97
6.2.	CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	104
6.3.	EFICIÊNCIA DAS MEMBRANAS.....	115
6.4.	ENSAIOS TOXICOLÓGICOS	124
6.4.1.	Teste agudo com <i>D. magna</i>	124
6.4.2.	Lixiviação das Membranas	125

6.4.3.	Ensaio crônico com <i>D. magna</i>	128
6.4.4.	Microscopias <i>D. magna</i>	131
6.4.5.	Viabilidade celular (MTT) em células Vero	138
6.4.6.	Lipoperoxidação (LPO) e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO) 141	
6.4.7.	Microscopia das células Vero.....	144
7.	CONCLUSÕES.....	149
8.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	153
9.	RECOMENDAÇÕES.....	154
	BIBLIOGRAFIA.....	157
	APÊNDICES.....	179

1. INTRODUÇÃO

O crescente problema mundial com o abastecimento de água potável desperta a atenção para a necessidade de desenvolver materiais eficientes com propriedades específicas para o tratamento de água, aliando quantidade e qualidade a custos reduzidos. A maior parte do planeta Terra é composta por água, porém considera-se somente 0,8% do total como potável (UNESCO, 2009). Sendo assim, é esperado que os desafios referentes a esta problemática sejam agravados nas próximas décadas.

As previsões de aumento populacional indicam que em 2050 existirão 9,31 bilhões de pessoas no mundo (UN, 2014). Ainda segundo documento de Nações Unidas (2014), a população em zonas urbanizadas em 2050 será equivalente a 66%, com número absoluto de 6,3 bilhões de pessoas, frente a 34% em zonas rurais. Somente na América Latina e Caribe, a população urbana chegará a mais de 80% em 2050 (UN, 2014). A urbanização, aliada ao uso intensivo de combustíveis fósseis, resultam em um rápido aumento na demanda por água potável e energia. Associado aos problemas decorrentes da falta de qualidade, estima-se que a demanda de água para 2050 seja elevada em 55% (VERIATO et al., 2015) principalmente devido às necessidades dos setores agroindustriais.

A crise hídrica no Brasil, nos anos de 2014 e 2015, realçou a necessidade do reuso da água. A região sudeste, compreendendo os estados de São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo e Rio de Janeiro sofreu com escassez crônica, sendo agravada pela alta densidade populacional da região e a falta do hábito de conservação e aproveitamento de água (ALMEIDA; BENASSI, 2015). Outro problema da falta de água é em relação à produção de energia. O sistema elétrico brasileiro é altamente dependente da geração hidrelétrica e a redução na quantidade de água disponível nos reservatórios afeta diretamente esta produção (GALVÃO; BERMANN, 2015). Como reflexo, houve aumento na utilização de termelétricas para suprir a demanda e consequente aumento no custo da energia produzida e consumida.

A poluição dos corpos hídricos também é outro fator a ser considerado quando se trata de tecnologias para tratamento de água. Associada à falta de chuvas, a crise hídrica na região metropolitana de São Paulo também foi decorrente da poluição. Grandes cargas de efluentes domésticos e industriais são despejadas nos corpos hídricos que abastecem os reservatórios da região (JACOBI; CIBIM; LEÃO, 2015).

Além disso, desastres ambientais, como o ocorrido em Mariana (MG), também estão ligados diretamente com a qualidade da água. O rompimento da barragem da mineradora Samarco, controlada pelas empresas Vale e BHP Billiton, despejou mais de 60 bilhões de litros de rejeitos de mineração de ferro ao longo do Rio Doce (JACOBI; CIBIM, 2015). Dentre os contaminantes encontrados no Rio Doce com concentração superior à permitida pela legislação brasileira, destacam-se os metais pesados arsênio, cádmio, chumbo, cromo, níquel, mercúrio e cobre (MARQUES, 2015). De maneira similar, em janeiro de 2019, o rompimento de outra barragem de minério de ferro da mineradora Vale em Brumadinho (MG) foi responsável por despejar lama ao longo do Rio Paraopeba. Esta lama pode conter ferro, manganês, alumínio, cromo, chumbo e arsênio, sendo que a ingestão da água do rio, recreação, pesca e consumo de alimentos que tiveram contato com a lama foi desaconselhada (RIBEIRO; CRUZ, 2019). A aldeia indígena Naõ Xohã, situada às margens do Rio Paraopeba, teve sua oferta de água potável afetada com o despejo de lama no rio, sendo necessário o uso de caminhões de água para abastecer esta população (COSTA, 2019). Outra preocupação é a possibilidade de contaminação do Rio São Francisco uma vez que o Rio Paraopeba é um dos seus principais afluentes. O São Francisco passa pelos estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Sergipe e Alagoas e é importante economicamente para esta região devido as atividades de navegação, irrigação e pesca, além de que sua transposição auxilia regiões de seca no nordeste brasileiro.

Em Florianópolis, capital do estado de Santa Catarina, a poluição de corpos hídricos traz prejuízos ao turismo da região (THOMÉ, 2016). Em 2016, a poluição do Rio do Braz atingiu a praia de Canasvieiras, resultando em surto epidêmico de vírus entéricos em moradores e turistas

da região (THOMÉ, 2016). Em 2017, outro destaque negativo foi a poluição do Rio Papaquara, sendo este um dos rios que constitui a bacia hidrográfica da Estação Ecológica de Carijós. O lançamento de efluentes da estação de tratamento de esgoto (ETE) das proximidades é apontado como principal agente poluidor do rio (POTTER, 2017).

A partir da problemática da escassez de água de qualidade e em quantidade suficiente para atender as mais diversas demandas, o desenvolvimento de membranas nanoestruturadas em camadas com propriedades específicas voltadas para a aplicação na nanofiltração (NF) e capazes de reter íons metálicos pode contribuir para sistemas de tratamento de águas que foram contaminadas por poluentes. Além disso, uma alta eficiência na dessalinização pode auxiliar comunidades que não possuem fácil acesso à água doce ou que o abastecimento de água é precário, garantindo uma boa qualidade no tratamento em espaço reduzido. Assim, localidades remotas, onde o tratamento de água é deficitário ou que não atende aos requisitos mínimos exigidos pelas legislações, podem utilizar como alternativa de tratamento de água um dispositivo de NF.

As membranas de NF auxiliam na remoção de poluentes mais difíceis de tratar, como os íons metálicos, após o tratamento convencional da água. Este refinamento resultaria em um efluente com a qualidade similar de um tratamento por osmose reversa, mas com menor gasto de energia devido à diminuição da pressão necessária.

As membranas nanoestruturadas de NF normalmente são preparadas a partir de modificações na composição e/ou superfície da membrana suporte. As modificações superficiais da membrana sobre a camada suporte geralmente partem de reações de polimerização *in situ* de filmes finos. O filme fino é o responsável pela seletividade da membrana e pode elevar a eficiência no tratamento de água (YIN; DENG, 2015). Além da seletividade, o fluxo de permeado é um importante parâmetro que está diretamente relacionado com o custo do sistema. Desta forma, é desejável um equilíbrio entre os parâmetros fluxo e seletividade para resultar na elevação da eficiência da membrana de NF.

Como camada suporte, a polissulfona (PSU) é amplamente utilizada em membranas de NF (LI et al., 2012b; MIAO; ZHANG; LIN,

2013; PANDA; DE, 2014). Entre as propriedades dos filmes finos polimerizados *in situ* em membranas nanoestruturadas, a polidopamina (PDA) é amplamente utilizada para promover compatibilidade entre a camada suporte e o filme fino responsável pela seletividade da membrana de NF (LV et al., 2016). A polietilenoimina (PEI) melhora a hidroflicidade e seletividade da membrana (LI et al., 2014; WU et al., 2014), pois sua estrutura química possui grupos aminas, que depois de polimerizados formam uma rede polimérica tridimensional. A seletividade da camada de filme fino de PEI pode ser modulada com reações químicas específicas, as quais resultam em ligações cruzadas ou reticulação dos grupos aminas. O gluteraldeído (GA) é um agente reticulante amplamente utilizado para promover ligações covalentes entre grupos aminas das cadeias poliméricas, fechando a estrutura, elevando a seletividade das membranas e reduzindo o carreamento dos NM (LV et al., 2016; ZHAO et al., 2016a).

A durabilidade e redução do fluxo de permeação das membranas de NF podem ser afetadas pela formação de *fouling* (incrustação). A prevenção da formação do *fouling* pode ser alcançada com a adição de nanomateriais (NM) como, por exemplo, nanopartículas (NP). A adição de NP em membranas tem resultado em grande avanço nas propriedades, prevenção do *fouling* e eficiência. A aplicação das NP pode ser feita tanto no suporte quanto na camada seletiva de filme fino. Embora a adição de NM possa trazer vantagens em relação a melhora das propriedades das membranas de NF, é necessário cautela quanto ao possível carreamento dos NM da membrana, pois as mesmas propriedades que tornam NM atrativos para as diversas aplicações também podem causar efeitos tóxicos para os seres vivos e meio ambiente (OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER; OBERDÖRSTER, 2005). Além disso, a lixiviação das NM promove a redução gradual da funcionalidade das membranas (YIN; DENG, 2015). A incorporação de NP de SiO₂ (ELMA et al., 2012; LV et al., 2016; WU; TANG; WU, 2013), mostraram melhorias na eficiência e propriedades das membranas. As NP SiO₂ têm como principais vantagens estabilidade, disponibilidade, hidroflicidade, boa resistência mecânica, baixo custo e são reportados melhorias na propriedade anti-*fouling*, aumento do fluxo e seletividade (ELMA et al., 2012; TALEBIAN; ZARE, 2014).

Neste trabalho foram avaliados os efeitos tóxicos de três diferentes nanomateriais de sílica (NM SiO₂), sendo eles sem (NHS) e com amino-funcionalização, para o microcrustáceo de água doce *Daphnia magna* e para a cultura de células Vero, proveniente de rim de macaco verde africano.

A amino-funcionalização se deu com as moléculas silanoamino primária (3-aminopropil)trimetóxisilano (APTMS) e silanoamino trissubstituída 3-[2-(2-aminoetilamino) etilamino]propiltrimetoxisilano (AEAEAPTMS), resultando, respectivamente, nos materiais NH1 e NH3. Adicionalmente, foram preparadas e caracterizadas membranas nanoestruturadas a partir do suporte de PSU, sendo que, sobre este, foi polimerizado *in situ* camada de PDA e camada de PEI com um dos três diferentes NM de sílica (NHS, NH1 e NH3). Ainda, as membranas foram reticuladas com glutaraldeído (GA). As camadas foram selecionadas objetivando a aplicação na dessalinização através da remoção de íons metálicos, com o intuito de aumento de fluxo e maior seletividade em relação à membrana sem adição de NM. Em função dos possíveis efeitos nocivos que a lixiviação das NM SiO₂ podem causar ao meio ambiente, avaliou-se o potencial tóxico das membranas pelo teste de toxicidade aguda com o organismo *D. magna* e a possível liberação de silício para o meio líquido lixiviado.

Neste contexto, o Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX), do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da Universidade Federal de Santa Catarina, vem produzindo estudos sobre o desenvolvimento de membranas de NF nanoestruturadas juntamente com a avaliação toxicologia e testes de eficiência na remoção de contaminantes, possuindo uma dissertação (OLIVEIRA, 2016) e uma tese (GONÇALVES, 2018) já concluídas. Sobre nanotoxicologia, o LABTOX conta com uma ampla quantidade de artigos publicados em revistas científicas internacionais, podendo-se destacar os estudos com as nanopartículas de óxido de cobre (NP CuO) sobre os organismos *Daphnia magna* e *Aliivibrio fischeri* (ROSSETTO et al., 2014) e sobre a lemnácia *Landoltia punctata* (LALAU et al., 2015); com a nanopartícula de óxido de cromo III (NP Cr₂O₃) sobre os organismos *D. magna* e *A. fischeri* (PUERARI et al., 2016) (Apêndice 4) e sobre as algas verdes *Chlamydomonas reinhardtii* (COSTA et al., 2016); estudo com nanobastões de óxido de zinco (NB ZnO) sobre o organismo *D. magna*

(GONÇALVES et al., 2018); e estudo com nanomateriais de óxido de silício (NM SiO₂) sobre o organismo *D. magna* e cultura celular Vero (VICENTINI et al., 2017; PUERARI et al., 2018) (Apêndices 5 e 6).

1.1. JUSTIFICATIVA

O relatório Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação para o quadriênio 2016-2020 (BRASIL, 2016) elencou 11 temas estratégicos para desenvolvimento, autonomia e soberania nacional. Um dos temas elencados é “Água” e tem como mote a necessidade do Brasil em investir em pesquisa e desenvolvimento de novas ferramentas para a gestão dos recursos hídricos aliado a tecnologias adaptativas (BRASIL, 2016). Dessa maneira, a presente pesquisa se justifica por estar inserida na proposta de solução para “a garantia da segurança hídrica, alimentar e energética da população brasileira”, tendo em vista que neste estudo se propõem o desenvolvimento de membrana de NF para dessalinização e remoção de metais pesados, bem como a avaliação se a tecnologia utilizada no desenvolvimento desta membrana não causa efeitos adversos ao meio ambiente.

No âmbito legal, a presente pesquisa está amparada pelo projeto “*Nanocompósitos para aplicação em nanofiltração de sais e de metais pesados de águas de abastecimento e efluentes*”, número 473046/2013-0, da Chamada Universal 14/2013 do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Este projeto visa a formação de recursos humanos em nível de mestrado, doutorado e pós-doutorado, a publicação e divulgação de conhecimento científico e o desenvolvimento de um produto eficiente, seguro e economicamente viável.

No âmbito social, os resultados do presente estudo podem servir para embasar escolhas de alternativas de tratamento de água para locais em que o tratamento convencional não seja eficiente para atender aos requisitos mínimos de qualidade de água.

No âmbito científico, a tese elucidada a influência da adição de nanomaterial de sílica (NM SiO₂) sem e com amino-funcionalização em membranas de NF e as diferentes propriedades que estes materiais conferem à tecnologia de filtração. Além disso, o estudo toxicológico destes NM SiO₂ contribui para o campo da nanotoxicologia, uma vez que demonstram a influência da funcionalização destes materiais e alguns de seus mecanismos de ação tóxica.

Dessa maneira, englobando os aspectos legal, social e científico, bem como estando inserindo num dos temas estratégicos de pesquisa no Brasil, o presente trabalho é justificado, pois demonstra relevância e inovação ao propor materiais alternativos para o tratamento de água, com a presença de nanomateriais (NM) amino-funcionalizados, bem como contribui para o campo da nanotoxicologia ao avaliar os materiais isoladamente e após aplicação nas membranas de NF.

2. HIPÓTESES

Considerando as problemáticas de aumento populacional, poluição de corpos hídricos e escassez de água de qualidade, formularam-se três hipóteses para o desenvolvimento de um material alternativo a ser aplicado na NF.

1 – A amino-funcionalização dos nanomateriais de sílica (NM SiO₂) confere maior potencial tóxico em relação aos NM SiO₂ não funcionalizados para o microcrustáceo *D. magna* e para a cultura celular Vero.

2 – A aplicação de NM SiO₂ amino-funcionalizados (NH1 e NH3) contribui para melhorar as propriedades da membrana, elevando a hidrofobicidade e a eficiência de filtração.

3 – A toxicidade dos materiais isolados não será conferida ao lixiviado das membranas, pois a amino-funcionalização resulta em maior imobilização dos NM na camada de filme fino de PEI devido à reticulação com GA.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos tóxicos de nanomateriais de sílica amino-funcionalizados isolados em *D. magna* e células Vero e imobilizados em composições de membranas poliméricas em *D. magna* e testar a eficiência na nanofiltração.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar as características dos NM SiO₂ sem (NHS) e com amino-funcionalização (NH1 e NH3);
- Preparar e caracterizar as membranas nanoestruturadas em camadas de polissulfona (PSU), polidopamina (PDA) e polietilenoimina (PEI) com os três diferentes NM SiO₂;
- Testar a eficiência das membranas no Sistema de Filtração Piloto do tipo *dead-end* quanto ao fluxo de permeação e eficiência na nanofiltração para os sais monovalentes AgNO₃ e NaCl e os sais bivalentes ZnSO₄ e MgCl₂;
- Avaliar os efeitos tóxicos da exposição aguda de NHS, NH1 e NH3 sobre o microcrustáceo *Daphnia magna*;
- Avaliar a citotoxicidade e os mecanismos de ação tóxica de NHS, NH1 e NH3 sobre células Vero;
- Avaliar o potencial tóxico do lixiviado das membranas para o microcrustáceo *D. magna* e se os NM SiO₂ foram lixiviados.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1. SEPARAÇÃO POR MEMBRANAS

Atualmente, existem diversas técnicas disponíveis para o tratamento de água e efluentes industriais. Uma delas é a separação por membranas. Essa técnica consiste no uso de membranas como barreira seletiva, regulando o transporte de substância entre dois compartimentos (ULBRICHT, 2006). Para Ulbricht (2006), a principal vantagem desta técnica sobre as outras é a seletividade de transporte da membrana, sendo que o tratamento pode ser realizado sem aditivos químicos e à baixa temperatura, o que demandaria menor consumo de energia.

Santos (2011) cita alguns processos utilizados nesta técnica:

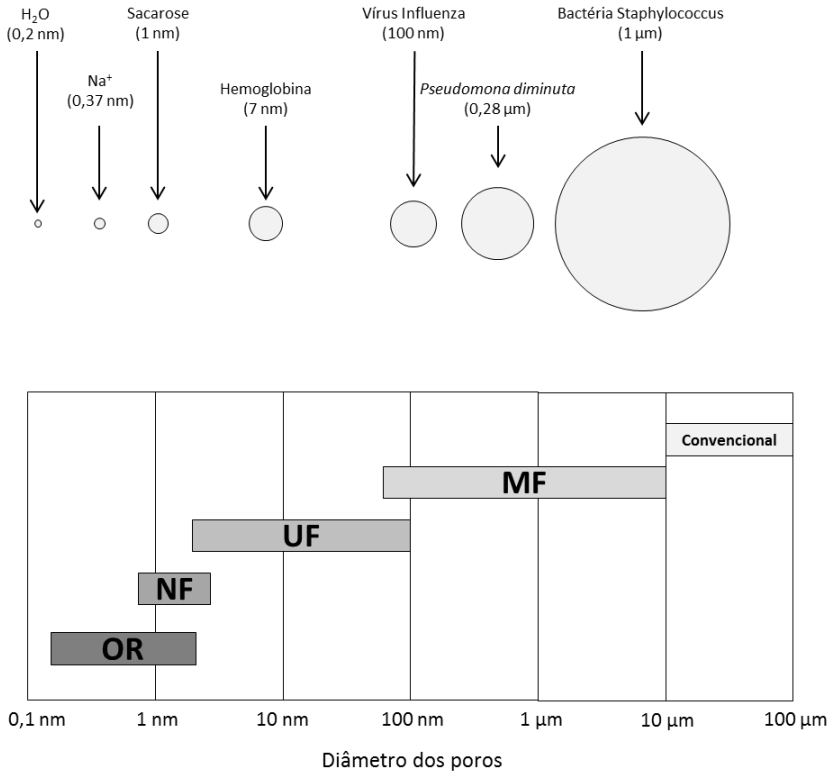
- Diálise: processo que usa diferencial de concentração como força motriz e retém moléculas de massa molar maior que 5000 Da. Permeação de íons e moléculas orgânicas de baixa massa molar;
- Eletrodiálise: diferencial de potencial elétrico como força motriz e retenção de macromoléculas e compostos não iônicos. Permeação de íons;
- Permeação de gases: força motriz pode ser combinação de diferencial de concentração e de pressão (0,2 a 0,5 bar) e retenção de gás menos permeável. Permeação de gás mais permeável;
- Pervaporação: pressão de vapor como força motriz e retenção de líquido menos permeável. Permeação de líquido mais permeável.

Porém, no processo de separação por membranas, destacam-se a microfiltração (MF), a ultrafiltração (UF), a nanofiltração (NF) e a osmose reversa (OR), que utilizam a pressão hidráulica como força motriz para separar a água dos contaminantes (METCALF & EDDY, 2014; MIERZWA et al., 2008).

A Figura 1 apresenta um comparativo do tamanho do poro característico para os processos de OR, NF, UF, MF e filtração

convencional em relação aos diferentes solutos que podem ser empregados em cada processo. As membranas utilizadas para a MF filtram partículas coloidais e bactérias de 0,1 a 10 μm de diâmetro, enquanto que as membranas de UF são capazes de reter macromoléculas dissolvidas, tais como a hemoglobina (7 nm) (BAKER, 2004). As membranas de OR são caracterizadas por serem densas, logo o mecanismo de transporte aceito por essas membranas é chamado de modelo de solução-difusão. De acordo com este modelo, a separação ocorre devido à diferença de solubilidades e mobilidades de diferentes solutos na membrana, sendo que a principal aplicação é na dessalinização de águas (BAKER, 2004).

Figura 1 - Tamanho do poro de cada processo de filtração e tamanho relativo dos solutos a serem aplicados.



Fonte: Adaptado de BAKER, 2004

Para a aplicação de pressão hidráulica sobre o líquido a ser tratado, existem dois sistemas de filtração utilizados, denominados de *dead-end* (filtração estática) e *cross-flow* (filtração tangencial). No sistema *dead-end*, o fluxo ocorre perpendicular à superfície da membrana, fazendo com que as partículas retidas se acumulem e se depositem na superfície da membrana (FANE; WANG; JIA; 2011). O acúmulo de material retido na superfície da membrana aumenta com o tempo de filtração e o incremento na espessura desta camada é responsável por diminuir o fluxo de permeação (MULDER, 1996). Já no sistema *cross-flow*, o fluxo de

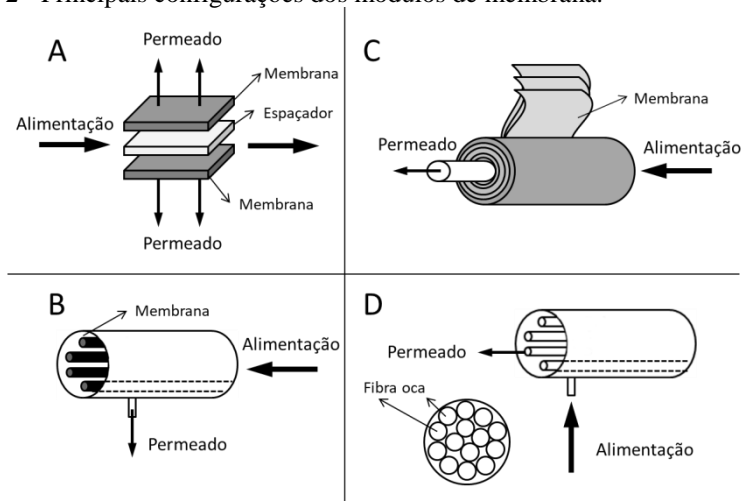
alimentação é paralelo à superfície da membrana. A filtração tangencial pode resultar em fluxos de permeação muito mais altos à medida que a corrente remove continuamente o material retido (FANE; WANG; JIA; 2011). Segundo Mulder (1996), para aplicações industriais, prefere-se o sistema *cross-flow* devido à menor tendência de formação de *fouling* que o sistema *dead-end*. Porém, a operação em sistema *cross-flow* necessita de equipamentos mais complexos e requer mais energia de operação devido à necessidade de recirculação da solução de alimentação (FANE; WANG; JIA; 2011). Assim, o sistema *dead-end* é mais usado no polimento de água e efluentes já previamente tratados, sendo necessária limpeza periódica para diminuir o efeito *fouling* (FANE; WANG; JIA; 2011).

O modo como as membranas são aplicadas nos processos de tratamento são variáveis (METCALF & EDDY, 2014). Dentre os módulos de membrana, destacam-se as seguintes configurações:

- Placas: uma das primeiras configurações de membrana empregadas em processos industriais (CHEN et al., 2011), tem estrutura simples (Fig. 2-A) e substituição de membranas é fácil, conforme Tabela 1. Essa configuração está mais próximas das membranas planas usadas em laboratórios de pesquisa (MULDER, 1996). Duas membranas são colocadas de forma semelhante a um sanduíche, com os lados de alimentação voltados um para o outro e um espaçador entre elas (CHEN et al., 2011; MULDER, 1996).
- Tubular: nesta configuração, membranas de formato tubular são inseridas em um tubo poroso de aço inoxidável, de cerâmica ou de plástico (Fig. 2-B) (MULDER, 1996). O fluxo de alimentação flui a partir do centro dos tubos e o de permeação flui através do tubo de suporte poroso (CHEN et al., 2011; MULDER, 1996). Geralmente esta configuração é usada para membranas cerâmicas (CHEN et al., 2011).

- Enrolado em espiral: neste módulo, as membranas planas são enroladas em torno de um tubo coletor central (MULDER, 1996), visualizado na Figura 2-C. A alimentação flui axialmente através do módulo cilíndrico paralelo ao longo do tubo central e o permeado flui radialmente em direção ao tubo central (CHEN et al., 2011) e esta configuração pode ser aplicada para OR, NF e UF (MULDER, 1996).
- Fibra oca: consiste de um grande número de fibras montadas em conjunto em um módulo (Fig. 2-D). As extremidades livres das fibras são frequentemente envasadas com agentes como resinas epoxi, poliuretanos ou borracha de silicone (CHEN et al., 2011). A solução de alimentação pode entrar tanto por dentro da fibra ("*inside-out*") quanto por fora ("*outside-in*"). Esse módulo é usado quando o efluente já é relativamente tratado, como em separação de gases e pervaporação. O uso na dessalinização de águas deve ser acompanhando de um pré-tratamento eficaz (MULDER, 1996).

Figura 2 - Principais configurações dos módulos de membrana.



Fonte: Adaptado de Chen et al. (2011)

Segundo Mulder (1996), a escolha da configuração das membranas deve ser realizada de acordo com questões econômicas, tendo que se levar em conta a aplicação ideal de cada módulo. Por exemplo, apesar de ser a configuração mais cara de acordo com a Tabela 1, a configuração tubular é aplicável em situações que podem gerar alto efeito *fouling*, e isso se dá uma vez que esta configuração apresenta facilidade de limpeza (MULDER, 1996). Segundo Metcalf & Eddy (2014), a configuração em placas é mais utilizada em processos industriais.

Tabela 1 - Comparação qualitativa das configurações de membrana.

	Tubular	Placas	Enrolada em espiral	Fibra oca
Densidade	Baixa	>	>	Muito alta
Investimento	Alto	<	<	Baixa
Tendência ao <i>Fouling</i>	Baixo	>	>	Muito alto
Limpeza	Fácil	<	<	Difícil
Substituição da membrana	Depende	Sim	Não	Não

Fonte: Adaptado de Mulder (1996).

Para Pawłowski et al. (1998), apesar do módulo enrolado em espiral ser o mais utilizado nas aplicações industriais, membranas planas são mais facilmente utilizadas em escala laboratorial devido a sua fácil substituição.

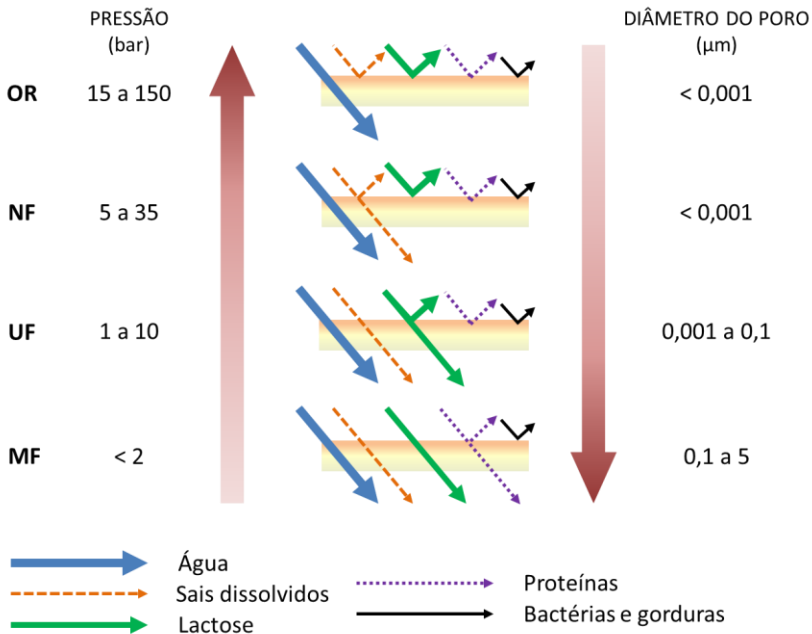
4.2. NANOFILTRAÇÃO

A NF é uma técnica de tratamento de água reconhecida no final da década de 80 (MOHAMMAD et al., 2014), sendo chamada inicialmente de “Osmose Reversa de Baixa Pressão” (VAN DER BRUGGEN; VANDECASTEELE, 2003). É uma tecnologia eficiente e ecológica para descontaminação e reuso de efluentes industriais (HILAL et al., 2004). Inicialmente aplicada para a separação de sal e lactose em indústria de laticínios, a NF tem sido utilizada em diversos segmentos (FANE; WANG; JIA; 2011), pois é eficiente na remoção de uma vasta gama de poluentes de águas subterrâneas e superficiais com o intuito ao abastecimento para consumo e reuso (VAN DER BRUGGEN; VANDECASTEELE, 2003). Sua principal aplicação é na remoção de

baixos níveis de contaminantes de águas já relativamente tratadas (BAKER, 2004).

A NF possui propriedades entre UF e OR, como pode ser observado na Figura 3. É eficaz na separação de sais inorgânicos bivalentes e polivalentes e pequenas moléculas orgânicas, sendo comumente utilizada em tratamento de efluentes e na dessalinização (MOHAMMAD et al., 2014; KAJITVICHYANUKUL et al., 2011), para remoção de micropoluentes, nitratos, arsênio, vírus e bactérias (VAN DER BRUGGEN; VANDECASTEELE, 2003).

Figura 3 - Características das membranas de acordo com o tipo de filtração (1 kPa = 0,01 bar).



Fonte: Adaptado de MIERZWA et al., 2008

A NF trabalha em um intervalo de pressões inferiores em comparação com OR, sendo assim, os gastos com energia são menores para NF. As principais vantagens das membranas de NF são menor

pressão de operação, alto fluxo, alta retenção de sais multivalentes, relativo baixo investimento e baixo custo de manutenção e operação (HILAL et al., 2004; LU; BIAN; SHI, 2002). Como desvantagem, as membranas de NF apresentam baixa rejeição a sais dissolvidos, principalmente sais monovalentes como cloreto de sódio (NaCl) e cloreto de potássio (KCl) (KAJITVICHYANUKUL et al., 2011). As membranas de NF possuem rejeição de NaCl na faixa entre 20 e 80%, enquanto que as membranas de OR conseguem reter mais de 90%. Em contra partida, as membranas destinadas a UF tem rejeição a este sal menor que 5% (BAKER, 2004). Outras características da NF são remoção de íons multivalentes acima de 99% e alta rejeição (>90%) a compostos orgânicos com peso molecular superior ao da membrana (LI et al., 2008).

O desenvolvimento da técnica de NF se baseia na criação de tecnologias cada vez melhores na filtração de substâncias de um líquido. Uma membrana é uma barreira física com permeabilidade seletiva que separa duas fases (MULDER, 1996). As membranas podem ser divididas entre naturais e sintéticas, sendo que esta última categoria pode subdividir-se em orgânicas, ou seja, membranas poliméricas ou líquidas, e inorgânicas, membranas cerâmicas ou metálicas (MULDER, 1996).

As membranas podem ser divididas quanto aos seus poros. Nos processos de UF e MF, as membranas porosas são mais utilizadas. Para OR, Pervaporação e Separação de Gases, a camada polimérica deve ser densa, sem a presença de poros visíveis (BAKER, 2004). Já as membranas de NF são categorizadas por possuírem poros com diâmetro entre 5 Å e 10 Å, estando entre membranas estritamente microporosas (UF) e membranas estritamente de solução-difusão (OR) (BAKER, 2004). A separação, neste caso, é atribuída às características intrínsecas do material que constitui a membrana (BAKER, 2004; MULDER, 1996). A maioria das membranas de NF é constituída por um suporte ou substrato poroso e sobre este é depositado uma ou mais camadas de filme fino, responsável por promover a separação de água e contaminantes.

O mecanismo de separação dos contaminantes da água em membranas de NF é caracterizado por ser uma soma de fatores. Sabe-se que o tamanho do poro é uma característica importante dessas membranas

(PAWŁOWSKI et al., 1998), cuja função se encontra na exclusão de componentes, isto é, não ocorre a permeação de compostos com tamanhos superiores ao diâmetro do poro. Outro fator que explica a eficiência na remoção de poluentes na NF é a carga da membrana. A presença de grupos iônicos na estrutura polimérica e suas dissociações, podendo ser $-\text{SO}_3\text{H}$, $-\text{COOH}$ ou $-\text{NH}_2$, por exemplo, confere carga quando a membrana entra em contato com uma solução (PAWŁOWSKI et al., 1998). Este processo é conhecido como efeito Donnan. A dissociação dos grupos iônicos ocorre tanto na superfície quanto no interior dos poros, podendo conferir característica ácida ou básica à membrana dependendo do material que foi empregado no seu desenvolvimento (MOHAMMAD et al., 2014). Devido à presença de carga quando em contato com solução salina, ocorre equilíbrio entre membrana e solução (PAWŁOWSKI et al., 1998). As concentrações iônicas na membrana são diferentes das da solução, o que gera uma diferença de potencial na interface, chamado de potencial de Donnan. A função deste potencial é neutralizar o transporte de contra-íons (íons com carga oposta à da membrana) para a fase de solução e de co-íons (íons com carga igual à da membrana) para a fase de membrana (PAWŁOWSKI et al., 1998). Dessa forma, íons com a mesma carga que os grupos iônicos da membrana sofrem exclusão e não são permeados (MULDER, 1996). O efeito do potencial de Donnan, então, é repelir o co-íon da membrana. Devido aos requisitos de eletroneutralidade, o contra-íon também é rejeitado e ocorre retenção de sal (PAWŁOWSKI et al., 1998). Assim, a exclusão de Donnan permite a remoção de íons de tamanhos menores que o poro da membrana devido à essa interação entre cargas.

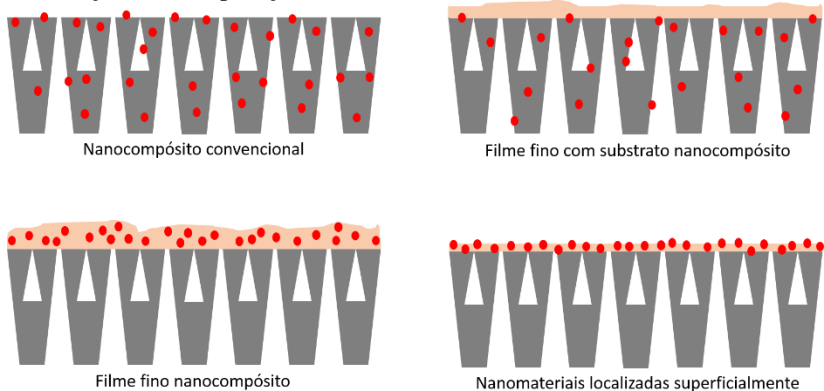
No caso das membranas poliméricas, melhoramentos como polimerização interfacial, incorporação de nanomateriais e tratamento UV, visam o desenvolvimento de membranas com maior seletividade, maior rejeição e menores problemas de incrustação (MOHAMMAD et al., 2014). Uma das técnicas utilizadas no desenvolvimento de membranas de NF é a deposição de um filme fino denso sobre um suporte poroso. Essa preparação é baseada na polimerização interfacial, que

ocorre na interface de duas fases imiscíveis para produzir uma camada de polímero muito fina e densa (WU et al., 2014).

Um dos principais problemas das membranas de NF é o efeito *fouling*. O crescimento de microrganismos sobre a membrana pode interferir nas suas propriedades hidráulicas e/ou promover um ataque biológico ao material (WANG et al., 2011). A inserção de nanomateriais (NM), como as nanopartículas (NP), tem sido apontada como uma solução para este problema. Na literatura, reporta-se que a utilização de NP ZnO (BALTA et al., 2012), NP Al₂O₃ (MAXIMOUS et al., 2010), NP TiO₂ (BAE; TAK, 2005), entre outros, foi capaz de reduzir o *fouling* das membranas, além de melhorar as propriedades de permeabilidade e rejeição de sais.

A incorporação de NM em membranas de NF pode ser classificada em 4 diferentes categorias dependendo da localização e estrutura da membrana. Na Figura 4, são apresentadas as 4 categorias. Além disso, os NM inseridos podem ser inorgânicos, orgânicos, biomateriais ou um NM híbrido com dois ou mais materiais constituintes (YIN; DENG, 2015).

Figura 4 - Classificação da membrana polimérica de acordo com a localização da incorporação do NM.



Fonte: Adaptado de YIN; DENG, 2015.

Em membranas nanocompósitas convencionais, a fabricação consiste em dispersar o NM antes do processo de inversão de fases (YIN; DENG, 2015). Os filmes finos consistem em uma camada ultra-fina sobre um suporte poroso, sendo que o seu uso tem sido empregado principalmente em dessalinização de água marinha, remoção de metais pesados, dureza, micro poluentes como pesticidas, entre outros (YIN; DENG, 2015). A utilização de NM na fabricação de filmes finos nanocompósitos é variada, sendo zeólitas, NT de carbono, SiO_2 , Ag e TiO_2 os materiais mais comuns (YIN; DENG, 2015). As membranas com camada de filme fino e substrato nanocompósito foram inicialmente desenvolvidas para avaliar a compactação, sendo que ao NM é atribuída a capacidade de promover a resistência mecânica para não haver o colapso da estrutura porosa e redução de espessura das membranas quando submetidas à pressão (YIN; DENG, 2015). Por fim, o último tipo de membrana é caracterizado por ter os NM localizados na superfície. Nesse processo, a estrutura intrínseca da membrana não é alterada, ou seja, podem-se aproveitar as membranas comerciais para efetuar as modificações superficiais pelos métodos de automontagem, deposição ou enxerto químico e com o uso de NM (YIN; DENG, 2015).

Em trabalho recente do LABTOX, Gonçalves (2018) desenvolveu uma membrana de NF composta por camada suporte de PSU com filme fino de PA e adição de diferentes concentrações de nanobastão de óxido de zinco (NB ZnO) amino-funcionalizados. A incorporação dos NB ZnO modificados diminuiu a hidrofobicidade e permeabilidade hidráulica das membranas, sendo que este fenômeno foi atribuído às concentrações elevadas de NM utilizadas (GONÇALVES, 2018). Além dessas reduções, com a incorporação dos NB ZnO foi relatado aumento no fluxo de água, moderada ou baixa rejeição a MgCl_2 e a NaCl e liberação de íons Zn pelas membranas conforme aumento da quantidade de NM adicionado, porém a quantidade liberada não foi suficiente para causar efeitos tóxicos em *Daphnia magna* (GONÇALVES, 2018).

4.3. DESSALINIZAÇÃO

O processo físico-químico de retirada de sais da água é conhecido por dessalinização e atualmente 4 métodos são adotados para tornar águas com salinidade em potável. A dessalinização pode ser feita através de membranas de OR (ALGHOUL et al., 2016), destilação multistágios (TOKUI et al., 2014), método térmico (TAMBURINI et al., 2016) e por congelamento (GAO et al., 2014). O uso de OR para dessalinização corresponde a mais fina forma de filtração existente, porém o alto custo relacionado à alta pressão empregada nesse tratamento requer o desenvolvimento de membranas com maior permeabilidade e menor pressão de operação.

De acordo com a Resolução CONAMA 357/2005, os corpos hídricos podem ser classificados em 3 diferentes categorias. As águas doces devem possuir salinidade inferior a 0,5 ‰, as águas salobras possuem salinidade entre 0,5 ‰ e 30 ‰, enquanto que as águas salinas tem salinidade superior a 30 ‰. Por salinidade entende-se que há a presença de sais dissolvidos na água, como $MgCl_2$ e $NaCl$, por exemplo. Ainda segundo a Resolução CONAMA 357/2005, as águas salobras que atendem aos requisitos exigidos para Classe I podem ser destinadas ao abastecimento para consumo humano após tratamento convencional ou avançado. Desta forma, uma alternativa para tratamento e redução da salinidade destas águas seria a NF.

Geralmente os sais dissolvidos na água são formados por metais. Os elementos dos grupos 1A (exceto o hidrogênio) e 2A da tabela periódica são classificados como metais, apesar de não se enquadrarem no termo “metais pesados”. Lítio (Li), sódio (Na), potássio (K), rubídio (Rb), céσιο (Cs) e frâncio (Fr), pertencentes ao grupo 1A, são considerados metais alcalinos, enquanto os elementos do grupo 2A, berílio (Be), magnésio (Mg), cálcio (Ca), estrôncio (Sr), bário (Ba) e rádio (Ra) são os metais alcalinos terrosos. Dentre estes metais, destacam-se o Na e o Mg, uma vez que são alvos de diversos estudos de remoção de sais que os contêm por membranas de NF. A Tabela 2 apresenta alguns estudos de dessalinização utilizando membranas de NF.

Tabela 2 - Rejeição de sais por membranas de NF.

Composição	Sal	Rejeição (%)	Pressão (bar)	Referência
PSU/CCh/PEI	MgSO ₄	91,3	6	(QIU et al., 2016)
	Na ₂ SO ₄	88,4		
	MgCl ₂	87,4		
	CaCl ₂	79,9		
	NaCl	41,5		
PAN/PDA/PEI	MgCl ₂	97*	6	(LV et al., 2015)
	CaCl ₂	95*		
	MgSO ₄	92*		
	Na ₂ SO ₄	55*		
	NaCl	47*		
PAN/QAPEEK	MgCl ₂	97,8	4	(DONG et al., 2016)
	NaCl	74*		
	MgSO ₄	61*		
	Na ₂ SO ₄	49*		

Legenda: * valor aproximado

Conforme observado na Tabela 2, no estudo de Qiu et al. (2016), a co-deposição de PEI e catecol (CCh) sobre suporte de PSU resultou na rejeição de sais na seguinte ordem MgSO₄ > Na₂SO₄ > MgCl₂ > CaCl₂ > NaCl. Sobre efeito Donnan, a membrana de carga superficial negativa apresentou maior repulsão à íons polivalentes (SO₄²⁻) que íons monovalentes (Cl⁻) (QIU et al., 2016). Outro fator que influencia a ordem de rejeição é o raio iônico de hidratação. O Mg²⁺ possui raio de hidratação igual a 0,70 nm, enquanto o Ca²⁺ tem 0,63 nm e o Na⁺ tem 0,47 nm (KIELLAND, 1973). Assim, cátions maiores são retidos com mais eficiência que cátions menores (QIU et al., 2016). A ordem de rejeição obtida por Lv et al. (2015) foi a seguinte: MgCl₂ > CaCl₂ > MgSO₄ > Na₂SO₄ > NaCl. Quando o tamanho do poro da membrana é muito maior que o tamanho do raio de hidratação do íon, a rejeição se dá principalmente pelas interações elétricas entre membrana e íons em solução (LV et al., 2015). A membrana desenvolvida por Lv et al. (2015),

ao contrário da desenvolvida por Qiu et al. (2016), possuía carga positiva, o que gera melhor rejeição para cátions polivalentes que ânions polivalentes. A maior rejeição de Na_2SO_4 em comparação a NaCl se dá pelo efeito de peneiramento (LI et al., 2012b; LV et al., 2015), uma vez que o raio de hidratação de SO_4^{2-} (0,55 nm) é muito maior que o de Cl^- (0,39 nm) (WANG et al., 2005).

A membrana de Dong et al. (2016), composta por poliéter éter cetona quaternizada (QAPEEK) sobre suporte de PAN, também possui carga superficial positiva. A ordem de rejeição obtida foi $\text{MgCl}_2 > \text{NaCl} > \text{MgSO}_4 > \text{Na}_2\text{SO}_4$ e a rejeição preferencial de Mg^{2+} sobre Na^+ é atribuída ao efeito Donnan, uma vez que a presença de grupos amônio quaternários gera uma forte força de repulsão com cátions multivalentes (DONG et al., 2016). Além disso, o SO_4^{2-} se liga facilmente aos íons da superfície da membrana, o que gera uma redução da carga efetiva da membrana e, conseqüentemente, rejeição menor para este ânion (DONG et al., 2016).

4.3.1. Metais Pesados

Os metais pesados são elementos metálicos ou metaloides (semimetais) que possuem alta densidade e que podem ser tóxicos em baixas concentrações (DUFFUS, 2002; NAGAJYOTI; LEE; SREEKANTH, 2010; TCHOUNWOU et al., 2012). Alguns destes metais são micronutrientes para os organismos (DUFFUS, 2002). Os elementos cobalto (Co), cobre (Cu), cromo (Cr), ferro (Fe), magnésio (Mg), manganês (Mn), molibdênio (Mo), níquel (Ni), selênio (Se) e zinco (Zn) são considerados nutrientes essenciais (RASKIN et al., 1994; TCHOUNWOU et al., 2012). Apesar de alguns serem considerados micronutrientes essenciais, a presença excessiva de metais pesados no organismo pode afetar organelas como membrana celular, mitocôndrias, lisossomos, retículo endoplasmático e algumas enzimas envolvidas no metabolismo celular (BOWER; LEONARD; SHI, 2005).

A contaminação ambiental por sais compostos de metais pesados é preocupante. Como poluentes nas águas, a presença de metais como As,

Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn tem como fontes as águas residuárias urbanas e industriais e as águas pluviais urbanas (VON SPERLING, 2005). Ainda segundo Von Sperling (2005), a presença de metais tem como possíveis efeitos poluidores toxicidade, inibição do tratamento biológico dos esgotos, problemas na disposição do lodo na agricultura e contaminação de águas subterrâneas. Em despejos industriais como galvanoplastia e curtumes, metais pesados conferem alta toxidez ao efluente impossibilitando o tratamento biológico (NUNES, 2012). Outras fontes de despejo de metais pesados são efluentes de tingimento, refino de petróleo, indústria química, mineração, fábricas de fertilizantes, indústria de processo fotográfico, fabricação de baterias e lixiviados de aterros (GHERASIM; MIKULÁŠEK, 2014).

Diversas técnicas podem ser empregadas para remoção de metais de efluentes, como precipitação química, troca iônica, adsorção por NM, biossorção, fotocatalise, entre outros (ZHAO et al., 2016b). Para a remoção de metais pesados de efluentes, a NF é considerada uma tecnologia promissora (AL-RASHDI; JOHNSON; HILAL, 2013; FU; WANG, 2011; GHERASIM; MIKULÁŠEK, 2014; ZHU et al., 2015). A Tabela 3 apresenta alguns resultados de rejeição de metais pesados utilizando NF.

Tabela 3 – Composições e resultados de rejeição de metais pesados na NF.

Composição	Metal	Rejeição (%)	Pressão (bar)	Referência
PVDF/A-HNTS	Cu ²⁺	47,9	3	(ZENG et al., 2016)
	Cr ³⁺	52,3		
	Cd ²⁺	44,2		
CA/QTS	Cu ²⁺	81,0	5	(GHAEI et al., 2015)
PSU/PMDC HE/QTS	Zn ²⁺	97,5	6	(JI et al., 2015)
PES/QTS	Pb ²⁺	93,0	10	(ZHANG et al., 2015)
	Ni ²⁺	96,3		
PSU/PA/PPZ	Ag	76,4	10	(SERRÃO SOUSA; RIBAU TEIXEIRA, 2015)
PSU/PPZ	Cr ³⁺	97,0	14	(RELIGA; KOWALIK-KLIMCZAK, 2015)
PES/PSU/PA	Ni ²⁺	95,0	30	(BASARAN et al., 2015)
	Cr ⁶⁺	95,0		
PSS/PEI	Ni ²⁺	94,1	4	(CHEN et al., 2014)
	Cd ²⁺	93,7		
PSU/PA	Cu ²⁺	90,0	4	(FERSI BENNANI; M'HIRI, 2013)
	Cd ²⁺	86,0		
	Zn ²⁺	93,0		
PSU/PA	Pb ²⁺	>98,0	10	(GHERASIM; MIKULÁŠEK, 2014)

Vale destacar, também, a existência de legislações brasileiras sobre a quantidade máxima de metais permitida em águas e efluentes. A Tabela 4 apresenta os limites de metais segundo a Resolução CONAMA

430/2011, referente a Padrões de Lançamentos de Efluentes, e a Portaria de Consolidação N° 5, de 28 de setembro de 2017, Anexo XX do Ministério da Saúde, referente a Padrões de Potabilidade de Água.

Tabela 4 - Concentrações limites de metais pela legislação brasileira.

METAL	CONAMA 430/2011	PRC N°5/2017
Alumínio (Al)	-	0,20 mg L ⁻¹
Antimônio (Sb)	-	0,005 mg L ⁻¹
Arsênio (As)	0,50 mg L ⁻¹	0,01 mg L ⁻¹
Cádmio (Cd)	0,20 mg L ⁻¹	0,005 mg L ⁻¹
Chumbo (Pb)	0,50 mg L ⁻¹	0,01 mg L ⁻¹
Cobre (Cu)	1,00 mg L ⁻¹	2,00 mg L ⁻¹
Cromo (Cr)	-	0,50 mg L ⁻¹
<i>Cr³⁺</i>	<i>1,00 mg L⁻¹</i>	-
<i>Cr⁶⁺</i>	<i>0,10 mg L⁻¹</i>	-
Estanho (Sn)	4,00 mg L ⁻¹	-
Ferro (Fe)	15,00 mg L ⁻¹	0,30 mg L ⁻¹
Manganês (Mn)	1,00 mg L ⁻¹	0,1 mg L ⁻¹
Mercúrio (Hg)	0,01 mg L ⁻¹	0,001 mg L ⁻¹
Níquel (Ni)	2,00 mg L ⁻¹	0,07 mg L ⁻¹
Prata (Ag)	0,1 mg L ⁻¹	-
Selênio (Se)	0,30 mg L ⁻¹	0,01 mg L ⁻¹
Sódio (Na)*	-	200 mg L ⁻¹
Zinco (Zn)	5,00 mg L ⁻¹	5,00 mg L ⁻¹

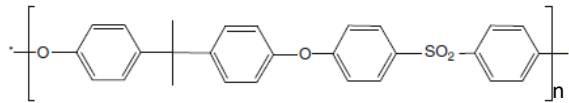
*O sódio é considerado um parâmetro organoléptico, isto é, que pode ser sentido pelos seres humanos.

Assim, tratamentos de água envolvendo a NF devem se basear nos limites máximos permitidos pelas legislações brasileiras no que tange às concentrações de metais em corpos hídricos.

4.4. POLISSULFONA

A polissulfona (PSU) é um polímero de característica predominantemente amorfa. Apresenta elevada resistência química, resistindo aos ácidos, álcalis, soluções salinas, detergentes, óleos e álcoois (SOUZA, 2006). A estrutura monomérica da PSU é apresentada na Figura 5.

Figura 5 - Estrutura monomérica da PSU.



Fonte: Adaptado de Ren; Wang (2011)

Membranas de PSU são usadas principalmente para MF, UF e membranas de separação de gases. Porém, podem ser utilizadas como uma camada suporte porosa para OR e NF (REN; WANG, 2011).

Para Nogueira (2012), as características que permitem a aplicação de PSU como membranas são:

- Elevada resistência mecânica e à deformação;
- Estabilidade em ampla faixa de pH (2 a 13);
- Excelente biocompatibilidade;
- Transformação rápida em membranas de MF e UF, oferecendo alto controle sobre o tamanho do poro e sobre a distribuição de tamanho dos poros.

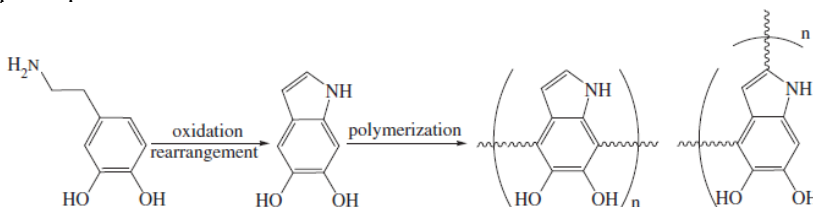
Outras características que corroboram para o uso de membranas de PSU são sua boa estabilidade físico-química, estabilidade térmica (aproximadamente 80 °C), resistência ao cloro e à oxidação (SINHA; PURKAIT, 2015). Tais características fazem da PSU uma excelente opção de suporte poroso e sustentação mecânica para as membranas de NF. Por outro lado, a desvantagem da membrana de PSU é a deposição de agentes promotores de *fouling* na superfície e nos poros devido à sua característica hidrofóbica (MULDER, 1996; SINHA; PURKAIT, 2015). No trabalho de Kumar et al. (2013b), a realização de uma blenda

QTS/PSU para membranas de UF melhorou as propriedades anti-*fouling*. A blenda com QTS, quando comparada com a membrana somente de PSU, promoveu a diminuição do ângulo de contato, ou seja, elevou a hidrofiliicidade, e aumento do fluxo de permeado (KUMAR et al., 2013b). A incorporação de NM é capaz de aumentar ainda mais a hidrofiliicidade. A inserção de nanotubos (NT) de TiO₂ em membrana de QTS/PSU promoveu melhoras na permeabilidade e nas propriedades anti-*fouling* quando comparada com a mesma composição de membrana sem a adição dos NM (KUMAR et al., 2013c). Na literatura também são encontrados trabalhos com a utilização da PSU como suporte para PDA e PEI (KASEMSET et al., 2017; LI et al., 2014; QIU et al., 2016; ZHAO et al., 2016a).

4.5. POLIDOPAMINA

A dopamina é uma substância que em sua estrutura possui os grupos funcionais catecol e amina primária (HEBBAR et al., 2016). A polimerização em polidopamina (PDA) ocorre sob condições de oxidação. Assim, a dopamina passa por um processo de auto polimerização em soluções aquosas gerando a PDA (HEBBAR et al., 2016), conforme apresentado na Figura 6.

Figura 6 – Esquema resumido da reação de polimerização da dopamina em polidopamina.



Fonte: Adaptado de Hong Xu, Xue Shi (2013)

A PDA é conhecida por possuir características altamente adesivas (HEBBAR et al., 2016; JIANG et al., 2013; LIU; SHAO; YANG, 2013).

Dessa maneira, este polímero vem sendo utilizado na literatura, entre outras aplicações, como revestimento de NM, inclusive com redução da toxicidade dos mesmos. Em estudo de Hong et al. (2011), revestiu-se semicondutores *quantum dots* (QDs) de seleneto de cádmio (CdSe) com uma camada de PDA. Este processo foi capaz de prevenir a liberação de íons tóxicos pelos QDs. A redução da toxicidade é atribuída à presença de grupos catecol da camada de PDA, que complexam os íons de Cd liberados da estrutura dos QDs (HONG et al., 2011). Apesar da dopamina ser uma substância conhecida por possuir efeitos citotóxicos, não foi observada a liberação de moléculas não-polimerizadas pela camada de PDA (HONG et al., 2011).

A presença de grupos funcionais hidroxila e amina na PDA confere aos substratos capacidade hidrofílica e anti-*fouling* (ZHU et al., 2011), características importantes quando se trata de membranas para tratamento de água. A modificação de membrana porosa de polietileno (PE) com PDA resultou em uma superfície menos rugosa e com visível redução dos poros (LIU; SHAO; YANG, 2013b). Também foi observada melhora na hidrofiliabilidade da membrana, uma vez que PE é conhecido por ser hidrofóbico. O ângulo de contato da membrana de PE sem modificação foi de $124,1 \pm 5,1^\circ$, enquanto que na presença de PDA foi equivalente a $46,7 \pm 3,8^\circ$ (LIU; SHAO; YANG, 2013). Além de melhora na hidrofiliabilidade, reporta-se que a utilização de camada de PDA funcionalizada com polivinilpirrolidona (PVP) em membrana de polipropileno (PP) foi capaz de melhorar a característica anti-*fouling* (JIANG et al., 2013). A simples inserção de membranas de UF de PSU em solução de PDA resultou em uma membrana de NF, com o aumento de hidrofiliabilidade, capacidade de rejeição completa de corantes e rejeição de 68,7% de CaCl_2 (LI et al., 2012b).

No estudo de Kasemset et al. (2017), foram testadas diferentes concentrações e diferentes tempos de deposição de PDA sobre membrana de UF de PSU. Em ensaio de permeação de água, o aumento da concentração e o aumento do tempo de deposição foram responsáveis pelo decréscimo do fluxo de água do permeado. Este efeito foi atribuído às diferentes espessuras resultantes de PDA obtidas e ao

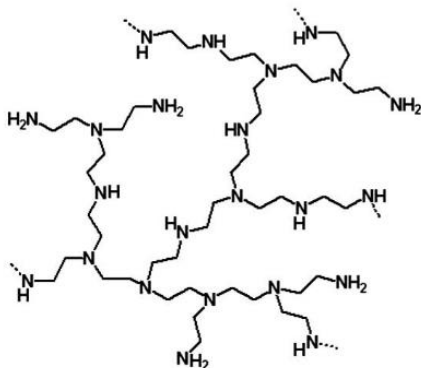
fechamento e bloqueamento de poros da membrana de PSU (KASEMSET et al., 2017). Kasemset et al. (2017) ainda apontam que a redução dos tamanhos dos poros da membrana geralmente resulta em uma maior rejeição de soluto, contudo não foram realizados ensaios para avaliar esta propriedade.

Apesar das características positivas que confere a membranas de NF, o revestimento com PDA somente não é denso o bastante para altas rejeições de sais (LV et al., 2015).

4.6. POLIETILENOIMINA

O polietilenoimina (PEI) (Figura 7) é um polímero altamente básico e carregado positivamente. Contém grupos amino primário, secundário e terciário na proporção 1:2:1. Devido a repetição do monômero etilamina, o PEI é altamente solúvel em água (VICENNATI et al., 2008). A aplicação industrial do PEI é ampla, podendo ser encontrado no tratamento de água e em aplicações biomédicas, apesar de alguns estudos demonstraram que o polímero pode ser citotóxico devido à baixa biodegradabilidade (VICENNATI et al., 2008). Além disso, na literatura reporta-se o potencial antimicrobiano do PEI (FOX et al., 2016).

Figura 7 - Estrutura em rede da polietilenoimina.



Fonte: VICENNATI et al. (2008)

O PEI se apresenta como amina polimérica favorável para a utilização na polimerização interfacial em membranas (WU et al., 2014). As membranas que possuem em sua constituição PDA e PEI apresentam interações entre o PDA e o substrato e entre o PDA e PEI baseadas em ligações químicas covalentes e não somente em adsorção física. Essa característica confere estabilidade estrutural e compatibilidade entre a camada ativa (filme fino) e camada suporte (LI et al., 2014). Outra vantagem quando se compara a utilização de PDA e PEI em relação a camada somente de PDA é o aumento da hidrofiliabilidade da superfície da membrana (LI et al., 2014).

Em estudo de Li et al. (2015), revestiu-se membrana comercial de OR de poliamida (PA) com camada de PDA e de PEI. Como resultado dessa modificação superficial, foi constatada a redução do ângulo de contato. A membrana de PA possuía ângulo de contato $65,7^\circ \pm 5,8^\circ$, enquanto que a membrana PA + PDA possuía $56,1^\circ \pm 4,2^\circ$ a membrana PA + PDA + PEI chegou a $49,2^\circ \pm 3,4^\circ$ (LI et al., 2015). Essa diminuição comprova o aumento da hidrofiliabilidade. Além disso, o revestimento PDA + PEI foi responsável por diminuir o fluxo e aumentar a rejeição de sal, assim como melhorar a capacidade anti-*fouling* (LI et al., 2015).

4.7. RETICULAÇÃO

A existência de grupos amina e hidroxila podem produzir ligações do tipo ligação de hidrogênio com água, resultando no intumescimento e no afastamento das cadeias poliméricas. Isso compromete a estabilidade dimensional e capacidade de retenção de íons. Dessa maneira, faz-se necessário a reticulação da membrana, ou seja, a formação de ligações cruzadas via reações químicas, que promovem a ligação covalente ou iônica dos grupos funcionais com a molécula reticulante. A reticulação restringe o intumescimento e o afastamento das cadeias poliméricas (TSAI; WANG, 2008). A reticulação tem como objetivo modificar as características do polímero, promovendo o aumento na estabilidade química e térmica, mudança de cor, permeabilidade e eficiência de quelação, entre outros (NETO et al., 2005).

No estudo de Li et al. (2014) foram preparadas membranas poliméricas de PDA/PEI sobre suporte de PSU. Foram testados três diferentes reticulantes: epicloriglucina (EPC), glutaraldeído (GA) e tolueno diisocianato (TDI). A EPC é conhecida por ser um ligante preferencial do grupo hidroxila (-OH) e o GA um ligante preferencial do grupo amina (-NH₂) (GONSALVES et al., 2011). Já o TDI pode atuar como ligante de ambos os grupos (DEVI et al., 2005; SRIDHAR et al., 2007). A aplicação de EPC e GA melhorou a superfície de membrana, deixando-a mais suave e densa (LI et al., 2014). A Tabela 5 apresenta os resultados referentes ao ângulo de contato e à rejeição dos sais MgCl₂ e NaCl de acordo com cada reticulante utilizado.

Tabela 5 - Resultados obtidos para ângulo de contato e rejeição dos sais MgCl₂ e NaCl no estudo de Li et al. (2014).

Reticulante	Ângulo de Contato (°)	Rejeição MgCl₂ (%)	Rejeição NaCl (%)
EPC	55,65	89,27	27,30
GA	51,97	81*	48*
TDI	>80	61*	40*

Legenda: * valor aproximado.

Quanto à hidrofiliabilidade, a reticulação com EPC e GA resultou em membranas com baixos ângulos de contato em comparação com a membrana reticulada com TDI (LI et al., 2014). Li et al. (2014) atribuíram este comportamento à presença de grupos hidrofóbicos na molécula de TDI (anel benzeno) e de grupos hidrofílicos na EPC e no GA. Na análise da eficiência, o fluxo de permeação foi muito superior quando a membrana foi reticulada com EPC. Quanto à rejeição de MgCl₂, a membrana reticulada com EPC foi a melhor, sendo este considerado como o melhor reticulante para esta composição de membrana (LI et al., 2014). Assim, foi concluído que tal efeito seja devido ao pequeno tamanho das moléculas de EPC, uma vez que há uma maior tendência deste reticulante a formar um filme fino na superfície da membrana,

auxiliando então na permeação e na redução do tamanho dos poros (HUANG et al., 2006; LI et al., 2014).

Apesar das vantagens apresentadas no estudo de Li et al. (2014) para a EPC, neste trabalho optou-se pela utilização da molécula de GA na reticulação das membranas. Conforme observado na Tabela 5, o resultado de rejeição de Mg^{2+} utilizando este reticulante foi aproximadamente 81%, enquanto que a rejeição de Na^+ foi de aproximadamente 48%, sendo esta a maior remoção deste cátion entre as três moléculas estudadas por Li et al. (2014). Outro fator a ser levado em conta é a necessidade de pH elevado (13,0) na reticulação com EPC (LI et al., 2014), o que adiciona uma etapa a mais no processo, causando impactos econômicos e em mais resíduos químicos. Além disso, a reticulação de membranas poliméricas com GA é largamente difundida na literatura, inclusive em composições contendo PDA e PEI (LV et al., 2015, 2016; ZHAO et al., 2016a).

O GA é uma molécula bifuncional que interage fortemente com compostos que possuem grupos amino na sua estrutura, sendo o mecanismo para essa ligação a interação que ocorre entre os grupos aldeído e os grupos amino livres dos compostos originando a formação de uma base de Schiff ($C=N$) (WANG et al., 2004). Uma vez que as estruturas da PDA, do PEI e das moléculas funcionalizantes dos NM empregados neste trabalho contêm grupamentos amina ($-NH_2$), o GA, por ser um reticulante preferencial deste grupo, possui o potencial de realizar uma reticulação mais eficaz entre os componentes da membrana, aumentando assim a resistência mecânica e dificultando a lixiviação dos materiais empregados.

4.8. NANOMATERIAL DE DIÓXIDO DE SILÍCIO

A sílica, dióxido de silício (SiO_2), é um composto encontrado em abundância na natureza, sendo que constitui de 90 a 95% da areia. Quando inalada em forma de pó, a sílica se torna uma preocupação ocupacional principalmente quando a exposição é prolongada (VUPPUTURI et al., 2012). Além de problemas pulmonares, como a

silicose (FILHO; SANTOS, 2006), a exposição ocupacional pode também estar relacionada a doenças nos rins (VUPPUTURI et al., 2012). Quando se encontra em nanoescala, SiO_2 geralmente é uma estrutura amorfa (FRUITIER-PÖLLOTH, 2012).

Devido às suas propriedades físico-químicas, baixo custo, facilidade de síntese e controle em nanoescala, os NM SiO_2 amorfas sintetizadas com diferentes morfologias como nanopartículas (NP), nanotubos (NT), nanobastão (NB), entre outros, são amplamente utilizados em produtos industriais tais como materiais de construção, polímeros, tintas, cosméticos, fármacos, perfumes e alimentos (MASER et al., 2015; NAPIERSKA et al., 2010).

Na área de tratamento de água, NM SiO_2 são considerados ferramentas promissoras para o desenvolvimento de membranas para NF devido às suas características de maior área superficial específica, estrutura porosa e menor tendência para aglomeração (ELMA et al., 2012; TALEBIAN; ZARE, 2014). Além disso, a adição de NM SiO_2 representa um custo menor quando comparada com a adição de NP Al_2O_3 e NP TiO_2 (JIN et al., 2012). Em UF, a adição de SiO_2 em membranas de polietersulfona (PES) para tratamento de água bruta não afetou a estrutura da membrana e aumentou a hidrofiliabilidade e capacidade anti-*fouling* (SHEN et al., 2011). No tratamento de efluentes com metais pesados, materiais mesoporosos de SiO_2 são adsorventes promissores devido a sua alta área superficial, ordenamento de poros e boa estabilidade hidrotermal (XU et al., 2012). Na literatura, ainda se reporta a remoção de Cr^{6+} através de materiais com SiO_2 (DINKER; KULKARNI, 2015).

A adição de SiO_2 em membranas de NF tem sido comumente encontrado em trabalhos relacionados a este tema (ELMA et al., 2012; JIN et al., 2012; LV et al., 2016; YIN; DENG, 2015). Alguns estudos que utilizaram NM SiO_2 em NF são apresentados na Tabela 6.

Tabela 6 - Estudos com inserção de NM SiO₂ em membranas de NF e seus resultados.

Composição	Resultado	Referência
PSU/PA + NP SiO ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Elevação na estabilidade térmica e na hidrofiliabilidade; • Melhora na permeação sem perder eficiência de filtração; • Taxa de rejeição a sais bivalentes maior que a membrana sem o NM. 	(JIN et al., 2012)
PAN/PDA/PEI + NP SiO ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento da concentração de NP SiO₂, diminuição da rejeição de MgCl₂; • Aumento no fluxo de permeado devido ao aumento da molhabilidade; • Rejeição maior que 90% para cátions bivalentes e menor que 30% para cátions monovalentes (em concentração ideal de NM SiO₂); • Fluxo de água resultante o triplo do obtido com a membrana sem a adição do NM (em concentração ideal de NM SiO₂). 	(LV et al., 2016)
PSU/QTS + NT SiO ₂	<ul style="list-style-type: none"> • Membrana de PSU incorporada com NT SiO₂ sem amino-funcionalização teve 6% de aumento no seu grau de molhabilidade; • Membrana de QTS teve aumento de 9% no grau de intumescimento quando incorporada com NT SiO₂ amino-funcionalizados; • Redução no ângulo de contato em membranas que continham NM, aumento de hidrofiliabilidade. 	(OLIVEIRA, 2016)

Morfologias porosas de NM SiO₂ podem ser importantes aliadas no tratamento de água, graças ao aumento de sua área superficial, permitindo maior contato com possíveis contaminantes presentes nos efluentes. Em comparação com os NT sintetizados no trabalho de Vicentini et al. (2017), os NH apresentaram maior área superficial, o que torna interessante sua utilização em membranas de NF. Além disso, a funcionalização desse NM com moléculas específicas pode contribuir para uma maior retenção de íons.

4.8.1. Toxicidade de NM SiO₂

Quando comparada à SiO₂ cristalina, a forma amorfa possui baixa toxicidade (FILHO; SANTOS, 2006; FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2012; NAPIERSKA et al., 2010). A absorção de SiO₂ amorfa significa que esta será excretada pelos rins sem acumulação no organismo, diferentemente do que ocorre com a forma cristalina, uma vez que esta pode ser encontrada nos pulmões e nos linfonodos (FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2012). Contudo, com o aumento da exposição ocupacional e o consumo deste material, faz-se necessária investigação dos impactos à saúde humana e ambiental (MASER et al., 2015). O estudo de Maser et al. (2015) mostrou que partículas de diferentes tamanhos de SiO₂ amorfa em altas concentrações induziram efeitos genotóxicos em células pulmonares *in vitro*. *In vivo*, porém, os mesmos materiais não apresentaram efeitos genotóxicos nos pulmões de ratos talvez devido à baixa dose que chegou às células destes animais. Na literatura, testes de toxicidade *in vitro* com NP SiO₂ mostraram internalização celular, aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ERO) e estimulação pré-inflamatória (NAPIERSKA et al., 2010). Contudo, reporta-se que a internalização de NP SiO₂ ocorra sem afetar as células (LI et al., 2012a). Segundo Napierska et al. (2010), em testes *in vivo* mostram inflamação pulmonar reversível, formação de granuloma e enfisema localizado sem a presença de fibrose pulmonar.

Outra questão a ser considerada na toxicidade de NM SiO₂ é a morfologia e superfície, pois a sílica como NM pode assumir outras

formas e ser revestida com diferentes moléculas. Vicentini et al. (2017) sintetizaram duas morfologias distintas de NM SiO₂, sendo que uma delas é inédita e foi denominada nanohank (NH) devido a morfologia esférica e porosa lembrar um novelo. Neste estudo, para ambas as morfologias NT e NH foram realizados testes de toxicidade aguda e crônica com microcrustáceo *Daphnia magna* e de viabilidade celular com células da linhagem Vero. Os resultados indicaram que, apesar de ambos os NM apresentarem potenciais tóxicos baixos, quando se faz a comparação entre NT SiO₂ e NH SiO₂, a nova forma confere maior toxicidade nos ensaios realizados (VICENTINI et al., 2017). Este resultado muito possivelmente está atrelado à forma dos materiais em questão.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recentemente vem desenvolvendo guias para proteção de trabalhadores submetidos à exposição ocupacional de NM manufaturados. Foram elencados onze NM que são fabricados em grandes quantidades e utilizados comercialmente, sendo que entre eles estão os NM SiO₂ amorfas, e os efeitos para nove parâmetros de toxicidade diferentes foram categorizados segundo seus riscos. Os parâmetros avaliados foram: toxicidade aguda, irritação de pele, irritação ocular, sensibilização respiratória ou cutânea, mutagenicidade, carcinogenicidade, toxicidade reprodutiva, toxicidade para órgãos-alvo específicos após única exposição e após exposição repetitiva (LEE et al., 2017). O relatório desenvolvido por Lee et al. (2017) indicou que a exposição aos NM SiO₂ não representa nenhum perigo quanto toxicidade aguda, danos na pele ou nos olhos, sensibilização respiratória ou cutânea, mutagenicidade em células germinativas e toxicidade reprodutiva, enquanto que para carcinogenicidade e toxicidade para órgãos-alvo específicos após única exposição não houve dados suficientes para classificação. Contudo, para o parâmetro toxicidade para órgãos-alvo específicos após exposição repetitiva, os NM SiO₂ foram classificados na Categoria 2, isto é, “substâncias que, com base em evidências em estudos de experimentação animal, podem possuir potencial para ser prejudicial à saúde humana após exposição repetida” (LEE et al., 2017).

4.8.2. Funcionalização

A funcionalização pode ser definida como uma técnica de ancorar moléculas com funcionalidades específicas na superfície de substratos ou NM via ligações covalentes ou eletrostáticas. A técnica permite modificar as propriedades superficiais dos substratos, podendo alterar, por exemplo, a carga superficial da partícula (BHATTACHARJEE et al., 2013).

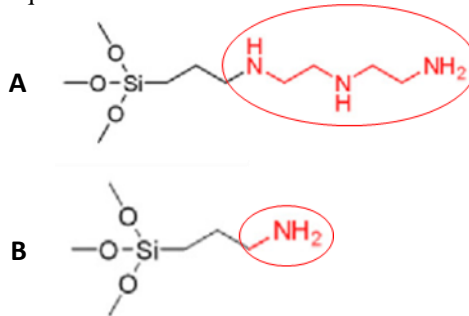
A funcionalização de NT SiO₂ com (3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS), [3-(metilamino)propil]trimetoxisilano (MAPTMS), [3-(dietilamino)propil]trimetoxisilano (DEAPTMS), [3-(2-aminoetil)aminopropil]trimetoxisilano (AEAPTMS) e 3-[2-(2-aminoetilamino) etilamino]propiltrimetoxisilano (AEAEAPTMS) mostrou que a ancoragem de moléculas silanoamino contendo grupos amino na superfície do NT aumentou a adsorção de íons Cu²⁺ na seguinte ordem de tri-amina > di-amina > amina primária > amina secundária > amina terciária (KO et al., 2013b).

Quanto à toxicidade, a funcionalização de NP SiO₂ com a molécula 3-(aminopropil)trimetóxisilano (APTMS) resultou em uma menor toxicidade para *Daphnia magna* e *Phaeodactylum tricorutum* quando comparada com a NP pura (CLÉMENT et al., 2013). Porém, a toxicidade depende do tipo de molécula funcionalizante empregada (MONTES-FONSECA et al., 2015) uma vez que a funcionalização pode potencializar o efeito tóxico dos NM (LIU et al., 2008a). O aumento do efeito tóxico foi observado por Vicentini et al. (2017). NT SiO₂ e NH SiO₂ foram amino-funcionalizados com molécula AEAEAPTMS visando avaliar e comparar a toxicidade das suas morfologias com e sem amino-funcionalização. Realizaram-se ensaios agudo e crônico com *Daphnia magna* e ensaio de viabilidade celular com célula Vero. A amino-funcionalização de ambas as morfologias de NM SiO₂ contribuíram para uma maior toxicidade em relação com as formas não funcionalizadas, possivelmente devido ao efeito “Cavalo de Tróia” (VICENTINI et al., 2017).

Neste trabalho, as moléculas funcionalizantes utilizadas foram AEAEAPTMS (tri-amina) e a APTMS (amina primária), respectivamente

apresentadas na Figura 8-A e 8-B. Destacado em ambas as figuras são apresentadas as regiões hidrofílicas das moléculas, sendo a região da AEAEAPTMS superior à do APTMS. Os comprimentos estimados de cada molécula são de 1,7 nm para a AEAEAPTMS e de 0,9 nm para a APTMS (KO et al., 2013b).

Figura 8 - Estruturas químicas da molécula A- AEAEAPTMS e B - APTMS.



Fonte: Adaptado de Ko et al. (2013b)

4.9. TOXICOLOGIA AMBIENTAL

A toxicologia ambiental pode ser definida como o estudo dos impactos de poluentes sobre a estrutura e o funcionamento de sistemas ecológicos (do molecular ao ecossistema) (LANDIS; YU, 2003), sendo esta uma ciência ampla e que envolve diferentes disciplinas como matemática, bioquímica, física, química, entre outras (YU, 2005). Identifica-se os efeitos ocasionados pelo contato, ingestão ou outra forma de acesso de substâncias específicas no interior dos organismos avaliando seus potenciais tóxicos quando liberadas no meio ambiente. Assim, esta ciência estuda as interações tóxicas de substâncias químicas no ecossistema e sua capacidade de afetar a fisiologia normal de organismos vivos (BRILHANTE; CALDAS, 1999).

Os termos toxicologia ambiental e ecotoxicologia possuem convergência de significados. O primeiro geralmente faz referência a efeitos de poluentes ambientais exclusivamente em humanos e o segundo

é aplicado tanto para humanos quanto para outras entidades ecológicas (NEWMAN; UNGER, 2003). Considera-se, também, a ecotoxicologia como uma área especializada da toxicologia ambiental, cujos objetivos dos estudos estão baseados nos efeitos ocasionados por agentes químicos e físicos sobre as populações e comunidades integrantes de ecossistemas definidos (NEWMAN, 2012; RONCO; BÁEZ; GRANADO, 2004; WALKER, 2014). Na toxicologia humana, os efeitos sobre os indivíduos são considerados a primeira preocupação, enquanto que na ecotoxicologia se dá mais enfoque sobre efeitos em populações e comunidades (WALKER, 2014). Assim, entende-se que o efeito sobre um indivíduo não necessariamente será o mesmo observado em sua população ou para o ecossistema presente. Isto se dá principalmente pelas interações da substância tóxica, dos organismos e do ambiente, proporcionando ações de bioacumulação ou não, degradabilidade e mobilidade das substâncias, bem como bioamplificação.

A partir disto, pode-se afirmar que a toxicologia ambiental e a ecotoxicologia são indissociáveis, sendo que ambas focam no estudo da interação de substâncias químicas geralmente antrópicas sobre os ecossistemas.

Um dos parâmetros para avaliação de toxicidade é a CE, ou seja, concentração que causa efeito em uma porcentagem de organismos expostos. Para *Daphnia magna*, tem-se uma classificação baseada no CE que correlaciona com o potencial tóxico de um composto. Quando em 100% de amostra há mortalidade de 10% dos indivíduos expostos, o composto é classificado como “Sem Toxicidade”. Se há de 20% a 40% de mortalidade dos organismos expostos em 100% de amostra, a classificação dada é de “Toxicidade Potencial”. Mortalidade de 50% dos organismos expostos em 100% de amostra é “Toxicidade Confirmada” e, por fim, quando há mortalidade de 50% dos organismos expostos em concentrações de amostra inferiores ou iguais a 75%, classifica-se como “Toxicidade Severa” (MARSALEK et al., 1999).

4.9.1. Nanotoxicologia

A nanotecnologia é uma ciência que lida com o desenvolvimento de materiais em nanoescala com alteração em alguma de suas

propriedades (ISO, 2005; CURTIS et al., 2006). Com o avanço cada vez mais pronunciado dessa ciência em diversos setores industriais, faz-se necessário estudos ecotoxicológicos dos produtos desenvolvidos. Ao serem despejados na natureza, estes materiais são potenciais causadores de contaminação ambiental devido ao reduzido tamanho, elevada área superficial e capacidade de aglomeração/dispersão (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010).

Dessa maneira, surge o campo da nanotoxicologia, termo utilizado a partir de meados dos anos 2000 (SHVEDOVA; KAGAN; FADEEL, 2010). Considerada, então, como uma área nova, existem poucos estudos na literatura sobre os efeitos de NM que, comparados ao seu estado bulk (macro), podem apresentar diferentes propriedades toxicológicas (CURTIS et al., 2006). A nanotoxicologia é essencialmente importante, pois as organelas celulares e os NM produzidos pelo homem possuem dimensões compatíveis, indicando que estes materiais podem entrar em contato diretamente com processos celulares vitais (SHVEDOVA; KAGAN; FADEEL, 2010).

Apesar de ser considerado um mecanismo benéfico para o campo da medicina, um dos efeitos conhecidos dos NM é chamado de *Trojan horse* (Cavalo de Tróia, em português) (CRONHOLM et al., 2013) e deve ser levado em conta na nanotoxicologia. Devido ao reduzido tamanho, os NM podem ser incorporados às células, transportando consigo agentes essenciais no tratamento de câncer, por exemplo (LI et al., 2016). Por outro lado, os materiais metálicos em escala nanométrica, podem liberar íons tóxicos no interior das organelas (LIMBACH et al., 2007; LUBICK, 2008; PERREAULT et al., 2012), justificando, assim, a pesquisa toxicológica no campo da nanotecnologia.

Ainda são poucas as regulações acerca dos riscos dos NM sobre o meio ambiente e não há legislações brasileiras sobre o lançamento de NM nos corpos hídricos. Contudo, pode-se classificar os NM (e outras substâncias de interesse) quanto à sua toxicidade. Bondarenko et al. (2013), após revisão de diversos ensaios toxicológicos na literatura e baseado na diretiva europeia EU-Directive 93/67/EEC, classificou a nanopartícula de prata (NP Ag) e NP ZnO como substâncias muito tóxicas, enquanto a NP CuO foi considerada tóxica. Nesta classificação,

leva-se em conta a menor CE_{50} média encontrada em testes em algas, crustáceos e peixes. $CE_{50} < 1,0 \text{ mg L}^{-1}$ indicam que a substância é muito tóxica a organismos aquáticos, $1,0 \text{ mg L}^{-1} < CE_{50} < 10,0 \text{ mg L}^{-1}$ a substância é considerada tóxica, $10,0 \text{ mg L}^{-1} < CE_{50} < 100,0 \text{ mg L}^{-1}$ a substância é perigosa e, por fim, $CE_{50} > 100,0 \text{ mg L}^{-1}$ não recebe classificação.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

Neste trabalho foram caracterizados e avaliados os efeitos tóxicos dos NM SiO₂ sem e com amino-funcionalização com duas moléculas distintas contendo grupos silanoaminos. As moléculas funcionalizantes utilizadas foram AEAEAPTMS (tri-amina) e a APTMS (amina primária). Estes NM foram sintetizados com objetivo de aplicá-los em membranas poliméricas contendo polissulfona (PSU) como substrato e filme fino de polidopamina (PDA) e polietilenoimina (PEI) reticuladas com gluteraldeído (GA) para a dessalinização inclusive de sais que continham metais pesados. As membranas, após preparadas, foram caracterizadas e suas eficiências de rejeição foram testadas para as substâncias AgNO₃, ZnSO₄, MgCl₂ e NaCl. Por fim, as membranas foram submetidas a lixiviação para avaliar se houve desprendimento de NM SiO₂ e se são capazes de conferir toxicidade à água.

Todos os NM SiO₂ utilizados neste estudo foram sintetizados pela pesquisadora Denice Schulz Vicentini no LABTOX do departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS) na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A metodologia de síntese e funcionalização dos NM SiO₂ está descrita no artigo publicado por Vicentini et al. (2017). Os ensaios foram conduzidos nas dependências do LABTOX e demais laboratórios integrados da universidade.

Para facilitar a leitura, os NM SiO₂ desenvolvidos neste trabalho foram chamados:

- NHS – Nanohank SiO₂;
- NH1 – Nanohank SiO₂ funcionalizado com molécula amina primária (APTMS);
- NH3 – Nanohank SiO₂ funcionalizado com molécula tri-amina (AEAEAPTMS).

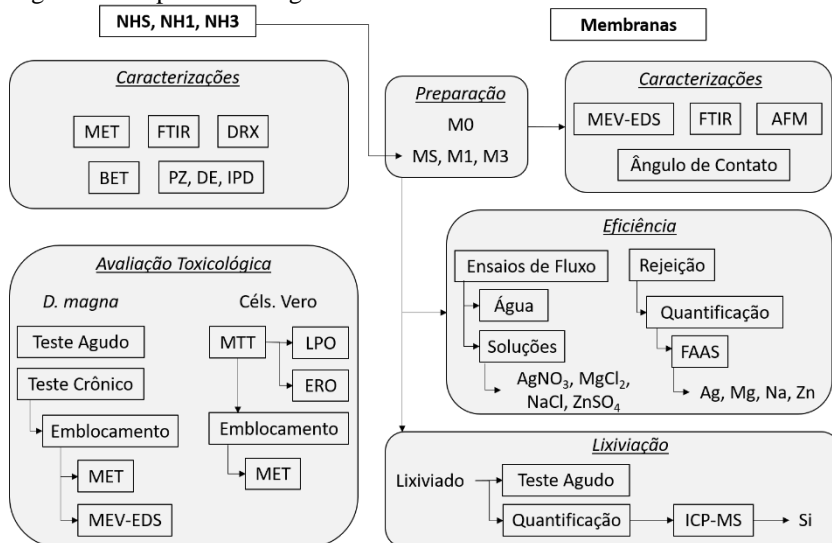
As membranas desenvolvidas também foram renomeadas para M0, MS, M1 e M3, sendo:

- M0 – Membrana sem incorporação de NM;
- MS – Membrana com incorporação de NHS;
- M1 – Membrana com incorporação de NH1;

- M3 – Membrana com incorporação de NH₃.

O mapa metodológico do trabalho pode ser observado através da Figura 9 em que são apresentadas todas as etapas experimentais referentes à tese.

Figura 9 - Mapa metodológico da tese.



Fonte: O autor.

Todas as etapas metodológicas são descritas nos tópicos a seguir.

5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS NM SiO₂

A caracterização dos NM teve como objetivo avaliar o tamanho e morfologia dos materiais, a área superficial e verificar a funcionalização.

5.1.1. Morfologia

A morfologia, a distribuição, o diâmetro médio e o potencial de aglomeração dos NM foram avaliados através da técnica de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). A metodologia de preparação das

amostras consistiu em suspender os NM SiO₂ em água ultrapura (UP) com auxílio do ultrassom (Q500 Sonicator 500W, QSonica, USA) empregando a potência de 165 W por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram gotejadas sobre grades de cobre revestidos com carbono. As análises foram realizadas no microscópio modelo TEM JEM 1011 (JEOL Ltd., Tóquio, Japão), localizado no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC. Da mesma maneira, analisou-se os NH diluídos nos diferentes meios de cultura utilizados nos ensaios toxicológicos (ISO, M4 e RPMI) a fim de investigar se houve influência dos meios nos materiais.

5.1.2. Composição química

Para obtenção dos grupos funcionais presentes nos NM, utilizou-se a técnica de Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). Nesta técnica, aplica-se radiação infravermelha à amostra. Alguns raios são absorvidos enquanto outros apenas atravessam a amostra, ou seja, são transmitidos. Como cada material absorve e transmite diferentes espectros no infravermelho, esta técnica é capaz de fornecer uma impressão específica para cada amostra, ou seja, os grupos funcionais presentes na amostra. Assim sendo, a funcionalização de um material pode ser evidenciada através do aparecimento das bandas específicas dos grupos funcionais presentes na molécula funcionalizante ligados aos NM.

As análises foram realizadas na Central de Análise do Departamento de Química (QMC) da UFSC. O equipamento utilizado foi espectrofotômetro Bruker FT-IR Alpha. As amostras foram prensadas com KBr para formar pastilhas. As pastilhas foram analisadas no intervalo de número de ondas entre 4000 e 400 cm⁻¹.

5.1.3. Estrutura

Os materiais podem ser caracterizados por difração de raios-x (DRX) para identificar se a estrutura é cristalina e/ou amorfa. No caso de materiais cristalinos, os difratogramas permitem identificar a estrutura cristalina e a(s) fase(s) presente(s) no NM.

A análise foi realizada no Laboratório de Caracterização Microestrutural (LCM), do Departamento de Engenharia Mecânica (EMC) da UFSC. As amostras de NHS, NH1 e NH3 foram analisadas em Difratorômetro de raios-X da marca Philips, modelo X'Pert. O ângulo de difração 2θ é registrado de 5 a 60° em temperatura ambiente e o tubo utilizado como fonte dos raios-X é de cobre, $\text{CuK}\alpha$, com $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$.

5.1.4. Área superficial

Para partículas sólidas, usualmente se utiliza o método BET para medição da área superficial do material. O método recebe este nome pois foi desenvolvido por Brunauer, Emmet e Teller, o qual ficou conhecido como método BET (BRUNAUER et al., 1938). Também é conhecido como Teoria de Adsorção Multimolecular, pois consiste na adsorção física de um gás inerte, usualmente o nitrogênio (N_2) a baixas temperaturas.

A análise da área superficial foi realizada no Laboratório de Materiais Elétricos (LaMatE), do Departamento de Engenharia Elétrica (EEL) da UFSC. Para a análise, resfriou-se a amostra a 77 K durante uma hora no próprio equipamento. Submeteu-se a ciclos de adsorção e dessorção através da injeção de nitrogênio líquido. A área superficial específica foi calculada pelo software do equipamento através da equação BET.

As amostras de NM SiO_2 foram analisadas na forma de pó através do equipamento NOVA® Surface Area Analyzer, modelo NOVA 1200e (Quantachrome Instruments).

5.1.5. Estabilidade em suspensão e diâmetro efetivo

O potencial zeta (PZ) foi medido para avaliar a estabilidade do material em suspensão. As suspensões são consideradas estáveis quando os valores absolutos de PZ são maiores que 30 mV (MURDOCK et al., 2008). Quanto mais estável, menor a sedimentação das partículas suspensas em meios líquidos.

Quando uma partícula está em meio líquido (água ou meios de cultura, por exemplo), geralmente há a formação de uma camada elétrica

dipolar em sua superfície. O tamanho da partícula mais essa camada superficial constituem o diâmetro efetivo. Este parâmetro, então, é fortemente relacionado à força iônica do meio em que a partícula está inserida.

O IPD é um parâmetro usado para indicar a variação da distribuição dos diâmetros efetivos das suspensões de materiais. Valores iguais ou inferiores a 0,3 são considerados monodispersos e apresenta uma faixa estreita de diâmetros (KÜLKAMP et al., 2009), enquanto que valores superiores indicam a polidispersão de diâmetros efetivos das suspensões.

As análises dos 3 parâmetros foram realizadas no LABTOX utilizando o equipamento Nanobrook 90Plus PALS (Brookhaven, Nova Iorque, EUA). As amostras em pó foram suspensas com auxílio de ultrassom em água UP, meios ISO, M4 e RPMI com uma concentração igual a $250 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

5.2. PREPARAÇÃO DAS MEMBRANAS POLIMÉRICAS

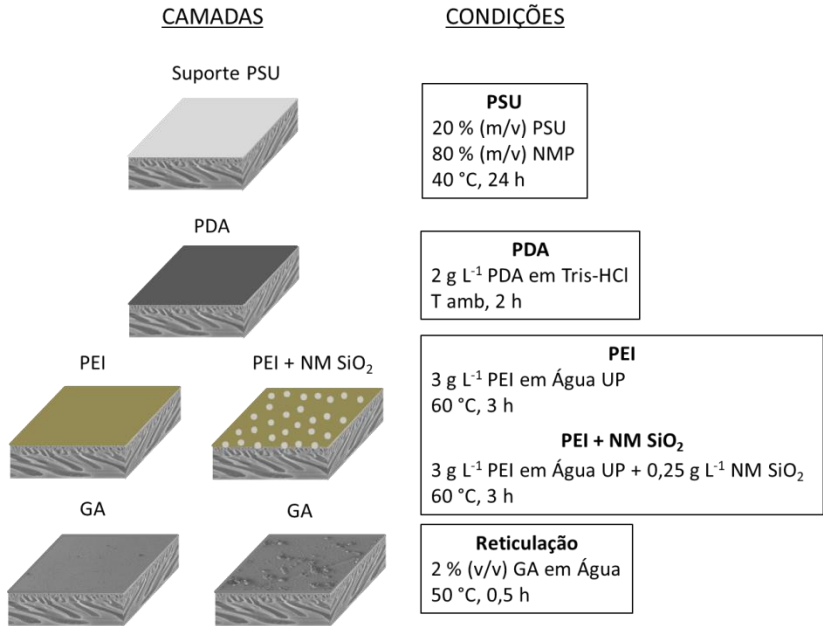
Para a preparação das membranas, foram utilizados os materiais descritos na Tabela 7.

Tabela 7 - Lista de materiais utilizados na preparação das membranas

MATERIAL	ESPECIFICAÇÕES	ORIGEM
Polissulfona (PSU)	Massa molar 2,2 x 10 ⁴ g mol ⁻¹	Sigma Aldrich
Polidopamina (PDA)	-	Sigma Aldrich
Polietilenoimina (PEI)	Massa molar 7,5 X 10 ⁵ g mol ⁻¹	Sigma Aldrich
Tris	Pureza ≥ 99,8%	Sigma Aldrich
Ácido clorídrico (HCl)	Pureza 99%	VETEC
Gluteraldeído (GA)	-	Sigma Aldrich
Etanol (EtOH)	-	LAFAN Química Fina Ltda.
Água de Osmose Reserva (OR)	Condutividade: 0,05 μS	LABTOX

As membranas de NF foram preparadas com 4 composições diferentes. A primeira composição (M0) consiste no suporte de PSU com a deposição de filme fino de PDA/PEI sem a incorporação de NM. As outras 3 composições (MS, M1 e M3) consistem em membranas com o NM SiO₂ adicionado ao filme de PEI. Todas as composições foram reticuladas com GA. Um esquema ilustrativo das camadas e o resumo do preparo das membranas são apresentados na Figura 10.

Figura 10 - Esquema ilustrativo das camadas da membrana e resumo do preparo.



A membrana de PSU foi preparada a partir da pesagem de 1 g de de PSU solubilizado em 5 mL de N-metil-2-pirrolidona (NMP), mantendo a porcentagem 20% de polímero em relação ao volume de NMP e agitado a 40 °C por 24 h. Após completa solubilização, o fluído viscoso foi vertido em uma placa de vidro e espalhada com o auxílio de “*doctor’s blade*” (espalhador com controle de espessura), ferramenta que garante a homogeneidade da espessura da membrana. Depois, a placa de vidro contendo a solução de PSU foi imersa em água para a completa inversão de fase. Posteriormente, a membrana foi lavada com sucessivas trocas de água e água/etanol para remoção do excesso de solvente. Por fim, a membrana foi retirada da água e seca em temperatura ambiente. As membranas de PSU após secas eram cortadas em discos com diâmetro de 4,5 cm.

O preparo do filme de PDA/PEI foi baseado na metodologia proposta por Lv et al. (2015) com algumas modificações. Antes da etapa de deposição do filme fino, as membranas de PSU foram deixadas em EtOH por 30 minutos e posteriormente foram acondicionadas em água por, pelo menos, 24 h.

Para a formação do filme de PDA foi necessária a preparação de solução de Tris-HCl, fundamental para a dissolução do polímero. A preparação desta solução consistiu em pesar 0,3028 g de Tris e diluição em 50 mL de água. Após, a solução de Tris (50 mmol L^{-1}) foi despejada em balão volumétrico de 200 mL, adicionou-se 12,2 mL de solução HCl 50 mmol L^{-1} e completou-se o balão com água. O pH da solução Tris-HCl foi corrigido para 8,5 com HCl concentrado.

Foi dissolvido 0,08 g de PDA em 40 mL de Tris-HCl (concentração 2 g L^{-1}). O disco de membrana de PSU foi então submerso nesta solução e ficou sob agitação à temperatura ambiente por 2 h. Após o período determinado, a membrana de PSU/PDA adquire coloração escura. O excesso de solução foi descartado e a membrana PSU/PDA foi lavada com água UP. Em seguida, foi realizada a dissolução de PEI em água, consistindo em 0,12 g de polímero em 40 mL (concentração 3 g L^{-1}). A membrana PSU/PDA recém-formada foi, então, submersa nesta nova solução, em contato por 3 h a $60 \text{ }^\circ\text{C}$. Após o período determinado, a membrana PSU/PDA/PEI adquire coloração amarela escura. O excesso de solução é descartado e a membrana é novamente lavada com água UP. Por fim, foi preparada uma solução de GA 2,0 % v/v em água. A membrana PSU/PDA/PEI foi submersa nessa solução para promover a reticulação dos grupos funcionais. Essa etapa teve duração de 30 minutos e ficou sob aquecimento de $50 \text{ }^\circ\text{C}$.

Para a preparação das membranas MS, M1 e M3, o NM SiO_2 correspondente a cada membrana foi adicionada à solução de PEI e água, passando por processo de ultrassonicação por 5 min a 165 W. A concentração dos NM SiO_2 a serem incorporados foi de $0,25 \text{ g L}^{-1}$. Essa concentração foi escolhida por ser a metade da concentração utilizada por Lv et al. (2016) em seu trabalho utilizando NP SiO_2 . Optou-se por uma única concentração para todos os NM SiO_2 da presente pesquisa a fim de possibilitar comparação entre eles.

As membranas foram estocadas em água para posterior realização dos testes previstos.

5.3. CARACTERIZAÇÃO DA MEMBRANA POLIMÉRICA

A caracterização da membrana teve por finalidade avaliar a formação de poros, a superfície da membrana e a presença dos NM SiO₂ inseridos. Também foi possível avaliar mudanças em sua hidrofiliabilidade quando inseridos os NM SiO₂.

5.3.1. Análises morfológicas

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) possibilita elevada profundidade no foco, gerando imagem com aparência tridimensional. Dessa maneira, ele é usualmente utilizado para caracterização de materiais, incluindo NM. Acoplado ao MEV, tem-se o EDS (*Energy Dispersive Spectroscopy*) em que é possível identificar e quantificar os elementos químicos nos materiais (MALISKA, 2003).

As membranas foram avaliadas por meio de microscopia MEV acoplado a um canhão de emissão de campo (FEG) da superfície e da seção transversal. Esta análise também foi realizada no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME), utilizando o equipamento JEOL JSM-6701F *Scanning Electron Microscope* (JEOL Ltd., Tóquio, Japão). Todas as membranas foram revestidas com ouro (Au) para a análise.

Para a seção transversal, foi necessário realizar um polimento das amostras de membrana. Após corte com lâmina (marca Wilkinson Sword), as membranas foram revestidas com Au e submetidas ao polimento com feixe de argônio no Polidor de Seção Transversal modelo SM-09010 (JOEL Ltd., Tóquio, Japão) para realização do polimento iônico. O EDS foi realizado a partir de imagens de regiões da superfície das membranas.

Já a Microscopia de Força Atômica (AFM) é uma técnica que permite conhecer a topografia da superfície de membranas através da formação de mapas topográficos. As membranas foram analisadas através

do microscópio de força atômica Nanosurf, EasyScan2. Ele é operado em modo *tapping* com frequência de varredura de 1.0 Hz com resolução de 512 x 512 pixels. As análises foram conduzidas no Laboratório de Optoeletrônica Orgânica e Sistemas Anisotrópicos (LOOSA) do Departamento de Física da UFSC. As imagens foram tratadas com o software WSxM 4.0 (HORCAS et al., 2007).

5.3.2. Composição química

A espectroscopia FTIR, com o método de reflexão total atenuada (ATR), foi utilizada para determinação da estrutura das moléculas orgânicas, visando determinar os grupos funcionais presentes na composição da membrana nanoestruturada. Esta técnica permite identificar as modificações nos grupos funcionais ou aparecimento de novos grupos funcionais após as reações de formação das camadas de filmes finos sobre o suporte de PSU e também indica a formação das ligações cruzadas, resultantes da reticulação.

As membranas foram analisadas no espectrômetro *Cary 600 Series FTIR Spectrometer* (Agilent Technologies, Califórnia, EUA) da Central de Análises do Departamento de Engenharia Química e de Alimentos da UFSC. Os espectros das membranas foram obtidos por refletância total (ATR) diretamente das superfícies das membranas. Com esta análise, observaram-se nos espectros os diferentes grupos funcionais presentes em cada material constituinte da membrana.

5.3.3. Hidrofilicidade

O teste do ângulo de contato avalia a hidrofilicidade da membrana através da técnica da gota séssil. A análise foi realizada no Laboratório de Materiais Vitrocerâmicos (Vitrocer) do departamento de Engenharia Mecânica (EMC) da UFSC.

Quando o ângulo de contato é maior que 90°, o líquido não molha a superfície, não ocorrendo o espalhamento. Quando é menor que 90°, há o molhamento e o líquido se espalha espontaneamente e quando o ângulo é próximo a 0°, considera-se o molhamento total e o líquido se espalha indefinidamente (LUZ; RIBEIRO; PANDOLFELLI, 2008).

5.4. EFICIÊNCIA DAS MEMBRANAS

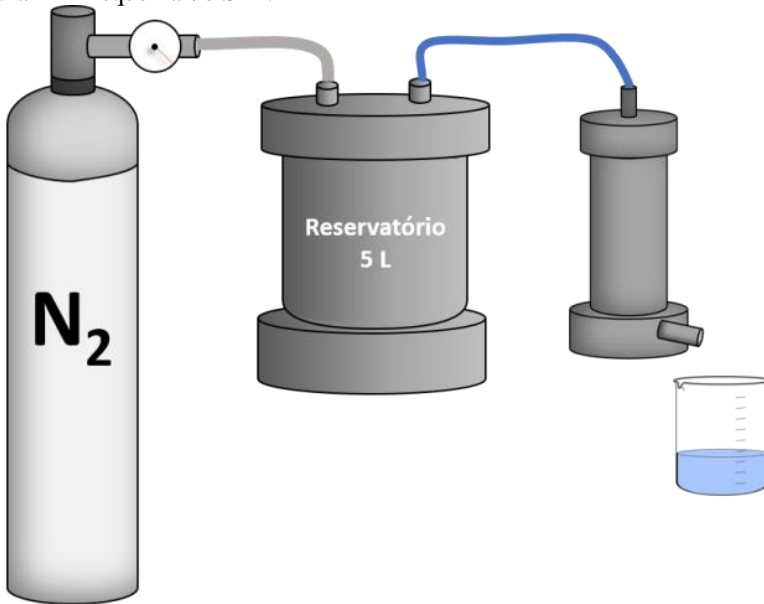
A eficiência das membranas foi avaliada para determinação de sua validade como membrana de NF.

5.4.1. Ensaio de filtração em bancada

Os ensaios de filtração em bancada foram realizados no LABTOX através de Sistema de Filtração Piloto (SFP). Este equipamento foi confeccionado em aço inoxidável e possui reservatório com capacidade volumétrica de 5 L. O equipamento opera em fluxo perpendicular (operação *dead-end*) e sob pressão constante. O sistema é apresentado na Figura 11 em esquema fora de escala real. Utilizou-se N_2 por este ser um gás inerte, não reagindo com as soluções salinas nem com a membrana.

O cilindro de N_2 possuía 1,4 m de altura e 24 cm de diâmetro. O reservatório possuía 25 cm de altura e diâmetro de 16 cm. Já a célula de filtração possuía 16 cm de altura e diâmetro de 4 cm, com capacidade de armazenamento estimada em 200 mL. Ressalta-se, ainda, a presença de manômetros a fim de regular a pressão empregada no SFP.

Figura 11 - Esquema do SFP.

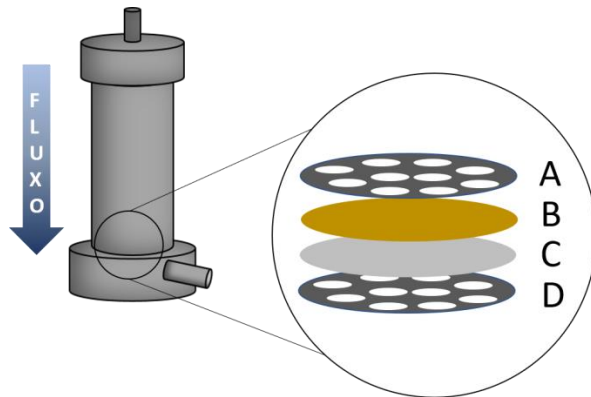


Fonte: O autor

A área total da membrana produzida era de aproximadamente 15,9 cm², porém a fixação na célula de filtração correspondia a um diâmetro de 4 cm, o que corresponde a uma área aproximada de 12,6 cm². Na célula de filtração, a membrana era fixada com auxílio de *O-Rings*, isto é, anel de vedação para prevenir o vazamento de gás e de líquido.

Para o funcionamento do sistema, colocou-se a membrana entre duas telas metálicas. Para evitar o aparecimento de defeitos nas membranas oriundos dos furos da tela metálica inferior, foi colocado um tecido TNT entre a tela e a membrana. Essa configuração é apresentada no esquema da Figura 12. A área de filtração da membrana é calculada em função do número de orifícios existentes na tela metálica inferior e da área individual de cada orifício. Este valor é de 0,00107521 m². Inicialmente, fez-se a compactação da membrana com água UP utilizando 10 bar de pressão por 1 h.

Figura 12 - Esquema da célula de filtração do tipo *dead-end* e de detalhe da colocação das membranas.



Fonte: O autor

Legenda: A – Tela metálica superior; B – Membrana; C – Tecido TNT; D – Tela metálica inferior.

Para o fluxo de água UP, fez-se um gradiente de pressão compreendendo 4, 6, 8 e 10 bar. O permeado era coletado a cada 5 min em béqueres e pesado em balança de precisão. Fez-se no mínimo 3 réplicas de cada membrana, sendo que para cada pressão o tempo total de filtração foi de 40 minutos.

O fluxo do permeado foi determinado pela Equação 1.

$$J = \frac{V}{A \cdot t} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:

J = fluxo de permeado ($L \cdot m^{-2} \cdot h^{-1}$);

V = volume permeado (L);

A = área efetiva da membrana (m^2);

t = tempo de coleta.

5.4.2. Ensaio de rejeição

O ensaio de rejeição foi realizado com o permeado do ensaio de filtração das soluções de nitrato de prata (AgNO_3), cloreto de magnésio (MgCl_2), cloreto de sódio (NaCl) e sulfato de zinco (ZnSO_4), a fim de averiguar os íons Ag^+ , Mg^{2+} , Na^+ e Zn^{2+} . As concentrações de cada solução eram de 1000 mg L^{-1} . Para este ensaio, optou-se por manter uma pressão fixa de 6 bar a fim de averiguar a eficiência de nanofiltração sob baixa pressão, uma vez que valores usuais de pressão nesta técnica variam de 5 a 35 bar. O fluxo de permeado da filtração das soluções também foi medido através da Equação 1 e o permeado foi coletado nas mesmas condições.

A eficiência de remoção dos metais foi avaliada com a mensuração da diferença de concentração do permeado e da solução de alimentação, de acordo com a Equação 2.

$$R = \left(1 - \frac{c_p}{c_i}\right) \cdot 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Em que:

R (%) = percentual de rejeição de íons metálicos;

C_p = concentração do permeado;

C_i = concentração inicial da solução de alimentação.

Para cada membrana, fez-se no mínimo 3 réplicas e os ensaios de rejeição duraram no mínimo 1 hora a fim de obter volume de permeado suficiente para as análises de quantificação.

5.4.3. Quantificação de metais

A quantificação da concentração dos metais testados (Ag, Mg, Na e Zn) foi realizada antes e depois do ensaio de filtração através de análise em espectroscopia de absorção atômica por chama (FAAS). O equipamento SpectrAA 50-B (Varian, Austrália) está localizado no Laboratório Integrado de Meio Ambiente (LIMA) do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (ENS) da UFSC.

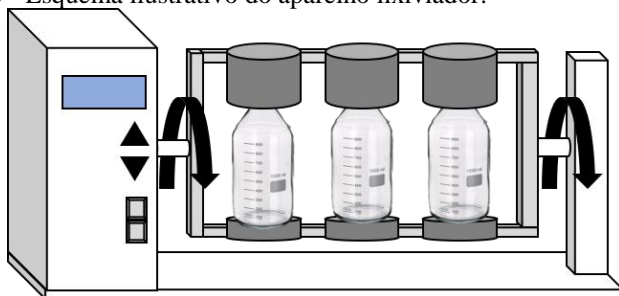
Para a leitura, as amostras foram acidificadas com ácido nítrico (HNO_3) para obtenção de $\text{pH} < 2$.

5.5. LIXIVIAÇÃO DAS MEMBRANAS

A lixiviação das membranas seguiu as recomendações da ABNT NBR 10.005/2004 com algumas modificações. Concentrações de membranas de 1 g L^{-1} (aproximadamente 11 membranas) foram deixadas no aparelho lixiviador por um período de tempo de 18 horas a 32 RPM. A Figura 13 mostra um esquema deste equipamento. As setas pretas indicam que as garrafas de borosilicato são rotacionadas ao longo do eixo do equipamento.

A lixiviação foi realizada em água UP e, para os testes de toxicidade aguda, também foi realizada em meio ISO, referente ao ensaio agudo com *D. magna*.

Figura 13 - Esquema ilustrativo do aparelho lixiviador.



Fonte: O autor.

A fim de verificar se houve desprendimento de NM SiO_2 das membranas, quantificou-se a concentração de Si presente no lixiviado em água UP. A quantificação se deu por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) com introdução da amostra por nebulizador pneumático (equipamento marca Perkin Elmer, modelo NexION 300 D, Shelton, EUA) no Laboratório de Espectrometria Atômica e de Massa (LEMA) no Departamento de Química (QMC) da UFSC.

5.6. ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

Para a avaliação toxicológica de NHS, NH1 e NH3 foram realizados o teste agudo e crônico com *D. magna*. As *D. magna* expostas no ensaio crônico foram emblocadas e analisadas através de MET e MEV-EDS.

Realizaram-se os ensaios de viabilidade celular (MTT), de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de lipoperoxidação (LPO) com células da linhagem Vero. Também foram realizados os emblocamentos das células Vero contaminadas com os NM SiO₂ para visualização em MET.

Para as membranas poliméricas M0, MS, M1 e M3, foram realizados ensaios agudos com *D. magna* após lixiviação das membranas em água UP e em meio ISO.

5.6.1. Cultivo de *Daphnia magna*

O cultivo do microcrustáceo *D. magna* no LABTOX é realizado seguindo as prescrições da ABNT NBR 12.713/2016. Os organismos são mantidos em béqueres de vidro de 2 L e armazenados em estufa com temperatura controlada à $18 \pm 2^\circ\text{C}$ e fotoperíodo de 16 h de luz. Cada recipiente é preenchido com volume aproximado de 1200 mL de meio de cultura M4 (NBR 12.713, 2016), onde são mantidos até 30 indivíduos. Renova-se o meio M4 três vezes por semana, sendo os organismos transferidos para o novo meio e alimentados, descartando o meio antigo. A alimentação é feita no mesmo dia da troca do meio e o alimento utilizado é a alga *Scenedesmus subspicatus*, inoculada em meio nutriente preparado no laboratório em conformidade com a norma NBR 12.713/2016.

Na troca, somente os indivíduos adultos são transferidos para o novo recipiente, enquanto que os filhotes ou são descartados em um recipiente com hipoclorito de sódio ou são reservados para a utilização em testes do laboratório.

5.6.2. Teste agudo com *Daphnia magna*

Este teste é realizado em laboratório sob condições específicas e controladas visando a avaliar a toxicidade de um agente nocivo sobre o organismo-teste quando este é exposto a um curto período de tempo. Os ensaios seguem de acordo com a NBR 12.713/2016 (ABNT, 2016).

Em cada recipiente de teste foram colocados 10 indivíduos jovens de *D. magna* e, ao final das 48 h correspondentes à duração do teste, contaram-se quantos organismos se encontravam imóveis em cada diluição. Os resultados foram tratados estatisticamente pelo método de *Trimmed Spearman-Kärber* e os valores obtidos foram expressos $CE_{50,48h}$, ou seja, Concentração Efetiva que causa imobilidade a 50% da população exposta.

Cada recipiente utilizado no teste possui capacidade máxima de 50 mL. As diluições inseridas em cada béquer possuem volume máximo de 25 mL. Não há alimentação nem troca do meio. Os testes foram realizados em réplicas e possuíram um teste controle somente com água reconstituída ISO capaz de validar o ensaio. Caso houvesse mortalidade acima de 10% neste teste controle, o ensaio não seria validado, conforme norma. A sensibilidade do ensaio foi realizada com diluições de dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$) e deve estar entre os valores $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ e $1,7 \text{ mg L}^{-1}$.

Para a realização destes testes, utilizou-se NHS, NH1 e NH3 em pó diluído em meio ISO e sonicado a 165 W por 2 min (Q500 Sonicator 500W, QSonica, USA). A concentração-mãe era de 10 g L^{-1} e as diluições para os ensaios variaram de 0,1 a 10 g L^{-1} .

A metodologia do ensaio agudo também foi empregada para as análises toxicológicas com os lixiviados das membranas sendo que para estas amostras os resultados foram expressos em $CE_{50,48h}$ e Fator de Diluição (FD). O FD é um parâmetro que indica em qual diluição não foi observado efeito tóxico, isto é, a diluição em que não houve imobilização ou mortalidade de nenhum organismo. Os FD investigados foram 1, 2, 4, 8 e 16, que representam, respectivamente, 100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25% de lixiviado.

A lixiviação das membranas foi realizada em água UP e, para confirmar se os efeitos tóxicos eram provenientes da lixiviação ou se apenas da exposição ao meio sem nutrientes, também se realizou o procedimento em meio ISO. Todas as diluições para os testes de toxicidade aguda foram realizadas usando meio ISO.

5.6.3. Teste crônico com *Daphnia magna*

A avaliação dos efeitos subletais de uma amostra é realizada a partir de ensaios em que o período de exposição compreende parte significativa do ciclo de vida do organismo. No caso de testes crônicos com *D. magna*, o período de tempo em que os organismos são submetidos à amostra é de 21 dias.

Ao final do período do teste, os resultados são tratados estatisticamente e os valores obtidos são CENO – Concentração de Efeito Não-Observado e CEO – Concentração de Efeito Observado.

Os parâmetros analisados em um ensaio crônico com *D. magna* são: longevidade, reprodução e crescimento. É possível também observar alterações morfológicas. O parâmetro de reprodução consistiu em contar o número de filhotes por *D. magna* ao longo dos 21 dias. A média de filhotes por réplica é realizada dividindo-se o número de filhotes pelo número de posturas de uma *D. magna*. O parâmetro de crescimento consiste em medir através de lupa de aumento e régua milimetrada o comprimento de cada *D. magna* sobrevivente após 21 dias de ensaio. Já o parâmetro de longevidade consiste em realizar a contagem de indivíduos adultos sobreviventes após 21 dias. Os valores para estes três parâmetros são comparados com os do teste controle e, após análise estatística, são obtidos a CENO e a CEO. Também foi observado o tempo (em dias) necessário para a primeira postura de cada organismo.

A disposição do teste crônico consiste em 10 béqueres por diluição enfileirados, bem como o teste controle, sendo que é colocado um organismo neonato por béquer. Há troca do meio M4 e alimentação 3 vezes por semana. O teste com *D. magna* é uma adaptação da ISO 10.706/2000 (ISO, 2000) e da NBR 13.373/2010 (ABNT, 2010).

Para os ensaios com NHS, NH1 e NH3, as concentrações utilizadas foram as subletais, isto é, que não apresentaram efeito agudo. As

concentrações para o teste com NHS foram 6,25; 12,50; 25,00; 50,00; 100,00; 250,00 e 500,00 mg L⁻¹. Tanto para NH1 quanto para NH3, as concentrações avaliadas foram 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,50; 25,00 e 50,00 mg L⁻¹.

5.6.4. Cultura celular

As células da linhagem *Vero* são provenientes de rim de macaco verde africano. A linhagem foi adquirida do Instituto Adolfo Lutz (São Paulo, Brasil). Realizou-se a manutenção das células uma vez por semana em fluxo laminar a fim de garantir ambiente estéril. Manteve-se as células em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), 2% de L-glutamina (200 mM), 1% de penicilina (50 U mL⁻¹) e estreptomicina (50 µg mL⁻¹). A temperatura foi mantida a 37 °C e a atmosfera com 5% de CO₂ (MATIAS; CREPPY, 1998; MELEGARI, 2010).

5.6.5. Teste de viabilidade celular (MTT)

A fim da determinação da viabilidade celular, realizou-se o teste de MTT. O teste foi baseado nas metodologias propostas por Nevozhay (2014) e Perreault et al. (2011) com algumas adaptações. Para realização do ensaio, a concentração de células utilizada foi no mínimo em 2×10^4 céls mL⁻¹.

Avaliou-se a viabilidade das células *Vero* através do ensaio com [brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (MTT), em que foi observada a atividade mitocondrial. As células foram incubadas em microplacas de 96 poços por 24 h com o meio de cultura em condições iguais ao cultivo (37 °C e 5% de CO₂). Depois de formado o tapete celular nos poços da microplaca, o meio foi descartado e as células foram expostas ao NHS, NH1 e NH3 diluídos em RPMI por 24 h. As concentrações avaliadas variaram de 0,04 g L⁻¹ a 5,00 g L⁻¹. Realizou-se um controle negativo, em que foi utilizado somente o meio RPMI, e um controle positivo com dodecil sulfato de sódio (SDS), substância conhecida por ser tóxica às células.

Ao final do período de exposição, o meio foi retirado por inversão da placa e adicionou-se 200 μL de solução de MTT 0,5 g L^{-1} diluída em RPMI. Esta solução foi preparada somente na hora do uso. A placa foi recoberta com papel alumínio para evitar a incidência de luz e incubada por 2 h em estufa nas mesmas condições do cultivo para a formação dos cristais de formazam. Após, a solução foi removida cuidadosamente com uma micropipeta e foram adicionados 200 μL de dimetil-sulfóxido (DMSO). Para a diluição dos cristais de formazan, agitou-se o DMSO nos poços por 2 min. A leitura da absorbância foi realizada em leitora automática de microplacas no comprimento de onda de 570 nm. Com as absorbâncias de cada poço, pôde-se aplicá-las no software Cherburator (NEVOZHAY, 2014) para a determinação das $\text{CE}_{50,24\text{h}}$ e viabilidades celulares.

5.6.6. Lipoperoxidação (LPO)

A molécula malondialdeído (MDA) é gerada como um dos produtos finais do ataque de radicais livres à membrana fosfolipídica das células, processo conhecido por lipoperoxidação (LPO) (MATIAS AND CREPPY, 1998; MELEGARI et al., 2012; PERREAULT et al., 2012). Os níveis de MDA foram quantificados de acordo com a metodologia proposta por Matias and Creppy (1998) com adaptações (MELEGARI et al., 2012; PERREAULT et al., 2012).

As células Vero foram incubadas a uma concentração inicial de 1×10^5 cels mL^{-1} em microplacas de 24 poços por 24 h. Após esse período de adesão, as células foram intoxicadas por 24 h com as amostras em concentrações equivalentes a $\text{CE}_{50,24\text{h}}$ obtida no ensaio MTT e a metade dessas concentrações ($\text{CE}_{50,24\text{h}}/2$). As concentrações avaliadas nesse ensaio, então, foram (em g L^{-1}): 0,738 e 1,477 para NHS; 0,127 e 0,254 para NH1; e 0,058 e 0,117 para NH3. Todas as amostras foram sonicadas a 165 W por 1,5 min. As células do controle foram expostas somente ao meio RPMI. Ao final da exposição, as células foram suspensas e centrifugadas por 5 min a 800 g e 4 °C. O sobrenadante foi removido e as células foram ressuspendidas em 250 μL de tampão SET (0,1 M NaCl, 20 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 8,0) e agitadas vigorosamente.

Alíquotas de 25 μL da suspensão celular foram retiradas de cada Eppendorf para dosagem de proteínas pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Para essa quantificação, absorbâncias em 595 nm foram medidas em espectrofotômetro UV-Vis (UV6100S, Global Trade Technology, Ribeirão Preto, Brasil). A curva de calibração foi obtida através de solução padrão de albumina bovina (BSA) e pode ser visualizada no Apêndice 2.

Ao volume restante dos Eppendorfs, foram adicionados 25 μL de SDS 7%, 300 μL de HCl 0,1 N, 40 μL de ácido fosfotungstíco 1% e 300 μL de ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) 0,67%. Os frascos passaram por vórtex e foram mantidos no escuro a 90 °C por 1 h. Após esse período, os tubos foram resfriados com banho de gelo (0 °C) por 10 min.

O complexo TBA-MDA formado foi extraído adicionando 300 μL de n-butanol. Realizou-se nova centrifugação por 10 min a 5000 g e 4 °C. A fase butanólica foi removida e o MDA quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC-fluorescência (1220 Infinity LC, Agilent Technologies, Califórnia, EUA). A coluna usada no equipamento foi C18, SB-5 μm de porosidade (250 \times 4,6 mm) com injeção automática de 40 μL . A fase móvel isocrática foi metanol:água 40:60 (v/v), em pH 8,4 (ajustado com KOH 0,5 M), e taxa de fluxo de 0,5 mL min^{-1} . A curva de calibração do MDA é apresentada no Apêndice 3. O resultado obtido foi expresso em quantidade de MDA por mg de proteína.

5.6.7. Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

O ensaio de produção de ERO foi baseado na metodologia proposta por Mhyre et al. (2003) e Schoultz et al. (2012). Neste método, a molécula 2,7-diclorodihidrofluoresceína diacetato (H2DCF-DA) é clivada e oxidada gerando a molécula fluorescente 2,7-diclorofluoresceína (DCF) como produto no meio intracelular.

Inicialmente, 1×10^5 céls mL^{-1} foram incubadas em placas de 24 poços nas mesmas condições do cultivo. Após o período de adesão, o meio de cultura foi aspirado e as amostras foram inseridas. Os NM SiO₂ foram diluídos em meio RPMI em concentrações equivalentes às CE_{50,48h} obtidas no ensaio MTT. As diluições foram sonicadas a 165 W por 1,5 min. Dessa maneira, as células Vero foram expostas a 1,477 mg L^{-1} de

NHS, 0,254 g L⁻¹ de NH₁ e a 0,117 g L⁻¹ de NH₃. As células também foram expostas a um controle negativo (RPMI) e a um controle positivo (1 mM H₂O₂). Após 24 h de exposição, as amostras foram aspiradas e as células foram lavadas com PBS. A próxima etapa consistiu em adicionar 50 µM H₂DCF-DA em cada poço e as placas foram mantidas a 37 °C e 5% CO₂ no escuro por 40 min. A H₂DCF-DA foi, então, aspirada e as células lavadas novamente com PBS, deixando 400 µL por poço no final da última lavagem. Ao final, a fluorescência foi medida usando o leitor de placa SpectraMax Paradigm (Molecular Device LCC, Califórnia, EUA) com comprimento de onda de excitação de 485 nm e de emissão 530 nm. As absorbâncias foram normalizadas pelo controle negativo e foram expressas em porcentagem (%). Foi realizada análise de variância one-way ANOVA seguida por teste Tukey de comparação múltipla para determinar as diferenças significativas entre o controle negativo e as amostras (p < 0,05).

5.6.8. Emblocamento

Para a visualização de danos celulares através de microscopia, as células Vero e as *D. magna* (teste crônico) expostas aos NM SiO₂ foram emblocadas em resina spurr (SPURR, 1969) no Laboratório de Biologia Celular Vegetal (LABCEV) do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética da UFSC.

Células na concentração de 5 x 10⁵ céls mL⁻¹ foram expostas em placas de 6 poços às CE_{50,24h} respectivas a cada NM SiO₂. Após 24 h de exposição, retirou-se o contaminante de cada poço e acrescentou-se 1 mL de tripsina para descolamento das células. As células suspensas foram aspiradas e colocadas em eppendorfs de 2 mL. Fez-se a lavagem das células com PBS através de centrifugação dos eppendorfs. Em seguida, fez-se a fixação com solução de gluteraldeído 2,5 % e tampão caco 0,1 M. A pós-fixação foi realizada com solução de ósmio 1,0 % e tampão caco 0,1 M. A próxima etapa consistiu em sucessivas lavagens com tampão caco 0,1 M e desidratação com concentrações crescentes de acetona. Após esta etapa, fez-se a infiltração com resina spurr em concentrações crescentes até 100%.

Para a análise em MET, fez-se a realização de cortes ultrafinos (60 a 70 nm de espessura) através de navalha de diamante nos blocos.

Para o emblocamento das *D. magna*, foram coletados organismos sobreviventes da menor CEO obtida para cada NM SiO₂. Para a exposição à NHS, a concentração escolhida foi 50 mg L⁻¹, para NH1 foi 3,12 mg L⁻¹ e para NH3 também foi 3,12 mg L⁻¹. Para MET, optou-se por analisar o intestino e os ovos dos organismos expostos. Após fixação, os organismos foram cortados com auxílio de bisturi e os intestinos e os ovos foram separados com auxílio pinça. O emblocamento ocorreu de maneira similar à metodologia utilizada para as células Vero.

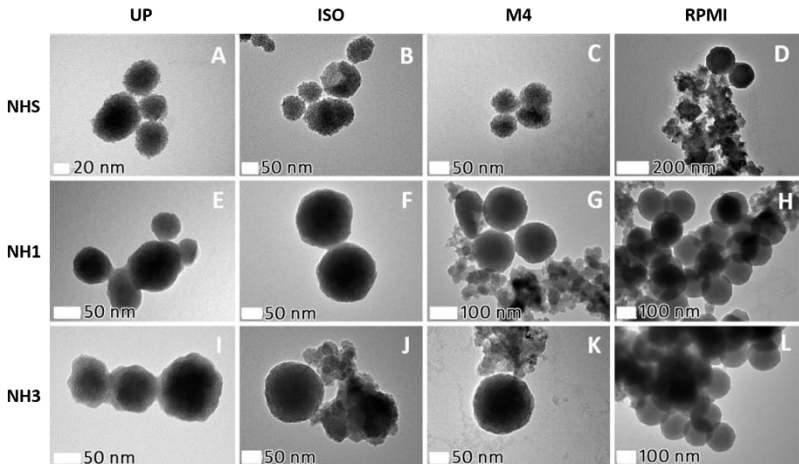
Já para o MEV-EDS, as *D. magna* foram fixadas por inteiro e a única diferença de procedimento foi a desidratação. Esta ocorreu em concentrações crescentes de etanol. Após a completa desidratação das amostras, estas passaram pelo processo de Ponto Crítico e foram revestidas com Au no próprio LCME.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1. CARACTERIZAÇÃO DOS NM SiO₂

A Figura 14 apresenta as micrografias obtidas por MET dos NHS diluídas em água UP (Fig. 14-A), em meio ISO (Fig. 14-B), em meio M4 (Fig. 14-C) e em meio RPMI (Fig. 14-D). Também são apresentadas as diluições de NH1 em água UP (Fig. 14-E), em ISO (Fig. 14-F), em M4 (Fig. 14-G) e em RPMI (Fig. 14-H). Por fim, a Fig. 14-I é do NH3 disperso em água UP, a Fig. 14-J é o NH3 em meio ISO, a Fig. 14-K é NH3 em M4 e a Fig. 14-L é o NH3 em RPMI. Todos os materiais apresentaram morfologia esférica, porosa e seus diâmetros médios ficaram abaixo de 100 nm. Em todas as imagens foi visualizado partículas conectadas umas às outras por fios de SiO₂.

Figura 14 - Micrografias dos NM SiO₂ em água UP e nos diferentes meios de cultura.



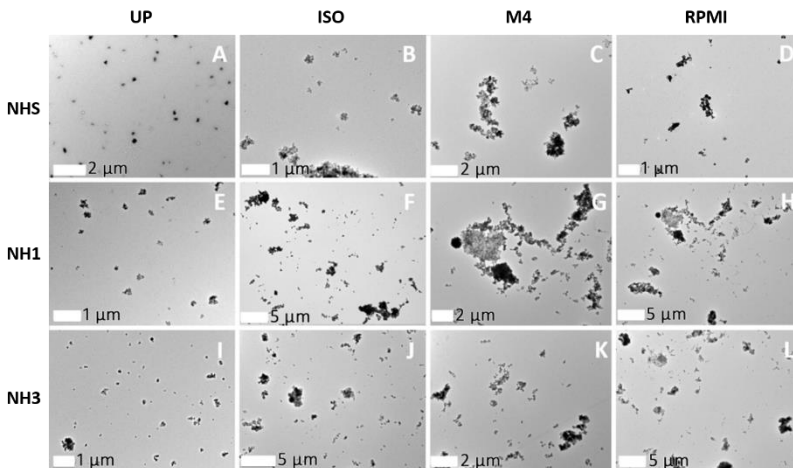
Legenda: A – NHS em UP; B – NHS em ISO; C – NHS em M4; D – NHS em RPMI; E – NH1 em UP; F – NH1 em ISO; G – NH1 em M4; H – NH1 em RPMI; I – NH3 em UP; J – NH3 em ISO; K – NH3 em M4 e L – NH3 em RPMI.

Fonte: Figuras 13-A, D, E, H, I e L: PUERARI et al. (2018).

O diâmetro médio da NHS foi mensurado em $48,2 \pm 13,1$ nm, enquanto o de NH1 foi $80,2 \pm 18,1$ nm e o de NH3 foi $84,7 \pm 19,5$ nm. As imagens de MET do NHS disperso em água UP revelaram uma diferença significativa em termos de diâmetro médio de partícula quando comparado com NH1 e NH3 dispersos no mesmo meio. Também foi visualizado que os fios que fazem a conexão entre as partículas tiveram sua espessura aumentada nas amostras amino-funcionalizadas em relação a NHS.

A Figura 15 apresenta os mesmos NM SiO₂ da Figura 14, permitindo uma melhor visualização da distribuição dos NM SiO₂ quando dispersos nos diferentes meios utilizados nesta pesquisa. Foi observado uma tendência de todos os NM SiO₂ à formação de aglomerados conforme a diluição em meios que contém sais em relação somente à água UP.

Figura 15 - Micrografias da distribuição dos NM SiO₂ em água e nos meios de cultura.

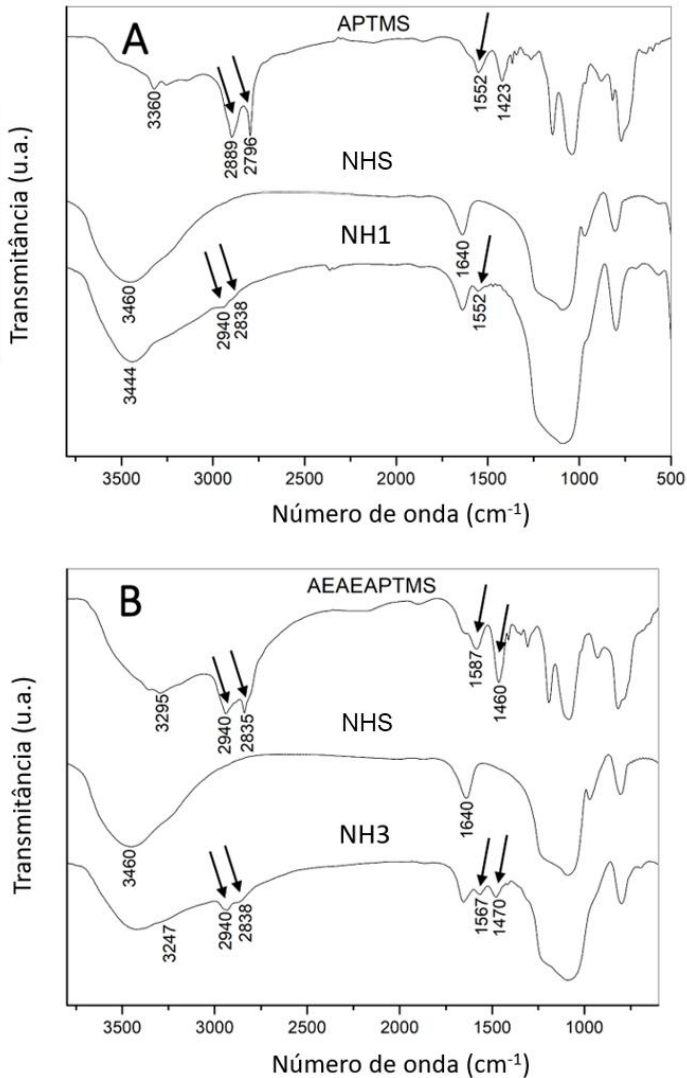


Legenda: A – NHS em UP; B – NHS em ISO; C – NHS em M4; D – NHS em RPMI; E – NH1 em UP; F – NH1 em ISO; G – NH1 em M4; H – NH1 em RPMI; I – NH3 em UP; J – NH3 em ISO; K – NH3 em M4 e L – NH3 em RPMI.

Fonte: Figuras 14-D, H e L: PUERARI et al. (2018).

A Figura 16 mostra os espectros de FTIR dos NM SiO₂ e das moléculas funcionalizantes. As bandas características da molécula funcionalizante APTMS (Fig. 16-A) e AEAEAPTMS (Fig. 16-B) apareceram aproximadamente em 3360 cm⁻¹ e em 3295 cm⁻¹, sendo atribuídas a deformação axial dos grupos amina. Na mesma região, foi verificada a sobreposição de bandas de vibração do estiramento de Si-OH presente nas moléculas funcionalizantes, assim como foi observado no espectro de NHS. Para AEAEAPTMS e NH₃ (Fig. 16-B), as bandas em 2940 cm⁻¹ e 2835 cm⁻¹ foram atribuídas aos estiramentos vibracionais assimétrico e simétrico do C-H alifático, respectivamente. Outra banda que caracteriza a presença de grupo funcional amina (N-H) apareceu em 1587 cm⁻¹ e foi atribuída às vibrações das deformações angulares simétricas no plano da amina. Em 1460 cm⁻¹, a banda atribuída à vibração da deformação angular simétrica do CH₂ foi verificada. O espectro de NHS apresentou bandas em 3460 cm⁻¹ e 1640 cm⁻¹, referentes às vibrações de estiramento e deformação de moléculas de OH e de hidratação de Si-OH, respectivamente. O ombro em 3247 cm⁻¹ pode ser atribuído à vibração de estiramento dos grupos Si-OH na estrutura de SiO₂ amorfa (MUSIC et al., 2011). Bandas em regiões similares aparecem no espectro do APTMS e NH₁ (Fig. 16-A).

No espectro de NH₁ (Fig. 16-A) e no de NH₃ (Fig. 16-B), as bandas características do NHS e das moléculas funcionalizantes foram observadas, evidenciando a funcionalização dos materiais. As bandas que confirmaram a funcionalização aparecem em aproximadamente 2940 cm⁻¹ e 2838 cm⁻¹, sendo atribuídas à vibração de estiramento assimétrico e simétrico do C-H alifático e em 1567 cm⁻¹ (Fig. 16-B) e 1552 cm⁻¹ (Fig. 16-A), essas atribuídas à vibração de deformação angular simétrica no plano N-H. A presença de grupos funcionais C-H e N-H nos espectros de NH₁ e NH₃ indicaram a ancoragem de molécula funcionalizante na superfície dos NM SiO₂, uma vez que o NHS não possui carbono ou amina em sua estrutura. Na Fig. 16, as setas pretas indicam as bandas das moléculas amino-funcionalizantes que aparecem nos espectros de NH₁ e NH₃. A banda em 1423 cm⁻¹ apresentada no espectro de APTMS não foi completamente evidente no espectro de NH₁ (Fig. 16-A), porém bandas em regiões similares foram observadas para AEAEAPTMS e NH₃ (Fig. 16-B).

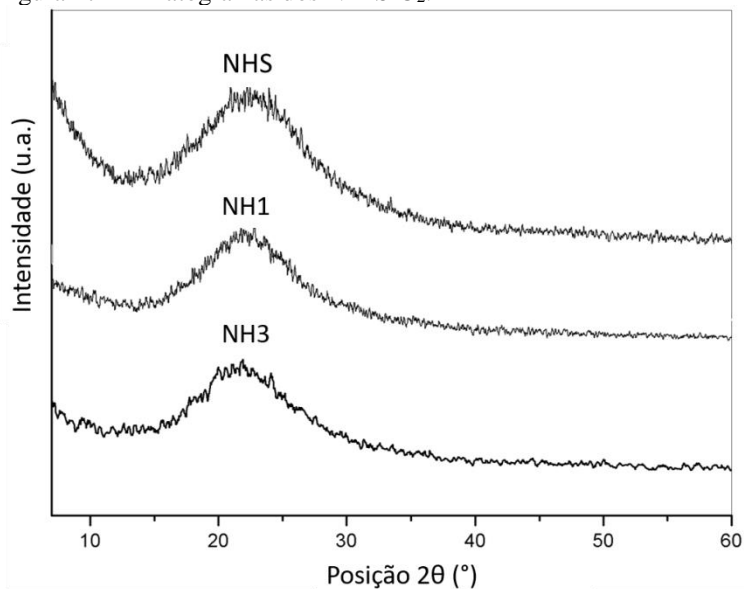
Figura 16 - Espectros FTIR das moléculas funcionalizantes e dos NM SiO₂.

Legenda: A - espectros de APTMS, NHS e NH1; B - espectros de AEAEAPTMS, NHS e NH3.

Fonte: Adaptado de PUERARI et al. (2018).

A Figura 17 mostra os difratogramas de NHS, NH1 e NH3 obtidos através da análise DRX. O aparecimento do halo em aproximadamente 20° é característico de SiO_2 amorfa (Ko et al., 2013b) e com a funcionalização não foi observada alteração no difratograma do NM SiO_2 .

Figura 17 - Difratogramas dos NM SiO_2 .



Fonte: Adaptado de PUERARI et al. (2018).

A Tabela 8 apresenta os dados de área superficial de NHS, NH1 e NH3 e os resultados de pH, PZ, DE e IPD dos materiais em todos os meios analisados. A redução na área superficial e aumento dos valores de pH e PZ foram observados para NH1 e NH3 em relação ao NHS. Também foi observado um aumento do DE quando os NM SiO_2 foram diluídos nos meios ISO, M4 e RPMI em comparação aos dispersos em água UP. O efeito observado no DE foi corroborado com o resultado obtido de MET (Fig. 14) e ambos indicaram que houve aumento do diâmetro das partículas após a amino-funcionalização. Ainda, todos os resultados de IPD indicaram que as partículas apresentaram diâmetros

efetivos monodispersos, ou seja, compreendem a uma estreita faixa de diâmetros efetivos, pois apresentou resultados de IPD menores ou iguais a 0,30.

Tabela 8 - Resultados de pH, PZ, DE e IPD para cada NM SiO₂ em água e nos diferentes meios de cultura.

	NHS	NH1	NH3	
Área Superficial (m ² g ⁻¹)	444,0 ^a	283,1 ^b	286,8 ^a	
pH	5,35 ^b	6,20 ^b	6,41 ^b	
Água UP	PZ (mV)	-22,87 ± 0,57 ^b	39,24 ± 0,28 ^b	44,09 ± 0,51 ^b
	DE (nm)	794,51 ± 33,19 ^b	867,99 ± 20,39 ^b	855,32 ± 28,69 ^b
	IPD	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,04	0,29 ± 0,02
	pH	7,30	7,93	8,19
ISO	PZ (mV)	-22,27 ± 0,26	30,52 ± 0,33	32,90 ± 0,51
	DE (nm)	1193,34 ± 22,80	2084,90 ± 55,80	2049,12 ± 90,61
	IPD	0,28 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,30 ± 0,01
	pH	7,36	7,83	8,21
M4	PZ (mV)	-22,15 ± 0,78	31,42 ± 0,16	29,73 ± 0,87
	DE (nm)	1386,49 ± 10,44	2248,83 ± 40,27	2181,59 ± 82,28
	IPD	0,30 ± 0,00	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,00
	pH	7,74 ^b	8,03 ^b	8,30 ^b
RPMI	PZ (mV)	-25,04 ± 0,17 ^b	29,34 ± 0,35 ^b	21,65 ± 0,59 ^b
	DE (nm)	2262,86 ± 29,43 ^b	2349,67 ± 15,38 ^b	2393,47 ± 22,76 ^b
	IPD	0,28 ± 0,02	0,25 ± 0,05	0,25 ± 0,06

Fonte: ^a VICENTINI et al. (2017); ^b PUERARI et al. (2018).

O aumento dos diâmetros pode ser atribuído à funcionalização via ancoragem de moléculas orgânicas de diferentes comprimentos na superfície do NHS (KO et al., 2013b). A amino-funcionalização resultou, então, em um aumento no diâmetro da partícula e, conseqüentemente, em uma redução de sua área superficial. Na literatura, reporta-se que a funcionalização de sílica porosa com diferentes moléculas reduz a sua área superficial (KO et al., 2013a; VICENTINI et al., 2017; CASHIN et al., 2018).

A presença das conexões entre as partículas formadas pelos fios de SiO₂ pode explicar os maiores valores de DE das partículas dispersas em água quando comparadas com os valores obtidos do diâmetro pelas imagens de MET. Devido às conexões, o DE pode estar medindo os aglomerados das partículas, enquanto que no MET foi observado cada partícula separada. Outra hipótese levantada para os maiores valores observados na análise do DE é que estes foram resultantes dos aglomerados, que não estão sendo completamente dispersos com a sonicação dos NM. Com esse efeito, o valor de DE médio obtido foi derivado de partículas separadas e de aglomerados.

A diferença nos comprimentos moleculares das silanoaminas resulta em diferentes regiões hidrofílicas nas moléculas funcionalizantes, o que é associado aos valores de pH. Uma vez que a molécula APTMS possui um grupamento amina e a AEAEAPTS apresenta 3 grupos amina, os NM funcionalizados adquiriram um caráter menos ácido quando se comparou os valores de pH de NHS com os de NH1 e NH3. Esta diferença no pH, então, foi atribuída à presença desses grupos. Ainda, o valor de pH de NH1 foi menor que o de NH3 possivelmente devido a menor região hidrofílica da molécula APTMS em comparação com a AEAEAPTMS.

A mudança no sinal dos valores de PZ indicou inversão de polaridade e modificação dos grupos superficiais de NM SiO₂. Este efeito foi atribuído ao caráter ácido de NHS, que atraiem para a sua superfície moléculas com caráter básico. Ainda, a funcionalização promoveu aumento da estabilidade dos NM SiO₂ em meio aquoso, o que foi atribuído a maior interação desses materiais com os meios devido à presença dos grupos amina (VICENTINI et al., 2017). Os maiores valores de PZ do NH1 e do NH3 em água UP foram evidenciados, sugerindo alta

estabilidade em suspensão. Quando diluídos em outros meios, os materiais funcionalizados apresentaram menores valores de PZ em relação às suas dispersões em água UP. Essa redução na estabilidade em suspensão é associada à composição dos meios (JI et al., 2010; ROSSETTO et al., 2014; ROSZAK et al., 2016). Quando diluídos em ISO, M4 e RPMI, as partículas tendem a aglomerar. Isso ocorre possivelmente devido à força iônica dos meios resultante da presença de uma grande variedade de cátions e ânions dos sais dissolvidos.

As imagens de MET (Fig. 15) mostraram que as amostras dispersas nos meios ISO, M4 e RPMI continham aglomerados maiores que as amostras dispersas em água UP. Os resultados de DE corroboraram com a hipótese de aglomeração, uma vez que nesta análise foram observadas diferenças significativas nos diâmetros de todos os materiais quando se comparou as diluições nos diferentes meios com as diluições em água UP. Como os NM SiO₂ deste estudo são porosos e os meios possuem uma grande variedade de componentes em suas formulações, alguns destes compostos podem se ligar à superfície dos materiais, aumentando o tamanho das partículas e estimulando a aglomeração.

6.2. CARACTERIZAÇÃO DAS MEMBRANAS

A Figura 18 apresenta as imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura acoplada com Canhão de Emissão de Campo (MEV-FEG) das seções transversais das membranas preparadas.

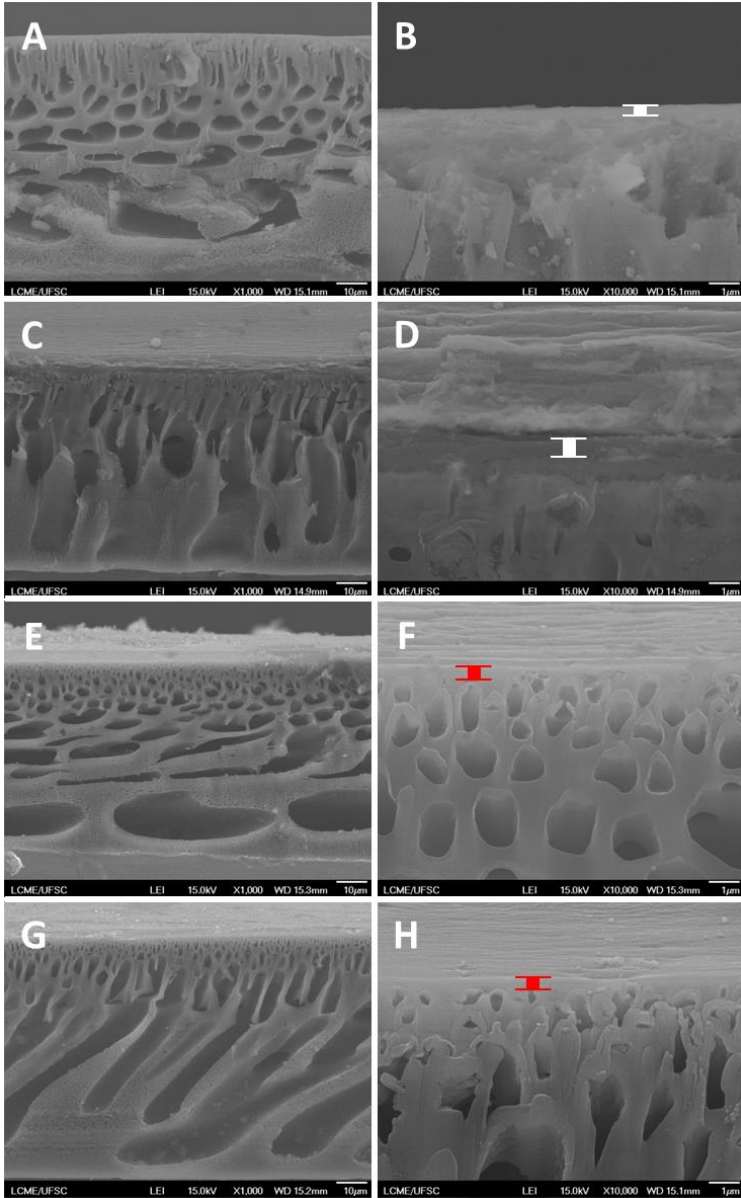
Nas imagens, foi visualizado que a camada suporte PSU é uma estrutura assimétrica formada por canais longitudinais. Este comportamento foi visualizado também no trabalho de Gonçalves (2018) e é uma característica dessa membrana possuir os canais longitudinais, conhecidos como “*finger-like pores*”, conforme observado na literatura (EREN et al., 2015; KUMAR et al., 2013a, 2013b).

As mesmas membranas de PSU foram produzidas no trabalho de Gonçalves (2018) e a camada suporte apresentava poros nanométricos. No presente trabalho, os poros da membrana de PSU foram estimados em $408,0 \pm 146,9$ nm, conforme Figura 19. Pelo gráfico de distribuição dos tamanhos (Fig. 18-B), pode-se notar que para todos os poros medidos, o

tamanho era menor que $1,0 \mu\text{m}$. Nas imagens aproximadas (Fig. 18-B, D, F e H) foi observada a discreta presença de filme fino sobre a camada suporte de PSU, o que confirma que o preparo resultou em membranas nanoestruturadas de filme fino. Este filme foi identificado como as camadas de filmes finos de PDA/PEI sobre a PSU na M0 e à deposição PDA/PEI+NM SiO_2 nas membranas MS, M1 e M3. Os filmes finos formados tiveram suas espessuras estimadas nos pontos destacados nas imagens e, para M0, a espessura foi de 416 nm, para MS foi 475 nm, para M1 foi 411 nm e para M3 foi de 428 nm. Contudo, devido à morfologia irregular da membrana de PSU, não foi possível precisar uma média geral para cada membrana, pois o filme fino presente sobre a camada suporte apresentou diferenças em suas espessuras dependendo do ponto em que foi analisado. Efeito similar foi encontrado no trabalho de Li et al. (2012b) quando PDA foi depositada sobre uma camada suporte de PSU. Gonçalves (2018) preparou membranas de NF compostas por camada suporte de PSU e filme fino de PA impregnado com NB ZnO. Foi observada a formação de filme fino com cerca de 350 nm de espessura sobre a camada suporte de PSU, porém, de maneira similar ao presente trabalho, não foi possível precisar com exatidão essa dimensão devido à morfologia irregular dos filmes.

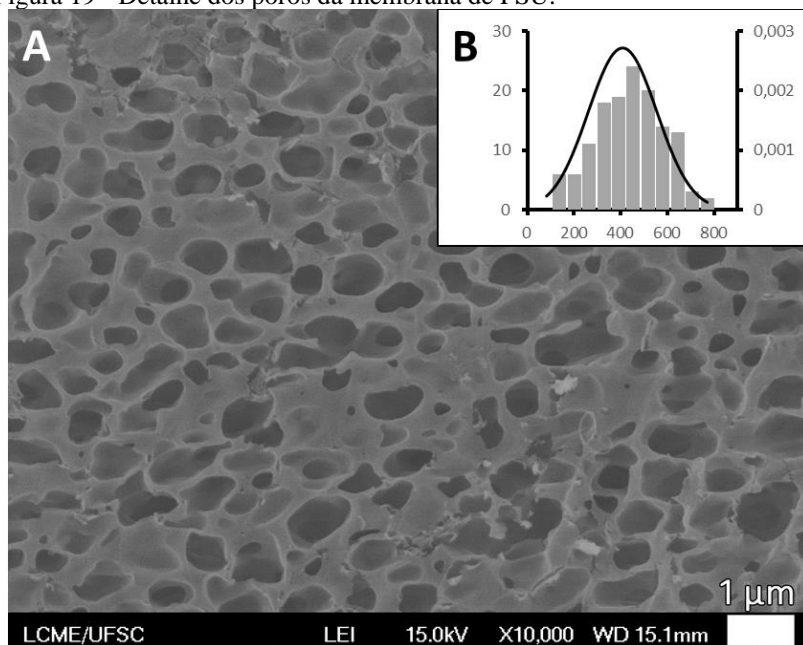
Ainda, não foi possível observar a presença dos NM SiO_2 no filme formado em cada membrana a partir das imagens de seção transversal.

Figura 18 - Micrografias das sessões transversais das membranas.



Legenda: A e B - M0; C e D - MS; E e F - M1; G e H - M3.

Figura 19 - Detalhe dos poros da membrana de PSU.



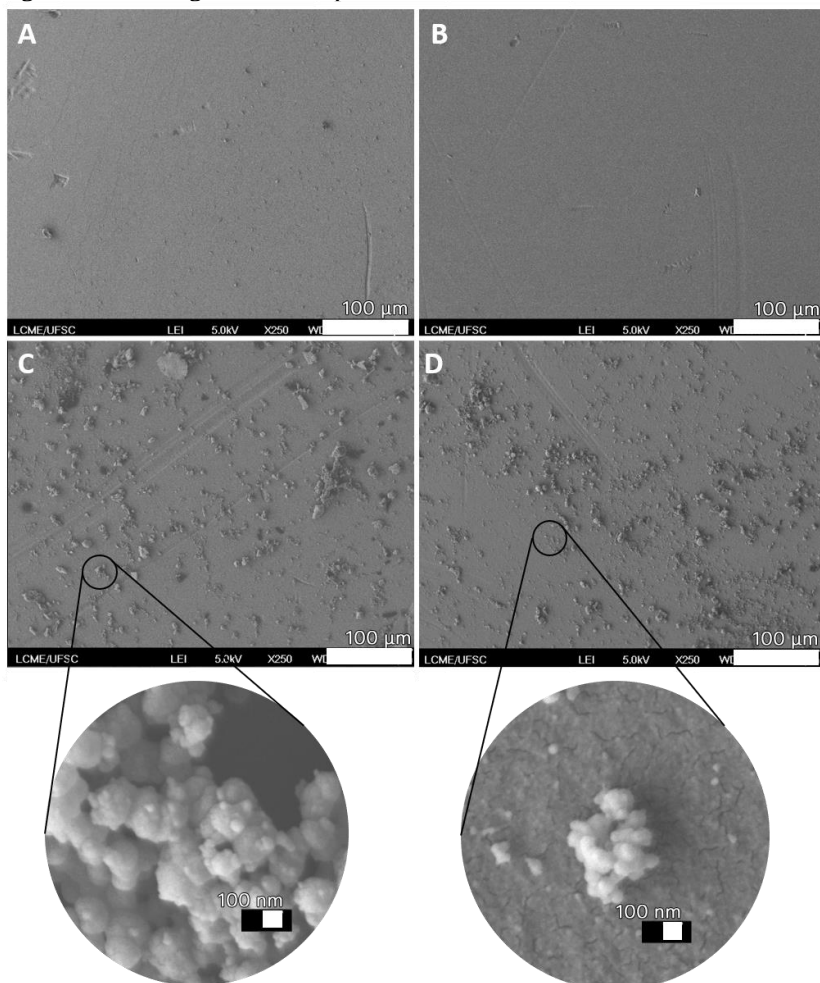
Legenda: A - MEV-FEG da membrana de PSU; B - histograma e distribuição dos tamanhos dos poros da membrana.

A Figura 20 apresenta as imagens de MEV-FEG da superfície de cada membrana. Nas imagens, foi visualizada a rugosidade das superfícies e a ausência de poros. Percebe-se que a M0, isto é, membrana sem a adição de NM SiO₂, possuía uma superfície com menor rugosidade em comparação com as membranas MS, M1 e M3. Em todas as membranas, porém, foram visualizados alguns agregados na sua superfície. Esses agregados podem ser partículas dos polímeros, conforme também observado no trabalho de Li et al. (2012b). Já em MS, M1 e M3, além de partículas dos polímeros, os agregados foram formados por aglomerados de NM SiO₂, conforme identificado pelas imagens de MEV analisadas pelo EDS acoplado. No estudo de Lv et al. (2016) foi realizada a deposição de NP SiO₂ em filmes fino de PDA/PEI sobre suporte de PAN. A adição de NP SiO₂ resultou no surgimento de

nódulos na superfície da membrana quando se comparou com a versão sem as NP SiO₂. Isto ocorreu provavelmente devido à aglomeração das NP SiO₂ (LV et al., 2016). Comportamento similar foi observado por Koseoglu-Imer et al. (2013) quando impregnou NP Ag em membranas de PSU.

Ressalta-se, ainda, a maior presença de NH1 e NH3 nas superfícies de M1 e M3, respectivamente, conforme visualizado nos destaques das Fig. 20. Este efeito ocorreu possivelmente devido à presença dos grupos amina na superfície de NH1 e NH3. Uma vez que há a presença de grupos amina na camada de filme fino, é possível que os NM SiO₂ amino-funcionalizados tenham reagido, via ligação covalente, com esses grupos do PEI após a reticulação, resultando em uma interação forte dos NM com a superfície da membrana de PEI.

Figura 20 - Micrografias das superfícies das membranas.



Legenda: A - M0; B - M5; C - M1; D - M3.

A hipótese de maior fixação dos materiais amino-funcionalizados à superfície das membranas foi corroborada com a análise EDS, apresentada na Tabela 9. Na tabela, têm-se os dados da porcentagem em massa dos elementos C, O, S e Si presentes nas membranas. Nota-se que em M0 não foi detectada a presença de Si, ao contrário do que ocorreu

com MS, M1 e M3. Ressaltam-se os maiores valores de Si em M1 e M3 em relação a MS, o que colabora com a afirmação de que a amino-funcionalização permite uma maior fixação dos NM SiO₂ às membranas. Os elementos C, O e S eram esperados em todas as membranas, uma vez que fazem parte das composições das mesmas.

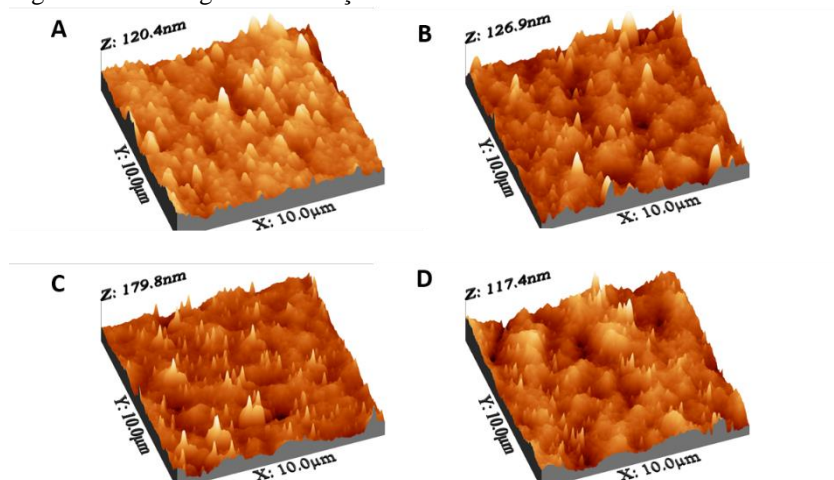
Tabela 9 - Porcentagem em massa dos elementos das membranas obtido por MEV-EDS.

	Carbono (C) (%)	Oxigênio (O) (%)	Enxofre (S) (%)	Silício (Si) (%)
M0	89,20 ± 0,76	7,92 ± 0,47	2,88 ± 0,27	ND
MS	89,02 ± 0,82	7,52 ± 0,47	3,21 ± 0,27	0,26 ± 0,07
M1	83,75 ± 0,75	9,95 ± 0,42	2,91 ± 0,23	3,39 ± 0,14
M3	85,83 ± 0,87	9,94 ± 0,51	1,01 ± 0,28	3,21 ± 0,18

Legenda: ND - Não Detectado pelo método.

Ainda sobre a superfície da membrana, as diferenças nas rugosidades observadas visualmente no MEV-FEG são corroboradas com a análise AFM (Figura 21). Os pontos escuros representam vales e os pontos mais claros representam picos. Nota-se que as membranas MS, M1 e M3 possuíam uma estrutura com mais picos e vales (“*ridge-and-valley*”) que a M0. Apesar de não ter realizado o ensaio AFM, Gonçalves (2018) observou através de MEV-FEG um favorecimento da estrutura *ridge-and-valley* nas membranas que foram impregnadas com NB ZnO. A incorporação de NP TiO₂ sem e com funcionalização com a molécula N-[3-(Trimetoxissilil) propil] etilenodiamina (AAPTS) em filmes de PA também promoveu o favorecimento da estrutura “*ridge-and-valley*”, visualizado através de MEV e de AFM (RAJAEIAN et al., 2013). Também através de AFM, Zhang et al., (2017) reportou que a geração *in situ* de NP TiO₂ em membranas de NF promoveu o favorecimento de *ridges-and-valleys*.

Figura 21 - Micrografias de força atômica das membranas.



Legenda: A - M0; B - MS; C - M1; D - M3.

A partir das imagens de AFM, foi calculada a rugosidade das superfícies através do software WSxM 4.0 (HORCAS et al., 2007). Os parâmetros obtidos foram Sa, Sq e Sz, sendo que Sa expressa, em valor absoluto, a diferença de altura de cada ponto com a média aritmética da superfície, parâmetro mais usado para medir rugosidade; Sq representa a raiz quadrada média dos valores das ordenadas dentro da área definida; e Sz é definido como a soma do maior valor de altura de pico e o maior valor de profundidade do vale. Estes resultados são apresentados na Tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros de rugosidade para cada membrana.

	Sa (nm)	Sq (nm)	Sz (nm)
M0	20,00	40,70	379,0
MS	24,54	42,28	438,5
M1	52,80	91,40	416,6
M3	51,10	87,90	405,6

Os valores calculados corroboram com as imagens (Fig. 20 e 21) uma vez que mostraram que as membranas que possuem maior

rugosidade (S_a) são a M1 e M3, com valores muito próximos entre si. A MS também apresentou maior S_a que a M0. A maior rugosidade apresentada com a adição dos NM SiO_2 pode ser devido à formação dos aglomerados dos materiais nas superfícies das membranas, sendo que este efeito já foi reportado na literatura (NIKSEFAT; JAHANSHAH; RAHIMPOUR, 2014). O favorecimento à formação das estruturas “*ridge-and-valley*” é evidenciado através de Sz, pois a adição dos NM SiO_2 nas membranas promoveu aumento nesse parâmetro em relação à M0.

Em estudo de NP SiO_2 em membranas de *forward osmosis* (FO), constituídas de camada suporte de PSU e filme fino de PA, também foi observado aumento em todos os parâmetros quando se fez a comparação das membranas sem e com adição dos NM SiO_2 (NIKSEFAT; JAHANSHAH; RAHIMPOUR, 2014). O aumento nos parâmetros relativos à rugosidade também foi reportado na geração *in situ* de NP TiO_2 em membranas de NF (ZHANG et al., 2017).

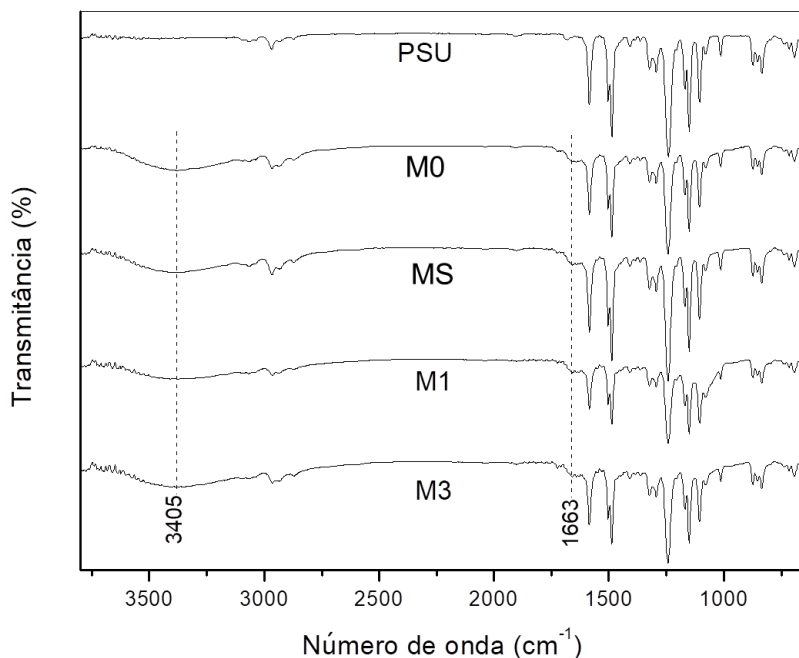
Os espectros de FTIR da Figura 22 mostraram informações qualitativas referentes aos grupos funcionais presentes na superfície das membranas. As principais bandas dos modos vibracionais foram identificadas no espectro da membrana de PSU em torno de 3031 cm^{-1} correspondente à vibração do alongamento simétrico do C-H de anel aromático, em 2970 e 2875 cm^{-1} referentes às vibrações assimétricas e simétricas do C-H alifático, respectivamente. A banda em 1680 cm^{-1} atribuída à deformação axial de C=C do anel aromático, a qual pode ter sido deslocada pelo efeito de conjugação ou efeito indutivo dos substituintes do anel. As bandas de vibração em 1583 , 1504 e 1484 cm^{-1} foram associadas à deformação axial de C=C de aromático. As bandas em torno de 1404 e 1365 cm^{-1} correspondem à deformação angular do CH_3 . As vibrações assimétricas e simétricas de O=S foram identificadas 1320 e 1156 cm^{-1} , respectivamente. As bandas 1245 e 1072 cm^{-1} foram atribuídas à deformação da ligação C-O do éter aromático (KUMAR et al. 2013a).

Em todos os espectros das membranas foi verificada a predominância das bandas dos modos vibracionais característicos de PSU. A formação do filme fino de PDA e PEI reticulados com GA sobre o PSU foi confirmada com o aparecimento da banda larga de amina na região de 3405 cm^{-1} , que corresponde à vibração de deformação axial nos átomos de hidrogênio ligados ao nitrogênio (N-H). Na região de 1580 e 1495 cm^{-1} também aparece uma banda fraca de deformação angular de

amina, sendo que esta possivelmente foi sobreposta pela banda de 1583 cm^{-1} de aromáticos. A reticulação do PEI com GA foi evidenciada com o aparecimento do ombro em torno de 1663 cm^{-1} atribuído à ligação entre C=N (imina) (LV et al. 2015) formada pela reação de condensação da amina primária do PEI e/ou da molécula funcionalizante com o aldeído do GA. A incorporação de NHS, NH1 e NH3 não alteraram os espectros das membranas MS, M1 e M3.

Dessa forma, a partir das informações obtidas nos espectros da Figura 22, ficou evidente a formação da camada de filme fino PDA/PEI sobre o suporte de PSU, corroborando com as imagens de MEV-FEG, e que o GA reticulou camada de filme de PEI e, possivelmente, as aminas primárias das moléculas funcionalizantes de NH1 e NH3.

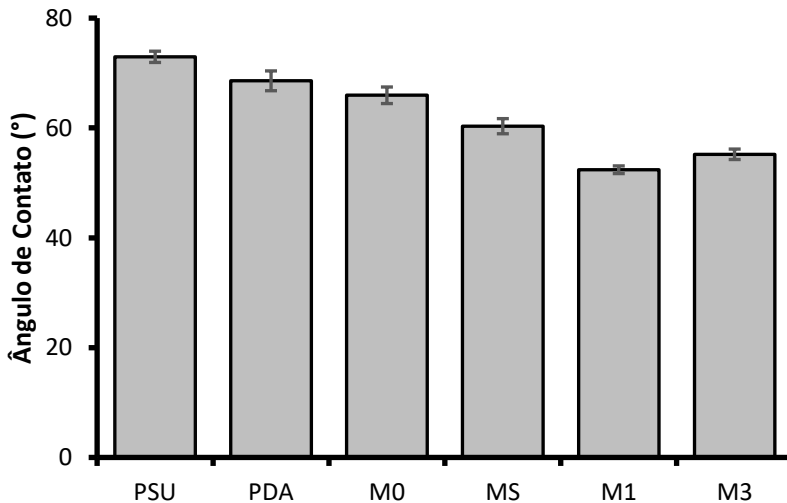
Figura 22 - Espectros FTIR das membranas.



A Figura 23 mostra o gráfico dos resultados do ângulo de contato para cada membrana testada. Todos os resultados são diferentes

significativamente entre si ($p < 0,05$). Quando se compara o ângulo de contato da membrana de PSU ($72,95^\circ \pm 1,03$) com a membrana de PSU somente com filme fino de PDA ($68,58^\circ \pm 1,80$), nota-se a diminuição do ângulo, o que, conseqüentemente, significa maior espalhamento da gota sobre a superfície da membrana. Conforme o esperado, a formação do filme fino de PDA sobre PSU resultou numa maior hidrofilicidade da membrana, e este comportamento também foi observado na literatura para a mesma composição (CHOI et al., 2019; LI et al., 2012b). A membrana M0 é constituída de PSU/PDA/PEI e o ângulo de contato obtido foi de $65,95^\circ \pm 1,51$. Houve diminuição do ângulo com a adição do filme fino de PEI sobre o filme de PDA e este efeito também foi observado na literatura (QIU et al., 2015; YANG et al., 2016). Este efeito ocorreu devido à presença de grupos amins nas estruturas do PDA e do PEI.

Figura 23 - Gráfico dos valores dos ângulos de contato de cada membrana.



O aumento da hidrofilicidade com a adição do NM SiO₂ pirolisado (VICENTINI et al., 2017) está associado à presença de grupos silanol e ou hidroxila na superfície dos NM SiO₂ (JIN et al., 2012). As partículas de NHS apresentaram menor estabilidade em suspensão que as

amino-funcionalizadas, possivelmente devido à presença dos grupos aminas, conforme observado nos resultados de PZ (Tabela 8). Dessa maneira, o menor aumento do ângulo de contato quando inseridas as partículas puras em relação às amino-funcionalizadas (redução de 8,5% para MS, 20,6% para M1 e 16,3% para M3) pode estar associado à aglomeração do NHS. Segundo Jin et al. (2012), quando NP SiO₂ se aglomeram, há redução da área superficial, o que resulta em menores quantidades de radicais hidróxidos. Ainda, a membrana M1 foi a que teve o menor ângulo de contato ($52,39^\circ \pm 0,70$), logo a maior hidrofiliçidade entre todas. Assume-se, então, que este efeito seja decorrente da adição de NH1 na composição da membrana. Era esperado que a membrana M3 fosse a mais hidrofílica devido à presença de 2 aminas secundárias e 1 amina primária na composição da molécula funcionalizante do NH3 adicionado, sendo que em NH1 a molécula possui apenas 1 amina primária. Uma hipótese para o comportamento apresentado é que, após a reticulação, as aminas primárias presentes em NH3 estejam mais desimpedidas estericamente para reagir com o GA para formar iminas, reduzindo sua disponibilidade. Com essa reticulação, ocorre a aproximação das cadeias e o fechamento da estrutura. Isso restringe a quantidade de espaço entre as cadeias poliméricas e nos grupos reativos, resultando então em uma menor hidrofiliçidade. Outra possível hipótese é a ocorrência de ligações inter e intramoleculares com a molécula funcionalizante e, conseqüentemente, promovendo a ciclização das moléculas.

6.3. EFICIÊNCIA DAS MEMBRANAS

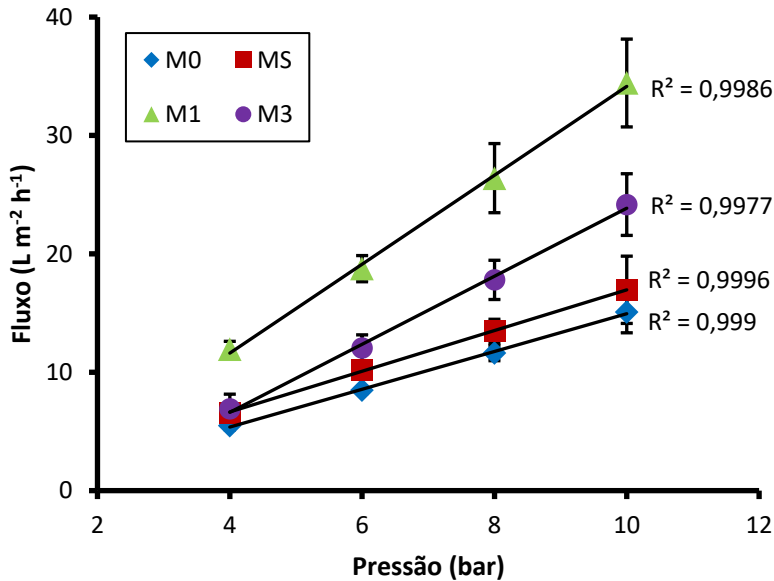
Quanto à eficiência das membranas preparadas, a Figura 24 apresenta gráfico obtido a partir da análise do fluxo de água UP em diferentes pressões para todas as composições de membrana investigadas nesta pesquisa. Todas as membranas apresentaram R² elevado (> 0,99) quando foram plotadas as retas que correlacionam fluxo e pressão para cada uma. Conforme foi observado no gráfico, a inserção de NM SiO₂ elevou o fluxo de água UP de todas as membranas em relação à M0.

Em média, quando foi dividido o resultado do fluxo por cada pressão empregada, resultou em:

- M0 - $1,43 \pm 0,06 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$;
- MS - $1,68 \pm 0,03 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$;
- M1 - $3,21 \pm 0,20 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ e, por fim,
- M3 - $2,10 \pm 0,29 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$.

Estes valores ficaram na faixa esperada para membranas de NF, uma vez que todos os fluxos ficaram compreendidos entre 1,40 e $12,00 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ (MULDER, 1996). A partir desses resultados, percebe-se que houve um aumento no fluxo de água de 14,68% quando se adicionou NHS à membrana. A adição de NH1 elevou o fluxo de água em 55,35%, enquanto que a adição de NH3 originou em um aumento de 31,52% no fluxo. Foi reportado na literatura que a adição de NP SiO_2 promoveu o aumento do fluxo de permeado em membranas de NF (JIN et al., 2012).

Figura 24 - Gráfico do fluxo de água UP de cada membrana para as pressões 4, 6, 8 e 10 bar.



O crescimento mais acentuado do fluxo, ou seja, os maiores coeficientes angulares das retas, observado para M1 e M3 em detrimento a MS pode estar relacionado à amino-funcionalização dos NM. A

presença de amina primária em NH1 e em NH3 que foi adicionado, respectivamente, em M1 e M3, pode ter contribuído para o aumento na permeação de água por essas membranas em relação à membrana que continha o NHS, isto é, o NM sem amino-funcionalização. Ressalta-se que a concentração de reticulante utilizada foi baixa, o que garante a reticulação somente de uma parcela de grupos amina, enquanto o restante permanece livre. O excesso de reticulante resultaria em uma estrutura muito rígida e fechada para a permeação de água.

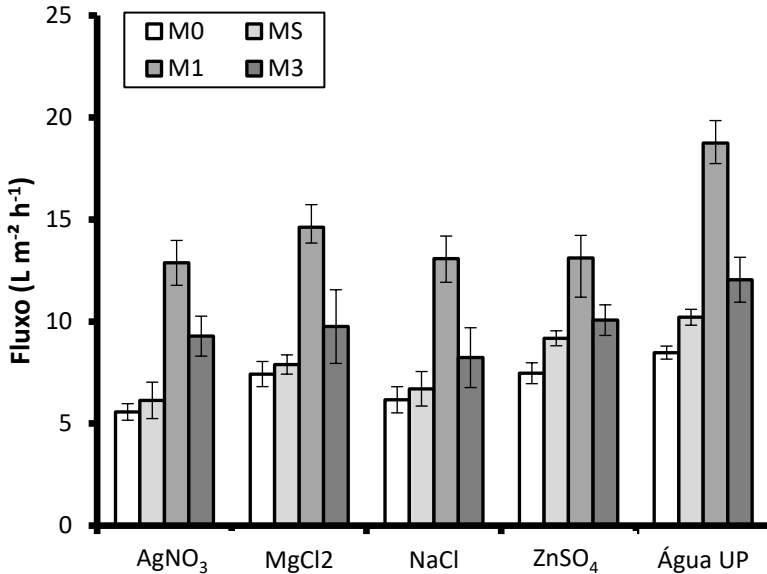
Logo, a ordem das membranas, do maior fluxo para o menor, é $M1 > M3 > MS > M0$. Esta ordem é corroborada pelos resultados obtidos no ensaio de ângulo de contato (Figura 23) que mostraram que a M1 era a membrana mais hidrofílica de todas (menor ângulo de contato), seguida por M3, MS e M0.

Em 6 bar, o fluxo de água para M0 foi $8,48 \pm 0,32 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, para MS foi $10,21 \pm 0,39 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, para M1 foi $18,75 \pm 1,10 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ e para M3 foi $12,05 \pm 1,10 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. No estudo de Jin et al. (2012), a membrana composta por filme fino de PA com NP SiO_2 sobre camada suporte de PSU apresentou fluxo de água pura de aproximadamente $11 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ em 6 bar, enquanto que a membrana sem a NP teve fluxo de aproximadamente $8 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$ na mesma pressão. Estes resultados estão muito próximos aos obtidos na presente pesquisa. Já a membrana estudado por Zhao et al. (2016), composta de camada suporte de PSU e filme fino de PA com adição nanotubos de carbono de múltiplas camadas (MWCNT - *multi-walled carbon nanotubes*) revestidos por camada de PDA/PEI obteve um fluxo muito superior, de aproximadamente $90 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$, enquanto que a membrana sem a adição de MWCNT revestidos obteve fluxo de aproximadamente $35 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1}$. Por pressão, os resultados foram $15,32 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$ e $5,88 \text{ L m}^{-2} \text{ h}^{-1} \text{ bar}^{-1}$, respectivamente.

Já a Figura 25 apresenta os fluxos de permeado de cada solução e da permeação de água UP para cada membrana na pressão 6 bar. Em todas as membranas, houve diminuição no fluxo quando se passou as soluções (de 1 g L^{-1}) AgNO_3 , MgCl_2 , NaCl e ZnSO_4 em relação ao ensaio que utilizou somente água UP. Esta redução está associada à presença de sais nas soluções, o que reduz o fluxo de passagem uma vez que estes estão sendo retidos pela membrana. De maneira análoga ao ensaio somente com água UP, a membrana que permitiu maior fluxo de

permeado, para todas as soluções testadas, foi a M1, seguida por M3, MS e M0.

Figura 25 - Fluxo de permeado de cada solução testada e de água UP para cada membrana (pressão de operação: 6 bar)

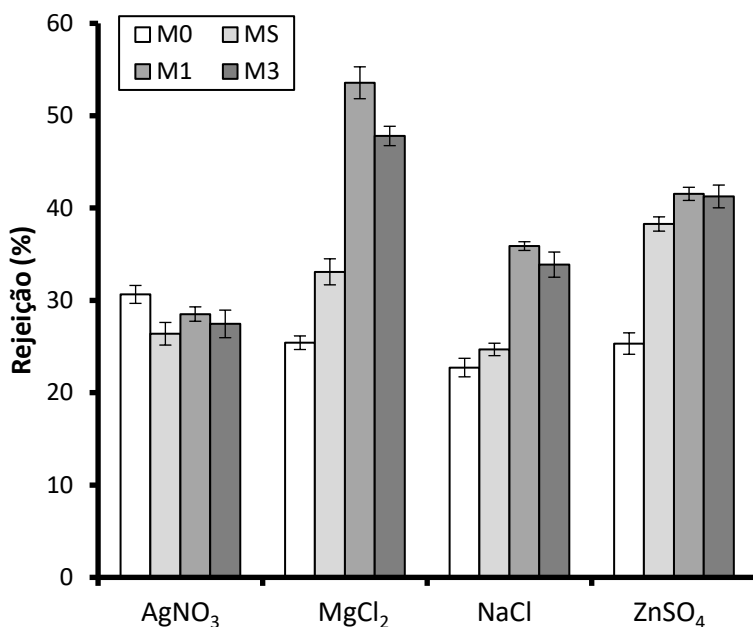


A Figura 26 mostra um gráfico das rejeições das soluções testadas para cada membrana na pressão 6 bar. Para MgCl₂, NaCl e ZnSO₄, a membrana responsável pela maior rejeição foi a M1 (rejeições de $53,56 \pm 1,76$ %, $35,88 \pm 0,47$ % e $41,54 \pm 0,71$ %, respectivamente). Já para AgNO₃, a membrana com maior rejeição foi a M0 com $30,65 \pm 0,97$ %. Vale ressaltar que, para este sal, a membrana com menor rejeição foi a MS com $26,39 \pm 1,22$ %, valor relativamente próximo à rejeição obtida pela M0.

De maneira geral, as membranas obtiverem as menores rejeições para as soluções de AgNO₃ e NaCl. Uma explicação para este efeito é que estes sais contêm os íons monovalentes Ag⁺ e Na⁺, respectivamente, e os raios iônicos de hidratação de ambos são 4,7 Å, isto é, 0,47 nm, enquanto que o raio iônico de hidratação do Mg²⁺ é 7,0 Å (0,70 nm) e do Zn²⁺ é 6,8 Å (0,68 nm) (KIELLAND, 1937). A partir do gráfico, observa-se que as

maiores rejeições foram obtidas quando se testou MgCl_2 , seguido por ZnSO_4 , NaCl e AgNO_3 . Esta ordem está de acordo com os raios de hidratação dos cátions, uma vez que o Mg^{2+} possui o maior raio atômico de hidratação, seguido pelo Zn^{2+} e, por fim, Na^+ e Ag^+ . Assim, tem-se o processo de exclusão pelo tamanho um dos responsáveis pela rejeição dos sais. Adicionalmente, a maior rejeição ao NaCl em relação ao AgNO_3 pelas membranas M1 e M3 pode ser explicado também pelos raios iônicos de hidratação. Sabe-se que o ânion NO_3^- possui raio de 3,1 Å (0,31 nm) e o Cl^- possui raio equivalente a 3,9 Å (0,39 nm). Uma vez que o nitrato é menor que o cloreto, há maior facilidade do NO_3^- em atravessar a membrana também pelo processo de exclusão, o que consequentemente reduz o efeito Donnan na filtração.

Figura 26 - Gráfico com a rejeição (%) de cada solução para cada membrana.



A Tabela 11 apresenta o compilado dos resultados de fluxo de permeado e de rejeição dos 4 sais testados para cada membrana e a Tabela 12 alguns resultados encontrados na literatura.

Tabela 11 - Resultados de rejeição e de fluxo de permeado para AgNO_3 , MgCl_2 , NaCl e ZnSO_4 para as membranas M0, MS, M1 e M3 quando submetidas a 6 bar.

	M0	MS	M1	M3
AgNO₃	Rejeição (%)	30,65 ± 0,97	28,52 ± 0,78	27,45 ± 1,50
	Fluxo ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	5,57 ± 0,41	12,87 ± 0,78	9,29 ± 0,98
MgCl₂	Rejeição (%)	25,41 ± 0,73	53,56 ± 1,73	47,81 ± 1,05
	Fluxo ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	7,43 ± 0,62	14,63 ± 1,17	9,75 ± 1,81
NaCl	Rejeição (%)	22,72 ± 1,00	35,88 ± 0,47	33,88 ± 1,36
	Fluxo ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	6,17 ± 0,64	13,09 ± 1,93	8,23 ± 1,47
ZnSO₄	Rejeição (%)	25,32 ± 1,16	41,54 ± 0,71	41,26 ± 1,24
	Fluxo ($\text{L m}^{-2} \text{h}^{-1}$)	7,47 ± 0,51	13,12 ± 1,01	10,07 ± 0,75

Tabela 12 - Resultados da literatura para rejeição e permeação.

Composição	Sal	Rejeição (%)	Fluxo (L.m ⁻² .h ⁻¹)	Pressão (bar)	Referência
PSU + NT	MgCl ₂	11,13 ± 2,70	29,30 ± 2,80	6	(OLIVEIRA, 2016)
SiO ₂ /QTS + NT	NaCl	6,34 ± 1,60	63,62 ± 3,10		
SiO ₂ @AF					
PSU/PEG + 2%	MgCl ₂	8*	18*	6,9	(PANDA; DE, 2014)
ZnCl ₂	NaCl	40*	22*		
PAN/PDA/PEI	MgCl ₂	96*	10,50*	6	(LV et al., 2015)
	NaCl	48*	11,50*		
PAN/PDA/PEI	MgCl ₂	90*	33*	6	(LV et al., 2016)
+ NP SiO ₂	NaCl	25*	31*		
Comercial – PSU/PA	Zn ²⁺	30*	30	6	(FERSI BENNANI; M’HIRI, 2013)
Comercial – PSU/PA	Zn ²⁺	96 a 99	N.I.	2 a 15	(BELKHOUCHE et al., 2009)
Comercial – PSU/PA/PPZ	Ag ⁺	76,4	N.I.	10	(SERRÃO SOUSA; RIBAU TEIXEIRA, 2015)

Legenda: * valor aproximado; N.I. - Não informado.

Comparando a Tabela 11 com a 12, percebe-se que, apesar do fluxo de permeado do presente estudo ser muito inferior aos encontrados por Oliveira (2016), a rejeição à $MgCl_2$ e a $NaCl$ foi superior. Apesar do volume de água tratada ser inferior, ressalta-se que a qualidade da mesma foi superior.

Quando se compara com a membrana constituída por suporte de PSU e camada de polietilenoglicol (PEG) modificada com $ZnCl_2$ produzida por Panda, De (2014), nota-se que todas as membranas do presente estudo obtiveram rejeições a $MgCl_2$ superiores, enquanto que a rejeição a $NaCl$ pela M1 ficou próxima a encontrada pelos autores. Ressalta-se, ainda, que a pressão utilizada por Panda, De (2014) foi de 6,9 bar, o que resulta nos maiores valores de fluxo verificados e em maior gasto energético.

A membranas MS, M1 e M3 também foram superiores à membrana produzida por Zhu et al. (2015), constituída por QTS e nanofolhas de montmorilonita (MMT). Operando em 4 bar, a membrana atingiu rejeições de cerca de 30% para $MgCl_2$ e de 15% para $NaCl$, inferiores às rejeições apresentadas na Tabela 11.

A membrana desenvolvida por Lv et al. (2016) possuía composição similar às membranas do presente trabalho. Os autores atingiram rejeições à $NaCl$ de aproximadamente 25% e de $MgCl_2$ de aproximadamente 90%, com fluxos de permeados superiores aos encontrados na Tabela 11. Apesar dos valores de rejeição de $MgCl_2$ serem bastante inferiores de Lv et al. (2016), ressalta-se que a rejeição ao $NaCl$ foi superior para as membranas M1 e M3. Este resultado é positivo, uma vez que as membranas de NF possuem relativa baixa eficiência na remoção de íons monovalentes. Assim, aumento na rejeição de $NaCl$ representa um avanço nesta tecnologia. Por outro lado, a membrana sem adição de NM desenvolvida por Lv et al. (2015) atingiu maiores rejeições a $MgCl_2$ e $NaCl$, porém, apesar da menor rejeição, a membrana M1 do presente trabalho obteve um maior fluxo de permeado possivelmente devido à adição de NH1 e isso representa maior volume de água tratada.

As membranas MS, M1 e M3 obtiveram resultados superiores de rejeição de zinco que a membrana comercial de NF avaliada por Fersi Bennani; M'Hiri (2013). Na pesquisa, os autores utilizaram zinco a uma concentração inicial de $65,38 \text{ mg L}^{-1}$ e o fluxo de filtração era tangencial.

Por outro lado, também utilizando membrana de NF comercial, Belkhouche et al. (2009) reportou rejeições de Zn de 96 a 99%, sendo que a fonte deste metal era proveniente de lixiviado de resíduos sólidos.

Para Ag, são poucos os estudos na literatura que usam NF para tratar este metal. A filtração por membrana de NF comercial de NP Ag diluída em água destilada resultou em rejeição de 76,4% dos íons de Ag^+ liberados no meio (SERRÃO SOUSA; RIBAU TEIXEIRA, 2015) quando se utilizou 10 bar. Na presente pesquisa, a utilização de pressão 6 bar resultou num máximo de rejeição de Ag de 30,65%. Por também ser um íon monovalente, ou seja, de difícil rejeição por membranas de NF, considera-se o resultado obtido como positivo.

Levando em conta os dados obtidos, percebe-se que a funcionalização dos NM SiO_2 e a adição nas membranas poliméricas promoveu melhorias na hidrofiliabilidade e, conseqüentemente no fluxo de água para todos os sais testados, além de melhorar os resultados de rejeição das soluções de $MgCl_2$, $NaCl$ e $ZnSO_4$. Ao contrário do que era esperado, foi verificado que a adição de NH_1 demonstrou eficiência superior em comparação com as membranas com NH_3 . Esse resultado pode ser justificado pela diferença na estrutura das moléculas amino-funcionalizantes. A molécula AEAEAPTMS (tri-amina) possui 3 nitrogênios com pares de elétrons disponíveis em sua estrutura e pode ter ocorrido reações intra e intermoleculares com possível ciclização da molécula. Com a ciclização, os possíveis sítios ativos da molécula ficam comprometidos, desfavorecendo a rejeição dos sais. Outra evidência de que esteja ocorrendo a ciclização foi a diferença na hidrofiliabilidade entre M1 e M3, uma vez que este processo reduz o caráter polar da estrutura química. Contudo, essa hipótese precisa de mais investigação. Outra justificativa para o comportamento observado é o tamanho da molécula que reveste os NH_3 em comparação com os NH_1 . Como AEAEAPTMS é maior que APTMS, as estruturas tendem a ficar mais afastadas umas das outras, o que possibilita maior passagem de íons.

6.4. ENSAIOS TOXICOLÓGICOS

6.4.1. Teste agudo com *D. magna*

Após a realização das caracterizações dos materiais, os NM SiO₂ foram testados quanto suas toxicidades para o organismo *D. magna*. A sensibilidade dos lotes, expressa em CE_{50,24h}, esteve em média $0,90 \pm 0,16 \text{ mg L}^{-1}$ de K₂Cr₂O₇. O Apêndice 1 (A1) apresenta o gráfico com as sensibilidades realizadas durante o período de realização do doutorado. Os limites mínimo e máximo não foram ultrapassados, garantindo que o cultivo de *D. magna* estabelecido no LABTOX estava apto para ser utilizado nos ensaios toxicológicos.

Os resultados de CE_{50,48h} para o NHS, NH1 e NH3 são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 – Resultados de CE_{50,48h} para cada NM SiO₂ do teste agudo com *D. magna*.

	CE _{50,48h} (g L ⁻¹)
NHS	2,20 ± 0,48
NH1	7,88 ± 0,70
NH3	0,22 ± 0,03

Segundo a diretiva europeia EU-Directive 93/67/EEC e o estudo de Bondarenko et al. (2013), para organismos aquáticos, pode-se classificar o NHS, o NH1 e o NH3 como substâncias sem classificação tóxica, uma vez que a CE₅₀ encontrada foi superior a 0,1 g L⁻¹ para os três materiais investigados. Dessa maneira, quando inseridos em uma membrana polimérica, espera-se que uma eventual lixiviação desses materiais não confira toxicidade aos organismos aquáticos expostos.

Através dos resultados apresentados na Tabela 13, percebe-se que o NH1 é o material menos tóxico dos 3. Este resultado corrobora com o de Clément et al. (2013). No estudo, a funcionalização de NP SiO₂ com a molécula APTMS foi capaz de promover uma diminuição da toxicidade do material em ensaios com *D. magna*. Clément et al. (2013) atribuiu este efeito ao aumento do diâmetro do NM quando funcionalizado, uma vez

que a NP SiO₂ possuía 14 nm e a NP SiO₂ funcionalizada tinha 22 nm. Na literatura, costuma-se atribuir a toxicidade dos NM principalmente devido ao seu tamanho e área superficial. Reporta-se que partículas menores e com maiores áreas são mais tóxicas, no entanto a maior toxicidade da NH₃ em comparação com a NHS não pode ser atribuída a isso, uma vez que a área superficial da NHS foi 444,0 m² g⁻¹, enquanto que da NH₃ foi 283,1 m² g⁻¹. Efeito semelhante foi encontrado na funcionalização de NT SiO₂ com a molécula AEAEAPTMS. Apesar do aumento do tamanho e diminuição da área superficial, os NT SiO₂ amino-funcionalizados apresentaram maior toxicidade que os NT SiO₂ (VICENTINI et al., 2017). Assim, acredita-se que, apesar do tamanho e área serem fatores cruciais, estes não devem ser considerados os únicos parâmetros para avaliação da toxicidade de materiais, uma vez que outros fatores podem contribuir para os efeitos tóxicos, como morfologia, tipo de revestimento, energia superficial, entre outros (LIU et al., 2016; VICENTINI et al., 2017).

A maior toxicidade do NH₃ em relação aos outros NM SiO₂ também pode estar atribuída à possível ciclização da molécula AEAEAPTMS. A diminuição do caráter hidrofílico, visualizado na análise de ângulo de contato da M3, pode resultar em uma maior interação com as células dos organismos, uma vez que partículas mais hidrofóbicas do que as membranas celulares tendem a ser fagocitadas mais facilmente do que aquelas que são mais hidrofílicas (CHEN; LANGER; EDWARDS, 1997).

6.4.2. Lixiviação das Membranas

A avaliação de possível desprendimento de NM SiO₂ das membranas foi realizada através de ensaio de lixiviação com posterior teste de toxicidade aguda com *D. magna* e quantificação de Si livre no lixiviado obtido.

Após a lixiviação das membranas em água UP e em meio ISO, *D. magna* foram expostas por 48 h ao lixiviado e os resultados foram

expressos tanto em $CE_{50,48h}$ quanto em Fator de Diluição (FD), conforme observado na Tabela 14.

Tabela 14 - Resultados dos testes agudos realizados com os lixiviados das membranas imersas em água UP e em meio ISO.

	Água UP		ISO	
	$CE_{50,48h}$ (%)	FD	$CE_{50,48h}$ (%)	FD
M0	72,20 ± 0,03	2	NT	1
MS	71,14 ± 0,01	2	NT	1
M1	71,14 ± 0,01	2	NT	1
M3	73,28 ± 0,03	2	NT	1

Legenda: FD - Fator de Diluição; NT - Não Tóxico.

Para a lixiviação em água UP, os resultados não diferiram tanto entre si quanto às $CE_{50,48h}$ encontradas para cada membrana. Vale destacar que a mortalidade dos organismos aconteceu apenas no FD 1, que corresponde somente à lixiviação das membranas em água UP. Dessa forma, o efeito tóxico encontrado é atribuído à falta de nutrientes no meio em que as *D. magna* foram expostas, uma vez que em FD 1 não houve diluição em meio ISO. O mesmo comportamento foi descrito por Gonçalves (2018) quando realizou a lixiviação de membranas em água UP. Quando há presença do diluente, isto é, a partir do FD 2, não há mortalidade de *D. magna* devido à presença de nutrientes.

Já a exposição ao lixiviado de M0, MS, M1 e M3 em meio ISO não apresentou toxicidade para *D. magna*, sendo que todos os organismos expostos permaneceram vivos após as 48 horas de ensaio. Esse resultado demonstra que o potencial tóxico dos NM SiO₂ isolados não é propagado quando estão inseridos nas membranas poliméricas nas condições estudadas.

Outras composições de membranas também já foram testadas quanto sua toxicidade. A membrana de Nogueira (2012) era constituída por PSU e QTS e era reticulada com GA. A membrana foi imersa nos meios de cultivo de *Daphnia similis* e *Ceriodaphnia dubia* por 24 h para avaliação da toxicidade e, ao final do período de tempo, foram retiradas e os organismos foram expostos aos respectivos meios. Como resultado, as membranas com e sem reticulação não foram capazes de introduzir

toxicidade aguda ou crônica ao meio em que estavam imersas (NOGUEIRA, 2012). Já Oliveira (2016) realizou a lixiviação de membranas poliméricas contendo NT SiO₂ com e sem amino-funcionalização com molécula AEAEAPTMS. A lixiviação de membranas de PSU, membranas de PSU com adição de NT SiO₂ e de membranas de QTS não foram tóxicas para os organismos *D. magna* (OLIVEIRA, 2016). Já a lixiviação de membranas de QTS com adição de NT SiO₂ amino-funcionalizados obteve baixa toxicidade, sendo que a toxicidade encontrada foi atribuída à quebra das membranas durante a lixiviação com possível desprendimento dos NM da matriz polimérica (OLIVEIRA, 2016). A quebra das membranas durante a lixiviação não foi observada no presente estudo, o que pode justificar a não toxicidade das mesmas.

No trabalho de Gonçalves (2018), foi observada toxicidade de NB ZnO amino-funcionalizados quando estavam isolados, porém, quando estavam inseridos nas membranas poliméricas, estas não apresentaram toxicidade aos organismos *D. magna*. Apesar disso, as membranas contendo NB ZnO liberaram íons Zn quando lixiviadas (GONÇALVES, 2018), o que se torna interessante do ponto de vista que esses íons podem atuar como inibidores de efeito *fouling*, apesar deste parâmetro não ter sido avaliado.

A Tabela 15 apresenta as quantificações de silício nas amostras de lixiviação em água ultrapura.

Tabela 155 - Quantificação de Si nos lixiviados das membranas em água UP.

Membrana	Si ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Porcentagem em relação ao total de Si inserido (%)
Água UP	< 12	-
M0	40 \pm 03	-
MS	100 \pm 15	0,008%
M1	246 \pm 05	0,019%
M3	390 \pm 08	0,030%

Os resultados da quantificação obtidos, ao contrário do que se esperava, mostraram que as membranas que continham NM SiO₂ amino-

funcionalizados, isto é, M1 e M3, liberaram mais silício para o meio que a membrana com NM SiO₂ sem amino-funcionalização (MS). Atribui-se este resultado à presença de mais materiais nas superfícies de M1 e M3 em comparação à superfície de MS, conforme observado nas imagens obtidas por MET (Figura 20). Assim, quando submetidas ao processo de lixiviação, o atrito mecânico das membranas com as paredes das garrafas utilizadas nos ensaios pode ter favorecido o desprendimento desses materiais das superfícies.

De acordo com Reed et al. (1994), a quantificação de Si pela técnica ICP-MS possui como interferentes espécies moleculares de C, H, O e N. Como os polímeros constituintes das membranas possuem esses elementos, é possível que os resultados obtidos da quantificação tenham sofrido interferência por eles. Isto também pode justificar a presença de Si após a lixiviação da membrana M0, sendo que nesta não houve a adição de NM SiO₂. Destaca-se, também, que as membranas que continham NM SiO₂ amino-funcionalizados apresentaram as maiores quantificações de Si. Sabendo que nas moléculas funcionalizantes eram encontrados C, H e N, estes elementos podem ter interferido nos resultados.

De qualquer maneira, apesar dos resultados de quantificação terem apontado para a liberação de Si, as concentrações encontradas são baixas em comparação com a quantidade inserida. A concentração utilizada no preparo de cada membrana foi de 0,25 g L⁻¹ de NM SiO₂, sendo, então, aproximadamente 0,12 g L⁻¹ de Si por membrana. Considerando que cada lixiviação foi realizada com 11 membranas, a quantidade total de Si nos frascos de lixiviação era de 1,28 g L⁻¹, valor muito superior ao encontrado nas quantificações. Portanto, em relação ao total presente em cada frasco, a membrana MS liberou aproximadamente 0,008% de Si; a liberação de M1 foi 0,019% e a de M3 foi 0,030%.

6.4.3. Ensaio crônico com *D. magna*

Na Tabela 16, são apresentados os resultados dos ensaios crônicos do NHS, NH1 e NH3.

Tabela 166 – Resultados dos ensaios crônicos com *D. magna* expostas a NHS, NH1 e NH3.

	Concen tração (mg L⁻¹)	L (%)	R (neonatos/ postura)	C (mm)	D (dias)
NHS	Controle Negativo	100	10,50 ± 2,16	3,94 ± 0,12	9,60 ± 0,47
	6,25	100	9,70 ± 1,10	3,81 ± 0,19	9,40 ± 0,46
	12,5	100	9,60 ± 0,62	3,79 ± 0,24	9,70 ± 1,12
	25	100	9,13 ± 1,09	3,68 ± 0,28	10,67 ± 1,12*
	50	100	8,70 ± 1,04*	3,49 ± 0,48*	11,38 ± 3,16*
	100	60*	6,50 ± 0,71*	2,70 ± 0,40*	18,50 ± 0,71*
	CEO (mg L⁻¹)	100	50	50	25
CENO (mg L⁻¹)	50	25	25	12,5	
NH1	Controle Negativo	100	10,50 ± 2,16	3,94 ± 0,12	9,60 ± 0,47
	0,78	100	9,50 ± 1,22	3,81 ± 0,12	9,88 ± 1,32
	1,56	100	9,00 ± 1,29	3,58 ± 0,14	9,90 ± 1,32
	3,12	70*	7,55 ± 1,34*	3,40 ± 0,21*	9,70 ± 1,28
	6,25	70*	7,56 ± 0,61*	3,10 ± 0,12*	10,20 ± 1,78
	12,5	70*	6,79 ± 1,56*	3,00 ± 0,08*	12,75 ± 1,49*
	CEO (mg L⁻¹)	3,12	3,12	3,12	12,5
CENO (mg L⁻¹)	1,56	1,56	1,56	6,25	
NH3	Controle Negativo	100	10,50 ± 2,16	3,94 ± 0,12	9,60 ± 0,47
	0,78	100	10,50 ± 0,96	3,77 ± 0,21	9,80 ± 0,79
	1,56	100	9,30 ± 0,87	3,70 ± 0,18	10,20 ± 1,65
	3,12	100	8,83 ± 0,97*	3,69 ± 0,22	11,44 ± 1,88*
	6,25	100	6,57 ± 0,89*	3,07 ± 0,72*	12,14 ± 1,77*
	12,5	60*	0*	2,10 ± 0,42*	-
	CEO (mg L⁻¹)	12,5	3,12	6,25	3,12
CENO (mg L⁻¹)	6,25	1,56	3,12	1,56	

Legenda: L - longevidade (sobreviventes); R - reprodução; C – comprimento; D – dias para a primeira postura; * diferença significativa em relação ao controle (p<0,05)

Diferentemente do ensaio agudo, ambos os materiais amino-funcionalizados apresentaram maior efeito tóxico do que o NHS na exposição crônica. Os maiores efeitos nos parâmetros longevidade, reprodução e crescimento foram observados na exposição ao NH1, sendo que uma concentração equivalente a $3,12 \text{ mg L}^{-1}$ já causava diferença significativa em relação ao controle. Já o maior efeito no parâmetro relacionado à quantidade de dias necessários para a primeira postura foi referente à exposição a NH3, com concentração de $3,12 \text{ mg L}^{-1}$.

Por se tratar de uma exposição crônica, acredita-se que o aumento considerável na toxicidade do NH1 seja referente ao efeito Cavalito de Tróia. Presume-se que a presença de 1 grupamento amina na estrutura do NH1 não seja suficiente para promover este efeito em caráter agudo para *D. magna* e que a menor toxicidade aguda em comparação com NHS seja realmente devido ao aumento de tamanho e diminuição da área superficial. Contudo, por se tratar de repetidas exposições ao longo do ciclo de vida do organismo e com a realização de alimentação, presume-se que o maior tempo de contato da NH1 com *D. magna* resulte efetivamente na ocorrência do cavalito de Tróia e que as algas utilizadas na alimentação estejam sendo contaminadas com NH1, bioamplificando os efeitos para os microcrustáceos. Enquanto isso, acredita-se que a presença de 3 grupos amina na estrutura NH3 já favoreça o aparecimento de efeitos agudos devido ao Cavalito de Tróia, sendo que o comportamento no ensaio crônico se deu de forma similar ao do NH1. Essas hipóteses, porém, necessitam de mais investigação. Além disso, o efeito Cavalito de Tróia será abordado novamente na discussão dos resultados sobre toxicidade em células Vero.

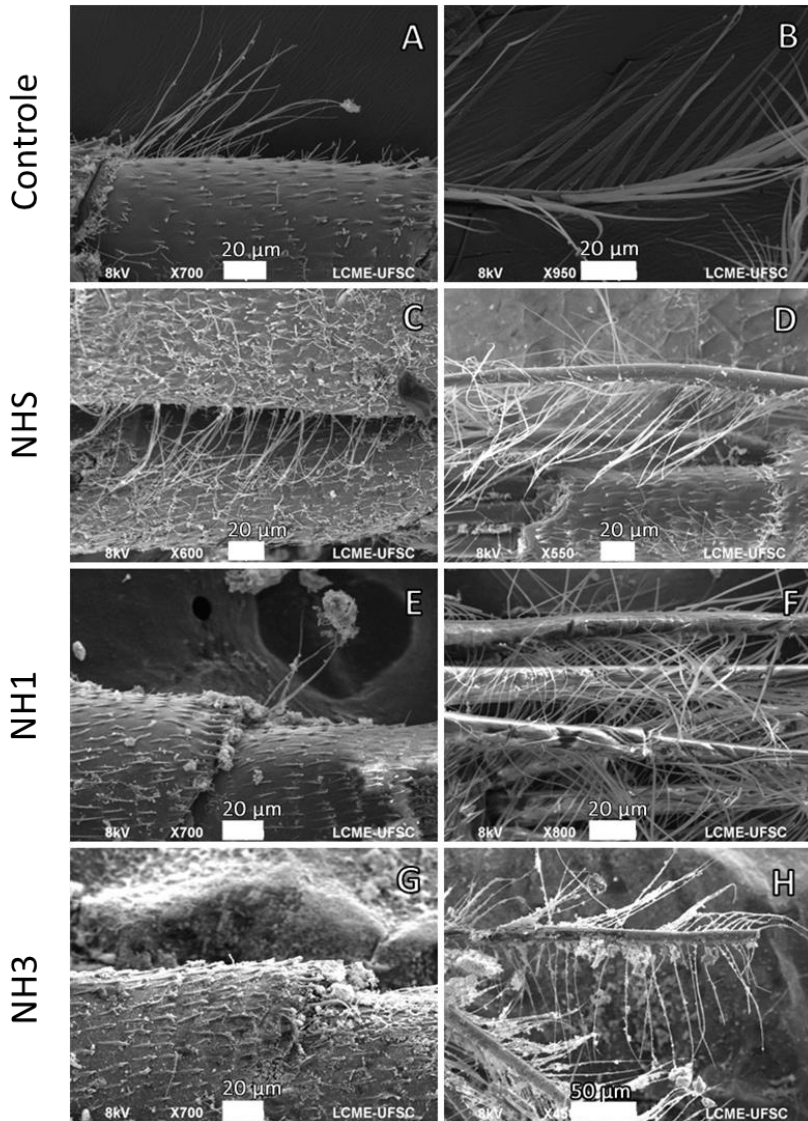
Pelos resultados de número de filhotes por postura e de dias necessários para a primeira postura, nota-se que a reprodução foi uma característica bastante afetada nos organismos. Na literatura não é reportado efeitos tóxicos sobre a reprodução para organismo expostos a formas amorfas de sílica, incluindo *D. magna* (FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2012; LEE; KIM; CHOI, 2009). Porém, sabe-se que a atividade biológica e a citotoxicidade podem estar relacionadas com as características superficiais da partícula que interagem com o meio (FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2012). Uma vez que a funcionalização altera as características superficiais do material, o efeito observado na reprodução

das *D. magna* pode ser atribuído, então, à presença da molécula amino-funcionalizante. Na literatura, reporta-se que a exposição de *D. magna* a NP SiO₂ de 7 nm e 10 nm de diâmetro não originou efeitos sob a reprodução dos organismos (LEE; KIM; CHOI, 2009), porém isso pode ter ocorrido devido à concentração utilizada de apenas 1,0 mg L⁻¹, inferior à do presente estudo. Ressalta-se ainda que à concentração 12,5 mg L⁻¹, o NH₃ foi capaz de inibir a reprodução dos organismos. Dessa forma, optou-se por fazer a investigação microscópica dos organismos expostos às concentrações que causaram efeitos na reprodução, ou seja, 50 mg L⁻¹ de NHS e 3,12 mg L⁻¹ de NH₁ e NH₃.

6.4.4. Microscopias *D. magna*

A Figura 27 apresenta as imagens de MEV das *D. magna* expostas a NHS, NH₁ e NH₃ nas CEO para o parâmetro reprodução do teste crônico. Nas imagens do controle (meio M4), percebe-se a presença de filamentos nas antenas dos organismos (Fig. 27-A) e filamentos ciliares nas regiões das brânquias (Fig. 27-B). Quando as *D. magna* foram expostas aos NM SiO₂, percebeu-se fusão nos filamentos das antenas (Fig. 27-C) e diminuição do número desses filamentos (Fig. 27-E e G). Também se observou desorganização nos filamentos ciliares (Fig. 27-D, F e H). Efeitos similares da exposição de *D. magna* a outros NM são encontrados na literatura (PUERARI et al., 2016). Apesar de não ser o principal local onde ocorrem as trocas gasosas, alterações nas regiões das brânquias podem comprometer a respiração dos organismos (PUERARI et al., 2016; YANG et al., 2014). Ainda, alterações nas antenas de *D. magna* comprometem sua capacidade natatória, o que dificulta a sua alimentação uma vez que são organismos filtrantes (EBERT, 2005). Em estudo comparativo entre NP SiO₂ (10 a 20 nm de diâmetro) e a forma *bulk* deste material (5 a 10 μm de diâmetro), percebeu-se que houve presença da forma nanométrica no trato digestivo, caracterizando ingestão, e nas brânquias, caracterizando absorção, enquanto que a forma *bulk* foi apenas ingerida pelas *D. magna* expostas (YANG et al., 2014). Portanto, a presença dos efeitos nos filamentos ciliares observados nas micrografias pode estar ocorrendo devido à absorção dos NM SiO₂.

Figura 27 - Micrografias de varredura das *D. magna* expostas a NHS, NH1 e NH3.



Legenda: A e B - Controle; C e D - Exposição à NHS; E e F - Exposição à NH1; G e H - Exposição à NH3.

Com as *D. magna* no MEV, aproveitou-se para realizar o EDS das mesmas. Os resultados dessa análise estão presentes na Tabela 17 e foram realizados através de pontos nas antenas dos organismos. Nota-se que não foi detectado silício nas amostras controle, diferentemente do que ocorreu nos organismos expostos aos tratamentos. Apesar da exposição a NHS ter sido realizada em concentração maior que NH1 e NH3 ($50 \text{ mg L}^{-1} > 3,12 \text{ mg L}^{-1}$), a maior quantidade de Si foi encontrada nas antenas dos organismos expostos ao NH1, seguido por NH3. Levando em conta que SiO_2 nanométrica pode ser ingerida e absorvida pela *D. magna* (YANG et al., 2014), atribui-se a maior presença de Si na análise EDS de NH1 e NH3 pelo fato dessas estruturas estarem revestidas com a molécula amino-funcionalizante e dessa maneira possuírem mais afinidade com os organismos, o que corrobora com a hipótese do efeito Cavalari de Tróia na exposição crônica.

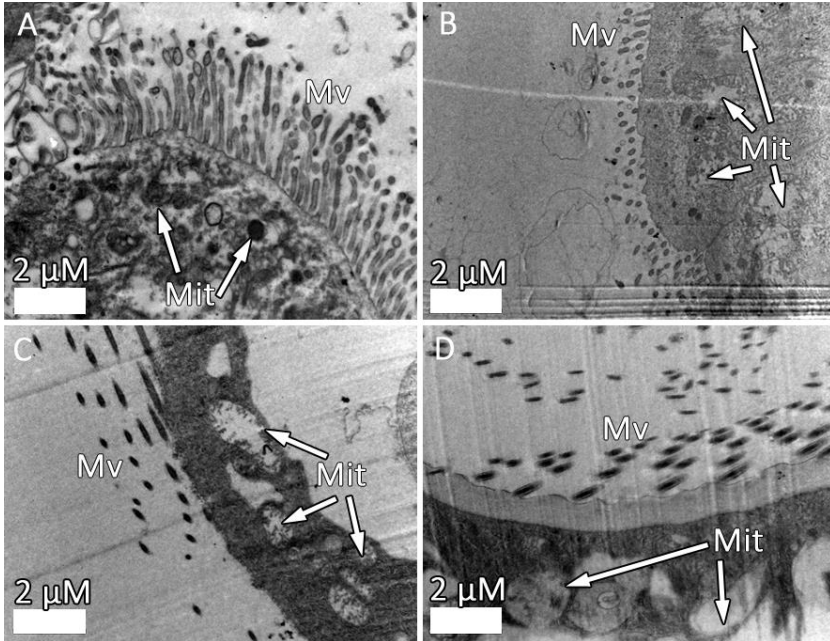
Tabela 177 - Porcentagem em massa dos elementos encontrados nas antenas de *D. magna* obtido pelo EDS.

	Carbono (C) (%)	Oxigênio (O) (%)	Cálcio (Ca) (%)	Silício (Si) (%)
Controle	66,54 ± 0,66	29,51 ± 0,58	3,95 ± 0,18	ND
NHS	63,07 ± 3,25	33,06 ± 2,64	3,38 ± 0,43	0,49 ± 0,25
NH1	65,70 ± 2,78	30,35 ± 2,20	2,98 ± 0,33	0,97 ± 0,28
NH3	59,33 ± 3,05	36,33 ± 2,41	3,47 ± 0,43	0,88 ± 0,26

Legenda: ND - Não Detectado.

As imagens de MET dos intestinos das *D. magna* expostas aos NM SiO_2 são apresentadas na Figura 28. No controle (Fig. 28-A), percebe-se a presença de mitocôndrias bem formadas e a presença de microvilosidades na parede do intestino. Com a exposição aos NM SiO_2 , os organismos apresentaram mitocôndrias com inchaços e perdas de cristais mitocondriais (cristólise). Ainda, é possível visualizar a diminuição das microvilosidades em comparação com a imagem do controle.

Figura 28 - Micrografias de transmissão das *D. magna* expostas a NHS, NH1 e NH3.



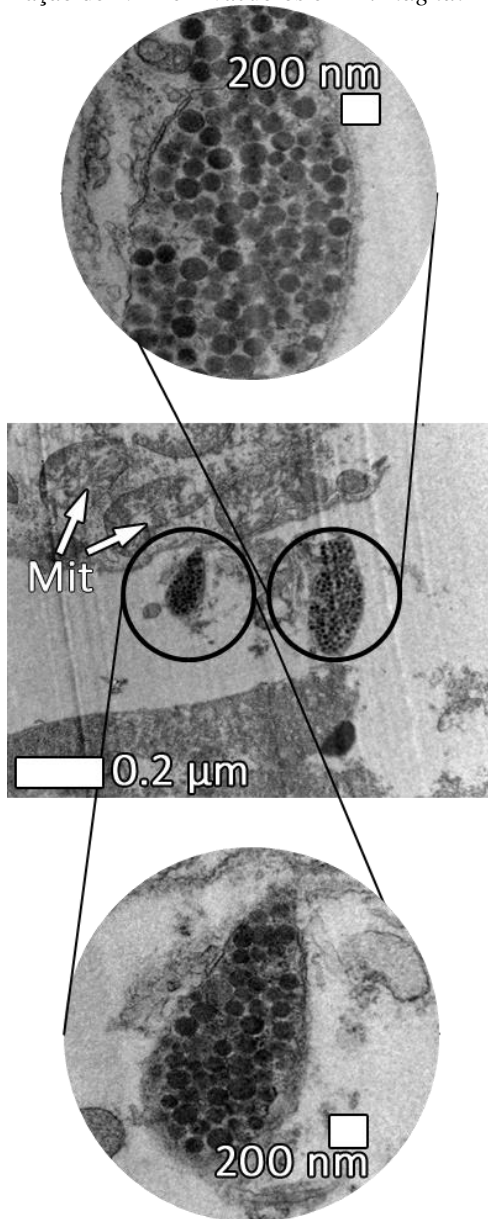
Legenda: A - Controle; B - Exposição à NHS; C - Exposição à NH1; D - Exposição à NH3. Mv - microvilosidade; Mit - mitocôndria.

Os danos observados nas microvilosidades podem ter ocorrido pelo acúmulo de NM SiO₂ no intestino dos indivíduos expostos, uma vez que esses materiais insolúveis podem estar agregando, não permitindo sua eliminação devido ao aumento de seu diâmetro (YANG et al., 2014). As microvilosidades são especializações da superfície da membrana celular e atuam na absorção de nutrientes. Dessa maneira, alterações nessas ultraestruturas levam a uma deficiência na quantidade de nutrientes absorvidos pelo organismo, interferindo no seu metabolismo (YANG; EDELMANN; ORIS, 2010). Já os efeitos nas mitocôndrias das células epiteliais do intestino podem prejudicar alguns processos bioquímicos e metabólicos, como a produção de ATP e NADPH. Sabe-se que essa organela também está envolvida com produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN), sendo o principal local de formação/acúmulo de

espécies reativas intracelular (KOWALTOWSKI; VERCESI, 1999). Assim, os resultados do teste crônico podem ser atribuídos aos danos nessas duas ultra-estruturas, uma vez que é provável a diminuição da absorção de nutrientes, produção de ERO e danos metabólicos.

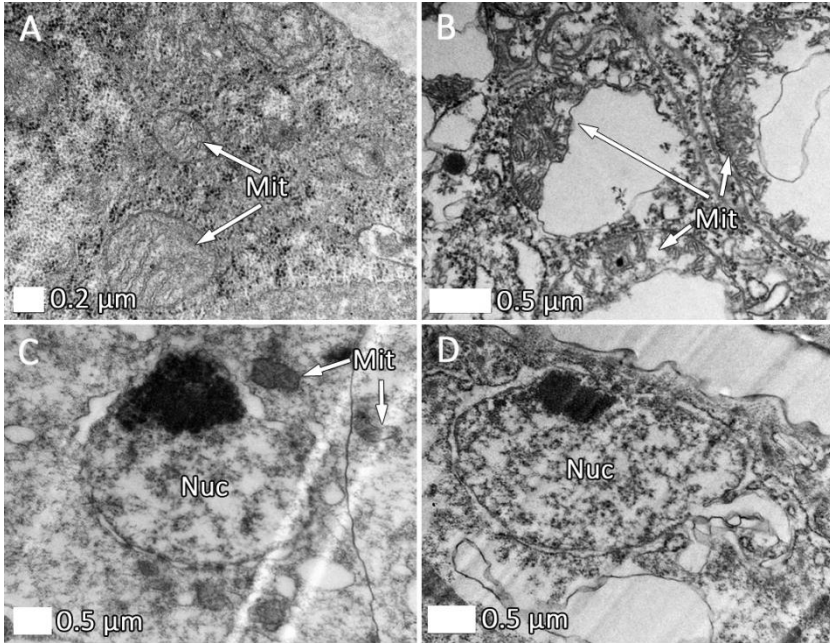
Além disso, nas imagens de MET dos organismos expostos a NH₁, foi possível observar a presença de vacúolos contendo esse NM no interior das células da *D. magna* próximos a mitocôndrias com deformidades (Fig. 29). Esta ocorrência reforça a hipótese do efeito Cavalo de Tróia promovido pela amino-funcionalização dos materiais. Contudo, não é possível afirmar devido ao fato de que não foi observado o mesmo comportamento nos organismos expostos a NH₃. Ao internalizar os NH₁ e afetar as mitocôndrias, supõe-se que esteja ocorrendo a formação de ERO e lipoperoxidação. Esses dois processos já foram relatados na literatura a partir da exposição de diferentes culturas celulares a nanoestruturas de SiO₂ amorfa (LIN et al., 2006; NAPIERSKA et al., 2010; PUERARI et al., 2018).

Figura 29 - Internalização de NH1 em vacúolos em *D. magna*.



Uma vez que a reprodução foi a característica mais afetada nos ensaios crônicos, investigou-se houve efeito intracelular a partir da exposição dos NM SiO₂ nos ovos das *D. magna*. As imagens de MET são apresentadas na Figura 30. Em comparação com o controle (Fig. 30-A), foi possível observar inchaços e cristólise nas mitocôndrias (Fig. 30-B e C), bem como inchaço nas membranas que revestem o núcleo das células (Fig. 30-C e D) dos organismos expostos aos materiais amino-funcionalizados. Gonçalves et al. (2018) realizaram ensaio de toxicidade crônica expondo NB ZnO sem e com amino-funcionalização com a molécula AEAEAPTMS a *D. magna*. No estudo, foram coletadas a primeira e a 12^a postura de filhotes de cada concentração investigada e esses neonatos foram expostos somente ao meio de cultura M4 e à alimentação. Como resultado, observou-se que mesmo sem a adição de NM ao longo do ciclo de vida, houve efeito crônico nos organismos devido à exposição maternal (GONÇALVES et al., 2018). Dessa maneira, supõe-se que as deformidades nas células dos ovos das *D. magna* observados no presente estudo possam ocasionar efeito tóxico às futuras gerações dos organismos, mesmo que estes não estejam em contato com os NM SiO₂. Esse comportamento pode trazer prejuízos às dinâmicas populacionais uma vez que as *D. magna* são importantes organismos nas cadeias alimentares aquáticas (GONÇALVES et al., 2018).

Figura 30 - Micrografias de transmissão dos ovos das *D. magna* expostas a NHS, NH1 e NH3.

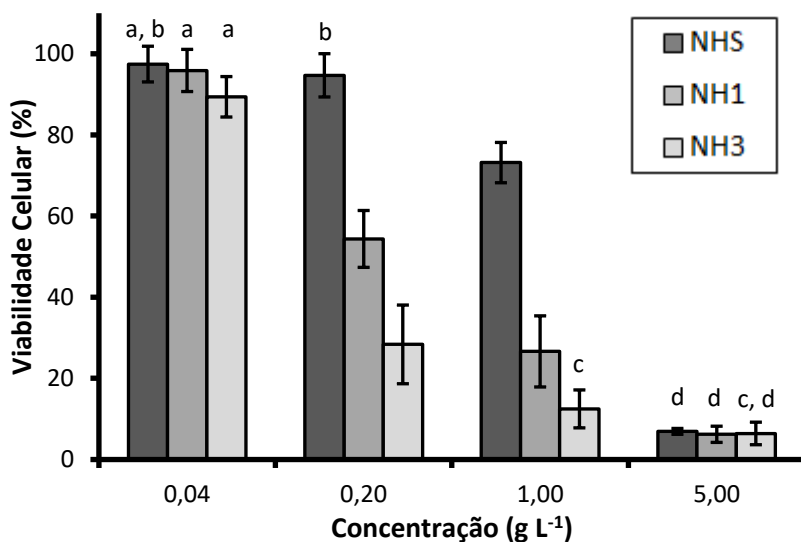


Legenda: A - Controle; B - Exposição à NHS; C - Exposição à NH1; D - Exposição à NH3. Mit - mitocôndria; Nuc - núcleo.

6.4.5. Viabilidade celular (MTT) em células Vero

Após a leitura das absorbâncias, foi possível realizar a avaliação da viabilidade celular das células Vero expostas aos NM SiO₂ e, através do software Cherburator, determinou-se as CE_{50,24h} do NHS, NH1 e NH3. O gráfico da viabilidade celular em cada concentração investigada é apresentado na Figura 31 e as letras “a”, “b”, “c” e “d” indicam grupos homogêneos a partir do teste de Tukey, isto é, não foi observada diferença significativa entre os valores que estão sob as mesmas letras. Os resultados das CE_{50,24h} são apresentados na Tabela 18.

Figura 31 - Gráfico das viabilidades celulares das células expostas ao NHS, NH1 e NH3.



Legenda: "a", "b", "c" e "d" - grupo de valores que não apresentam diferença significativa entre si.

Tabela 18 - Resultado da $CE_{50,24h}$ para exposição de células Vero para cada NM SiO₂.

	$CE_{50,24h}$ (g L ⁻¹)
NHS	1,477 ± 0,12
NH1	0,254 ± 0,07
NH3	0,117 ± 0,05

Diferentemente do teste de toxicidade aguda com *D. magna*, ambos os NM SiO₂ funcionalizados apresentaram maior toxicidade que o NHS quando células Vero foram expostas a esses materiais, conforme pode ser observado na Tabela 16. A ordem de citotoxicidade encontrada foi, da mais tóxica para a menos, NH3 > NH1 >> NHS. Vicentini et al. (2017) também encontraram maior toxicidade de NM SiO₂ (NT e NH) funcionalizados com molécula AEAEAPTMS em comparação com os

materiais sem a ancoragem, quando estes foram expostos a células Vero. Em ensaio de citotoxicidade utilizando a linha celular RTG-2 (linhagem celular de gônada de truta-arco-íris), a exposição por 24 h a NP SiO₂ amorfa também resultou em baixa citotoxicidade, sendo que não foi encontrada diferença significativa da viabilidade celular em relação ao controle negativo quando a NP SiO₂ estava na maior concentração avaliada (1,0 g L⁻¹) (CASADO; MACKEN; BYRNE, 2013). Este resultado e o do presente estudo evidenciam a baixa citotoxicidade das nanoestruturas de SiO₂ amorfas.

Estatisticamente ($p < 0,05$), a exposição de NHS, NH₁ e NH₃ na concentração 0,04 g L⁻¹ não difere quanto à viabilidade celular (legenda “a” na Figura 31). Na concentração de 0,20 g L⁻¹, a viabilidade celular das células expostas ao NHS não apresenta diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparada com as células expostas à concentração 5 vezes menor (legenda “b” na Figura 31), evidenciando uma baixa toxicidade do NHS. O efeito tóxico da NH₃ fica mais evidenciado quando, já na concentração de 1,00 g L⁻¹, a exposição não difere estatisticamente a viabilidade celular quando comparada com uma concentração 5 vezes maior (legenda “c” na Figura 31). Na concentração 5,00 g L⁻¹, todos os materiais resultaram em viabilidade celular parecida, ou seja, sem diferença estatística (legenda “d” na Figura 31).

Os NM SiO₂ também podem estar sendo adsorvidos pela superfície das células através de interações físicas e químicas, afetando a estrutura e a integridade da membrana celular. As interações da sílica amorfa com as membranas externa e interna das células são relacionadas com a sua citotoxicidade, uma vez que podem induzir liberação de substâncias endossômicas, ERO, citosinas e quimosinas, assim induzindo respostas inflamatórias (FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2012).

Em geral, quanto menor a partícula, maior o efeito tóxico devido à facilidade de penetração celular. Contudo, esse comportamento não foi observado nesta pesquisa, uma vez que NH₁ e NH₃ são maiores que NHS. Dessa maneira, supõe-se que a amino-funcionalização promoveu um efeito cavalo de Tróia sob as células. Este efeito significa que as células reconhecem algumas moléculas como nutrientes, até mesmo se elas estiverem somente revestindo a superfície de um material, e a entrada no citosol se torna facilitada. Sabe-se que a presença de certos grupos

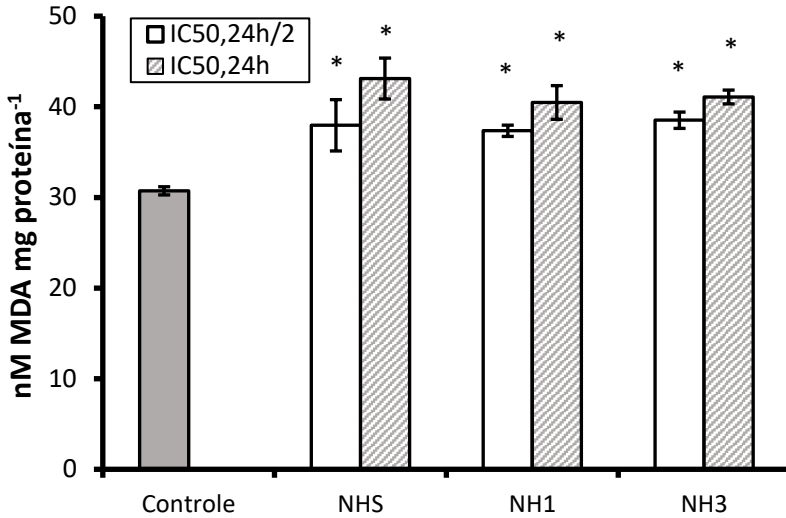
funcionais hidrofílicos, como o COOH, NH₂ e SH, é um requisito para permitir a conjugação com moléculas biológicas (XIONG et al., 2009). Assim, a presença dos grupos amina na superfície do NH1 e do NH3 pode estar mascarando os materiais, facilitando suas internalizações nas células.

Outro fator que contribui para a toxicidade é o pH. Sob condições alcalinas, SiO₂ libera sílica dissolvida e isso não ocorre em ambientes ácidos (FRUIJTIER-PÖLLOTH, 2016). Além disso, a dissolução de SiO₂ é aumentada em pH mais altos, como observado em estudo envolvendo sílica no intestino de ratos (VAN DER ZANDE et al., 2014). Com relação aos materiais investigados no presente estudo, o maior pH observado foi do NH3 (Tabela 8) e este foi o NM SiO₂ que apresentou a maior citotoxicidade.

6.4.6. Lipoperoxidação (LPO) e Espécies Reativas de Oxigênio (ERO)

Os resultados do ensaio de LPO são apresentados na Figura 32. Após 24 h de incubação, as células expostas somente ao meio RPMI produziram espontaneamente $30,72 \pm 0,45$ nM MDA mg proteína⁻¹. Este valor foi estabelecido como o valor controle para as células Vero. Com a exposição ao NHS, houve um aumento no valor de MDA de aproximadamente 23% para CE_{50,24h/2} e 40% para CE_{50,24h}. Os materiais amino-funcionalizados apresentaram aumentos similares nos níveis de MDA: NH1 promoveu aumento de 21% para CE_{50,24h/2} e 32% para CE_{50,24h}; NH3 para CE_{50,24h/2} e para CE_{50,24h} promoveu aumento de 25% e 34%, respectivamente. Todos estes aumentam representam diferença significativa em relação ao controle ($p < 0.05$).

Figura 32 - Gráfico da LPO em células Vero através da quantificação do MDA.

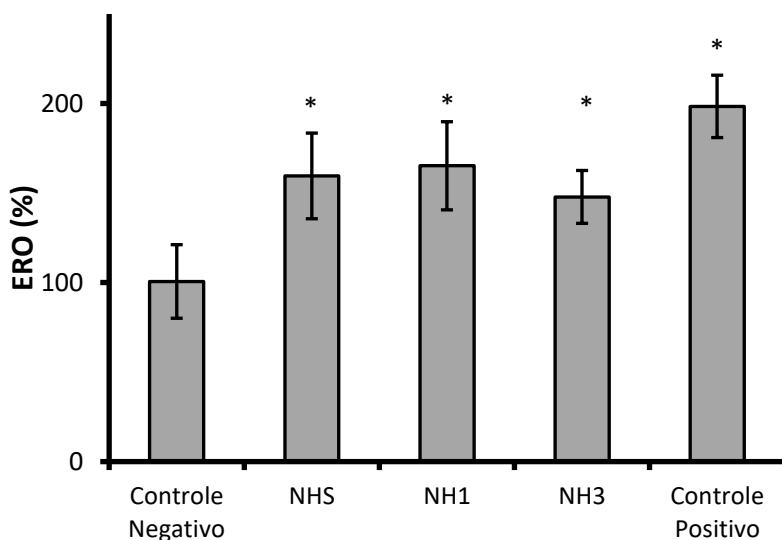


Fonte: Adaptado de PUERARI et al. (2018)

Legenda: * $p < 0,05$

Os resultados de produção de ERO, conforme apresentados na Figura 33, foram $160 \pm 24\%$ para NHS, $165 \pm 25\%$ para NH1 e $147 \pm 15\%$ para NH3. Ainda, observa-se que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre a geração de ERO após as exposições a NHS, NH1 e NH3, mesmo com esses materiais sendo testados em concentrações diferentes. O controle positivo realizado com H_2O_2 , uma substância conhecida por induzir a geração de ERO, gerou $198 \pm 17\%$ e apresentou diferença significativa em relação ao controle negativo e a todos os NM SiO_2 ($p < 0.05$).

Figura 33 - Gráfico da produção de ERO em células Vero quando expostas a NHS, NH1, NH3 e a H₂O₂.



Fonte: Adaptado de PUERARI et al. (2018)

Legenda: * $p < 0,05$

LPO e geração de ERO já foram observadas em células humanas A549 para a exposição a NP SiO₂ (LIN et al., 2006). Após a entrada dos NM SiO₂, houve um aumento na produção de ERO e isso pode levar a uma reação em cadeia na célula. Sabe-se que as ERO podem afetar as mitocôndrias (SUN et al., 2011) e induzir apoptose (INOUE et al., 2018). Os resultados do ensaio de LPO também podem ser atribuídos ao aumento na produção de ERO. Ainda, uma superprodução de MDA é associada com a inibição da síntese de proteínas e a formação de adutos de DNA, originando efeitos genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (HALLIWELL, 2007; MELEGARI et al., 2012).

Os resultados de produção de ERO e de LPO fornecem evidências do efeito Cavalo de Tróia. Nos dois ensaios, as concentrações utilizadas eram as respectivas CE_{50,24h} de cada NM SiO₂ obtidas no ensaio MTT. Não foi observada diferença significativa na produção de ERO mesmo com cada um dos NM SiO₂ estando em concentrações diferentes entre si.

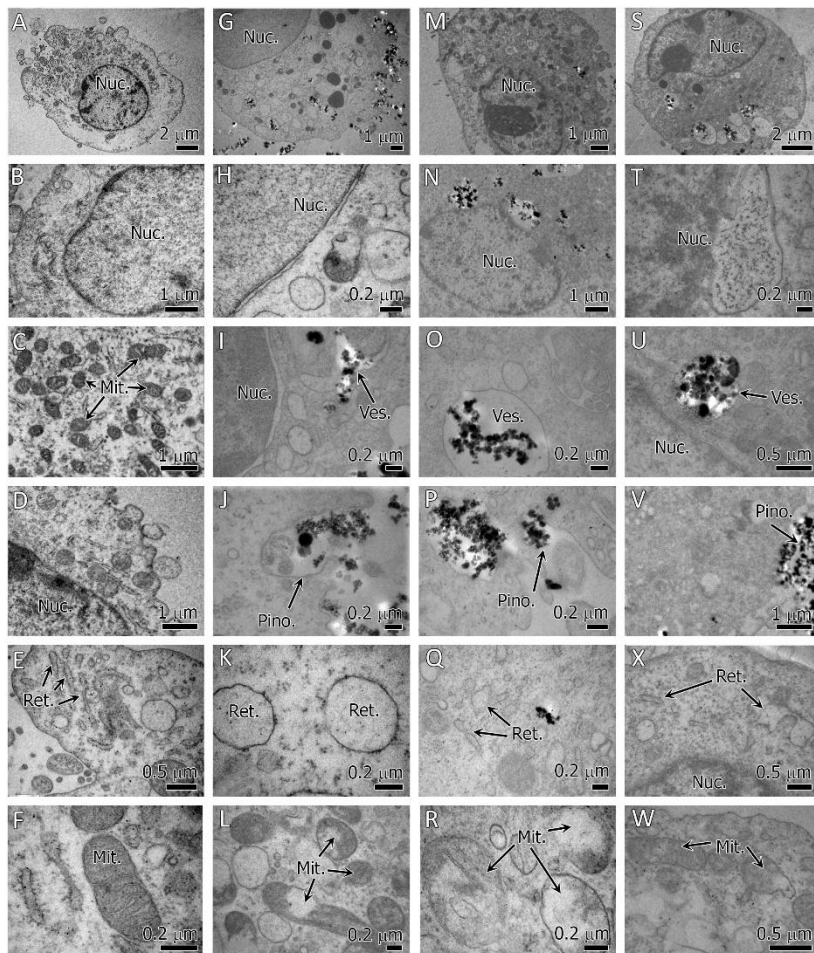
Efeito similar foi observado no ensaio LPO. Assim, supõe-se que o mesmo efeito gerado pela exposição a NHS tenha ocorrido em concentrações menores de NH1 e NH3 devido à facilidade de penetração celular promovida pela funcionalização desses materiais.

6.4.7. Microscopia das células Vero

Com as $CE_{50,24h}$ obtidas no teste MTT com as células Vero, realizou-se as imagens em MET das células intoxicadas em cada concentração. Na Figura 34, as micrografias de MET das células controle (Fig. 34-A a F) e das células expostas a NHS (Fig. 34-G a L), a NH1 (Fig. 34-M a R) e a NH3 (Fig. 34-S a W) são apresentadas.

Em comparação com o controle (Fig. 34-A), é possível observar que houve internalização de NHS (Fig. 34-G), NH1 (Fig. 34-M) e NH3 (Fig. 34-S). As internalizações vistas nas micrografias já foram reportadas na literatura por pesquisadores que avaliaram a exposição de células embrionárias de ratos a NP SiO₂ (Park et al., 2009).

Figura 34 - Micrografias das células Vero após exposição a NHS, NH1 e NH3.



Fonte: Adaptado de PUERARI et al. (2018).

Legenda: A a F - Controle; G a L - Exposição à NHS; M a R - Exposição à NH1; S a W - Exposição à NH3. Nuc - núcleo; Mit - mitocôndria; Ret - retículo; Ves - vesícula; Pino - pinocitose.

O núcleo da célula controle é normal e bem definido, conforme Fig. 34-B, enquanto que, após os tratamentos, descontinuidade (Fig. 34-H

e N) e inchaços (Fig. 34-N, T e I) podem ser observados na membrana nuclear, efeito similar ao encontrado nas imagens de MET dos ovos de *D. magna*. Os danos nessa região provavelmente foram causados pela presença de vesículas contendo NHS (Fig. 34-I), NH1 (Fig. 34-N) e NH3 (Fig. 34-U) próximas ao núcleo da célula.

A invaginação da membrana celular observada nas Fig. 34-J, P e V é característica de processo de pinocitose, sendo o provável modo de entrada dos NM SiO₂ no citosol.

Nas Fig. 34-K, Q e X pode-se visualizar alterações no retículo endoplasmático rugoso, em contraste com a Fig. 34-E (controle) em que não há deformação nessa organela. Uma vez que é responsável pela síntese de proteínas, o inchaço observado no retículo endoplasmático rugoso pode estar associado com a acumulação de proteínas em seu interior, não sendo transportadas para o complexo de Golgi. Este efeito é conhecido por estresse no retículo endoplasmático (*ER stress*) ou resposta a proteínas mal enoveladas (*Unfolded Protein Response – UPR*). A *UPR* pode levar à recuperação ou desencadear uma reação em cascata, resultando em apoptose (CHRISTEN; FENT 2012) e está envolvida na maioria dos tipos de câncer, incluindo câncer de pulmão, fígado, próstata e mama (SIMARD et al., 2016). Esse mecanismo de citotoxicidade também foi observado em outros estudos de exposição celular a NP SiO₂ (CHRISTEN; FENT, 2012).

Ainda, as Fig. 34-C e F mostram que há mitocôndrias bem definidas nas células controle. Já nas Fig. 34-L, R e W, as mitocôndrias expostas aos NM SiO₂ apresentaram inchaço, perda de cristas mitocondriais (cristólise) e rupturas. O ensaio MTT avalia o dano mitocondrial e os resultados das imagens corroboram com o do ensaio. Como observado nas micrografias, essa organela foi severamente afetada pela exposição aos NM SiO₂. Por estar envolvida em processos como o suprimento de energia, diferenciação celular e apoptose (SUN et al., 2011), defeitos nas mitocôndrias são um dos fatores envolvidos na citotoxicidade. Os danos observados na membrana nuclear e nas outras organelas também podem ser atribuídos ao aumento na geração de ERO no interior das células.

Assim, após entrar nas células Vero através de processo de pinocitose, as vias de toxicidade de NHS, NH1 e NH3 são estresse

oxidativo e lipoperoxidação, afetando principalmente mitocôndrias e retículos endoplasmáticos rugosos.

7. CONCLUSÕES

A presente tese de doutorado avaliou a toxicidade de NM SiO₂ sem e com amino-funcionalização com as moléculas APTMS e AEAEAPTMS, sendo que estes NM SiO₂ foram adicionados em distintas composições de membranas nanoestruturadas em camadas suporte (PSU) e filmes finos (PDA/PEI). A eficiência, as propriedades e a toxicidade das membranas foram determinadas. A partir dos resultados do trabalho, conclui-se que:

- Todos os NM SiO₂ avaliados apresentaram diâmetros médios abaixo de 100 nm, superfície porosa, com fios de SiO₂ que conectam as partículas, sendo que a amino-funcionalização de NH1 e NH3 foi confirmada através das imagens (MET) com aumento de diâmetro, elevação da estabilidade e diâmetro efetivo (PZ, DE) e aparecimento dos grupos funcionais de amina (FTIR);
- A dispersão dos NM SiO₂ em diferentes meios de cultura promoveu uma maior aglomeração dos mesmos em relação à dispersão em água UP, bem como promoveu aumento em seus DE;
- As membranas poliméricas preparadas apresentaram propriedades de membranas de NF, sendo que foi possível confirmar a formação de filme fino de PDA/PEI sobre camada suporte de PSU (MEV-FEG/EDS), bem como a reticulação com GA pelo aparecimento do ombro referente ao grupo imina (FTIR-ATR);
- A inserção de NM SiO₂ nas membranas poliméricas foi confirmada e promoveu aumento de rugosidade (AFM) e hidrofiliicidade (ângulo de contato) em relação a membrana sem NM SiO₂;
- Entre as 4 composições de membranas avaliadas, a M1 foi a mais hidrofílica, com maior fluxo de água UP, maior fluxo de permeado e maiores rejeições para MgCl₂, NaCl e ZnSO₄. Ainda, a adição de NH1 em M1 foi responsável pela maior rejeição de AgNO₃ entre as membranas que continham NM SiO₂. A inserção de NM SiO₂ resultou em ordem, da mais eficiente (rejeição e fluxo de permeado) para a menos, M1 > M3 > MS;

- Os ensaios de toxicidade aguda com *D. magna* resultaram em ordem de toxicidade, de mais tóxica para menos, NH₃ > NHS > NH₁, porém todos os materiais são descritos como sem classificação tóxica devido aos altos valores de CE_{50,48h} encontrados;
- Nos ensaios de toxicidade crônica, foi observado que a NHS foi a substância menos tóxica entre as 3 e que a reprodução das *D. magna* foi uma das características mais afetadas pela exposição aos NM SiO₂;
- Nas imagens (MEV-EDS) foi constatada alterações nas antenas e nas brânquias dos indivíduos expostos aos NM SiO₂ e foi destacada maior concentração de silício nos organismos expostos a NH₁ e NH₃, corroborando com hipótese de efeito Cavallo de Tróia;
- Nas imagens (MET) dos intestinos das *D. magna* expostas foram encontradas alterações ultra-estruturais em mitocôndrias e microvilosidades capazes de comprometer o metabolismo dos organismos. Também foi observada a presença de NH₁ em vacúolos intracelulares;
- Foi visualizado (MET) que houve deformações ultra-estruturais em mitocôndrias e nas membranas dos núcleos celulares dos ovos de *D. magna* expostos aos NM SiO₂;
- Nos ensaios com células Vero, a ordem de citotoxicidade dos materiais foi, do mais tóxico para o menos, NH₃ > NH₁ >> NHS;
- A exposição a NH₃, NH₁ e NHS promoveu lipoperoxidação via geração de espécies reativas de oxigênio. Mesmo em concentrações diferentes entre si, não houve diferença significativa nos níveis de MDA e de ERO gerados pelos NM SiO₂, o que corrobora com a hipótese do efeito Cavallo de Tróia;
- Nas imagens (MET) das células expostas aos NM SiO₂, observou-se internalização dos 3 materiais, bem como alterações nas membranas nucleares, mitocôndrias e retículos endoplasmáticos rugosos;

- A toxicidade aguda relatada de NHS, NH1 e NH3 não foi transferida para as membranas MS, M1 e M3 conforme ensaio de toxicidade do lixiviado dessas membranas;
- Após a lixiviação, houve pequena liberação de Si pelas membranas.

Relacionando os resultados obtidos com as hipóteses levantadas, tem-se que:

1 – Houve diferença de toxicidade promovida pela amino-funcionalização dos NM SiO₂, sendo que ancoragem das moléculas funcionalizantes aumentou o efeito tóxico dos NM SiO₂;

2 – A inserção de NM SiO₂ sem e com amino-funcionalização melhorou as propriedades da membrana de nanofiltração, incluindo hidrofiliabilidade, fluxo de água UP e rejeição de metais, com exceção ao AgNO₃, em relação à membrana M0.

3 – A presença de NM SiO₂ não conferiu toxicidade às membranas de nanofiltração, apesar da pouca liberação de Si.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados obtidos neste trabalho foi concluído que entre as composições de membranas preparadas, a M1 apresentou o melhor desempenho para os parâmetros testados (hidrofilicidade, fluxo de permeação e rejeição). As membranas preparadas nesta tese tinham como objetivo a remoção de íons metálicos de soluções salinas e a realização de mais estudos pode possibilitar a utilização dessas membranas de NF como pós-tratamento na etapa de refinamento de água e de efluentes. Assim, a composição de membrana M1 é uma candidata para avançar com os estudos, entre eles os relacionados ao *fouling*, e para posteriores testes em maiores escalas.

Quanto aos NM adicionados nas membranas, percebeu-se que, apesar da sílica amorfa possuir baixo potencial tóxico, a aminofuncionalização foi capaz promover efeitos significativos devido à facilitação da internalização dos materiais pelos organismos e células. Este comportamento merece maior atenção, pois cada vez mais as superfícies de NM são modificadas com o intuito de conferir diferentes propriedades a eles sem que possíveis interações biológicas sejam avaliadas. Apesar disso, estes materiais não promoveram efeitos toxicológicos nas membranas poliméricas nas condições estudadas, o que garante o uso seguro dessas membranas na NF. Sendo assim, considera-se que as membranas apresentaram melhorias com a adição de NM SiO₂ em suas composições e que são passíveis de serem utilizadas sem que haja prejuízos ambientais.

9. RECOMENDAÇÕES

Com base nos resultados apresentados, recomenda-se para trabalhos futuros:

- Funcionalização de NM SiO₂ com diferentes moléculas funcionalizantes para investigação dos potenciais tóxicos;
- Realização de ensaios anti-*fouling* das membranas com o objetivo de verificar se a adição de NM SiO₂ promove melhorias nessa propriedade e permite aumento da vida útil da membrana;
- Aplicação de diferentes concentrações de NHS, NH1 e NH3 nas membranas poliméricas a fim de determinar a concentração ideal de adição de NM SiO₂;
- Realização de teste crônico com *D. magna* dos lixiviados das membranas.
- Realização de ensaios de bioamplificação a partir da intoxicação das algas *Scenedesmus subspicatus* e alimentação de *D. magna*.
- Realização de ensaios crônicos multigeracionais com *D. magna* expostas a NHS, NH1 e NH3 a fim de verificar se os efeitos tóxicos são repassados para as futuras gerações;
- Investigação das vias de ação tóxica em *D. magna* (LPO, ERO, entre outros);
- Exposição de células pulmonares à NM SiO₂ e à sílica cristalina a fim de comparação de efeitos sobre células reconhecidamente afetadas pela forma cristalina.

BIBLIOGRAFIA

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS: **NBR 10.005** - Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólidos. 2004.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS: **NBR 12.713** - Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia* spp (Crustacea, Cladocera). 2016.

ABNT - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 13.373**: Ecotoxicologia aquática – Toxicidade crônica – Método de ensaio com *Ceriodaphnia* spp (Crustacea, Cladocera), 3ª edição, 18 p., Rio de Janeiro, 2010.

ADAM, N. et al. The chronic toxicity of ZnO nanoparticles and ZnCl₂ to *Daphnia magna* and the use of different methods to assess nanoparticle aggregation and dissolution. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 7, p. 709–17, 2014.

AGUIAR, M. R. M. P. DE; NOVAES, A. C.; GUARINO, A. W. S. Remoção de metais pesados de efluentes industriais por aluminossilicatos. **Química Nova**, v. 25, n. 6b, p. 1145–1154, 2002.

AL-RASHDI, B. A. M.; JOHNSON, D. J.; HILAL, N. Removal of heavy metal ions by nanofiltration. **Desalination**, v. 315, p. 2–17, 2013.

ALGHOUL, M. A.; et al. Design and experimental performance of brackish water reverse osmosis desalination unit powered by 2 kW photovoltaic system. **Renewable Energy**, v. 93, p. 101-114, 2016.

ALLEN, H. J. et al. Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 29, n. 12, p. 2742–2750, 2010.

ALMEIDA, D. L.; BENASSI, R. F. Crise hídrica e de energia elétrica entre 2014- 2015 na região Sudeste. **Revista Hipótese**, v. 1, n. 2, p. 65–76, 2015.

ALMEIDA, E.; DIAMANTINO, T. C.; DE SOUSA, O. Marine paints: The

particular case of antifouling paints. **Progress in Organic Coatings**, v. 59, n. 1, p. 2–20, 2007.

ASHARANI, P. V. et al. Cytotoxicity and Genotoxicity of Silver Nanoparticles in Human Cells. **ACS Nano**, v. 3, n. 2, p. 279–290, 24 fev. 2009.

BAE, T. H.; TAK, T. M. Effect of TiO₂ nanoparticles on fouling mitigation of ultrafiltration membranes for activated sludge filtration. **Journal of Membrane Science**, v. 249, n. 1–2, p. 1–8, 2005.

BAKER, R. W. **Membrane Technology and Applications**. 2nd ed. New York: John Wiley and Sons. 2004.

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

BASARAN, G. et al. Comparative study of the removal of nickel(II) and chromium(VI) heavy metals from metal plating wastewater by two nanofiltration membranes. **Desalination and Water Treatment**, v. 3994, n. February 2016, p. 1–11, 2015.

BELKHOUCHE, N.-E. et al. Zinc rejection from leachate solutions of industrial solid waste — effects of pressure and concentration on nanofiltration membrane performance. **Desalination**, v. 239, n. 1–3, p. 58–65, abr. 2009.

BHATTACHARJEE, S. et al. Cytotoxicity of surface-functionalized silicon and germanium nanoparticles: the dominant role of surface charges. **Nanoscale**, v. 5, n. 11, p. 4870, 2013.

BONDARENKO, O. et al. Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: A critical review. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 7, p. 1181–1200, 2013.

BORTOLETTO, E. C. et al. Remoção da prata em efluentes radiográficos Remoção da prata em efluentes radiográficos - zeólita X Y e A.pdf. p. 37–41, 2007.

- BOWER, J. J.; LEONARD, S. S.; SHI, X. Conference overview: Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 279, n. 1–2, p. 3–15, 2005.
- BRASIL. Estratégia Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação 2016-2020. Ministério da Ciência, Tecnologia, Inovações e Comunicações. Brasília, 2016.
- BRASIL. Resolução CONAMA 357 de 17 de março de 2005. Conselho Nacional de Meio Ambiente. Brasília, 2005.
- BRILHANTE, O. M., CALDAS, L. Q. A. **Gestão e avaliação de risco em saúde ambiental**. Rio de Janeiro: Edition FIOCRUZ, 155 p. 1999.
- BRUNAUER, S. et al. Adsorption of Gases in Multimolecular Layers. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 60, 9 309 – 319, 1938.
- CASADO, M. P.; MACKEN, A.; BYRNE, H. J. Ecotoxicological assessment of silica and polystyrene nanoparticles assessed by a multitrophic test battery. **Environment International**, v. 51, p. 97–105, 2013.
- CASHIN, V.B. et al. Surface functionalization and manipulation of mesoporous silica adsorbents for improved removal of pollutants: a review **Environ. Sci.: Water Res. Technol.**, 4 (2) (2018), pp. 110-128, 2018.
- CHEN, H.; LANGER, R.; EDWARDS, D. A. A Film Tension Theory of Phagocytosis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 190, n. 1, p. 118–133, 1997.
- CHEN, H. M. et al. Rejection of Heavy Metal Ions with Polyelectrolyte Composite Nanofiltration Membrane. **Applied Mechanics and Materials**, v. 529, p. 87–91, 2014.
- CHEN, J. P. et al. **Membrane Separation: Basics and Applications**. Membrane and Desalination Technologies. Handbook of Environmental Engineering, Volume 13, 2011.
- CHOI, H. GYU et al. Thin-film composite membranes comprising ultrathin hydrophilic polydopamine interlayer with graphene oxide for forward osmosis. **Desalination**, v. 449, n. October, p. 41–49, 2019.

CHRISTEN, V.; FENT, K. Silica nanoparticles and silver-doped silica nanoparticles induce endoplasmatic reticulum stress response and alter cytochrome P4501A activity. **Chemosphere**, 87 (2012), pp. 423-434, 2012.

CLÉMENT, L. et al. Toxicity assessment of silica nanoparticles, functionalised silica nanoparticles, and HASE-grafted silica nanoparticles. **Science of The Total Environment**, v. 450–451, p. 120–128, 2013.

COSTA, C. H. DA et al. Effect of chromium oxide (III) nanoparticles on the production of reactive oxygen species and photosystem II activity in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Science of The Total Environment**, p. 1–10, 2016.

COSTA, L. Rompimento de barragem afeta oferta de água potável a indígenas em MG. Reuters, 2019. Disponível em: <
<https://noticias.uol.com.br/ultimas-noticias/reuters/2019/01/29/rompimento-de-barragem-deixa-indios-com-pouca-oferta-de-agua-potavel-diz-funai.htm>
>. Acesso em 30/01/2019.

CRONHOLM, P. et al. Intracellular uptake and toxicity of Ag and CuO nanoparticles: A comparison between nanoparticles and their corresponding metal ions. **Small**, v. 9, n. 7, p. 970–982, 2013.

CURTIS, J. et al. Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians. **Toxicological reviews**, v. 25, n. 4, p. 245–260, 2006.

DEVI, D. A. et al. Pervaporation separation of isopropanol/water mixtures through crosslinked chitosan membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 262, n. 1–2, p. 91–99, 2005.

DINKER, M. K.; KULKARNI, P. S. Recent Advances in Silica-Based Materials for the Removal of Hexavalent Chromium: A Review. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 60, n. 9, p. 2521–2540, 2015.

DONG, X. et al. Thin film composite nanofiltration membranes fabricated from quaternized poly(ether ether ketone) with crosslinkable moiety using a benign solvent. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 463, p. 332–341, 2016.

EBERT, D. **Ecology, Epidemiology, and Evolution of Parasitism in Daphnia** [Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US),

National Center for Biotechnology Information. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Books>. 2005.

ELMA, M. et al. Microporous Silica Based Membranes for Desalination. **Water**, v. 4, n. 4, p. 629–649, 2012.

EREN, E. et al. Preparation, characterization and performance enhancement of polysulfone ultrafiltration membrane using PBI as hydrophilic modifier. **Journal of Membrane Science**, v. 475, p. 1–8, 2015.

FANE, A. G.; WANG, R; JIA, Y. **Membrane Technology: Past, Present and Future**. Membrane and Desalination Technologies. Handbook of Environmental Engineering, Volume 13, 2011.

FERSI BENNANI, C.; M’HIRI, O. Comparative study of the removal of heavy metals by two nanofiltration membranes. **Desalination and Water Treatment**, n. February 2014, p. 1–7, 25 out. 2013.

FILHO, M. T.; SANTOS, U. D. E. P. Silicose. **J bras Pneumol**, v. 32, n. Supl 1, p. 41–47, 2006.

FOLDBJERG, R.; DANG, D. A.; AUTRUP, H. Cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles in the human lung cancer cell line, A549. **Archives of Toxicology**, v. 85, n. 7, p. 743–750, 2011.

FOX, S. J. et al. Insight into membrane selectivity of linear and branched polyethylenimines and their potential as biocides for advanced wound dressings. **Acta Biomaterialia**, v. 37, p. 155–164, 2016.

FRUIJTIER-PÖLLOTH, C. The toxicological mode of action and the safety of synthetic amorphous silica-A nanostructured material. **Toxicology**, v. 294, n. 2–3, p. 61–79, 2012.

FRUIJTIER-PÖLLOTH, C. The safety of nanostructured synthetic Amorphous silica (SAS) as a food additive (E 551). **Arch. Toxicol.**, 90 (2016), pp. 2885-2916, 2016.

FU, F.; WANG, Q. Removal of heavy metal ions from wastewaters: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 92, n. 3, p. 407–418, 2011.

- GALVÃO, J.; BERMANN, C. Crise hídrica e energia: conflitos no uso múltiplo das águas. **Estudos Avançados**, v. 29, n. 84, p. 43–68, 2015.
- GAO, P.; et al. Performance analysis of evaporation-freezing desalination system by humidity differences. **Desalination**, v. 347, p. 215–223, 2004.
- GHAEE, A. et al. Preparation of chitosan/cellulose acetate composite nanofiltration membrane for wastewater treatment. **Desalination and Water Treatment**, n. July, p. 1–8, 2015.
- GHERASIM, C.-V.; MIKULÁŠEK, P. Influence of operating variables on the removal of heavy metal ions from aqueous solutions by nanofiltration. **Desalination**, v. 343, p. 67–74, 2014.
- GONÇALVES, R. A. et al. Comparative assessment of toxicity of ZnO and amine-functionalized ZnO nanorods toward *Daphnia magna* in acute and chronic multigenerational tests. **Aquatic Toxicology**, v. 197, n. September 2017, p. 32–40, 2018.
- GONSALVES, A. D. A. et al. Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Química Nova**, v. 34, n. 7, p. 1215–1223, 2011.
- GRANATO, A. E. C. et al. Avaliação da citotoxicidade de membranas de quitosana em cultura de células. **XIII Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e IX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação**, p. 3–6, 2009.
- 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.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.**, 35 (2007), pp. 1147–1150, 2007.
- DUFFUS, J. H. “HEAVY METALS ”— A MEANINGLESS TERM? (IUPAC Technical Report). **IUPAC, Pure and Applied Chemistry**, v. 74, n. 5, p. 793–807, 2002.
- HEBBAR, R. S. et al. Fabrication of polydopamine functionalized halloysite nanotube/polyetherimide membranes for heavy metal removal. **J. Mater. Chem. A**, v. 4, p. 1764–774, 2016.

HELLAND, A. et al. Risk Assessment of Engineered Nanomaterials : A Survey of Industrial Approaches Risk Assessment of Engineered Nanomaterials : A Survey of Industrial Approaches. v. 42, n. 2, p. 640–646, 2008.

HILAL, N. et al. A comprehensive review of nanofiltration membranes: Treatment, pretreatment, modelling, and atomic force microscopy. **Desalination**, v. 170, n. 3, p. 281–308, 2004.

HONG, S. et al. Attenuation of the in vivo toxicity of biomaterials by polydopamine surface modification. **Nanomedicine**, v. 6, n. 5, p. 793–801, 2011.

HONG XU, XUE SHI, Y. L. AND Z. M. The preparation and antibacterial activity of polyester fabric loaded with silver nanoparticles. **Textile Research Journal**, v. 83, n. 3, p. 321–326, 2013.

HORCAS et al. WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology. **Rev. Sci. Instrum.** 78, 013705, 2007.

HUANG, R. et al. A novel composite nanofiltration (NF) membrane prepared from graft copolymer of trimethylallyl ammonium chloride onto chitosan (GCTACC)/poly(acrylonitrile) (PAN) by epichlorohydrin cross-linking. **Carbohydrate Research**, v. 341, n. 17, p. 2777–2784, dez. 2006.

INOUE, Y. et al. Effect of silica nanoparticles on cultured central nervous system cells. **World J. Neurosci.**, 8 (2018), pp. 146-156, 2018.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION, 2005. **ISO/TC229**. Technical committees. Nanotechnologies. International Organization for Standardization.

ISO – INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **ISO 10706**: Water quality – Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). Geneva, ISO. 2000.

JACOBI, P. R.; CIBIM, J. A NECESSÁRIA COMPREENSÃO DAS CONSEQUÊNCIAS AMPLIADAS DE UM DESASTRE. **Ambiente & Sociedade**, v. 18, n. 4, p. 0–0, dez. 2015.

JACOBI, P. R.; CIBIM, J.; LEÃO, R. DE S. Crise hídrica na Macrometrópole Paulista e respostas da sociedade civil. **Estudos Avançados**, v. 29, n. 84, p. 27–42, 2015.

JI, Y. L. et al. Fabrication of chitosan/PDMCHEA blend positively charged membranes with improved mechanical properties and high nanofiltration performances. **Desalination**, v. 357, p. 8–15, 2015.

JI, Z. et al. Dispersion and stability optimization of TiO₂ nanoparticles in cell culture media. **Environ. Sci. Technol.**, 44 (2010), pp. 7309-7314, 2010.

JIANG, J. et al. Antifouling and antimicrobial polymer membranes based on bioinspired polydopamine and strong hydrogen-bonded poly(n-vinyl pyrrolidone). **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 5, n. 24, p. 12895–12904, 2013.

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

KAJITVICHYANUKUL, P. et al. **Potable Water Biotechnology, Membrane Filtration and Biofiltration**. Membrane and Desalination Technologies. Handbook of Environmental Engineering, Volume 13, 2011.

KASEMSET, S. et al. Influence of polydopamine deposition conditions on hydraulic permeability, sieving coefficients, pore size and pore size distribution for a polysulfone ultrafiltration membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 522, p. 100–115, 2017.

KIELLAND, J. Individual Activity Coefficients of Ions in Aqueous Solutions. **J. Am. Chem. Soc.** 1937, 59, 9, 1675-1678. 1937.

KO, Y. G. et al. Cu²⁺ sequestration by amine-functionalized silica nanotubes. **Journal of Hazardous Materials**, v. 260, p. 489–497, 2013a.

KO, Y. G. et al. Amines immobilized double-walled silica nanotubes for CO₂ capture. **Journal of Hazardous Materials**, v. 250–251, p. 53–60, 2013b.

KOSEOGLU-IMER, D. Y. et al. The production of polysulfone (PS)

membrane with silver nanoparticles (AgNP): Physical properties, filtration performances, and biofouling resistances of membranes. **Journal of Membrane Science**, v. 428, p. 620–628, 2013.

KÜLKAMP, I. C. et al. Stabilization of Lipoic Acid by Encapsulation in Polymeric Nanocapsules Designed for Cutaneous Administration. **Quimica Nova**, v. 32, n. 8, p. 2078–2084, 2009.

KUMAR, R. et al. Synthesis and characterization of novel water soluble derivative of Chitosan as an additive for polysulfone ultrafiltration membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 440, p. 140–147, 2013a.

KUMAR, R. et al. Polysulfone–Chitosan blend ultrafiltration membranes: preparation, characterization, permeation and antifouling properties. **RSC Advances**, v. 3, n. 21, p. 7855, 2013b.

KUMAR, R. et al. Permeation, antifouling and desalination performance of TiO₂ nanotube incorporated PSF/CS blend membranes. **Desalination**, v. 316, p. 76–84, 2013c.

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

LANDIS, W. G.; YU, M. **Introduction of environmental toxicology: impacts of chemical upon ecological systems**. 3^a Ed. Lewis Publishers. 2003.

LEE, N. et al. **Which hazard category should specific nanomaterials or groups of nanomaterials be assigned to and how?** Geneva: World Health Organization; 2017. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO.

LEE, S. H. et al. Amine-functionalized gold nanoparticles as non-cytotoxic and efficient intracellular siRNA delivery carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 1, p. 94–101, 2008.

LEE, S.; KIM, S.; CHOI, J. Genotoxicity and ecotoxicity assays using the freshwater crustacean *Daphnia magna* and the larva of the aquatic midge *Chironomus riparius* to screen the ecological risks of nanoparticle exposure. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 28, p. 86–91, 2009.

- LI, H. et al. Enhancement in membrane performances of a commercial polyamide reverse osmosis membrane via surface coating of polydopamine followed by the grafting of polyethylenimine. **RSC Adv.**, v. 5, n. 119, p. 98566–98575, 2015.
- LI, M. et al. Bioinspired fabrication of composite nanofiltration membrane based on the formation of DA/PEI layer followed by cross-linking. **Journal of Membrane Science**, v. 459, p. 62–71, 2014.
- LI, N. N. et al. **Advanced Membrane Technology and Applications**. John Wiley & Sons, Inc., Publication. USA. 2008.
- LI, T. et al. Comparative toxicity study of Ag, Au, and Ag-Au bimetallic nanoparticles on *Daphnia magna*. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 2, p. 689–700, 2010.
- LI, X. et al. Biocompatibility and toxicity of nanoparticles and nanotubes. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 2012a.
- LI, X. L. et al. Hydrophilic nanofiltration membranes with self-polymerized and strongly-adhered polydopamine as separating layer. **Chinese Journal of Polymer Science (English Edition)**, v. 30, n. 2, p. 152–163, 2012b.
- LI, Z. et al. Small gold nanorods laden macrophages for enhanced tumor coverage in photothermal therapy. **Biomaterials**, v. 74, p. 144–154, 2016.
- 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, W. et al. In vitro toxicity of silica nanoparticles in human lung cancer cells. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 217, n. 3, p. 252–259, 2006.
- LIU, J. et al. Effects of ZnO, CuO, Au, and TiO₂ nanoparticles on *Daphnia magna* and early life stages of zebrafish *danio rerio*. **Environment Protection Engineering**, v. 40, n. 1, p. 139–149, 2014.
- LIU, L. et al. Facet Energy and Reactivity versus Cytotoxicity: The Surprising Behavior of CdS Nanorods. **Nano Letters**, v. 16, n. 1, p. 688–694,

13 jan. 2016.

LIU, L.; SHAO, B.; YANG, F. Polydopamine coating - Surface modification of polyester filter and fouling reduction. **Separation and Purification Technology**, v. 118, p. 226–233, 2013.

LIU, Z. et al. Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 5, p. 1410–5, 2008a.

LIU, Z. et al. Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment. **Cancer Research**, v. 68, n. 16, p. 6652–6660, 2008b.

LU, X.; BIAN, X.; SHI, L. Preparation and characterization of NF composite membrane. **Journal of Membrane Science**, v. 210, n. 1, p. 3–11, 2002.

LUBICK, N. Nanosilver toxicity: ions, nanoparticles or both? **Environmental Science & Technology**, v. 42, n. 23, p. 8617–8617, dez. 2008.

LUZ, A. P.; RIBEIRO, S.; PANDOLFELLI, V. C. Artigo revisão: uso da molhabilidade na investigação do comportamento de corrosão de materiais refratários. **Cerâmica**, v. 54, n. 330, p. 174–183, 2008.

LV, Y. et al. Nanofiltration membranes via co-deposition of polydopamine/polyethylenimine followed by cross-linking. **Journal of Membrane Science**, v. 476, p. 50–58, fev. 2015.

LV, Y. et al. Nanocomposite Membranes via the Co-deposition of Polydopamine/ Polyethyleneimine with Silica Nanoparticles for Enhanced Mechanical Strength and High Water Permeability. **ACS Applied Materials & Interfaces**, p. acsami.6b13761, 2016.

MALISKA, A. M. **Microscopia eletrônica de varredura**. Santa Catarina: Departamento de Engenharia Mecânica. Universidade Federal de Santa Catarina, 2003. 98p. Apostila.

MASER, E. et al. In vitro and in vivo genotoxicity investigations of differently sized amorphous SiO₂ nanomaterials. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 794, p. 57–74,

2015.

MARQUES, J. Instituto mineiro encontra metais pesados acima do limite no rio Doce. Folha de São Paulo, 27 de novembro. 2015.
<<http://www1.folha.uol.com.br/cotidiano/2015/11/1711919-instituto-mineiro-encontra-metais-pesados-acima-do-limite-no-rio-doce.shtml>>. Data de acesso: 15/02/2016.

MARSALEK, J. et al. An exploratory study of urban runoff toxicity. **Water Science and Technology**, v. 39, n. 12, p. 33–39, 1999.

MATIAS, W. G.; CREPPY, E. E. Lipoperoxidação induzida pelo Ácido Okadaico. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 4, p. 40–44, 1998.

MAXIMOUS, N. et al. Optimization of Al₂O₃/PES membranes for wastewater filtration. **Separation and Purification Technology**, v. 73, n. 2, p. 294–301, 2010.

MELEGARI, S. P. **Estudo do mecanismo de ação tóxica da saxitoxina e avaliação de sua adsorção em materiais alternativos para aplicação em sistemas de tratamento de água**. 2010. 205p. Tese (Doutorado em Engenharia Ambiental). Programa de Pós-Graduação em Engenharia Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

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

MENDONÇA, R. **Aplicação de espectroscopia de fotoelétrons ao estudo de processos de corrosão e de oxidação de superfícies metálicas: Inconel 182, Fe/Cu(100) e U-Zr-Nb**. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Minas. Rede Temática em Engenharia de Materiais. 2011.

METCALF & EDDY. **Wastewater Engineering: Treatment and Resource Recovery**. 5th Edition, McGraw-Hill, New York. 2014.

MIAO, J.; ZHANG, L. C.; LIN, H. A novel kind of thin film composite nanofiltration membrane with sulfated chitosan as the active layer material. **Chemical Engineering Science**, v. 87, p. 152–159, 2013.

MIERZWA, J. C. et al. Tratamento de água para abastecimento público por ultrafiltração: Avaliação comparativa através dos custos diretos de implantação e operação com os sistemas convencional e convencional com carvão ativado. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 13, n. 1, p. 78–87, 2008.

MOHAMMAD, A. W. et al. Nanofiltration membranes review: Recent advances and future prospects. **Desalination**, v. 356, p. 226–254, 2014.

MONTES-FONSECA, S. L. et al. Cytotoxicity of protein-carbon nanotubes on J774 macrophages is a functionalization grade-dependent effect. **Biomed Res Int**, v. 2015, p. 796456, 2015.

MORTIMER, M.; KASEMETS, K.; KAHRU, A. Toxicity of ZnO and CuO nanoparticles to ciliated protozoa *Tetrahymena thermophila*. **Toxicology**, v. 269, n. 2–3, p. 182–189, 2010.

MULDER, M. **Basic principles of membrane technology**. 2nd edition. K.Iuwer Academic Publishers, The Netherlands. 1996.

MURDOCK, R. C. et al. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. **Toxicological Sciences**, v. 101, n. 2, p. 239–253, 2008.

MUSIĆ, S.; FILIPOVIĆ-VINCEKOVIĆ, N.; SEKOVANIĆ, L.. Precipitation of amorphous SiO₂ particles and their properties. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 28, p. 89–94. 2011.

MYHRE, J.M.; ANDERSEN, H.; AARNES, F. Evaluation of the probes 2',7'-dichlorofluorescein diacetate, luminol, and lucigenin as indicators of reactive species formation. **Biochem. Pharmacol.**, 65 (2003), pp. 1575-1582, 2003.

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.

NASCENTE, P. A. P. **Caracterização de materiais por espectroscopia de fotoelétrons**. 19^o Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (CBECiMat).Campos do Jordão, SP, Brasil. 2010.

NAPIERSKA, D. et al. The nanosilica hazard: another variable entity. **Particle and fibre toxicology**, v. 7, n. 1, p. 39, 2010.

NETO, C. G. T. et al. Permeability studies in chitosan membranes. Effects of crosslinking and poly(ethylene oxide) addition. **Carbohydrate Research**, v. 340, n. 17, p. 2630–2636, 2005.

NEVOZHAY, D. Cheburator software for automatically calculating drug inhibitory concentrations from in vitro screening assays. **PLoS ONE**, v. 9, n. 9, p. 1–10, 2014.

NEWMAN, M. C. **Quantitative ecotoxicology**. 2nd ed. CRC Press, Florida. 2011.

NEWMAN, M. C.; UNGER, M. A. **Fundamentals of Ecotoxicology**. 2nd ed. Florida: Lewis Publishers, 458p. 2003.

NIKSEFAT, N.; JAHANSHAH, M.; RAHIMPOUR, A. The effect of SiO₂ nanoparticles on morphology and performance of thin film composite membranes for forward osmosis application. **Desalination**, v. 343, p. 140–146, 2014.

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

NOGUEIRA, P. F. M.; PAINO, I. M. M.; ZUCOLOTTI, V. Nanosilver: Propriedades, Aplicações e Impactos na Saúde Pública e Meio Ambiente. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 1, n. 4, p. 59–71, 2013.

NOWACK, B.; KRUG, H. F.; HEIGHT, M. 120 Years of Nanosilver History: Implications for Policy Makers. **Environmental Science & Technology**, v. 45, n. 4, p. 1177–1183, fev. 2011.

NUNES, J. A. **Tratamento físico-químico de águas residuárias industriais**. 6^a ed. Revisada, ampliada e atualizada. Aracaju: Gráfica Editora J. Andrade. 2012.

OBERDÖRSTER, G.; OBERDÖRSTER, E.; OBERDÖRSTER, J. Nanotoxicology: An Emerging Discipline Evolving from Studies of

Ultrafine Particles. **Environ Health Perspect**, v. 113, n. 7, p. 823–839, 2005.

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

PANDA, S. R.; DE, S. Preparation, characterization and performance of ZnCl₂ incorporated polysulfone (PSF)/polyethylene glycol (PEG) blend low pressure nanofiltration membranes. **Desalination**, v. 347, p. 52–65, 2014.

PARK, M. V. D. Z. et al. In vitro developmental toxicity test detects inhibition of stem cell differentiation by silica nanoparticles. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 240, n. 1, p. 108–116, 2009.

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

PATI, R. et al. Zinc-oxide nanoparticles exhibit genotoxic, clastogenic, cytotoxic and actin depolymerization effects by inducing oxidative stress responses in macrophages and adult mice. **Toxicological Sciences**, 21 jan. 2016.

PAWŁOWSKI, L. et al. (EDS.). **Chemistry for the Protection of the Environment 3**. Boston, MA: Springer US, 1998.

PERREAULT, F. et al. Investigation of animal and algal bioassays for reliable saxitoxin ecotoxicity and cytotoxicity risk evaluation. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, n. 4, p. 1021–1026, 2011.

PERREAULT, F. et al. Genotoxic effects of copper oxide nanoparticles in Neuro 2A cell cultures. **Science of the Total Environment**, v. 441, p. 117–124, 2012.

PICCINNO, F. et al. Industrial production quantities and uses of ten engineered nanomaterials in Europe and the world. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 14, n. 9, 2012.

POTTER H. **ICMBio aplica multa de R\$ 3 milhões na Casan por despejo de efluente no rio Papaquara, em Florianópolis**. Diário Catarinense, 2017.

Disponível em: < <http://dc.clicrbs.com.br/sc/noticias/noticia/2017/01/icmbio-aplica-multa-de-r-3-milhoes-na-casan-por-despejo-de-efluente-no-rio-papaquara-em-florianopolis-9479397.html>>. Acesso em: 07/02/2017.

PUERARI, R. C. et al. Synthesis, characterization and toxicological evaluation of Cr₂O₃ nanoparticles using *Daphnia magna* and *Aliivibrio fischeri*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 128, p. 36–43, jun. 2016.

PUERARI, R. C. et al. Investigation of toxicological effects of amorphous silica nanostructures with amine-functionalized surfaces on Vero cells. **Chemosphere**, 2018.

QIU, W. Z. et al. Composite nanofiltration membranes via the co-deposition and cross-linking of catechol/polyethylenimine. **RSC Adv.**, v. 6, n. 41, p. 34096–34102, 2016.

QIU, W. Z. et al. Co-deposition of catechol/polyethyleneimine on porous membranes for efficient decolorization of dye water. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 3, n. 27, p. 14438–14444, 2015.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 76–83, 2009.

RAJAEIAN, B. et al. Fabrication and characterization of polyamide thin film nanocomposite (TFN) nanofiltration membrane impregnated with TiO₂nanoparticles. **Desalination**, v. 313, p. 176–188, 2013.

RASKIN, I. et al. Bioconcentration of heavy metals by plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 5, n. 3, p. 285–290, 1994.

REED, N. M. et al. Characterization of polyatomic ion interferences in inductively coupled plasma mass spectrometry using a high resolution mass spectrometer. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 9, n. 8, p. 881, 1994.

RELIGA, P.; KOWALIK-KLIMCZAK, A. Effect of interaction between anionic surfactants and poly(piperazine-amide) nanofiltration membranes used for chromium(III) recovery from saline solution. **Water Science and Technology**, v. 72, n. 10, p. 1803–1809, 2015.

REN, J; WANG, R. **Preparation of Polymeric Membranes**. Membrane and Desalination Technologies. Handbook of Environmental Engineering, Volume 13, 2011.

RIBEIRO, F. et al. Silver nanoparticles and silver nitrate induce high toxicity to *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio*. **Science of The Total Environment**, v. 466–467, p. 232–241, 2014.

RIBEIRO, L.; CRUZ, M. M. **Saiba quais são as impurezas da lama da barragem de Brumadinho e os riscos**. Correio Braziliense, 2019.

Disponível em: <

<https://www.correiobraziliense.com.br/app/noticia/brasil/2019/01/30/interna-brasil,734108/saiba-quais-sao-as-impurezas-da-lama-da-barragem-de-brumadinho-e-os-ri.shtml> > Acesso em: 30/01/2019.

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

ROSSETTO, A. L. DE O. F. et al. Synthesis, characterization and toxicological evaluation of a core-shell copper oxide/polyaniline nanocomposite. **Chemosphere**, v. 108, p. 107–114, 2014.

ROSZAK, J. et al. Effect of particle size and dispersion status on cytotoxicity and genotoxicity of zinc oxide in human bronchial epithelial cells. **Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen**, 805 (2016), pp. 7-18, 2016.

SANTOS, T. **Preparação e caracterização de membranas compósitas polisulfona/material celulósico como barreira seletiva**. Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Materiais, 2011.

SCHIAVO, S. et al. Genotoxic and cytotoxic effects of ZnO nanoparticles for *Dunaliella tertiolecta* and comparison with SiO₂ and TiO₂ effects at population growth inhibition levels. **Science of The Total Environment**, v. 550, p. 619–627, 2016.

SERRÃO SOUSA, V.; RIBAU TEIXEIRA, M. Silver nanoparticles separation from the water using nanofiltration membranes: The role of mono-divalent salts and NOM. **Separation and Purification Technology**, v. 149,

p. 165–173, 2015.

SIMARD, J. C.; DUROCHER, I.; GIRARD, D. Silver nanoparticles induce irreparable endoplasmic reticulum stress leading to unfolded protein response dependent apoptosis in breast cancer cells. **Apoptosis**, 21 (2016), pp. 1279-1290, 2016.

SHEN, J. NAN et al. Preparation and characterization of PES-SiO₂ organic-inorganic composite ultrafiltration membrane for raw water pretreatment. **Chemical Engineering Journal**, v. 168, n. 3, p. 1272–1278, 2011.

SCHOULTZ, I. et al. McKayIndomethacin-induced translocation of bacteria across enteric epithelia is reactive oxygen species-dependent and reduced by vitamin C. **AJP Gastrointest. Liver Physiol.**, 303 (5), pp. G536-G545, 2012.

SHVEDOVA, A. A; KAGAN, V. E.; FADEEL, B. Close encounters of the small kind: adverse effects of man-made materials interfacing with the nanocosmos of biological systems. **Annual review of pharmacology and toxicology**, v. 50, p. 63–88, 2010.

SINHA, M. K.; PURKAIT, M. K. Preparation of fouling resistant PSF flat sheet UF membrane using amphiphilic polyurethane macromolecules. **Desalination**, v. 355, p. 155–168, 2015.

SOSAN, A. et al. Engineered silver nanoparticles are sensed at the plasma membrane and dramatically modify physiology of Arabidopsis thaliana plants. **Plant J**, p. 245–257, 2015.

SOUZA, J. F. **Desenvolvimento de membranas de polissulfona para a imobilização de lipase**. Dissertação. Programa de Mestrado em Materiais. Universidade de Caxias do Sul, 2006.

SPURR, A. R. A low-viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. **Journal of Ultrastructure Research**, v. 26, n. 1–2, p. 31–43, 1969.

SRIDHAR, S. et al. Development of crosslinked poly(ether-block-amide) membrane for CO₂/CH₄ separation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 297, n. 1–3, p. 267–274, 2007.

SUN, L. et al. Cytotoxicity and mitochondrial damage caused by silica nanoparticles. **Toxicol. Vitro**, 25 (2011), pp. 1619-1629, 2011.

TALEBIAN, N.; ZARE, E. Structure and antibacterial property of nano-SiO₂ supported oxide ceramic. **Ceramics International**, v. 40, n. 1 PART A, p. 281–287, 2014.

TAMBURINI, A. et al. CHP (combined heat and power) retrofit for a large MED-TVC (multiple effect distillation along with thermal vapour compression) desalination plant: high efficiency assessment for different design options under the current legislative EU framework. **Energy**, in press, 2016.

TCHOUNWOU, P. B. et al. Heavy Metal Toxicity and the Environment. In: LUCH, A. (Ed.). **Exs. Experientia Supplementum**. Basel: Birkhäuser Basel, 2012. v. 100p. 133–164.

THOMÉ, L. **Polução do rio do Brás provoca viroses, revolta turistas e prejudica temporada em Canasvieiras**. Notícias do Dia, 2016. Disponível em: < <http://ndonline.com.br/florianopolis/noticias/poluicao-do-rio-do-bras-provoca-viroses-revolta-turistas-e-prejudica-temporada-em-canasvieiras>>. Acesso em: 07/02/2017.

TOKUI, Y.; MORIGUICHI, H.; NISHI, Y. Comprehensive environmental assessment of seawater desalination plants: multistage flash distillation and reverse osmosis membrane types in Saudi Arabia. **Desalination**, v. 351, p. 145-150, 2014.

TSAI, H.-S.; WANG, Y.-Z. Properties of hydrophilic chitosan network membranes by introducing binary crosslink agents. **Polymer Bulletin**, v. 60, n. 1, p. 103–113, 2008.

ULBRICHT, M. Advanced functional polymer membranes. **Polymer**, v. 47, n. 7, p. 2217–2262, 2006.

United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division (2014). **World Urbanization Prospects: The 2014 Revision, Highlights (ST/ESA/SER.A/352)**. 2014.

UNESCO – The United Nations World. **Water Development Report 3:**

Water in a Changing World, UNESCO Publishing, Paris, 2009.

VAN DER BRUGGEN, B.; VANDECASTEELE, C. Removal of pollutants from surface water and groundwater by nanofiltration: Overview of possible applications in the drinking water industry. **Environmental Pollution**, v. 122, n. 3, p. 435–445, 2003.

VAN DER ZANDE, M. et al. Sub-chronic toxicity study in rats orally exposed to nanostructured silica. **Part. Fibre Toxicol.**, 11 (2014), pp. 1-19, 2014.

VERIATO, M. K. L. et al. Água : Escassez , crise e perspectivas para 2050. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 10, n. 5, p. 17–22, 2015.

VICENNATI, P. et al. Polyethylenimine in medicinal chemistry. **Current medicinal chemistry**, v. 15, n. 27, p. 2826–2839, 2008.

VICENTINI, D. S. et al. Toxicological impact of morphology and surface functionalization of amorphous SiO₂ nanomaterials. **NanoImpact**, v. 5, p. 6–12, 2017.

VON SPERLING, M. **Introdução à qualidade das águas e ao tratamento de esgotos**. 3ª ed, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2005.

VUPPUTURI, S. et al. Occupational silica exposure and chronic kidney disease. **Renal failure**, v. 34, n. 1, p. 40–6, 2012.

WALKER, C. **Ecotoxicology: Effects of Pollutants on the Natural Environment**. CRC Press, Florida. 2014.

WANG, D. X. et al. Separation performance of a nanofiltration membrane influenced by species and concentration of ions. **Desalination**, v. 175, n. 2, p. 219–225, 2005.

WANG, L. K. et al. **Treatment of Food Industry Foods and Wastes by Membrane Filtration**. Membrane and Desalination Technologies. Handbook of Environmental Engineering, Volume 13, 2011.

WANG, T. et al. Selected properties of pH-sensitive, biodegradable chitosan-

poly(vinyl alcohol) hydrogel. **Polymer International**, v. 53, p. 911-918, 2004.

WU, D. et al. Thin film composite nanofiltration membranes assembled layer-by-layer via interfacial polymerization from polyethylenimine and trimesoyl chloride. **Journal of Membrane Science**, v. 472, p. 141-153, 2014.

WU, H.; TANG, B.; WU, P. Optimizing polyamide thin film composite membrane covalently bonded with modified mesoporous silica nanoparticles. **Journal of Membrane Science**, 2013.

XIE, W. et al. Polyamide interfacial composite membranes prepared from m-phenylene diamine, trimesoyl chloride and a new disulfonated diamine. **Journal of Membrane Science**, v. 403-404, p. 152-161, 2012.

XIONG, L. Q. et al. Synthesis, characterization, and in vivo targeted imaging of amine-functionalized rare-earth up-converting nanophosphors. **Biomaterials**, v. 30, n. 29, p. 5592-5600, 2009.

XU, R. et al. Preparation of mesoporous poly (acrylic acid)/SiO₂ composite nanofiber membranes having adsorption capacity for indigo carmine dye. **Applied Physics A**, v. 106, n. 3, p. 747-755, 2012.

YANG, H. C. et al. Effects of polyethyleneimine molecular weight and proportion on the membrane hydrophilization by codepositing with dopamine. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 32, p. 1-10, 2016.

YANG, S. et al. Ecotoxicological effect of nano-silicon dioxide particles on *Daphnia Magna*. **Integrated Ferroelectrics**, v. 154, n. 1, p. 64-72, 2014.

YANG, X. Y.; EDELMANN, R. E.; ORIS, J. T. Suspended C60 nanoparticles protect against short-term UV and fluoranthene photo-induced toxicity, but cause long-term cellular damage in *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 100, n. 2, p. 202-210, 2010.

YIN, J.; DENG, B. Polymer-matrix nanocomposite membranes for water treatment. **Journal of Membrane Science**, v. 479, p. 256-275, 2015.

YOKOI, T.; YOSHITAKE, H.; TATSUMI, T. Synthesis of amino-

functionalized MCM-41 via direct co-condensation and post-synthesis grafting methods using mono-, di- and tri-amino-organoalkoxysilanes. **J. Mater. Chem.**, v. 14, n. 6, p. 951–957, 2004.

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

ZENG, G. et al. Novel polyvinylidene fluoride nanofiltration membrane blended with functionalized halloysite nanotubes for dye and heavy metal ions removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 317, p. 60–72, 2016.

ZHANG, Q. et al. Loose nanofiltration membrane for dye/salt separation through interfacial polymerization with in-situ generated TiO₂ nanoparticles. **Applied Surface Science**, v. 410, p. 494–504, 2017.

ZHANG, S. et al. Thin film interfacial cross-linking approach to fabricate a chitosan rejecting layer over poly(ether sulfone) support for heavy metal removal. **Industrial and Engineering Chemistry Research**, v. 54, n. 1, p. 472–479, 2015.

ZHAO, F. Y. et al. High-Flux Positively Charged Nanocomposite Nanofiltration Membranes Filled with Poly(dopamine) Modified Multiwall Carbon Nanotubes. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 8, n. 10, p. 6693–6700, 2016a.

ZHAO, M. et al. New trends in removing heavy metals from wastewater. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 15, p. 6509–6518, 2016b.

ZHU, J. et al. Fabrication of a novel “loose” nanofiltration membrane by facile blending with Chitosan–Montmorillonite nanosheets for dyes purification. **Chemical Engineering Journal**, v. 265, p. 184–193, 2015.

ZHU, L. P. et al. Immobilization of bovine serum albumin onto porous polyethylene membranes using strongly attached polydopamine as a spacer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, n. 1, p. 111–118, 2011.

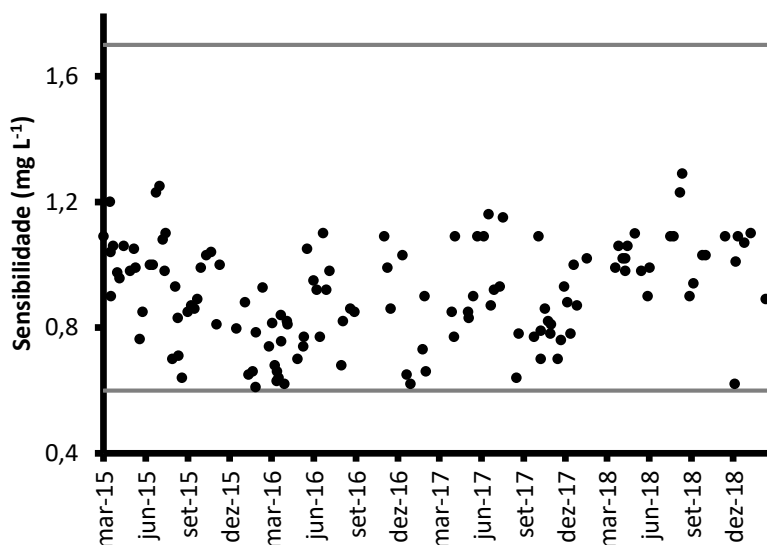
ZHU, W. P. et al. Poly(amidoamine) dendrimer (PAMAM) grafted on thin film composite (TFC) nanofiltration (NF) hollow fiber membranes for heavy metal removal. **Journal of Membrane Science**, v. 487, p. 117–126, 2015.

APÊNDICES

A1 – Histórico da sensibilidade dos lotes de *D. magna* no LABTOX no período que compreende a realização do doutorado (2015-2019)

Cada ponto no gráfico (Figura A1) representa um teste de sensibilidade a dicromato de potássio realizado para validar os testes agudos e crônicos com o organismo *D. magna*. As linhas superiores e inferiores indicam os limites máximo ($1,7 \text{ mg L}^{-1}$) e mínimo ($0,6 \text{ mg L}^{-1}$) de $CE_{50,24h}$, respectivamente, para que o cultivo esteja apto para ser utilizado nos ensaios toxicológicos.

Figura A1 - Gráfico dos resultados de sensibilidade à dicromato de potássio ao longo do período de realização do doutorado.



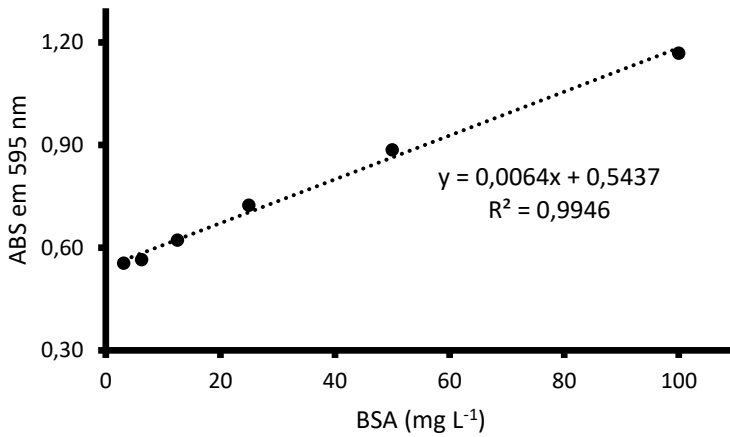
A2 – Curva de calibração para a quantificação de proteínas, método Bradford (1976)

A curva de calibração da dosagem de proteínas foi construída baseada em 6 pontos que correspondem a diferentes concentrações do padrão albumina bovina (BSA). A leitura se deu por espectrometria de ultravioleta (UV) com comprimento de onda de 595 nm. As concentrações e as absorvâncias são apresentadas na Tabela A2. Com os resultados, plotou-se a curva de calibração de proteínas (Figura A2). A reta obteve $R^2 = 0,9946$ e a equação da melhor reta foi utilizada para a determinação da concentração de proteínas nas amostras empregadas no ensaio de LPO.

Tabela A2 - Absorbâncias para cada concentração de BSA utilizada na construção da curva de calibração.

BSA (mg L⁻¹)	ABS em 595 nm
3,125	0,56
6,25	0,57
12,5	0,62
25,0	0,72
50,0	0,89
100,0	1,17

Figura A235 - Curva de calibração da proteína.



Para a correção da diluição da dosagem de proteínas nas amostras, foi utilizada a seguinte equação:

$$\text{Quantidade de proteínas} \times 0,23 \times 0,50$$

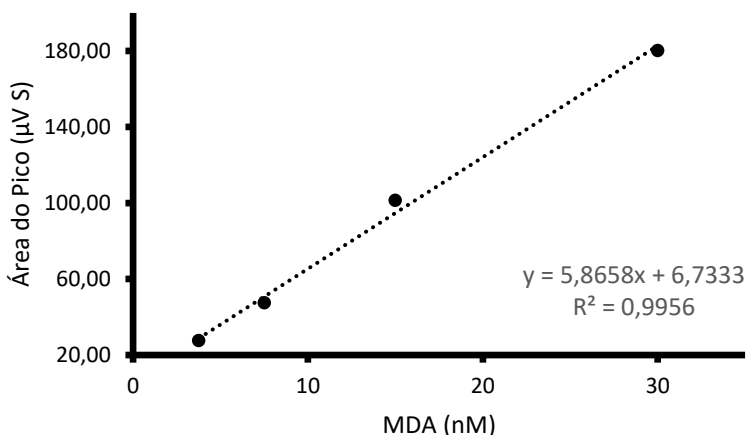
A3 – Curva de calibração do malondialdeído (MDA)

Para a construção da curva de calibração do malondialdeído foram escolhidas 4 concentrações do padrão de MDA e foi analisado através de HPLC. As áreas dos picos resultantes são apresentadas na Tabela A3. Com estes resultados, foi possível plotar a curva de calibração do MDA (Figura A3), sendo que $R^2 = 0,9956$ e a equação da melhor reta foi empregada para as áreas de pico das amostras utilizadas no ensaio de LPO.

Tabela A3 – Área do pico para cada concentração de MDA utilizada na construção da curva de calibração.

MDA (nM)	Área do Pico ($\mu\text{V S}$)
3,75	27,70
7,50	47,49
15,00	101,39
30,00	180,31

Figura A336 - Curva de calibração do MDA.



A4 – Artigo 1: Publicado na revista científica *Ecotoxicology and Environmental Safety*

Ecotoxicology and Environmental Safety 128 (2016) 36–43



Contents lists available at ScienceDirect

Ecotoxicology and Environmental Safety

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ecoenv



Synthesis, characterization and toxicological evaluation of Cr₂O₃ nanoparticles using *Daphnia magna* and *Allivibrio fischeri*



Rodrigo Costa Puerari^a, Cristina H. da Costa^a, Denice S. Vicentini^a, Cristiane F. Fuzinato^{a,c},
Silvia P. Melegari^{a,d}, Éder C. Schmidt^b, Zenilda L. Bouzon^b, William G. Matias^{a,*}

^a Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus
Universitário, CEP: 88040–970 Florianópolis, SC, Brazil

^b Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, CEP: 88040–900, Florianópolis,
SC, Brazil

^c Universidade Federal do Paraná, Campus Erichon, CEP: 99700-970, Erichon - RS, Brazil

^d Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal do Paraná, CEP: 83255-076, Ponta do Paraná, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 November 2015

Received in revised form

5 February 2016

Accepted 8 February 2016

Available online 15 February 2016

Keywords:

Chromium (III) oxide nanoparticle

Aquatic toxicology

Chronic toxicity

Daphnia magna

Allivibrio fischeri

ABSTRACT

Chromium III oxide (Cr₂O₃) nanoparticles (NPs) are used in pigments for ceramics, dyes, paints and cosmetics. However, few studies addressing the toxic potential of these NPs have been reported in the literature. Thus, this research aimed to evaluate the acute and chronic effects of Cr₂O₃ NPs through acute toxicity tests with *Daphnia magna* and *Allivibrio fischeri* and chronic toxicity tests with *Daphnia magna*. Cr₂O₃ NPs were synthesized by the sol-gel method and characterized through TEM, X-ray diffraction (XRD), zeta potential (ZP) and surface area analysis. In the acute toxicity tests the EC₅₀ value obtained with *D. magna* was 6.79 mg L⁻¹ and for *A. fischeri* the EC₅₀ value was 16.10 mg L⁻¹ and the EC₁₀ value was 12.91 mg L⁻¹. Regarding the chronic toxicity tests with *D. magna*, effects on longevity (OEC=1.00 mg L⁻¹), reproduction (OEC=1.00 mg L⁻¹) and growth (OEC=0.50 mg L⁻¹) were observed. On the SEM and TEM images, ultrastructural alterations in the organelles of exposed organisms were also observed. Thus, toxicological studies with NPs are of great importance in order to reduce the risk of environmental contamination.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Nanoparticles (NPs) are one of the products of nanotechnology (NT). This area of science deals with the development and application of materials in nanoscale and research on controlling changes in some of their properties, as surface and charge modifications (ISO, 2005; Moore, 2006). The intrinsic characteristics of NPs, such as small size, high surface area and a capacity for agglomeration or dispersion, can facilitate their translocation between environmental compartments, highlighting the importance of researching the bioavailability, degradability, reactivity and toxicity of nanomaterials (Paschoalino et al., 2010).

The element chromium exists in the oxidation states 0, 2, 3, 4 and 6. However, only trivalent chromium (Cr(III)) and hexavalent chromium (Cr(VI)) are stable and present in the environment (Matos et al., 2008). Cr(VI) is carcinogenic and is more toxic than Cr(III) (Newman and Unger, 2003; Holmes et al., 2008; Xie et al., 2008; Proctor et al., 2011). Cr(III) is the most stable oxidation state,

appearing when the pH of the medium is between 4.0 and 8.0 (Barros and Souza-Aguiar, 2001). Cr(III) is also the form found in greatest abundance in nature and is an essential micronutrient for human beings, since it aids the glucose transport mechanism, boosting the action of insulin (Silva et al., 2008).

Cr(III) oxide nanoparticles (Cr₂O₃ NPs) are employed in the manufacture of pigments for use in the textile industry, in leather tanning, in the pigmentation of ceramics, providing materials with refractive characteristics (ATSDR, 2012), and in cosmetics (Carrion et al., 2002).

Toxicity studies published in the literature showed that Cr₂O₃ NPs can cause a reduction in the mitotic index of *Allium cepa* cells, and chromosomal aberrations have also been identified (Kumar et al., 2015). The exposure of wheat seeds (*Triticum aestivum* L.) to 20–150 µg mL⁻¹ of Cr₂O₃ NPs inhibited their germination and growth (Vajpayee et al., 2011). In relation to human cells, the effect of Cr₂O₃ NPs has been studied in lung cells (A549 human lung carcinoma) and keratinocytes cells (HaCat human keratinocyte) and it was observed that there was an increase in reactive oxygen species (ROS) with consequent DNA damage. With the increase in ROS, the mitochondrial membrane potential decreases causing

* Corresponding author.

E-mail address: williamg.matias@ufsc.br (W.G. Matias).

A5 – Artigo 2: Publicado na revista científica *NanoImpact*

NanoImpact 5 (2017) 6–12



Contents lists available at ScienceDirect

NanoImpact

journal homepage: www.journals.elsevier.com/nanoimpact

Research paper

Toxicological impact of morphology and surface functionalization of amorphous SiO₂ nanomaterialsDenice S. Vicentini^a, Rodrigo C. Puerari^a, Karine G. Oliveira^a, Miriam Arl^a,
Sílvia P. Melegari^{a,b}, William C. Matias^{a,*}^a Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, 880-40-970 Florianópolis, SC, Brazil^b Centro de Estudos do Mar, Universidade Federal de Paraná, 83255-976 Paraná do Paraná, PR, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 13 September 2016

Received in revised form 25 October 2016

Accepted 22 November 2016

Available online 20 December 2016

Keywords:

Nanomaterials

Amorphous SiO₂

Morphology

Functionalization

Toxicology

Daphnia magna

Vero cells

ABSTRACT

Amorphous silica nanomaterials (SiO₂NMs) with tubular - nanotube (NT) and spherical - nanoshank (NH) morphologies were synthesized. The surfaces of these SiO₂NMs were amine functionalized (AF) with 3-[2-(2-aminoethylamino)ethylamino]propyltrimethoxysilane (SiO₂NMMAF). The amorphous structure was verified by XRD and the amine functionalization was confirmed by FTIR spectroscopy, surface area, and zeta potential results. The toxicological evaluation of the SiO₂NMs was performed using acute and chronic toxicity tests with aquatic microcrustaceans *Daphnia magna* and a cell viability test with Vero cells. All of the SiO₂NH tests showed higher toxicity compared to SiO₂NT, due to the spherical shape and larger surface area of the former. The SiO₂NMMAF, regardless of the morphology (NT or NH), were more toxic, despite their increased size and reduced surface area. In all cases evaluated, chronic toxicity tests showed a decrease in the reproduction and growth of the organisms, as the NM concentration increased.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Silica is the name given to materials with the chemical formula of silicon dioxide, SiO₂. It is considered chemically inert, optically transparent, resistant to microbial attack, mechanically strong and thermally (Meunier et al., 2010; Perullini et al., 2014). It is found in several living organisms including diatoms, bacteria, and plants, as well as animals belonging to higher trophic levels (Perullini et al., 2014). SiO₂ can be amorphous or crystalline, porous or non-porous (dense) and anhydrous or hydroxylated, regardless of its nature (natural or synthetic). Most of the manufactured silicas used in industrial applications are amorphous (Napierska et al., 2010).

SiO₂ nanomaterials (SiO₂NMs) can be produced in different morphologies, such as nanoparticles (NPs), nanotubes (NTs), nanorods and coatings for core-shell NPs. The synthesis can be performed either by a wet process (colloidal sol-gel or precipitated SiO₂) or by pyrolytic synthesis (fumed colloidal SiO₂) (Frujtier-Piloth, 2012; Maser et al., 2015; Napierska et al., 2010). The application of synthetic amorphous silica in different industries (cosmetics, drugs, printer

toners, construction materials, varnishes, paints, food, among others) is due to the different physical-chemical properties, low cost, ease of synthesis and large-scale production (Masjed-Arani et al., 2016).

The modification of the SiO₂NM surface has been widely used, either by functionalization via anchorage of organic molecules containing specific functional groups (Ko et al., 2013a, 2013b), NP deposition, for example, TiO₂ or Ag, on the SiO₂ surface (Pan et al., 2014; Pinho et al., 2015; Wilhelm and Stephan, 2006; Xu et al., 2015), or the use of SiO₂ as a coating in core-shell NPs (Chatterjee et al., 2014; Lee et al., 2012; Yuan et al., 2013; Zhang et al., 2013). Such surface modifications in NMs amplify or impart new properties to the nanocomposite, for example, an increase in the thermal and hydrophilic stability or biocidal properties. Also, they can promote chemical affinity with the substrates of interest. The surface-modified NMs can be applied in the form of particulate solids (Lee et al., 2012; Yuan et al., 2013) or incorporated into polymeric membranes (Jin et al., 2012; Yin and Deng, 2010). Studies by Ko et al. (2013a, 2013b) are examples of SiO₂NM applications in the form of solid particulates. The SiO₂NT double layer was functionalized with the immobilization of different aminosilane molecules (primary, secondary, tertiary, di- and tri-substituted) and applied on the surface in the form of particulate solids for CO₂ capture and Cu²⁺ sequestration. The results indicated that for Cu²⁺ sequestration, the efficiency decreased according to the following order: tri- > di- > primary > secondary > tertiary

* Corresponding author at: Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX, Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário, 880-40-970 Florianópolis, SC, Brazil.
E-mail address: william.matias@ufsc.br (W.C. Matias).

A6 – Artigo 3: Publicado na revista científica *Chemosphere*

Chemosphere 214 (2019) 679–687



Contents lists available at ScienceDirect

Chemosphere

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chemosphere

Investigation of toxicological effects of amorphous silica nanostructures with amine-functionalized surfaces on Vero cells



Rodrigo Costa Puerari ^a, Emeline Ferrari ^b, Martina Garcia de Cezar ^a,
Renata Amanda Gonçalves ^a, Carmen Simioni ^c, Luciane Cristina Ouriques ^c,
Denice Schulz Vicentini ^a, William Gerson Matias ^{a,*}

^a Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

^b Department of Basic and Applied Sciences, University of Lorraine, Metz, France

^c Department of Cell Biology, Embryology and Genetics Federal University of Santa Catarina, Florianópolis, Brazil

HIGHLIGHTS

- Amine-functionalization of SiO₂ NS enhanced the cytotoxicity toward Vero cells.
- SiO₂ NS entered the Vero cells and promoted ROS production and lipid peroxidation.
- Evidence of Trojan horse effect was observed after SiO₂ NS amine-functionalization.
- Mitochondria and endoplasmic rough damages were observed after exposure to SiO₂ NS.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 August 2018

Received in revised form

27 September 2018

Accepted 28 September 2018

Available online 1 October 2018

Handling Editor: Wilik Peijnenburg

Keywords:

Amorphous silica
Amine-functionalization
Nanotoxicology
Nanostructures
Vero cells

ABSTRACT

Amorphous silica (SiO₂) nanostructures are described in the literature as having low toxicity and are widely used in many industrial products. However, surface modifications, such as amine-functionalization, can result in increased cytotoxicity. In this study, amorphous SiO₂ nanostructures (SiO₂ NS) were synthesized and amine-functionalized with two different amine molecules: primary (SiO₂ NS@1) and tri-amine (SiO₂ NS@3). The materials were characterized by transmission electron microscopy (TEM), zeta potential (ZP), effective diameter (ED) and surface area measurements, X-ray diffraction (XRD) and Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). The toxicity of the three SiO₂ NS samples toward Vero cells was evaluated. According to the methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay, the IC_{50,24h} was 1.477 ± 0.12 g L⁻¹ for SiO₂ NS, 0.254 ± 0.07 g L⁻¹ for SiO₂ NS@1 and 0.317 ± 0.05 g L⁻¹ for SiO₂ NS@3. The order of cytotoxicity was SiO₂ NS@3 > SiO₂ NS@1 > SiO₂ NS. There was an increase in malondialdehyde (MDA) levels and ROS productions in the cells exposed to all three materials. Also, TEM images showed damage on the mitochondria and rough endoplasmic reticulum.

© 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Silicon dioxide is a compound found in abundance in nature in crystalline form, constituting 90–95% of sand. When inhaled as a powder, silica becomes an occupational hazard, especially in cases of prolonged exposure (Vupputuri et al., 2012). In addition to lung problems, such as silicosis (Filho and Santos, 2006), occupational

exposure may also be related to kidney disease (Vupputuri et al., 2012). After inhalation, silica nanostructures (SiO₂ NS) can be transported in blood to the kidneys causing toxic effects in these organs (Passagne et al., 2012).

Due their physicochemical properties, low cost, ease of synthesis and nanoscale control, amorphous SiO₂ NS can be synthesized with different formats including nanoparticles (NP), nanotubes (NT) and nanorods (NR). SiO₂ NS are widely used in industrial products, such as building materials, polymers, paints, cosmetics, pharmaceuticals, perfumes and food (Maser et al., 2015; Napierska et al., 2010). In the food industry, SiO₂ particles are added to modify properties, such as taste and color, and to enhance

* Corresponding author. Laboratório de Toxicologia Ambiental, LABTOX - Depto. de Engenharia Sanitária e Ambiental, Universidade Federal de Santa Catarina, Campus Universitário Trindade, CEP. 88040-970, Florianópolis, SC, Brazil.
E-mail address: william.gmatias@ufsc.br (W.G. Matias).