

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA NANOTOXICIDADE DE  
NANOESTRUTURAS DE ÓXIDO DE ZINCO E HIDROXIAPATITA VISANDO  
APLICAÇÕES EM FERTILIZANTES**

**FLÁVIA FONTES PEREIRA**

**São Carlos, SP  
Junho, 2017**

**FLÁVIA FONTES PEREIRA**  
**(Bióloga)**

**SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA NANOTOXICIDADE DE  
NANOESTRUTURAS DE ÓXIDO DE ZINCO E HIDROXIAPATITA VISANDO  
APLICAÇÕES EM FERTILIZANTES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-  
Graduação em Biotecnologia da Universidade  
Federal de São Carlos como parte dos  
requisitos para obtenção do título de Doutora  
em Biotecnologia.

Área de Concentração: Nanobiotecnologia.

Orientadores: Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa  
Prof. Dr. Marcos David Ferreira

**São Carlos, SP**  
**Junho, 2017**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

---

Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Flávia Fontes Pereira, realizada em 30/06/2017:

---

Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa  
Embrapa

---

Profa. Dra. Vera Lucia Arantes  
USP

---

Profa. Dra. Ana Teresa Lombardi  
UFSCar

---

Prof. Dr. Paulo Teixeira Lacava  
UFSCar

---

Profa. Dra. Elaine Cristina Paris  
Embrapa

**Dedico este trabalho à minha família,  
minha mãe Sônia, meu pai Fernando, meu irmão Gabriel e meu esposo Bruno,  
por toda estrutura familiar, compreensão, apoio e amor recebidos,  
em mais uma fase da minha vida.**

## AGRADECIMENTOS

À Deus, por tudo o que fez de bom em mim e para mim, pela saúde, força, coragem, fé e amor concedidos para a realização de mais uma conquista pessoal e profissional;

Ao Prof. Dr. Daniel Souza Corrêa pela orientação, atenção, dedicação, dicas, pelas excelentes oportunidades oferecidas para o aprimoramento nos estudos e, principalmente pela sua paciência, sempre que necessitei, ao longo destes anos de doutorado;

Ao Prof. Dr. Marcos David Ferreira pela orientação e atenção em todos os momentos;

À querida Prof. Dra. Elaine Cristina Paris pela co-orientação, pela atenção, pelos ensinamentos e dicas fundamentais sobre síntese e caracterização de nanopartículas, imprescindíveis para a realização deste trabalho;

À minha família, por tudo o que sou hoje, pelo amor incondicional e pela confiança em meu desempenho profissional;

Ao meu amado esposo Bruno, pelos auxílios na área de informática, pela incansável paciência nos meus momentos mais difíceis, pela tolerância e principalmente pelo seu amor;

Ao meu irmão Gabriel, pelos ensinamentos de química e dicas construtivas para a pós-graduação;

Aos meus familiares, em especial meu avô José e minha avó Djanira (*in memoriam*) pelo incentivo, amor e carinho eternos;

Ao meu querido e especial tio Prof. Dr. Sérgio Rodriguês Fontes (*in memoriam*), Ex-Docente e Pesquisador do Departamento de Engenharia Mecânica, da Escola de Engenharia de São Carlos – EESC-USP, hoje homenageado e nomeado pela biblioteca da EESC, pelo seu exemplo de vida, pela sua grandiosa capacidade e ética profissionais, mas acima de tudo pelo seu caráter, dignidade e humildade admiráveis, trazendo para mim, em meio a brincadeiras, a torcida, o incentivo, a seriedade, a responsabilidade e a dedicação como ensinamentos preciosos para a minha vida acadêmica e profissional;

À querida e paciente Milene Mitsuyuki Foschini, especialista em estatística do Embrapa Instrumentação, pela disposição e suporte técnico para a realização do tratamento dos dados e das análises estatísticas, especialmente para os bioensaios de nanotoxicidade;

Aos queridos técnicos e analistas do Embrapa Instrumentação: Joana, Adriana, Viviane, Silviane, Paulinho e Matteo por toda a dedicação, pelos auxílios com os experimentos e análises e, pelos momentos de descontração;

Aos amigos e colegas do Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA), do Laboratório de Pós-Colheita e do Laboratório de Amostras Biológicas pelas trocas de experiência e agradável rotina de trabalho;

À Embrapa Instrumentação e a Rede Agronano, pela importante parceria e pela possibilidade para realizar esta pesquisa, pela sua excelente infraestrutura em laboratórios, além de seu estimulante ambiente de trabalho;

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (PPG-Biotec) da UFSCar, pela oportunidade de perseverar em meus estudos, pelo apoio e por me possibilitar avançar em minhas pesquisas e na minha carreira acadêmica tão almejada;

À todos os amigos e colegas do PPG-Biotec, pelos momentos vividos ao longo desta árdua caminhada da pós-graduação;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de estudos concedida, Processo Nº 2013/17.528-8;

À todos, que de alguma maneira, torceram por mim em mais uma etapa vencida.

**MUITO OBRIGADA!**

*“A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro.”*

(Albert Einstein)

*“Quanto mais aumenta nosso conhecimento, mais evidente fica nossa ignorância.”*

(John F. Kennedy)

## RESUMO

O crescente avanço da nanotecnologia possibilitou o desenvolvimento de materiais com propriedades otimizadas, incluindo a produção de fertilizantes nanoestruturados visando o crescimento da produção de alimentos e insumos. Fertilizantes nanoestruturados podem fornecer os nutrientes necessários às culturas agrícolas de maneira mais eficiente que os fertilizantes na micro- e macroescala e, ao mesmo tempo, com mobilidade inferior aos fertilizantes de base líquida, evitando eutrofização em corpos hídricos. Contudo, com o crescente interesse na utilização de fertilizantes nanoestruturados aumentou também a preocupação sobre os efeitos causados pelos nanomateriais no meio ambiente, os quais podem ocasionar impactos desde sua aplicação nas culturas agrícolas até alcançarem os corpos de água, afetando a biota aquática e, conseqüentemente, a saúde humana. Fatores tais como alterações no tamanho, na forma das partículas e carga superficial alteram a maneira de interação com o ambiente, além do descarte inadequado e do uso indiscriminado dos nanofertilizantes podendo ocasionar um potencial aumento do nível de toxicidade. O presente estudo tem por objetivo sintetizar e caracterizar fertilizantes nanoestruturados baseados em hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (HAP) e óxido de zinco (ZnO), e avaliar a nanotoxicidade dos mesmos para a espécie de microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, uma vez que as microalgas formam a base da cadeia trófica aquática. As sínteses das nanopartículas de HAP e ZnO foram realizadas pelos métodos de coprecipitação e hidrotermalização. Na sequência foram caracterizadas quanto à estrutura e morfologia para a realização dos bioensaios de nanotoxicidade. Os resultados mostraram que as nanopartículas de HAP Hidrotermal com o dispersante PMAA apresentam elevado potencial como nanofertilizante, uma vez que, no intervalo de concentrações testadas ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $250 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $500 \text{ mg L}^{-1}$  e  $750 \text{ mg L}^{-1}$ ) neste estudo, não se observou inibição considerável do crescimento algáceo significativo e nem indício de eutrofização para os corpos de água. Porém, as nanopartículas de ZnO, principalmente as que não foram sintetizadas com o PMAA, apresentaram elevada toxicidade para as microalgas no intervalo de concentrações testadas ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $25 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $50 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e  $200 \text{ mg L}^{-1}$ ), o que pode ser prejudicial para a aplicação sustentável em culturas agrícolas. Além disso, os nanofertilizantes tiveram efeito de sombreamento nas algas e várias deformações na morfologia celular foram observadas, contribuindo para o aumento dos efeitos nanotoxicológicos.

**Palavras-chave:** nanopartículas, fertilizantes minerais, hidroxiapatita, óxido de zinco, nanotoxicidade, microalgas.



## ABSTRACT

The increasing advance of nanotechnology has enabled the development of materials with optimized properties, including the production of nanostructured fertilizers aiming at increasing food and agricultural supplies production. Nanostructured fertilizers can provide the required nutrients to crops more efficiently than fertilizers at the micro- and macro-scale and at the same time, with inferior mobility than their liquid counterparts, avoiding eutrophication in bodies of water. However, the increasing interest in using nanofertilizers also raises concerns about side effects caused by the release of nanomaterials in the environment, which can impact aquatic biota and consequently the human health. Changes in the size, shape and superficial charge of the nanoparticles modify the way they interact with the environment, and the inappropriate disposal and indiscriminate use of nanofertilizers can increase the level of toxicity, especially in water bodies. In this context, the present study aims to synthesize and characterize, by several physic-chemical techniques, nanofertilizers based on zinc oxide (ZnO) and hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  (HAP), and evaluate the potential nanotoxicity of these materials for the microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*, since it forms the base of the aquatic trophic chain. The synthesis of ZnO nanoparticles and HAP were carried out by coprecipitation and hydrothermalization methods, and after characterized regarding structure and morphology, they were used in the nanotoxicity bioassays. The results showed that the hydrothermal HAP nanoparticles with APMA presented high potential as a nanofertilizer, once no significant growth inhibition to algae was observed in the range of concentrations employed (50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup>, 250 mg L<sup>-1</sup>, 500 mg L<sup>-1</sup> e 750 mg L<sup>-1</sup>) and neither evidence of eutrophication process. However, ZnO nanoparticles, especially those which were not synthesized with APMA, showed high toxicity to microalgae in the range of concentrations employed (10 mg L<sup>-1</sup>, 25 mg L<sup>-1</sup>, 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup>), which can be deleterious for sustainable application in agricultural crops. In addition, the shading effect and several deformations in the cellular morphology were observed, contributing to the increase the nanotoxicological effects.

**Keywords:** nanoparticles, mineral fertilizers, hydroxiapatite, zinc oxid, nanotoxicity, microalgae.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da cela unitária da Hidroxiapatita: (a) vista lateral e (b) vista superior: verde $\text{Ca}^{2+}$ , violeta $\text{P}^{5+}$ , vermelho $\text{O}^{2-}$ e branco $\text{H}^{1+}$ (Figura retirada de LOU et al. (2012)).	7
Figura 2 - Rede cristalina de ZnO (Figura retirada de FELTRIN (2010)).	9
Figura 3 - Representação esquemática do sistema de hidrotermalização (Figura retirada de MOURÃO et al. (2009)).	13
Figura 4 (A e B) - Etapas do ciclo de vida da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> . Na imagem 4A pode-se observar os estágios do ciclo de vida e na imagem 4B as micrografias de fluorescência com contraste de fase mostrando as diferentes morfologias para cada estágio de vida (Figura retirada de MACHADO e SOARES (2014)).	21
Figura 5 (A e B) - Etapas de síntese da HAP pelo método de Coprecipitação por via úmida. Na Figura A, 1 mostra a bureta para titulação do $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , e 2 o cilindro de $\text{N}_2$ . Já em B, 3 mostra o agitador magnético para homogeneização do precipitado branco e 4 o balão de três bocas onde está a solução de formação do precipitado.	25
Figura 6 (A e B) - Etapas da síntese de ZnO através do método de Coprecipitação. Em A são mostrados os reagentes hidróxido de sódio e nitrato de zinco e em 6B tem-se a formação do precipitado de ZnO em agitação no recipiente de teflon.	26
Figura 7 - Tratamento hidrotermal das nanopartículas de HAP e ZnO, sendo (1) Controlador de temperatura e tempo, (2) Agitador magnético para homogeneização da solução, (3) Forno elétrico com resistência elétrica, (4) Manômetro e (5) Válvula de segurança.	27
Figura 8 - Recipientes-teste com Meio de Cultivo W.C. e nanopartículas de HAP e ZnO Coprecipitados em agitação a 130 rpm na incubadora refrigerada de cultivo pelo período de 3 dias para o aumento da dispersão e homogeneização das nanopartículas.	33
Figura 9 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanopartículas de HAP obtidas por: Coprecipitação (A), método hidrotermal 2 horas sem o dispersante PMAA (C) e método hidrotermal 2 horas com PMAA (E). Os respectivos histogramas do diâmetro das partículas estão apresentados em B, D e F, respectivamente (Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017)).	39
Figura 10 - Difractogramas de raios -X das nanopartículas de HAP obtidas por Coprecipitação, Hidrotermalização por 2 horas e Hidrotermalização por 2 horas com	

dispersante PMAA. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017). .....	41
Figura 11 - Espectros na região do infravermelho (FTIR) das nanopartículas de HAP coprecipitada e HAP hidrotermal (2 horas) sem e com o dispersante PMAA. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017). .....	43
Figura 12 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao nanofertilizante de HAP Coprecipitada, para as distintas concentrações e para o respectivo controle. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).....	46
Figura 13 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao nanofertilizante de HAP Hidrotermal (2 horas), para as distintas concentrações e para o respectivo controle. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).....	47
Figura 14 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao nanofertilizante de HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA, para as distintas concentrações e para o respectivo controle. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017). .....	48
Figura 15 - Velocidade do crescimento (céls.mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) e duração da fase lag (horas) da <i>P. subcapitata</i> em função da concentração (mg L <sup>-1</sup> ) para as nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal (2 horas) e HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA, respectivamente. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017). .....	50
Figura 16 (A, B e C); (D, E e F) e (G, H e I) - Comportamento do crescimento de <i>P. subcapitata</i> quando exposta às nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal sem PMAA e HAP Hidrotermal com PMAA, respectivamente. As Figuras 16 (C, F e I) representam imagens de microscopia óptica das microalgas nas amostras de HAP Coprecipitada, Hidrotermal sem PMAA e Hidrotermal com PMAA, respectivamente.	55
Figura 17 A - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de 50 mg L <sup>-1</sup> (a), 100 mg L <sup>-1</sup> (b), 250 mg L <sup>-1</sup> (c) and 750 mg L <sup>-1</sup> (d) da HAP Coprecipitada, respectivamente. Circulos vermelhos indicam aglomeração entre as nanopartículas com as células de microalgas. Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravazamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou	

aumento do volume celular. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017). .....	57
Figura 17 B - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de 50 mg L <sup>-1</sup> (a), 100 mg L <sup>-1</sup> (b), 250 mg L <sup>-1</sup> (c) and 750 mg L <sup>-1</sup> (d) da HAP Hidrotermal sem PMAA, respectivamente. Circulos vermelhos indicam aglomeração entre as nanopartículas com as células de microalgas. Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravazamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).....	59
Figura 17 C - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de 50 mg L <sup>-1</sup> (a), 100 mg L <sup>-1</sup> (b), 250 mg L <sup>-1</sup> (c) and 750 mg L <sup>-1</sup> (d) da HAP Hidrotermal com PMAA, respectivamente. Circulos vermelhos indicam aglomeração entre as nanopartículas com as células de microalgas. Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravazamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).....	61
Figura 18 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da HAP coprecipitada, fósforo (P), cálcio (Ca) e oxigênio (O) nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 50 mg L <sup>-1</sup> , 100 mg L <sup>-1</sup> , 250 mg L <sup>-1</sup> , 500 mg L <sup>-1</sup> e 750 mg L <sup>-1</sup> .....	63
Figura 19 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da HAP hidrotermal sem PMAA, fósforo (P), cálcio (Ca) e oxigênio (O) nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 50 mg L <sup>-1</sup> , 100 mg L <sup>-1</sup> , 250 mg L <sup>-1</sup> , 500 mg L <sup>-1</sup> e 750 mg L <sup>-1</sup> .....	65
Figura 20 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da HAP hidrotermal com PMAA, fósforo (P), cálcio (Ca) e oxigênio (O) nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 50 mg L <sup>-1</sup> , 100 mg L <sup>-1</sup> , 250 mg L <sup>-1</sup> , 500 mg L <sup>-1</sup> e 750 mg L <sup>-1</sup> .....	67
Figura 21 (A, B) - Imagem de microscopia eletrônica da amostra de ZnO na forma de pó obtida a partir do método de Coprecipitação (Figura 21A) e o histograma de distribuição do diâmetro médio das partículas, em morfologia de brotos (Figura 21B), respectivamente. ....	69

Figura 22 (A, B) - Imagem de microscopia eletrônica da amostra de ZnO Hidrotermal por 30 minutos sem PMAA na forma de pó, e histograma de distribuição do diâmetro médio das partículas, em morfologia de placas, respectivamente. ....	71
Figura 23 (A, B) - Imagem de microscopia eletrônica da amostra de ZnO Hidrotermal por 30 minutos com PMAA na forma de pó, e o histograma de distribuição do diâmetro médio das partículas, em morfologia de placas, respectivamente. ....	71
Figura 24 (A, B) - Imagem de microscopia eletrônica da amostra de ZnO Hidrotermal por 2 horas sem PMAA na forma de pó, e o histograma de distribuição do diâmetro médio dos arranjos florais (agregados de partículas) e das partículas, respectivamente. ....	72
Figura 25 (A, B) - Imagem de microscopia eletrônica de um arranjo floral de ZnO Hidrotermal por 2 horas sem PMAA na forma de pó, e o histograma de distribuição do comprimento médio das facetas florais (agregados de partículas) e das partículas menores, respectivamente. ....	73
Figura 26 (A, B) - Imagem de microscopia eletrônica da amostra de ZnO Hidrotermal por 2 horas com PMAA na forma de pó, e o histograma de distribuição do diâmetro médio dos arranjos florais (agregados de partículas) e das partículas, respectivamente. ....	73
Figura 27 (A, B) - Imagem de microscopia eletrônica de um arranjo floral individual de ZnO Hidrotermal por 2 horas com PMAA na forma de pó, e o histograma de distribuição do comprimento médio das facetas florais (agregados de partículas) e das partículas menores, respectivamente. ....	74
Figura 28 - Difratometria de raios-X das amostras de ZnO Coprecipitada e Hidrotermais nos períodos de 30 minutos e 2 horas, com e sem o dispersante PMAA, respectivamente. ....	75
Figura 29 - Espectros na região do infravermelho (FTIR) das nanopartículas de ZnO coprecipitado, ZnO Hidrotermal (30 minutos) com e sem PMAA e ZnO Hidrotermal (2 horas) com e sem PMAA. ....	78
Figura 30 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao nanofertilizante de ZnO Coprecipitado, para as distintas concentrações e para o respectivo controle. ....	81
Figura 31 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao nanofertilizante de ZnO Hidrotermal (30 minutos) sem PMAA, para as distintas concentrações e para o respectivo controle. ....	82

Figura 32 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao nanofertilizante de ZnO Hidrotermal (30 minutos) com PMAA, para as distintas concentrações e para o respectivo controle. ....	83
Figura 33 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao nanofertilizante de ZnO Hidrotermal (2 horas) sem PMAA, para as distintas concentrações e para o respectivo controle. ....	84
Figura 34 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao nanofertilizante de ZnO Hidrotermal (2 horas) com PMAA, para as distintas concentrações e para o respectivo controle. ....	85
Figura 35 - Velocidade do crescimento ( $\text{céls.mL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) da <i>P. subcapitata</i> em função da concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para as nanopartículas de ZnO Coprecipitada, ZnO Hidrotermal (30 minutos), ZnO Hidrotermal (30 minutos) com PMAA, ZnO Hidrotermal (2 horas) e ZnO Hidrotermal (2 horas) com PMAA, respectivamente.....	87
Figura 36 A - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de $10 \text{ mg L}^{-1}$ (a), $25 \text{ mg L}^{-1}$ (b), $50 \text{ mg L}^{-1}$ (c) $100 \text{ mg L}^{-1}$ (d) e $200 \text{ mg L}^{-1}$ (e) de ZnO Coprecipitado, respectivamente. Circulos vermelhos indicam aglomeração entre as nanopartículas com as células de microalgas. Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravazamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular. ....	90
Figura 36 B - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de $10 \text{ mg L}^{-1}$ (a), $25 \text{ mg L}^{-1}$ (b), $50 \text{ mg L}^{-1}$ (c) $100 \text{ mg L}^{-1}$ (d) e $200 \text{ mg L}^{-1}$ (e) de ZnO Hidrotermal (30 minutos), respectivamente. Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravazamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular. ....	92
Figura 36 C - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de $10 \text{ mg L}^{-1}$ (a), $25 \text{ mg L}^{-1}$ (b), $50 \text{ mg L}^{-1}$ (c) $100 \text{ mg L}^{-1}$ (d) e $200 \text{ mg L}^{-1}$ (e) de ZnO Hidrotermal (30 minutos) com PMAA, respectivamente. Circulos vermelhos indicam aglomeração entre as nanopartículas com as células de microalgas. Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravazamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular.....	94

Figura 36 D - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de 10 mg L <sup>-1</sup> (a), 25 mg L <sup>-1</sup> (b), 50 mg L <sup>-1</sup> (c) 100 mg L <sup>-1</sup> (d) e 200 mg L <sup>-1</sup> (e) de ZnO Hidrotermal (2 horas), respectivamente. Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravazamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular. ....	96
Figura 36 E - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de 10 mg L <sup>-1</sup> (a), 25 mg L <sup>-1</sup> (b), 50 mg L <sup>-1</sup> (c) 100 mg L <sup>-1</sup> (d) e 200 mg L <sup>-1</sup> (e) de ZnO Hidrotermal (2 horas) com PMAA, respectivamente. Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravazamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular.....	98
Figura 37 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da ZnO Coprecipitado, Zn e O nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 10 mg L <sup>-1</sup> , 25 mg L <sup>-1</sup> , 50 mg L <sup>-1</sup> , 100 mg L <sup>-1</sup> e 200 mg L <sup>-1</sup> .....	100
Figura 38 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da ZnO Hidrotermal (30 minutos), Zn e O nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 10 mg L <sup>-1</sup> , 25 mg L <sup>-1</sup> , 50 mg L <sup>-1</sup> , 100 mg L <sup>-1</sup> e 200 mg L <sup>-1</sup> .....	102
Figura 39 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da ZnO Hidrotermal (30 minutos) com PMAA, Zn e O nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 10 mg L <sup>-1</sup> , 25 mg L <sup>-1</sup> , 50 mg L <sup>-1</sup> , 100 mg L <sup>-1</sup> e 200 mg L <sup>-1</sup> . ....	104
Figura 40 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da ZnO Hidrotermal (2 horas), Zn e O nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 10 mg L <sup>-1</sup> , 25 mg L <sup>-1</sup> , 50 mg L <sup>-1</sup> , 100 mg L <sup>-1</sup> e 200 mg L <sup>-1</sup> .....	106
Figura 41 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da ZnO Hidrotermal (2 horas) com PMAA, Zn e O nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 10 mg L <sup>-1</sup> , 25 mg L <sup>-1</sup> , 50 mg L <sup>-1</sup> , 100 mg L <sup>-1</sup> e 200 mg L <sup>-1</sup> .....	108
Figura A.1 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao nanofertilizante de HAP Coprecipitada, para as distintas concentrações e para o respectivo controle. ....	125
Figura A.2 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao nanofertilizante de HAP Hidrotermal, para as distintas concentrações e para o respectivo controle. ....	126

Figura A.3 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao nanofertilizante de HAP Hidrotermal com PMAA, para as distintas concentrações e para o respectivo controle.....	127
Figura B.1 - Velocidade do crescimento (céls.mL <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> ) e duração da fase lag (horas) da <i>P. subcapitata</i> em função da concentração (mg L <sup>-1</sup> ) para as nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal (2 horas) e HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA, respectivamente. ....	128
Figura D.1 - Curvas de Crescimento da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA) (Controles-Positivo) e seu respectivo controle para o bioensaio de HAP Hidrotermal com PMAA em baixas concentrações.....	130
Figura D.2 - Curvas de Crescimento da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA) (Controles-Positivo) e seu respectivo controle para o bioensaio de HAP Hidrotermal com PMAA em altas concentrações.....	130
Figura E.1 - Curvas de Crescimento da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA) (Controles-Positivo) e seu respectivo controle para o bioensaio de ZnO Hidrotermal (30 minutos) com PMAA, em morfologia de placas.....	131
Figura E.2 - Curvas de Crescimento da microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> quando exposta ao dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA) (Controles-Positivo) e seu respectivo controle para o bioensaio de ZnO Hidrotermal (2 horas) com PMAA, em morfologia de arranjos florais.....	131



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição e concentrações das soluções-estoque para o preparo do meio de cultivo W.C.....	32
Tabela 2 - Valores do diâmetro médio das partículas (nm), potencial Zeta (mV) e da área superficial ( $m^2g^{-1}$ ) obtidos para as nanopartículas de HAP coprecipitada, HAP hidrotermal (2 horas) e HAP hidrotermal (2 horas) com o dispersante PMAA.....	42
Tabela 3 - Parâmetros estimados para a variável dependente velocidade do crescimento para as nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal (2 horas) e HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA. Tabela retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017). .....	51
Tabela 4 - Parâmetros estimados para a variável dependente fase lag para as nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal (2 horas) e HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA. Tabela retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017). .....	51
Tabela 5 - Valores do potencial zeta (mV) para as amostras de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal sem PMAA e HAP Hidrotermal com PMAA dispersas em 100 mL do meio de cultura W.C.....	53
Tabela 6 - Valores da área superficial específica (AS) ( $m^2g^{-1}$ ), do diâmetro (DM) e comprimento (CM) médios (nm) e do potencial Zeta (mV) obtidos para as nanopartículas de ZnO coprecipitado, ZnO hidrotermal (30 minutos) com e sem PMAA e ZnO hidrotermal (2 horas) com e sem PMAA, respectivamente.....	76
Tabela 7 - Valores do potencial zeta (mV) para as amostras de ZnO Coprecipitado, ZnO Hidrotermal (30 minutos) e ZnO Hidrotermal (2 horas) sem e com PMAA dispersas em 100 mL do meio de cultura W.C. ....	88
Tabela C.1 - Parâmetros estimados para a variável dependente velocidade do crescimento para as nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal (2 horas) e HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA.....	129
Tabela C.2 - Parâmetros estimados para a variável dependente duração da fase lag para as nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal (2 horas) e HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA. ....	129

## SUMÁRIO

Capítulo 1 - Introdução.....	1
1.1 Aspectos gerais .....	1
1.2 Justificativa .....	4
Capítulo 2 - Referencial Teórico .....	5
2.1 Fertilizantes minerais .....	5
2.1.1 Hidroxiapatita.....	7
2.1.2 Óxido de Zinco.....	8
2.2 Métodos de Síntese dos Nanofertilizantes de HAP e ZnO .....	10
2.2.1 Método de Coprecipitação .....	10
2.2.2 Método de Hidrotermalização .....	11
2.3 Nanotecnologia e Nanotoxicologia Ambiental.....	14
2.3.1 Efeitos nanotoxicológicos diretos e indiretos.....	17
2.3.2 Algas.....	18
2.3.3 Microalga <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .....	19
Capítulo 3 - Objetivos .....	23
3.1 Objetivo Geral.....	23
3.2 Objetivos Específicos .....	23
Capítulo 4 - Materiais e Métodos .....	24
4.1 Síntese das nanopartículas de HAP e ZnO por Coprecipitação.....	24
4.1.1 Síntese das nanopartículas de HAP por Coprecipitação .....	24
4.1.2 Síntese das nanopartículas de ZnO por Coprecipitação .....	25
4.2 Tratamento das nanopartículas de HAP e ZnO por Hidrotermalização .....	26
4.3 Caracterização estrutural e morfológica das nanopartículas de HAP e ZnO.....	28
4.3.1 Difração de Raios X.....	28
4.3.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	28

4.3.3 Potencial Zeta.....	29
4.3.4 Isotermas de adsorção/dessorção de N <sub>2</sub> .....	29
4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG).....	30
4.4 Bioensaios de nanotoxicidade.....	30
4.4.1 Bioensaios de nanotoxicidade ambiental .....	30
4.4.2 Meio de cultivo e Manutenção das culturas de <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> .....	31
4.4.3 Bioensaios de nanotoxicidade com <i>P. subcapitata</i> .....	32
Capítulo 5 - Nanofertilizante de HAP - Resultados e Discussões.....	38
5.1 Caracterização morfológica e estrutural das nanopartículas de HAP .....	38
5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG).....	38
5.1.2 Difractometria de Raios-X.....	41
5.1.3 Método de Brunner-Emmet-Teller (BET) e Potencial Zeta .....	42
5.1.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	42
5.2 Bioensaios de nanotoxicidade para as nanopartículas de HAP .....	44
5.2.1 Curvas de Crescimento.....	44
5.2.2 Análises dos parâmetros das curvas de crescimento .....	50
5.2.3 Análise da Estabilidade de carga superficial das nanopartículas de HAP no meio de cultivo W.C.....	53
5.2.4 Comportamento do crescimento e análises morfológicas das microalgas .....	53
5.2.5 Análise de EDS dos bioensaios de nanotoxicidade.....	62
Capítulo 6 - Nanofertilizante de ZnO - Resultados e Discussões.....	69
6.1 Caracterização morfológica e estrutural das nanopartículas de ZnO.....	69
6.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG).....	69

6.1.2 Difractometria de Raios-X .....	75
6.1.3 Método de Brunnaner-Emmet-Teller (BET) e Potencial Zeta .....	76
6.1.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	78
6.2 Bioensaios de nanotoxicidade para as nanopartículas de ZnO .....	80
6.2.1 Curvas de Crescimento.....	80
6.2.2 Análises dos parâmetros das curvas de crescimento.....	87
6.2.3 Análise da Estabilidade de carga superficial das nanopartículas de ZnO no meio de cultivo W.C.....	88
6.2.4 Comportamento do crescimento e análises morfológicas das microalgas .....	89
6.2.5 Análise de EDS dos bioensaios de nanotoxicidade.....	99
Capítulo 7 - Conclusões Finais.....	110
Publicações bibliográficas durante o período da tese.....	113
Referências Bibliográficas.....	115
Apêndice A.....	125
Apêndice B .....	128
Apêndice C .....	129
Apêndice D.....	130
Apêndice E .....	131
Anexo .....	132

*“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”*

(Isaac Newton)

## **Capítulo 1 - Introdução**

### **1.1 Aspectos gerais**

Segundo informações da Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação (FAO) e da Associação Nacional para Difusão de Adubos (ANDA), as tendências mundiais e nacionais do consumo de fertilizantes vêm aumentando significativamente. A FAO estima que o consumo mundial de fertilizantes foi de 161,7 milhões de toneladas em 2009 e de 169,7 milhões de toneladas em 2010. A previsão quanto à demanda mundial por fertilizantes é crescente, com uma taxa média anual de crescimento de 2,6%, entre 2010 e 2014.

Segundo Benites (2014), o Brasil é o quarto maior consumidor de fertilizantes do mundo e o sexto maior produtor. Atualmente, a maior parte dos fertilizantes consumidos no país é importada, sendo que fertilizantes de alguns sistemas de produção podem atingir 50% do custo variável.

Sabe-se que o macronutriente fósforo, representante do nanofertilizante de HAP é um nutriente fundamental para os produtores primários e para a produção agrícola e foi selecionado neste estudo pois o seu uso e descarte inadequados levam a consequências ambientais e prejuízos na sustentabilidade de forma bastante crítica (GEORGE; HINSINGER; TURNER, 2016; SCHIPPER, 2014). Já, o uso do micronutriente zinco, o qual compõem o fertilizante de ZnO é imprescindível para o crescimento normal e melhor rendimento das plantas, porém o aumento em excesso nas culturas leva a problemas ambientais e toxicidade nos demais níveis tróficos (SADEGHZADEH, 2013).

A nanotecnologia é a tecnologia que visa manipular a matéria em escala atômica, molecular ou macromolecular (escala de 1 a 100 nm), para a produção dos mais variados materiais e/ou produtos, os quais apresentam características e propriedades significativamente diferentes dos materiais em maior escala (KARUNARATNE; KOTTEGODA; DE ALWIS, 2012; MOORE, 2006; NEL, 2006; TARAFDAR; SHARMA; RALIYA, 2013). As propriedades dos nanomateriais têm sido bastante

exploradas para o uso nas áreas da medicina, cosméticos, energias renováveis, remediação ambiental, agricultura e sistemas eletrônicos (FABREGA et al., 2011).

As “nanotecnologias” possuem imensos potenciais tecnológicos, incluindo nas áreas agrícola e agroindustrial com aplicações no desenvolvimento de sistemas para o encapsulamento e liberação controlada de fertilizantes, pesticidas e herbicidas, processamento de alimentos, produção de embalagens inteligentes, sensores para análise de resíduos e alimentos, remediação de resíduos de agrotóxicos, tratamento de efluentes e também no desenvolvimento de agroquímicos ou nanofertilizantes (BECARO et al., 2015; BORTOLIN et al., 2013; MERCANTE et al., 2017; MORARU et al., 2003).

Os fertilizantes são substâncias naturais ou sintéticas adicionadas ao solo ou outro meio de cultivo para fornecer nutrientes necessários ao desenvolvimento das plantas (BHABRA et al., 2009; NAIR et al., 2010). O uso é uma prática comum e necessária na agricultura com a função de aumentar a produtividade da lavoura, já que os fertilizantes podem incrementar a produtividade agrícola em até 40%. Visando aumentar a eficiência do uso destes nutrientes, os nanofertilizantes surgem como uma alternativa promissora, já que podem fornecer os nutrientes necessário às culturas agrícolas de maneira mais eficiente que os fertilizantes na micro- e macroescala ao regular a liberação dos mesmos no solo (KOOKANA et al., 2014; LIU; LAL, 2014; LIU et al., 2014; TARAFDAR; SHARMA; RALIYA, 2013) e ao mesmo tempo com mobilidade inferior aos fertilizantes de base líquida, evitando eutrofização em corpos hídricos.

O processo de eutrofização consiste no crescimento excessivo de algas e plantas devido a alta disponibilidade de luz solar, dióxido de carbono e nutrientes, principalmente de nitrogênio e fósforo, aumentando a taxa fotossintética destes organismos. Este processo acarreta como consequências negativas para os demais níveis tróficos pertencentes aos ecossistemas aquáticos, a diminuição de oxigênio dissolvido, aumento da matéria orgânica e mortalidade dos demais organismos aquáticos (CHISLOCK et al., 2013)

Os fertilizantes podem incrementar a produtividade agrícola em até 40% e para aumentar a eficiência do uso destes nutrientes, amenizando o crônico problema da eutrofização, os nanofertilizantes surgem como uma alternativa promissora. As tentativas para o desenvolvimento dos nanofertilizantes tem por finalidade regular a liberação de nutrientes de maneira controlada, tornando-se mais eficiente que os adubos convencionais (TARAFDAR; SHARMA; RALIYA, 2013).

Segundo Chinnamuthu e Boopathi (2009), a utilização de nanofertilizantes como alternativa para substituir os fertilizantes convencionais permite a redução na utilização de nutrientes, principalmente nitrogênio e fósforo, os quais quando em excesso nos solos, podem ser lixiviados por água de chuva e ocasionar eutrofização, além de contaminação dos corpos d'água. Os nanofertilizantes dependendo do tipo de encapsulamento podem ser liberados lentamente no ambiente ao se controlar variáveis como pH, umidade do solo, etc, permitindo uma otimização no processo de liberação e absorção dos nutrientes pelas plantas. Além disto, os nanofertilizantes amenizam a produção de resíduos e, consequentemente, os custos de proteção ambiental.

Contudo, devido ao crescimento da indústria de nanomateriais manufaturados, a preocupação sobre possíveis efeitos nanotóxicos, com impacto para a biota, começou a atrair a atenção da comunidade científica. Quando inseridos no ambiente, alguns nanomateriais podem sofrer alterações no tamanho da partícula, na forma, na carga de superfície e no controle crítico da biodisponibilidade (BATLEY; KIRBY; MCLAUGHLIN, 2013). Parthasarathi (2011) mostra que ainda não são bem compreendidos os processos de bioacumulação, biomagnificação e biotransformação das nanopartículas em culturas alimentares. Pouco tem se estudado sobre as nanopartículas e a interação destas com os vegetais, com relação à acumulação e subsequente disponibilidade nas culturas alimentares. Entretanto, uma vez que estes sistemas nanoestruturados são aplicados nas culturas agrícolas, as nanopartículas interagem com o ar, água e solo, levando, como consequência, à alteração das suas propriedades de superfície, podendo resultar em agregação, alterações nas cargas, entre outros efeitos. As características das nanopartículas que compõem estes fertilizantes utilizados na agricultura, tais como tamanho, forma, estrutura geométrica e propriedades individuais podem ter um potencial aumento do nível de toxicidade ambiental, principalmente para a biota aquática (BHABRA et al., 2009; RAJ, 2007).

Algumas nanopartículas apresentam um elevado potencial tóxico devido a sua elevada área superficial, o que a torna potencialmente reativa. No entanto, não apenas o tamanho da partícula influencia na toxicidade, mas também sua estrutura, composição e as concentrações das nanopartículas (GUZMÁN; TAYLOR; BANFIELD, 2006). Outro aspecto importante a se considerar é que as nanopartículas apresentam uma maior tendência para dissolver do que partículas maiores, o que pode ser atribuído a maior área superficial característica de partículas com dimensões nanométricas, atingindo uma

solubilidade até 10.000 vezes maior se comparada às partículas micrométricas (MAYO et al., 1999).

Liu e Lal (2014, 2015), bem como Taj e Zarrin (2016) discutem a importância de novas nanotecnologias aplicadas no desenvolvimento de fertilizantes nanoestruturados, especialmente para o controle de liberação do nutriente fósforo (P), a fim de evitar também o processo de eutrofização dos corpos de água. Ainda, Liu e Lal (2015) fizeram um levantamento na literatura sobre os tipos de nanomateriais que apresentam a eficácia para a aplicação de nanofertilizante compostos por macronutrientes e micronutrientes.

Dentre as fontes de micronutrientes e macronutrientes para plantas mais pesquisados e comercializados, destacam-se as fontes de fósforo e zinco. Neste contexto, neste trabalho de doutorado, foram sintetizadas e caracterizadas nanopartículas de hidroxiapatita (HAP) ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) e de óxido de zinco (ZnO), que apresentam potencial para uso como nanofertilizantes, e avaliados seus aspectos de toxicidade para as microalgas *Pseudokirchneriella subcapitata*, as quais formam a base da cadeia trófica aquática.

## 1.2 Justificativa

As nanopartículas de HAP e ZnO são uma alternativa promissora para substituir os fertilizantes convencionais, com ganho de produtividade e redução de insumos utilizados. Entretanto, quando as nanopartículas interagem com o meio ambiente podem ser lixiviadas até os corpos de água, apresentando alterações em suas propriedades de superfície. As características como tamanho, forma, estrutura geométrica e a solubilidade interferem em suas propriedades toxicológicas. Além disso, com o uso e descarte indevidos dos sistemas nanoestruturados nos ecossistemas, pode-se haver uma potencialização dos efeitos tóxicos aos organismos aquáticos. Portanto, a presente pesquisa é de grande relevância diante da necessidade de investigar o comportamento dos nanofertilizantes quando dispostos no ambiente aquático, e os efeitos tóxicos gerados para a microalga bioindicadora ambiental da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata*, a qual serve como modelo e integra a produtividade primária dos ecossistemas aquáticos.



## Capítulo 2 - Referencial Teórico

### 2.1 Fertilizantes minerais

Quando o solo não apresenta os nutrientes necessários para o desenvolvimento e cultivo de das plantas, torna-se necessário o emprego de fertilizantes. Estes devem apresentar uma série de características desejáveis, dentre elas o uso racional para cumprir a função de nutrir as plantas, de modo a causar o menor impacto possível no ambiente natural aumentando a produtividade agrícola da área (ALCARDE; GUIDOLIN; LOPES, 1998; NKEBIWE et al., 2016).

Na classe dos fertilizantes minerais, encontram-se aqueles a base de compostos inorgânicos, embora alguns compostos orgânicos sintéticos também sejam considerados, tais como, uréia, quelatos e calciocianamida (ALCARDE; GUIDOLIN; LOPES, 1998).

Os vegetais são seres vivos que necessitam de micro e macronutrientes provenientes do solo, água e ar. A adição de alguns nutrientes aos vegetais, por vezes se faz necessário, pois alguns nutrientes não são absorvidos, ou ainda o processo de absorção é muito prolongado, sendo importante haver a intervenção com fertilizantes minerais, ricos em elementos minerais (naturais ou sintéticos) essenciais para evitar a deficiência da planta e manter uma produtividade agrícola ideal (ISHERWOOD, 2000; LAPIDO-LOUREIRO; MELAMED; NETO, 2009).

A literatura aponta que o macronutriente fósforo (P) é o segundo nutriente mais importante requerido para o crescimento e desenvolvimento das plantas e não pode ser substituído por nenhum outro elemento mineral (HAYGARTH; JARVIS, 1999). O fósforo atua diretamente no crescimento das raízes e surgimento de novas raízes, uma vez que é absorvido pelas raízes e movido para todo o vegetal. Além disso, o nutriente pode ficar armazenado como em um reservatório sazonal de nutrientes para as necessidades das plantas (KATZNELSON, 1977; KLEIN; AGNE, 2013).

De acordo com Némery; Garnier (2016) e Fayiga; Noke (2016), o P é essencial para a produção de alimentos, porém pode causar o processo natural de eutrofização em corpos de água. Nos sistemas agrícolas, o P é absorvido e removido do solo pela biomassa vegetal, sendo necessário a sua reposição a fim de sustentar a produção. Foi em meados do século XIX que houve a descoberta do processo viável de comercialização de fertilizantes fosfatados, o que aumentou a disponibilidade deste macronutriente e

consequentemente aumentando a alimentação para a população em geral. Entretanto, na metade do século XX, notou-se elevados níveis de fósforo em águas superficiais. As razões para tal evento foram o aumento das fontes difusas de fertilizantes aplicados nas culturas agrícolas e fontes pontuais industriais relacionadas ao descarte de produtos químicos somadas ao tratamento inadequado das águas residuais.

O micronutriente zinco (Zn) é de extrema importância para o metabolismo das plantas e para o alongamento celular, pois a sua deficiência provoca mudanças complexas nas reações metabólicas naturais das plantas, dentre elas, alterações na produção de carboidratos, proteínas, hormônios como a auxina, comprometimento da integridade das membranas celulares e deficiência na produção de enzimas. Como consequência destes fatores, tem-se o retardamento do crescimento dos vegetais (KIRKBY; RÖMHELD, 2007) e a consequente diminuição da produtividade agrícola. Este fundamental micronutriente deve ser aplicado de forma contínua e em pequenas dosagens sobre as culturas.

Montalvo et al. (2016) ressaltam que milhões de hectares de terras agrícolas são afetados pela deficiência de Zn e que estima-se que cerca de um terço da população mundial é deficiente deste micronutriente. Por isso, uma estratégia eficaz que tem sido utilizada com sucesso para combater a deficiência de Zn é a aplicação de fertilizantes contendo Zn. Porém, Alves; Dos Reis; Gratão (2016) e Chattopadhyay (2016) explicam que este micronutriente é um metal pesado e pode, em concentrações elevadas, contaminar solos e na águas, intoxicando as plantas e os demais organismos da cadeia trófica.

De acordo com a Resolução N° 357 (2005) dentro do tópico Classe I para Água Doce, em ambientes lênticos, o limite para P total é de 0,020 mg/L, enquanto para ambientes lóticos e tributários de ambientes intermediários não deve ultrapassar 0,1 mg/L. Segundo (HECKRATH et al., 1995) as concentrações de P que levam a efeitos de eutrofização em corpos de água variam de 0,02 a 0,035 mg/L.

Com relação a concentração de Zn total em águas doces da classe I, o limite estabelecido pela Resolução N° 357 (2005) é de 0,18 mg/L, para ambientes lênticos e lóticos. Para o elemento Zn o valor mínimo é de 15 mg/kg e o máximo tolerável deve ser de 200 mg/kg. O valor alerta para este nutriente presente no solo é de 300 mg/kg.

### 2.1.1 Hidroxiapatita

O composto hidroxiapatita (HAP), de fórmula química  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , é um material biocerâmico e um constituinte mineral natural. Estes minerais ocorrem na natureza, entretanto de maneira geral, são constituintes de rochas ígneas e metamórficas, destacando-se em calcários cristalinos (MA; LOGAN; TRAINA, 1995). A Figura 1 mostra uma representação da célula unitária da hidroxiapatita.

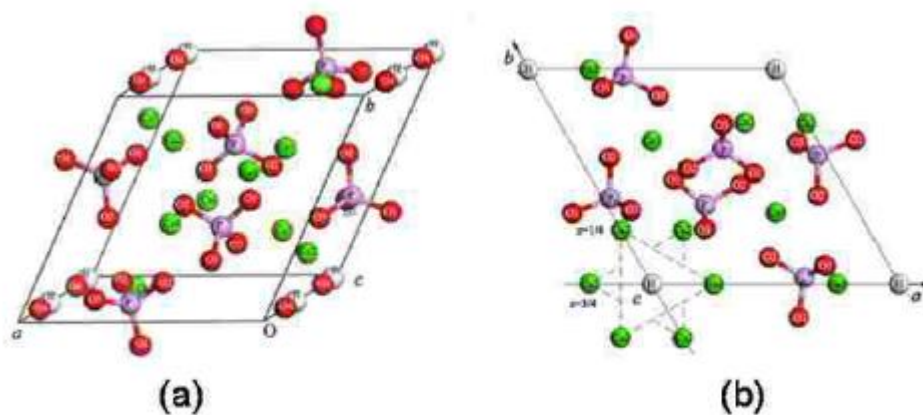


Figura 1 - Representação da célula unitária da Hidroxiapatita: (a) vista lateral e (b) vista superior: verde  $\text{Ca}^{2+}$ , violeta  $\text{P}^{5+}$ , vermelho  $\text{O}^{2-}$  e branco  $\text{H}^{1+}$  (Figura retirada de LOU et al. (2012)).

Na estrutura da hidroxiapatita, o fósforo forma com o oxigênio o grupo fosfato, sendo chamado de grupo hidroxila a ligação entre o oxigênio e o hidrogênio. Quando estes grupos juntam-se com o íon cálcio, distribuem-se espacialmente segundo um arranjo em forma hexagonal, o qual apresenta dimensões de célula unitária sendo,  $a=b= 9,42 \text{ \AA}$  e  $c= 6,88 \text{ \AA}$ . Sua célula unitária hexagonal possui 10 íons cálcio localizados em 2 sítios não equivalentes, 4 no sítio I (CaI) e 6 no sítio II (Ca II) (ARAUJO, 2006).

A hidroxiapatita também é denominada de rocha de fosfato ou fosforitos, os quais apresentam propriedades de biocompatibilidade e osteointegração, somadas a sua alta capacidade de adsorção de moléculas. Esta característica a torna importante no tratamento da ação prolongada de drogas anticancerígenas, e na eficiência de remoção de metais pesados em águas e solos poluídos (COSTA et al., 2009; KOTTEGODA et al., 2011). Além disto, a HAP é uma das maiores fontes do nutriente fósforo, largamente utilizada

em aplicações agrícolas, especialmente nas indústrias de fertilizantes (COSTA et al., 2009).

Kottegoda et al. (2011) ressalta que há grande interesse tecnológico e econômico na síntese de nanopartículas de HAP para a área agrícola, visando a utilização como fertilizante. O tamanho pequeno das apatitas cristalinas é um fator extremamente importante e relacionado com as propriedades estruturais e biológicas das atividades de superfície, velocidade de dissolução, comportamento de sinterização e moldagem (MIR et al., 2012).

O fator solubilidade da HAP também é relevante, pois este pode ser afetado mediante as variações de tamanho da partícula, do pH do meio, da estequiometria, da cristalinidade e do próprio método de síntese adotado (FULMER et al., 2002). Desta forma, a escolha do método de síntese da HAP é uma etapa fundamental para obtenção de partículas com solubilidade controlada.

### **2.1.2 Óxido de Zinco**

O óxido de zinco (ZnO) tem sido usado há milhares de anos para muitas funções diferentes e é considerado um material bem estabelecido na engenharia, atingindo uma produção anual de um milhão e meio de toneladas (BROWN, 1976; FREDERICKSON; KOH; BUSH, 2005; MOEZZI; MCDONAGH; CORTIE, 2012).

Há décadas, o óxido de zinco é estudado, e por ser um material semicondutor, possui grande aplicabilidade em diversas áreas da ciência. É conhecido também como Zincita e possui uma estrutura hexagonal do tipo wurtzita (ZnS). Apresenta como parâmetros de rede  $a = 0,32501$  nm e  $c = 52071$  (FELTRIN, 2010). A Figura 2 mostra a representação da estrutura cristalina do ZnO.

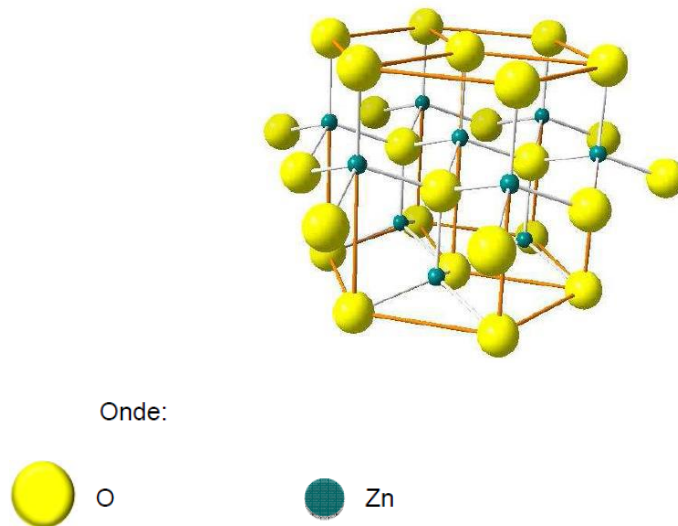


Figura 2 - Rede cristalina de ZnO (Figura retirada de FELTRIN (2010)).

O tamanho e a morfologia das partículas de ZnO influenciam fortemente suas propriedades. O tamanho em escala nanométrica apresenta características únicas, as quais são exploradas com sucesso para as diversas aplicações tecnológicas (FELTRIN, 2010).

As nanopartículas de ZnO são utilizadas como material para aplicações eletrônicas, filmes de proteção para a radiação UV, sensores químicos (MEULENKAMP, 1998), assim como protetores solares com filtros UV (SERPONE; DONDI; ALBINI, 2007). Além disso, é aplicado em processos de fotocatalise, optoeletrônica, luminescência, materiais piezelétricos, sensores de gases, laser de diodos, transistor de efeito de campo, diodo emissor de luz, sensores e catalisadores, filtro de superfícies de ondas acústicas e células solares (FELTRIN, 2010).

Em relação às aplicações agrícolas, Milani et al. (2012) relatam que o micronutriente Zn está entre os fertilizantes mais popularmente utilizados, sendo aplicados amplamente em culturas de diversas regiões do mundo. Contudo, segundo as classificações de risco da União Européia, o ZnO é classificado como N – R 50-53, sendo muito tóxico para o ambiente aquático ou ecotóxico. Diante disso, qualquer tipo de material ou resíduo contendo ZnO deve ser rotulado como Classe 9 - UN3077 e registrado como substância ambientalmente perigosa (MOEZZI; MCDONAGH; CORTIE, 2012).

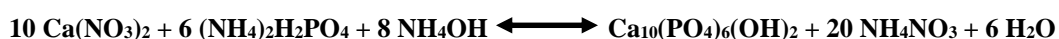
## 2.2 Métodos de Síntese dos Nanofertilizantes de HAP e ZnO

### 2.2.1 Método de Coprecipitação

Para a obtenção da HAP, o método utilizado foi o da Coprecipitação, o qual em envolve reações em meio aquoso entre precursores de cálcio e fósforo, com controle de pH e temperatura. A natureza do reagente é referente à sua composição, podendo ou não, apresentar íons indesejados alterando características morfológicas e cristalográficas. A solução deve estar supersaturada para que ocorra o processo de nucleação e conseqüentemente, formação de nanopartículas (BURDA et al., 2005; CUSHING; KOLESNICHENKO; O'CONNOR, 2004).

A taxa de nucleação dos cristais está relacionada com a adição de reagentes e a velocidade de gotejamento à cinética da reação, ou seja, quando se adiciona lentamente os íons fosfato há uma maior taxa de crescimento das partículas e menor taxa de nucleação o que proporciona a formação de partículas maiores, enquanto que se o processo de titulação for mais rápido, formam-se um maior número de núcleos, não havendo tempo suficiente para o crescimento das partículas (KOUTSOPOULOS, 2002; RIGO; GEHRKE; CARBONARI, 2007).

Uma das rotas mais frequentes utilizadas para a síntese de HAP é:



**Equação 1**

Para essa reação é necessária a utilização de hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) para a manutenção do pH básico da solução. Posteriormente se devem realizar várias lavagens do produto obtido após o processo de síntese com água (CUNHA et al., 2004; KWEH; KHOR; CHEANG, 1999; MAMANI, 2009). Inicialmente, há a formação de uma fase metaestável inicial, a qual passa por um ou mais passos intermediários de recristalização até a formação do precipitado termodinamicamente estável.

Segundo os estágios de Ostwald, para baixas saturações a primeira fase é a de maior solubilidade, em que ocorrem dissolução e recristalização transformando as fases subsequentes em menos solúveis (GOUVEIA, 2008). Após estes processos tem-se que

obter valores de pH maiores que 7 onde a primeira fase a se precipitar é o fosfato de cálcio amorfo, o qual é transformado lentamente em hidroxiapatita.

Um dos métodos de síntese do ZnO é o método de Coprecipitação a partir de um precursor de zinco (usualmente o nitrato de zinco  $Zn(NO_3)_2$ ) juntamente com um agente mineralizador (hidróxido de sódio (NaOH)). A solubilização do sal  $Zn(NO_3)_2$  em água deionizada é necessária para posteriormente se adicionar a solução de NaOH até a formação do precipitado. Quando comparada à síntese da HAP, a produção de ZnO é muito mais simples de ser processada.

Alguns parâmetros são muito importantes para a formação de partículas, tais como concentração e natureza dos reagentes, temperatura da reação, pH e tempo de envelhecimento, os quais necessitam de controle por serem variáveis críticas para a pureza e características cristalográficas do material obtido (COSTA et al., 2009; CUSHING; KOLESNICHENKO; O'CONNOR, 2004; KWEH; KHOR; CHEANG, 1999).

Durante todo o método de síntese da HAP e ZnO nanoestruturados verifica-se que é de fundamental importância considerar as variáveis empregadas tais como reagentes precursores, solventes, temperatura e mineralizadores, para desta forma obter as características finais do material desejado.

### **2.2.2 Método de Hidrotermalização**

O método de hidrotermalização, além de permitir a obtenção de produtos com qualidade, é vantajoso por produzir menos resíduos e poder utilizar uma grande variedade de matérias-primas de custo reduzido (SŌMIYA; HISHINUMA; AKIBA, 1995). Dessa maneira, verifica-se que a composição química, o tamanho e a forma das partículas de HAP e ZnO são totalmente dependentes do método e das condições de síntese empregadas. Uma vez que estes fatores são determinantes no processo de solubilidade da HAP e ZnO, uma gama de variações pode ser empregada com a finalidade de otimizar este comportamento.

O método hidrotermal vem sendo muito utilizado e explorado, pois tem demonstrado bastante eficácia no processo de crescimento de nanocristais com controle da formação de fase (estequiometria), do tamanho e da forma das nanopartículas.

O método consiste em um reator hidrotérmico (normalmente feito de aço) aquecido por meio de uma fonte externa (por exemplo, banho de óleo, manta de

aquecimento ou resistência elétrica) via condução térmica. As regiões da solução que estão em contato com as paredes do reator irão aquecer primeiramente, originando o aparecimento de gradientes térmicos dentro deste ambiente líquido. Este fenômeno gera correntes de convecção no interior da solução, mantendo-a em constante agitação até que o equilíbrio térmico seja alcançado (HEWITT, 2008; KAPPE; DALLINGER; MURPHREE, 2009).

O Sistema Hidrotérmico de Convecção (SHC) é um sistema composto por um reator hidrotérmico (RH) feito em aço inoxidável, placa de agitação, controlador de temperatura e resistência elétrica (BARRADO, 2008). As paredes do reator são espessas e por isso o equipamento pode suportar pressões extremas. Para promover o aquecimento do RH, é utilizada uma resistência elétrica que envolve a lateral externa do RH com potência específica em uma temperatura máxima adequada.

Um controlador externo é responsável pelo funcionamento deste dispositivo elétrico e pela programação da temperatura e do tempo de processamento. Um copo de politetrafluoretileno (PTFE), conhecido por Teflon é usado como recipiente para a solução precursora com o intuito de minimizar possíveis fontes de contaminação presentes nas paredes de aço do reator.

Já a placa de agitação tem a finalidade de assegurar o contínuo movimento do líquido e de impedir o acúmulo de partículas no fundo do copo, aumentando a homogeneização da solução.

O tempo de tratamento e a temperatura são importantes condições de síntese, as quais são variáveis para a melhor otimização a fim de obter nanopartículas com tamanho, forma e distribuição controlados.

A Figura 3 mostra uma representação esquemática do sistema de tratamento hidrotérmico para a síntese de nanopartículas.



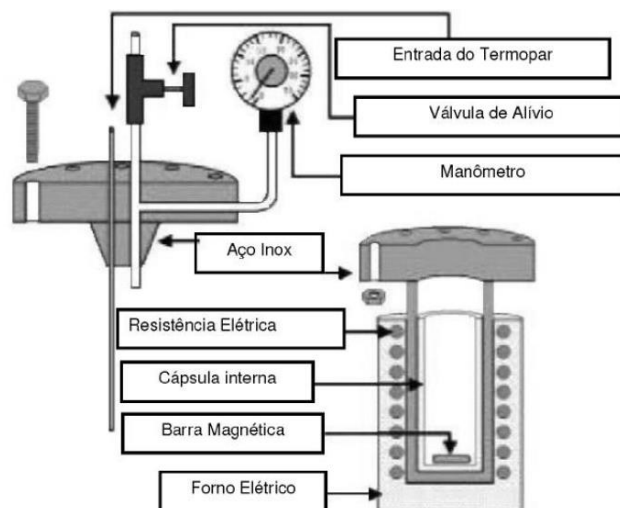


Figura 3 - Representação esquemática do sistema de hidrotérmica (Figura retirada de MOURÃO et al. (2009)).

A reação química que ocorre neste sistema fechado pode envolver um ou mais precursores diferentes na presença de água a uma temperatura superior à sua ebulição ( $100^{\circ}\text{C}$ ), sendo, portanto, baseado na sobreposição entre a pressão como fator termodinâmico e as propriedades específicas da água (BURDA et al., 2005; DEMAZEAU, 2011).

Normalmente, a síntese hidrotérmica da HAP é realizada em temperaturas até  $300^{\circ}\text{C}$  (BURDA et al., 2005). Para o presente estudo, os processos hidrotérmicos das sínteses de HAP e ZnO foram realizados em temperatura controlada de  $150^{\circ}\text{C}$ , durante um período de 30 minutos e 2 horas, respectivamente.

Para o processo de cristalização, a pressão de vapor e a estrutura da água em temperatura elevada desempenham importante e diferente função daquela na temperatura ambiente, sendo um excelente precursor (BURDA et al., 2005).

No processo hidrotérmal ocorre um aumento significativo na solubilidade da partícula amorfa e sua cristalização pode ocorrer simultaneamente com processos de redissolução e reprecipitação (SŌMIYA; HISHINUMA; AKIBA, 1995).

O processo de nucleação e o crescimento das partículas ocorrem com tamanho específico para as nanopartículas em suspensão que são solubilizadas na solução. Quando as soluções são menos saturadas ocorre uma diminuição nas taxas de crescimento das nanopartículas (BYRAPPA; OHACHI, 2003).

Vários fatores podem afetar o processo hidrotérmal, incluindo o tipo de precursor, pH da solução, relação água/precursor, temperatura, natureza do solvente e estabilizante (BURDA et al., 2005; DEMAZEAU, 2011).

Quando há a variação em algum destes parâmetros, as partículas podem ser sintetizadas com diferentes tamanhos, formas e estados de aglomeração. Nesta etapa poderão ser adicionados diferentes surfactantes para controlar a dispersão e o tamanho das partículas. O grau de cristalinidade das nanoestruturas se eleva quando a temperatura aumenta em soluções sob alta pressão, obtendo uma razão Ca/P próximo ao valor estequiométrico (Ca/P = 1,67) (ELLIOTT, 1994).

Para a preparação de materiais específicos é importante o controle ideal do pH, na estabilização de diferentes formas estruturais, elaboração de nanocompósitos e no controle do tamanho e forma dos cristais (DEMAZEAU, 2011).

### **2.3 Nanotecnologia e Nanotoxicologia Ambiental**

A nanotecnologia tem atraído cada vez mais atenção da comunidade científica mundial e do público em geral (PATIL et al., 2016). A nanotecnologia é o conhecimento e o controle da matéria na escala nanométrica, nas dimensões entre 1 a 100 nm, com propriedades novas e únicas para as mais diversas aplicações (ABO ENIN, 2014; KUNDURU et al., 2017; MIHINDUKULASURIYA; LIM, 2014).

A nanotecnologia tem aplicações em todos os setores da ciência e tecnologia incluindo as áreas da engenharia, médica, farmacêutica, agricultura, meio ambiente, cosméticos, filtros solares, embalagens para alimentos, produtos de limpeza, vestuário, sistemas de purificação de água, sensores e biosensores (BONDARENKO et al., 2013; CONTRERAS; RODRIGUEZ; TAHA-TIJERINA, 2017; KOTTEGODA et al., 2011; SERRANO; RUS; GARCIA-MARTINEZ, 2009). Há uma década, o termo nanotoxicologia surgiu como uma sub-disciplina pertencente a interface entre toxicologia e ciência dos nanomateriais. Esta ciência enfatiza a interação direta e a interferência de nanopartículas com os processos celulares vitais (SHVEDOVA; PIETROIUSTI; KAGAN, 2016).

Segundo Khan, Fulekar e Pathak (2015), dois fatores evidenciam a importância da nanotoxicologia e a necessidade de seu desenvolvimento e aprofundamento: produção em larga escala de diferentes nanomateriais e desenvolvimento de nanomateriais com propriedades físico-químicas novas e complexas.

Farcas et al. (2015) relatam que os nanomateriais manufaturados têm se tornado foco dos estudos em diversas aplicações, devido as suas novas e únicas propriedades, em escala nanométrica. Além disso, a partir da década passada, houve um aumento

exponencial no número de artigos científicos produzidos e relacionados aos estudos sobre os efeitos toxicológicos de nanomateriais.

Krug (2014) revela que de 1999 a 2014, foram produzidos cerca de 10.000 trabalhos sobre as questões ambientais e de saúde, os quais apresentaram insatisfatórios resultados com protocolos experimentais pobres ou carentes de referências *in vivo* e *in vitro* para caracterização e testes de toxicidade para diversos nanomateriais (SHVEDOVA; PIETROIUSTI; KAGAN, 2016).

Oberdorster et al. (2005) explicam que a atividade biológica das nanopartículas dependerá dos parâmetros físico-químicos não-comumente considerados em estudos para avaliação da toxicologia convencional (substâncias químicas), trazendo uma lista de parâmetros para melhor compreensão na avaliação nanotoxicológica, tais como: concentração, tamanho da partícula, distribuição do tamanho, estado de aglomeração, forma da partícula, estrutura cristalina, composição química, área superficial, química superficial, carga superficial e porosidade.

Dawson et al. (2013) mencionam que é de extrema necessidade o aperfeiçoamento de metodologias que determinem as interações entre nanomateriais e a matriz biológica. O projeto de infra-estrutura de pesquisa denominado de Quality-Nano enfatiza a importância de se padronizar e harmonizar os métodos e procedimentos experimentais para a segurança e caracterização dos nanomateriais *in situ*. Um dos projetos de grande relevância internacional é o projeto NanoReg, composto por 70 institutos parceiros, as quais recebem um grande número de recursos financiados pela Comissão Européia e participantes dos Estados membros, a fim de facilitar a padronização e regulamentação dos testes nanotoxicológicos. Além disso, o projeto visa integrar e estreitar a colaboração das organizações internacionais tais como a Agência Européia dos Produtos Químicos (ECHA), a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE), o Comitê Europeu de Normalização (CEN) e a Organização Internacional para Padronização (ISO).

As diretrizes de vários protocolos desenvolvidos pela OECD como as voltadas para a análise das propriedades físico-químicas dos nanomateriais, a análise quantitativa de revestimentos de superfície e análise de distribuição de tamanhos no estado seco ou em pó, bem como no estado húmido também estão sendo verificadas pelo projeto NanoReg, o qual faz uma abordagem européia comum para o teste regulamentar de nanomateriais manufacturados (BLEEKER et al., 2013).

Nos últimos anos, tem ocorrido um grande crescimento no campo da toxicologia aquática. As razões para tal fato são devido à introdução de novas metodologias, e o aumento da preocupação na segurança de novos materiais sintéticos, como os nanomateriais. A ecotoxicologia engloba o estudo do comportamento ambiental, transporte, biodisponibilidade, bioacumulação (exposição), e a toxicidade de agentes nos mais diferentes níveis tróficos (WANG, 2011). Não se sabe com precisão qual o destino ambiental dos diversos nanomateriais dispostos nos ecossistemas, muito menos o seu potencial tóxico para os organismos da cadeia trófica aquática (FRANKLIN et al., 2007).

No escopo da nanotoxicologia, a toxicidade dos mais diversos nanomateriais deve ser determinada nos diferentes níveis tróficos presentes nos ecossistemas, a fim de avaliar da forma mais adequada e significativa os efeitos destes para a saúde ambiental e humana. No entanto, são poucos os protocolos ou materiais de referência específicos e certificados para a realização dos bioensaios de toxicidade com nanomateriais. Diante disso, os pesquisadores tentam adequar as melhores metodologias existentes para este tipo de avaliação, contornando as dificuldades na interpretação e comparação das conclusões obtidas (BAUN et al., 2008)

Atualmente, os efeitos causados pelas interações entre as nanopartículas e nanomateriais com o ambiente vem sendo muito estudados em ecossistemas aquáticos, buscando elucidar os mecanismos de toxicidade envolvidos (BOLIK; KOOP, 1991; SEGURA; SHEA, 2001). O trabalho de Biswas e Wu (2005) relata uma profunda discussão sobre as interações e os impactos das nanopartículas no ambiente.

Schierz et al. (2014) destacam que um dos aspectos mais importantes que um nanomaterial apresenta é a sua tendência à agregação e aglomeração, pois as partículas se unem por forças secundárias, incluindo as forças de Van der Waals e forças eletrostáticas. Além disso, as partículas tendem a formar grupos que são dificilmente dispersas por meios mecânicos, sendo denominadas, neste caso, de agregados de partículas. Os complexos agregados geram efeitos de comportamento diferentes daqueles apresentados pelas partículas individuais.

Gong et al. (2011) evidenciaram que os recursos hídricos são consideravelmente vulneráveis a contaminação por nanomateriais, apresentando grande potencial de toxicidade para a biota aquática, a qual deve ser analisada de forma minuciosa. Muitos são os trabalhos encontrados na literatura com o foco de avaliação da nanotoxicidade em organismos aquáticos, dos quais parte deles são relacionados à toxicidade de nanopartículas de óxido de zinco (ZnO), óxido de cobre (CuO), óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>),

materiais da família dos grafenos e nanomateriais como os quantum dots (QDs) (ARUOJA et al., 2009; FRANKLIN et al., 2007; SADIQ et al., 2011; WANG et al., 2008; WONG et al., 2010; ZHAO et al., 2017). Dentre os organismos aquáticos comumente testados, estão as microalgas verdes e as cianofíceas de várias espécies (CHELONI; MARTI; SLAVEYKOVA, 2016; GALLETTI et al., 2016; GONG et al., 2011; GUO; SELBY; BOXALL, 2016; LEI et al., 2016; OECD, 2011a; PERREAULT et al., 2012; SADIQ et al., 2011; WANG et al., 2016b; ZHAO et al., 2017).

Marcone (2011) descreve sucintamente as principais características da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* (anteriormente denominada *Selenastrum capricornutum*), a qual é comumente utilizada em bioensaios de toxicidade (ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006). O autor ainda ressalta que as algas são largamente utilizadas em programas de monitoramento ambiental por formarem a produtividade primária dos ecossistemas aquáticos e por serem os primeiros seres vivos a sinalizarem os impactos em corpos de água, viabilizando ações de correção na gestão frente a efeitos danosos. Além disso, os bioensaios que empregam as microalgas como organismos-teste são geralmente sensíveis, rápidos e econômicos.

### **2.3.1 Efeitos nanotoxicológicos diretos e indiretos**

Muitos estudos que investigam a nanotoxicidade em algas apontam os efeitos tóxicos possíveis de ocorrer quando há a interação entre diferentes nanopartículas com as células e os mecanismos bioquímicos que ocorrem no metabolismo celular. As propriedades estruturais, de forma e de superfície das nanopartículas são as responsáveis por gerar vários efeitos tóxicos (PETERSEN et al., 2015), os quais são classificados como diretos, os quais podem ser também denominados de físicos e efeitos indiretos e/ou físicos indiretos (LI; BRETT, 2013; LONG et al., 2012; PETERSEN et al., 2015; QU; ALVAREZ; LI, 2013; ZHAO et al., 2017).

Wang et al. (2016b) relatam que os efeitos físicos diretos são danos morfológicos celulares, das membranas e paredes celulares (LIN et al., 2012; MACHADO; SOARES, 2012) e a formação de aglomerados/agregados com as nanopartículas (GALLETTI et al., 2016). Já os efeitos físicos indiretos são gerados pela redução na disponibilidade de luz, denominado de efeito de sombreamento (LONG et al., 2012), estresse oxidativo decorrente a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), danos no material genético (DNA) (TOH et al., 2014) e as condições de crescimento devido a absorção deficiente ou

depleção de nutrientes pelas células algais causadas pela interação das células com diferentes tipos de nanopartículas aglomeradas/agregadas, as quais reagem com alguns nutrientes presentes no meio de cultivo (ARUOJA et al., 2009; HARTMANN et al., 2010; JI; LONG; LIN, 2011; LEI et al., 2016; SCHWAB et al., 2011).

Um importante fator com relação a toxicidade indireta é a influência do meio de cultivo onde elas sobrevivem. O meio de cultivo é composto de nutrientes minerais, os quais, quando entram em contato com nanopartículas de elevada área superficial, podem sofrer a depleção de alguns nutrientes, inibindo o crescimento das microalgas (ZHAO et al., 2017).

Vários são os efeitos tóxicos causados pelos nanomateriais às microalgas, mas em geral, os mais relatados e conhecidos são alteração do metabolismo, inibição do crescimento e efeito de sombreamento (GONG et al., 2011).

### **2.3.2 Algas**

Algas ou vegetais avasculares são seres classificados como eucarióticos, podendo ser unicelulares ou pluricelulares, os quais apresentam algumas características semelhantes às plantas ou vegetais superiores, como a presença de cloroplastos e organelas responsáveis pelos processos fotossintéticos. Além disso, as algas podem ter ou não mobilidade e seu tamanho varia desde poucos micrômetros (microalgas) a mais de um metro de comprimento (macroalgas) (ROUND, 1983). Os métodos de reprodução podem ser assexuados e sexuados, frequentemente caracterizados pela produção de zoósporos ou gametas flagelados móveis, evoluindo ainda para oogamia em diversos grupos (ROUND, 1983).

Apesar da extrema variabilidade de aspectos morfológicos, citológicos e reprodutivos que apresentam, os seus mecanismos básicos e vias metabólicas parecem ser similares aos dos demais vegetais. Todas as algas apresentam clorofila *a* e possuem sistema fotossintetizante que funciona a partir deste pigmento. Os requisitos nutritivos básicos e os produtos finais de assimilação, carboidratos e proteínas, são similares aos dos vegetais superiores, embora seja maior a variedade de carboidratos (ROUND, 1983).

Do ponto de vista ecológico, as algas representam um grupo cosmopolita, ocorrendo na superfície de todos os tipos de solos e regiões permanentemente cobertas de

gelo e neve, tendo, porém, seu maior centro de distribuição nas águas, as quais cobrem 70% da superfície do planeta, onde constituem os principais produtores primários de compostos orgânicos de carbono. Ocorrem sob a forma de fitoplâncton microscópico e ainda como organismos micro e macroscópicos na zona limite entre ambiente terrestre e aquático (LEE, 1989; ROUND, 1983).

Olaizola (2003) relata que as microalgas são microrganismos heterogêneos, usualmente microscópicos, unicelulares, coloniais ou filamentosos, coloridos e fotoautotróficos. Filogeneticamente, podem ser procarióticos ou eucarióticos. O cultivo de microalgas está crescendo gradativamente no mundo inteiro, o qual é utilizado para as mais variadas aplicações (BERTOLDI; SANT'ANNA; OLIVEIRA, 2008).

As algas, em especial as microalgas, são denominadas de produtores primários dominantes por serem organismos com função primordial na cadeia trófica aquática, constituindo a base dos níveis tróficos. Por esta razão, elas são comumente empregadas nos testes de toxicidade, uma vez que havendo desequilíbrio nesta população, conseqüentemente poderá haver efeitos negativos para os demais níveis tróficos (MACHADO; SOARES, 2012).

### **2.3.3 Microalga *Pseudokirchneriella subcapitata***

A espécie de microalga verde *Pseudokirchneriella subcapitata* foi descrita pela primeira vez por Printz em 1914 como a antiga *Selenastrum capricornutum* e também *Raphidocelis subcapitata* (PRINTZ, 1914), hoje pertencente ao Filo *Chlorophyta*, ao gênero *Pseudokirchneriella* e a classe *Chlorophyceae* (ARUOJA, 2011; ARUOJA et al., 2009; OLIVEIRA, 2007). Entretanto, a sua taxonomia ainda é bastante complexa, pois há vários nomes que são usados em paralelo para sua designação (ARUOJA, 2011).

Segundo Korshikov F. Hindák (1990), a classificação taxonômica mais atual da microalga é a seguinte:

Reino: *Plantae*;

Subreino: *Viridiplantae*;

Filo: *Chlorophyta*;

Subfilo: *Chlorophytina*;

Classe: *Chlorophyceae*;

Ordem: *Sphaeropleales*;

Família: *Selenastraceae*;

Gênero: *Pseudokirchneriella*;

Espécie: *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Esta espécie encontra-se geralmente em águas doces, tanto em ambientes oligotróficos como eutróficos (ARUOJA, 2011; BLAISE, 1998; BLAISE; VASSEUR, 2005).

Com relação à sua morfologia quando dispostas em cultura, as células apresentam-se solitárias, exceto durante a divisão celular, ocorrendo ocasionalmente a formação de grupos unicelulares envelopados por uma delicada mucilagem incolor. As células têm uma forma helicoidal, normalmente semi-circular curva na fase vegetativa. É similar a um formato de meia-lua e apresenta um cloroplasto único, parietal e desprovido de pirenóide, longo e de cor verde brilhante indicando a presença do pigmento clorofila. O diâmetro das células em 154 - 360° de arco varia entre 4,8-10,8 µM, com largura de 1,6-4,4 µM e profundidade/largura 1,7-4,1 (ARUOJA, 2011; BLAISE; VASSEUR, 2005).

O modo de reprodução desta microalga é assexuado através de auto-esporos. A célula mãe se divide em 2, 4 ou 8 auto-esporos (NYGAARD, 1986). Apresenta um ciclo de vida curto, podendo ser facilmente cultivada em laboratório, o que a torna um organismo-teste ideal empregado em bioensaios de toxicidade (CEREJEIRA et al., 2005).

O trabalho de Machado e Soares (2014) aponta as etapas do ciclo de vida das células de *P. Subcapitata*, mostrando em A as três importantes fases: (1) crescimento da célula-mãe; (2) divisão celular e (3) liberação das células-filhas (auto-esporos), e em B as morfologias correspondentes para cada estágio do ciclo através de fotomicrografias de fluorescência com contraste de fase, podendo observar o núcleo celular em cada estágio (Figura 4 A e B).



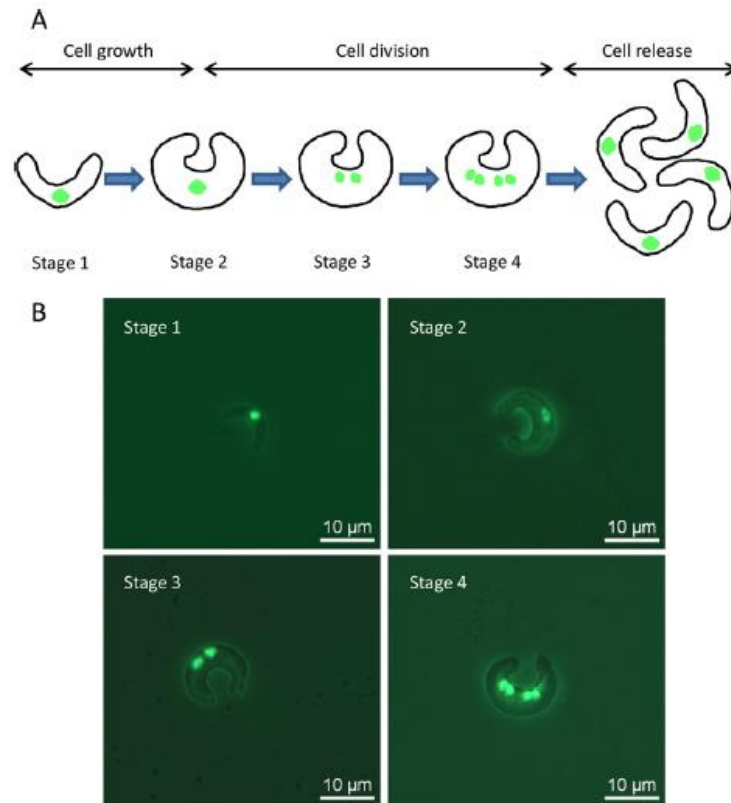


Figura 4 (A e B) - Etapas do ciclo de vida da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. Na imagem 4A pode-se observar os estágios do ciclo de vida e na imagem 4B as micrografias de fluorescência com contraste de fase mostrando as diferentes morfologias para cada estágio de vida (Figura retirada de MACHADO e SOARES (2014)).

A espécie depende de algumas condições ambientais específicas com relação à luz, ao oxigênio, temperatura e disponibilidade de nutrientes. O seu desenvolvimento se torna limitante na ausência de luz e em meios pobres em oxigênio, no entanto é capaz de sobreviver em meios pobres em nutrientes, sendo os principais fatores limitantes de seu crescimento o nitrogênio e o fósforo. A temperatura ideal para o seu florescimento deve ser em torno de 24° C (CEREJEIRA et al., 2005).

Por todas estas razões, Aruoja (2011), Aruoja et al. (2009) e Oliveira (2007) relatam que esta espécie de microalga faz parte dos bioindicadores mais utilizados em testes de toxicidade de água doce (LEWIS et al., 1994), uma vez que é uma das espécies mais representativas da base da cadeia trófica aquática (VIDOTTI; ROLLEMBERG, 2004), além de ser mais sensível que os demais organismos, tais como invertebrados e peixes (KALLQUIST et al., 2008; MOREIRA-SANTOS; SOARES; RIBEIRO, 2004).

Como todas as algas de água doce possuem distribuição cosmopolita em solos e corpos d'água, evidencia-se ainda mais um motivo pelo qual tem sido amplamente

utilizada em estudos de ecotoxicologia de poluentes ambientais, além de serem recomendadas no registro de agentes químicos e pesticidas por órgãos ambientais nacionais e internacionais, tais como a Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (OECD, 2006, 2011b), Agência de Proteção Ambiental (LEWIS et al., 1994; UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 1996), Companhia de Tecnologia de Saneamento Ambiental (CETESB, 2005) e Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA, 2005).

Segundo Machado e Soares (2012), a espécie *P. subcapitata* é recomendada pelos métodos de agências internacionais, tais como U.S. EPA (U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY OFFICE OF WATER, 2002) ou OECD (OECD, 2006, 2011a), além de muitos protocolos nacionais, os quais foram também mencionados anteriormente.

## Capítulo 3 - Objetivos

### 3.1 Objetivo Geral

O presente estudo teve por objetivo geral sintetizar e caracterizar compostos nanoestruturados baseados em hidroxiapatita e óxido de zinco visando aplicação como nanofertilizantes e avaliar o potencial aspecto de sua nanotoxicidade ambiental utilizando como organismo-teste a microalga da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata*.

### 3.2 Objetivos Específicos

Visto os conceitos e trabalhos debatidos anteriormente no Capítulo 1 – Introdução e no Capítulo 2 – Referencial Teórico, este estudo teve os seguintes objetivos específicos:

- Sintetizar os compostos nanoestruturados de Hidroxiapatita ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) (HAP) e de Óxido de Zinco (ZnO) e, determinar as suas propriedades estruturais e características morfológicas;
- Avaliar os efeitos nanotoxicológicos dos nanofertilizantes para o organismo-teste da espécie *Pseudokirchneriella subcapitata*, a partir das curvas de crescimento e demais parâmetros estatísticos, tais como velocidade do crescimento algáceo e duração da fase lag;
- Avaliar as alterações morfológicas das células algáceas expostas as nanoestruturas de HAP e ZnO.

## Capítulo 4 - Materiais e Métodos

### 4.1 Síntese das nanopartículas de HAP e ZnO por Coprecipitação

#### 4.1.1 Síntese das nanopartículas de HAP por Coprecipitação

No Laboratório de Preparação de Amostras, pertencente às dependências do Laboratório Nacional de Nanotecnologia para o Agronegócio (LNNA) da Embrapa Instrumentação, foram definidos 3 tipos de sínteses para a HAP nanoestruturada via método de coprecipitação por via úmida. As sínteses da HAP Coprecipitada foram obtidas através de suspensões baseadas na hidrólise do sal contendo os íons de interesse ( $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{P}^{5+}$ ). Para cada síntese foram solubilizados 3,53 g nitrato de cálcio ( $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) em água deionizada sob constante agitação em balão de 3 bocas, a temperatura ambiente. Paralelamente, solubilizou-se 1,18 g de fosfato de amônio ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ) em água deionizada, cuja solução foi transferida para uma bureta, na qual com gotejamento lento esta solução foi transferida para a solução de nitrato de cálcio.

O pH do meio reacional foi constantemente ajustado para 11 com a adição de hidróxido de amônio, quando necessário. Todo processo de síntese foi realizado sob fluxo de nitrogênio. Nas Figuras 5 A e B, indicação das etapas de síntese da HAP pelo método de coprecipitação, com procedimentos de titulação do  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , agitação magnética da solução de formação do precipitado de HAP, galão de fluxo de  $\text{N}_2$  e o balão de 3 bocas, onde ocorre a síntese.

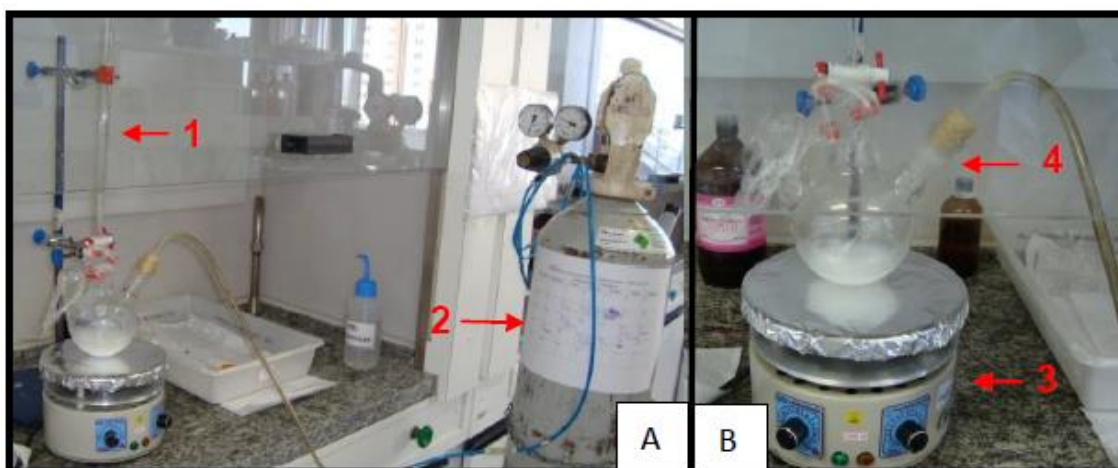


Figura 5 (A e B) - Etapas de síntese da HAP pelo método de Coprecipitação por via úmida. Na Figura A, 1 mostra a bureta para titulação do  $((\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4)$ , e 2 o cilindro de  $\text{N}_2$ . Já em B, 3 mostra o agitador magnético para homogenização do precipitado branco e 4 o balão de três bocas onde está a solução de formação do precipitado.

Ao final de cada síntese obteve-se a formação de um precipitado branco e as suspensões obtidas foram submetidas a centrifugações (centrífuga da marca HANIL, modelo Continent) para lavagem do material com água deionizada, utilizando 10.000 rpm, em 5 ciclos de 10 minutos, a  $\pm 23^\circ\text{C}$  de temperatura até atingir pH 7.

Em seguida, o precipitado de uma das sínteses realizadas foi acondicionado em placa de Petri e seco em estufa a vácuo (marca Nova Ética) a  $40^\circ\text{C}$ . Já os produtos das outras duas sínteses de HAP via método coprecipitação foram tratados pelo método hidrotermal, no período de 2 horas. Neste caso, as amostras não foram submetidas às etapas de centrifugação, lavagem e secagem.

#### 4.1.2 Síntese das nanopartículas de ZnO por Coprecipitação

Para o nanofertilizante de ZnO, foram definidas cinco sínteses a partir da obtenção de nanopartículas de ZnO puro. Pelo método de Coprecipitação foram realizadas cinco sínteses de ZnO puro, nas quais foram solubilizados 5,47g de nitrato de zinco ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ ) e 4g de hidróxido de sódio (NaOH), em água ultrapura deionizada (18,3 M $\Omega$  cm de resistividade, obtida por sistema de purificação Barnstead Thermo e modelo Nanopure Diamond Analytical).

Posteriormente, a solução de NaOH foi misturada à solução de  $(\text{Zn}(\text{NO}_3)_2)$  até formar um precipitado branco, a temperatura ambiente e agitação constante, mantendo o

pH final na faixa entre 12 a 14. O precipitado em formação ficou em agitação por 10 minutos com a finalidade de intensificar o processo de nucleação das partículas (Figura 6 A e B). Em seguida, o precipitado de uma das sínteses foi acondicionado em placa de Petri e seco em estufa a vácuo (marca Nova Ética) a 60°C. Já os produtos das outras quatro sínteses de ZnO via método coprecipitação foram tratados pelo método hidrotermal, sendo as primeiras 2 sínteses sem a adição do dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA) e, as 2 últimas com a adição de 100µL de PMAA, nos períodos de 30 minutos e 2 horas, objetivando definir a cristalinidade e morfologia, além de dispersar as partículas agregadas/aglomeradas.

Ao final de cada síntese, obteve-se a formação de um precipitado branco e as suspensões obtidas foram submetidas a centrifugações (centrífuga da marca HANIL, modelo Continent) para lavagem do material com água deionizada, a 10.000 rpm, em 5 ciclos de 10 minutos, a  $\pm 23^{\circ}\text{C}$  de temperatura até atingir pH 7. A Figura 6 (A e B) mostra o processo de síntese pelo método de coprecipitação do ZnO.



Figura 6 (A e B) - Etapas da síntese de ZnO através do método de Coprecipitação. Em A são mostrados os reagentes hidróxido de sódio e nitrato de zinco e em 6B tem-se a formação do precipitado de ZnO em agitação no recipiente de teflon.

#### **4.2 Tratamento das nanopartículas de HAP e ZnO por Hidrotermalização**

Após a síntese da HAP coprecipitada, as suspensões ficaram em torno de 2 horas em fluxo de nitrogênio para evitar a formação de compostos carbonatados nas amostras.

Duas das suspensões de HAP foram submetidas ao processo de hidrotermalização para o envelhecimento dos precipitados.

Para os dois tratamentos hidrotermais realizados, a temperatura estabelecida foi de 150°C, com pressão máxima atingida de 15 atm e duração de 2 horas.

Cada amostra foi transferida para o frasco de Teflon de 100 mL, no qual foi corrigido o volume e o pH em torno de 11, antes de acoplá-lo no reator hidrotérmico. Este

tem por finalidade minimizar os efeitos de ataque químico, o qual é aquecido externamente por um forno tubular. Para a aferição da temperatura e da pressão no sistema foi utilizada uma sonda interna (termopar), acoplada a um controlador de temperatura, e um manômetro.

Com o intuito de reduzir os aglomerados/agregados, e aumentar o tamanho e a dispersão das nanopartículas de HAP, adicionou-se na última síntese de HAP 100  $\mu$ L do dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA) antes do processo hidrotermal.

O tempo de hidrotermalização foi de 2 horas para ambas as amostras de HAP.

Após o processo hidrotermal, cada produto resultante foi lavado com água deionizada, até o pH da suspensão chegar a 7, utilizando os mesmos parâmetros de centrifugação anteriores. As amostras foram transferidas para placas de Petri e acondicionadas em estufa para secagem à temperatura de 40°C.

Para os quatro tratamentos hidrotérmicos das nanopartículas de ZnO puro, os precipitados brancos obtidos foram transferidos para o copo de Teflon de 100mL e levado ao reator hidrotermal e mantidos a uma temperatura de 150°C por 30 minutos e 2 horas, respectivamente. A variação de pressão ocorrida foi mínima.

Ao final do processo, os materiais foram centrifugados com os mesmos parâmetros utilizados até atingir pH 7. As amostras foram acondicionadas em placas de Petri para secagem em estufa a uma temperatura de 60°C.

A Figura 7 mostra o processo hidrotermal de síntese da HAP e do ZnO, com as peças necessárias para o sistema.



Figura 7 - Tratamento hidrotermal das nanopartículas de HAP e ZnO, sendo (1) Controlador de temperatura e tempo, (2) Agitador magnético para homogeneização da solução, (3) Forno elétrico com resistência elétrica, (4) Manômetro e (5) Válvula de segurança.

Após secagem em estufa, as amostras de HAP e ZnO foram desaglomeradas com auxílio de pistilo e almofariz até a obtenção de um pó extremamente fino. As amostras foram acondicionadas em tubos de eppendorf e devidamente etiquetadas até a realização da caracterização estrutural e morfológica das nanopartículas, e dos bioensaios de nanotoxicidade.

### **4.3 Caracterização estrutural e morfológica das nanopartículas de HAP e ZnO**

#### **4.3.1 Difração de Raios X**

A técnica de difração de raios X (DRX) foi utilizada para a caracterização estrutural dos materiais cristalinos, permitindo a identificação da fase e da estrutura cristalina da amostra, sem a destruição do material.

As amostras de HAP e ZnO foram acondicionadas em lâminas de vidro, com quantidade suficiente para preencher todo o porta-amostra. Com o auxílio de uma lamínula planificou-se a amostra, a qual foi para leitura no equipamento.

Os difratogramas de raios X foram obtidos através do equipamento da marca Shimadzu, modelo XRD 6000. As condições operacionais utilizadas foram ângulo variando de 5° a 80° (2 $\theta$ ) e velocidade de 1°/min.

#### **4.3.2 Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)**

A técnica de espectroscopia na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) é obtida por meio da radiação na região do infravermelho refletida, transmitida ou absorvida pelo material. Para esta pesquisa, a técnica foi utilizada para verificar a presença, ou não, de espécies adsorvidas na superfície da amostra e como ferramenta adicional para a confirmação da obtenção da HAP e do ZnO.

Primeiramente foram preparadas pastilhas de KBr, pesando 0,001g de cada amostra de HAP e ZnO, e 0,1 g do diluente KBr. Misturou-se e triturou-se o pó com auxílio de pistilo e almofariz até homogeneização das amostras, para desta forma inserí-las no porta-amostra. Este foi pressionado a 5 atm no suporte de pressão por 2 minutos para se obter uma conformação ideal das pastilhas.



A leitura das amostras foi realizada no equipamento da marca Perkin Elmer, modelo Spectrum 1000. O software empregado para a obtenção dos espectros foi o Spectrum V 5.3.1. Foram realizadas 32 varreduras entre 4000 e 400  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , e intervalo de 2  $\text{cm}^{-1}$ .

### **4.3.3 Potencial Zeta**

A análise de Potencial Zeta é de extrema importância para as nanopartículas em suspensão, pois estas normalmente possuem carga eletrostática na sua superfície, e podem adsorver íons e surfactantes, modificando o potencial de superfície total, formando uma dupla camada elétrica em torno de cada partícula, cujo potencial da superfície é designado de potencial zeta. Além disso, o potencial pode ser afetado pelo pH ou força iônica do meio e a interação das partículas se dá pela magnitude do potencial, isto é, potenciais em módulo, maiores que  $\pm 30$  mV, indicam estabilidade da dispersão coloidal (MAHMOUDI et al., 2011).

Para as medidas de potencial zeta das suspensões de HAP e ZnO, foi utilizado o equipamento da marca Malvern Instruments, modelo Zetasizer Nano ZS90. O software empregado foi o DTS Nano. As condições para esta análise foram calculadas por meio de medidas de mobilidade eletroforética realizadas no referido equipamento. Para isso, pesaram-se 0,004 g da amostra de cada material que foram dispersas em 25 mL de água Mili-Q. Deixou-se por 1 minuto em ponteira de ultrassom, com amplitude de 30% para uma dispersão mais homogênea.

### **4.3.4 Isotermas de adsorção/dessorção de N<sub>2</sub>**

As análises de adsorção e dessorção de N<sub>2</sub> pelo método (Brunauer, Emmett e Teller) – BET foram realizadas para se obter as medidas da área superficial específica das nanopartículas de HAP e ZnO. O equipamento utilizado para as análises é da marca ASAP modelo 2020, e o software é ASAP 2020V 303.

Durante o processo de análise, cuja duração foi de aproximadamente 3 horas, as amostras passaram por um pré-tratamento durante 12 horas no equipamento em processo Degás, no qual foram removidas todas as impurezas presentes nas mesmas. Os parâmetros utilizados para esta caracterização foram: rampa de aquecimento de 10°C min<sup>-1</sup>,

temperatura de aquecimento final de 80°C, taxa de evacuação de 1,5 mmHg s<sup>-1</sup>, tempo de evacuação de 60 minutos e o vácuo foi de 20 µmHg.

#### **4.3.5 Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG)**

A técnica de microscopia eletrônica é muito utilizada para estudar o tamanho, a forma e distribuição de partículas por meio da obtenção de imagens com alta resolução. Para o presente estudo, as imagens de microscopia da HAP e ZnO foram obtidas através do microscópio da marca JEOL, modelo JSM 6701F.

As amostras de HAP e ZnO foram preparadas por meio da deposição de uma fina camada do material no porta-amostras, o qual foi recoberto com uma camada fina de tinta carbono utilizando um pincel. Após a secagem da tinta, as amostras foram acondicionadas ao microscópio. Após a obtenção das imagens no MEV-FEG foram obtidos os histogramas com os valores do diâmetro médio das nanopartículas de HAP e ZnO, utilizando o programa de imagens Image J, versão 1.5. Para isso foram selecionadas dentre as fotos 100 partículas de cada amostra de HAP e ZnO, para a obtenção da média e do desvio padrão.

### **4.4 Bioensaios de nanotoxicidade**

#### **4.4.1 Bioensaios de nanotoxicidade ambiental**

No laboratório de Amostras Biológicas do EMBRAPA Instrumentação, bioensaios de nanotoxicidade ambiental com a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* foram realizados para as nanopartículas de HAP e ZnO.

Os bioensaios com as nanopartículas de HAP e ZnO foram realizados de acordo com as normas preconizadas pela (OECD, 2011a). A norma consiste em determinar o crescimento exponencial de várias espécies de microalgas, como o de *Pseudokirchneriella subcapitata* quando são expostas à substâncias químicas dentro do período mínimo de 72 horas de teste, avaliando diferentes efeitos tóxicos.

Na primeira parte do trabalho foram realizados os bioensaios com as 3 sínteses das nanopartículas de HAP: HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal 2 horas sem PMAA (dispersante polimetacrilato de amônio) e HAP Hidrotermal 2 horas com PMAA.

Na segunda etapa do estudo nanotoxicológico foram realizados os bioensaios com as 5 sínteses das nanopartículas de ZnO: ZnO Coprecipitado, ZnO Hidrotermal 30 minutos sem PMAA, ZnO Hidrotermal 30 minutos com PMAA, ZnO Hidrotermal 2 horas sem PMAA e ZnO Hidrotermal 2 horas com PMAA.

Visando otimizar o processo de dispersão e solubilização dos pós de ambos os nanofertilizantes, os quais são praticamente insolúveis em meio aquoso e, no meio de cultivo W.C., foram realizados testes de dispersão com as nanopartículas, em banho de ultrassom e ultrassom de ponta para diferentes períodos, porém não foram obtidos resultados satisfatórios, uma vez que ambos os materiais voltaram a se aglomerar e precipitar no fundo dos erlenmeyers minutos após o término de cada processo.

Como as nanopartículas de HAP e ZnO estavam na forma de pós foi necessário fazer sua dispersão no próprio meio de cultivo W.C. das microalgas para todas as concentrações selecionadas. O procedimento de dispersão ocorreu por 3 dias em incubadora refrigerada com agitação da marca Tecnal, modelo TE- 421, a 130 rpm de rotação, a uma temperatura controlada de  $22\pm 1^\circ\text{C}$  e fotoperíodo de 24 horas claro, sendo nas mesmas condições experimentais para os bioensaios.

Após a finalização dos bioensaios para ambas as nanopartículas foram realizadas as análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV) simultaneamente com o espectrômetro de energia dispersiva de raio X (EDS) para a constatação de eventuais alterações morfológicas celulares e a verificação dos elementos químicos constituintes das amostras dos recipientes-teste, semi-quantificando os principais elementos representativos das nanopartículas de HAP e ZnO, respectivamente.

#### **4.4.2 Meio de cultivo e Manutenção das culturas de *Pseudokirchneriella subcapitata***

As culturas de *P. subcapitata* foram iniciadas a partir de inóculos de uma cepa do Laboratório de Amostras Biológicas da Embrapa Instrumentação. Originalmente, as microalgas foram obtidas do banco de culturas disponível da UFSCar, CCMA-UFSCar 048, originado da NIVA (Noruega).

A alga obtida foi mantida em meio de cultura previamente autoclavado a  $120^\circ\text{C}$  por 15 minutos, preparada de acordo com as recomendações de Guidelines for the testing of chemicals, test n° 201: Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test

(GUILLARD; LORENZEN, 1972; OECD, 2011a). O meio de cultivo W.C. utilizado na manutenção dos inóculos e para os recipientes-teste foi escolhido dentre os recomendados pela norma, o qual apresenta composições de micro e macronutrientes fundamentais para o desenvolvimento desta microalga de água doce. O inóculo da microalga foi preparado para se obter uma concentração final de  $5 \times 10^4$  células/mL para pipetagem nos recipientes-teste e recipientes-controle no primeiro dia de bioensaio (0 horas).

A Tabela 1 apresenta os componentes das soluções-estoque para o preparo do meio de cultivo W.C.

Tabela 1 - Composição e concentrações das soluções-estoque para o preparo do meio de cultivo W.C.

Componentes	Estoque (g/L)	Meio W.C. (ml/L)
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	36.76	1.00
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	36.97	1.00
NaHCO <sub>3</sub>	12.60	1.00
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8.71	1.00
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>	28.42	1.00
NaNO <sub>3</sub>	85.01	1.00
Na EDTA	4.36	1.00
FeCl <sub>3</sub> ·6H <sub>2</sub> O	3.15	1.00
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.01	1.00
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.022	1.00
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.01	1.00
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	0.18	1.00
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.006	1.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.00	1.00
Tiamina B1	0.10	1.00
Biotina B8	0.0005	1.00
B12 Cianocobalamina	0.0005	1.00

#### 4.4.3 Bioensaios de nanotoxicidade com *P. subcapitata*

Visando otimizar o processo da dispersão das nanopartículas de HAP e ZnO, de modo a aumentar a solubilização e dispersão entre as partículas antes de cada bioensaio, os recipientes-teste com 100 mL do meio W.C. e suas respectivas concentrações selecionadas foram acondicionados em incubadora de cultivo refrigerada a 130 rpm de rotação por 3 dias nas mesmas condições do bioensaio (Figura 8).

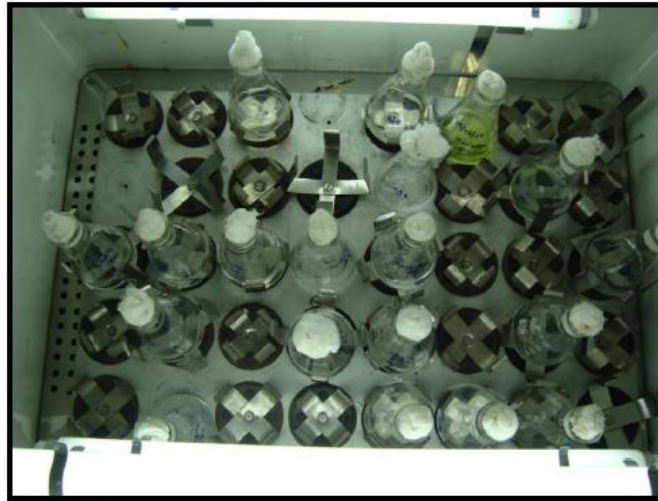


Figura 8 - Recipientes-teste com Meio de Cultivo W.C. e nanopartículas de HAP e ZnO Coprecipitados em agitação a 130 rpm na incubadora refrigerada de cultivo pelo período de 3 dias para o aumento da dispersão e homogenização das nanopartículas.

#### **4.4.3.1 Estabilidade de carga superficial das nanopartículas de HAP e ZnO no meio de cultivo W.C.**

Análises de potencial zeta foram realizadas para avaliar a estabilidade de carga da superfície das nanopartículas de HAP e ZnO dispostas no meio de cultivo W.C das algas para todos os tratamentos de cada bioensaio.

O equipamento utilizado foi da marca Malvern Instruments, modelo Zetasizer Nano ZS90. O software empregado foi o DTS Nano.

Utilizaram-se baixas concentrações (10 mg L<sup>-1</sup>, 25 mg L<sup>-1</sup>, 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup>) e altas concentrações (50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup>, 250 mg L<sup>-1</sup>, 500 mg L<sup>-1</sup>, 750 mg L<sup>-1</sup>) para as nanopartículas de HAP e, somente as baixas concentrações para as nanopartículas de ZnO.

Cada tratamento foi disperso em 100 mL do meio de cultivo W.C por 1 minuto em ultrassom de ponta, com uma amplitude de 30% para uma dispersão mais homogênea.

#### **4.4.3.2 Montagem dos Bioensaios de Nanotoxicidade**

A montagem dos bioensaios com as nanopartículas de HAP e ZnO foi realizada atendendo as reivindicações da norma preconizada, com eventuais ajustes, tais como

tempo de exposição da microalga ao nanofertilizante, número de réplicas para os controles e de números de concentrações utilizadas.

Para ambos os nanofertilizantes, os bioensaios foram realizados em frascos de erlenmeyers de vidro devidamente autoclavados, sendo organizados em triplicatas para 5 concentrações selecionadas (tratamentos), mais 3 recipientes-teste para os controles e 3 recipientes-teste para os controles-positivo (dispersante PMAA) a fim de evitar o falseamento dos resultados de toxicidade do material de interesse.

Os bioensaios com as nanopartículas de HAP com e sem a adição de 100 µL do dispersante PMAA tiveram duração de 72 e 96 horas, sendo inicialmente utilizados tratamentos de baixas concentrações de 10 mg L<sup>-1</sup>, 25 mg L<sup>-1</sup>, 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup> no período de 96 horas e posteriormente tratamentos em altas concentrações, sendo 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup>, 250 mg L<sup>-1</sup>, 500 mg L<sup>-1</sup> e 750 mg L<sup>-1</sup> pelo período de 72 horas.

Para os bioensaios com as diferentes nanopartículas de ZnO foram empregadas somente as baixas concentrações (10 mg L<sup>-1</sup>, 25 mg L<sup>-1</sup>, 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup>), no período de 96 horas.

Os bioensaios de nanotoxicidade foram processados em condições de iluminação contínua com fotoperíodo de 24 horas claro, agitação de 130 rpm em incubadora refrigerada com agitação da marca Tecnal brand, modelo TE-421 e temperatura controlada de 22±1°C.

#### **4.4.3.3 Análise morfológica das células algais**

Finalizados os bioensaios de nanotoxicidade com as nanopartículas de HAP e ZnO foram realizadas as análises morfológicas para verificar eventuais alterações celulares da microalga *P. subcapitata*.

Inicialmente foram preparadas as amostras com os tratamentos selecionados e seus respectivos controles para posterior visualização e aquisição das imagens em microscópio eletrônico de varredura (MEV) da marca JEOL (modelo JSM 6510) acoplado a um espectrômetro de energia dispersiva de raio X (EDS) (modelo Thermo Scientific UltraDry), para também verificar os elementos químicos constituintes de ambas as nanopartículas, respectivamente.

Para o tratamento de 500 mg L<sup>-1</sup> referente ao bioensaio com a HAP Hidrotermal com PMAA não foi possível avaliar os resultados das imagens de MEV devido a problemas nos procedimentos experimentais.

#### **4.4.3.3.1 Procedimentos para as análises no MEV e EDS das microalgas**

Após a reprodução dos bioensaios de nanotoxicidade com as diferentes sínteses de HAP e de ZnO foram selecionadas as concentrações para o procedimento de fixação das amostras até a realização das análises morfológicas das microalgas.

Inicialmente, lâminas de vidro de microscópio óptico foram cortadas de modo a encaixar sobre a área do porta-amostra para a fixação das amostras. Os substratos foram lavados com solução de acetona pura e depois secos. Posteriormente, foi adicionada 1 gota de Poli-L-lisina na superfície dos substratos visando aumentar a adesão da amostra através de receptores químicas do composto com os receptores químicos celulares.

Os recipientes-teste de cada tratamento foram homogeneizados e na sequência foi adicionado com pipeta de vidro 1 gota de cada suspensão nas lâminas preparadas. Após 1 hora, as lâminas foram imersas na solução fixadora Karnovsky dentro de microtubos de 2 mL cada.

Em seguida, o fixador de todos os microtubos foi removido para o processo de lavagem e retirada de água das células fixadas nas lâminas, de modo a não desintegrar a estrutura celular original das microalgas.

As plaquinhas de vidro foram então lavadas com água ultrapura e em seguida iniciou-se a bateria de lavagem com acetona 30%, 50%, 70%, 90% por 10 minutos cada e acetona 100% 3 vezes por 10 minutos.

A boca de cada microtubo foi vedada com papel filtro contendo pequenos furos para evitar vácuo, e acondicionada em béqueres dentro do congelador a -25°C. Em seguida, as amostras foram liofilizadas por 4 horas.

No laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura do Embrapa Instrumentação foram montados os porta-amostras para cada amostra com seus respectivos tratamentos e controles, todos devidamente identificados.

Após colar a fita carbono dupla-face sobre o porta-amostra, fixou-se o substrato de vidro contendo cada amostra, para posterior recobrimento com ouro a fim de uma visualização adequada das imagens. Para a análise da morfologia celular no MEV, as

plaquinhas com a gota de suspensão seca foram revestidas com ouro utilizando um pulverizador de ouro (marca Leica, modelo SCDO50) colocadas sobre os porta-amostras utilizando fita de carbono.

Os porta-amostras preparados ficaram acondicionados em dessecador para remoção da umidade até o dia da análise.

Para análise de EDS foram selecionados os mesmos tratamentos escolhidos para a análise no MEV. Os recipientes-testes foram homogeneizados e foi pipetado 1 mL de cada tratamento das diferentes sínteses de HAP e ZnO em eppendorffs de 2 mL, adicionando 1 gotinha da solução fixadora Karnowsky para preservação das amostras em geladeira até a montagem dos porta-amostras.

No laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura foi realizado o procedimento de montagem dos porta-amostras com as amostras de HAP e ZnO selecionadas. Primeiramente foi colado fita carbono dupla-face em cada porta-amostra, de modo a fixar na superfície superior do mesmo uma gota da amostra de HAP com as microalgas até a secagem total. Os porta-amostras devidamente identificados foram acondicionados em dessecador para completa secagem das amostras até o dia da análise.

Para a análise semiquantitativa de EDS as suspensões secas das amostras em fita carbono foram revestidas com carbono utilizando um pulverizador de carbono (marca Leica, modelo SCDO50). Os resultados de EDS foram apresentados na forma de mapeamento dos elementos químicos de interesse, destacando o Ca, P e O para o nanofertilizante de HAP e, Zn e O para o nanofertilizante de ZnO.

#### **4.4.3.4 Análise dos dados experimentais**

Para o tratamento dos dados obtidos, alíquotas de cada tratamento foram coletadas para a contagem celular das microalgas, usando a câmara de Neubauer, utilizando a objetiva de 40× em microscópio óptico da marca New Optical Systems, modelo New 107, com o auxílio do contador de células manual.

As curvas de crescimento algáceo foram ajustadas de acordo com a função sigmóide descrita por Baranyi e Roberts (1994), usando o software DMFit (Excel add-in) versão 3.5. Os parâmetros r1, r2 e r3 representam as triplicatas para cada tratamento dos nanofertilizantes de HAP e ZnO.



De acordo com Johari (2014), este modelo tem sido amplamente empregado com bastante sucesso para modelar o crescimento de diferentes espécies de algas (MOHAMED et al., 2014; TEVATIA; DEMIREL; BLUM, 2012). A fórmula do modelo é a seguinte:

$$y(t) = A + \mu_{max}t + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-\mu_{max}t} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{max}t-h_0}) - \ln \left( 1 + \frac{e^{\mu_{max}t} + \frac{1}{\mu_{max}} \ln(e^{-\mu_{max}t} + e^{-h_0} - e^{-\mu_{max}t-h_0})}{e^{(y_{max}-A)}} \right)$$

onde  $A$  é a concentração inicial de células  $\mu_{max}$  é a velocidade de crescimento específico máximo;  $h_0$  é o tempo da fase lag,  $y_{max}$  é a concentração de células assintóticas;  $t$  é o tempo.

Para ajudar a entender o comportamento da velocidade de inibição do crescimento algáceo e o comportamento da duração da fase lag com a função da concentração das nanopartículas de HAP e ZnO, análises de regressão linear foram realizadas para calcular os intervalos de confiança e o teste t-student para os parâmetros estimados.

Os valores de IC50% (FRANKLIN et al., 2007; LEI et al., 2016), os quais são as concentrações inibitórias das nanopartículas de HAP e ZnO que causam 50% de inibição do crescimento algáceo, foram calculados através da velocidade de inibição do crescimento algáceo em função das diferentes concentrações ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para o nanofertilizante de HAP. Não foi possível obter os resultados de IC50% para os nanofertilizantes de ZnO sintetizados.

O teste de comparações múltiplas não-paramétricas de Kruskal-Wallis foi utilizado para comparar as distribuições do diâmetro das partículas para ambos os materiais. O nível de significância foi considerado de 5%. O software utilizado para estas análises foi a versão R 3.3.0.

## Capítulo 5 - Nanofertilizante de HAP - Resultados e Discussões

Parte dos resultados do estudo com o nanofertilizante de HAP foram publicados na revista *Ecotoxicology and Environment Safety* – ELSEVIER (Fator de Impacto = 3,743 e classificado como qualis A). A autorização de uso das figuras deste capítulo se encontra no anexo da tese.

PEREIRA, F. F. et al. Investigation of nanotoxicological effects of nanostructured hydroxyapatite to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 138–147, 2017. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.06.008.

### 5.1 Caracterização morfológica e estrutural das nanopartículas de HAP

#### 5.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG)

Na Figura 9 (A, C e E) são mostradas as imagens de microscopia eletrônica obtidas das nanopartículas de HAP Coprecipitada (9 A), HAP Hidrotermal 2 horas (9 C) HAP Hidrotermal 2 horas com PMAA (9 E) por via úmida, as quais evidenciam grande formação de aglomerados/agregados de nanopartículas com morfologia de nanobastões. A Figura 9 (B, D e F) mostra os histogramas de distribuição do diâmetro das partículas, respectivamente.

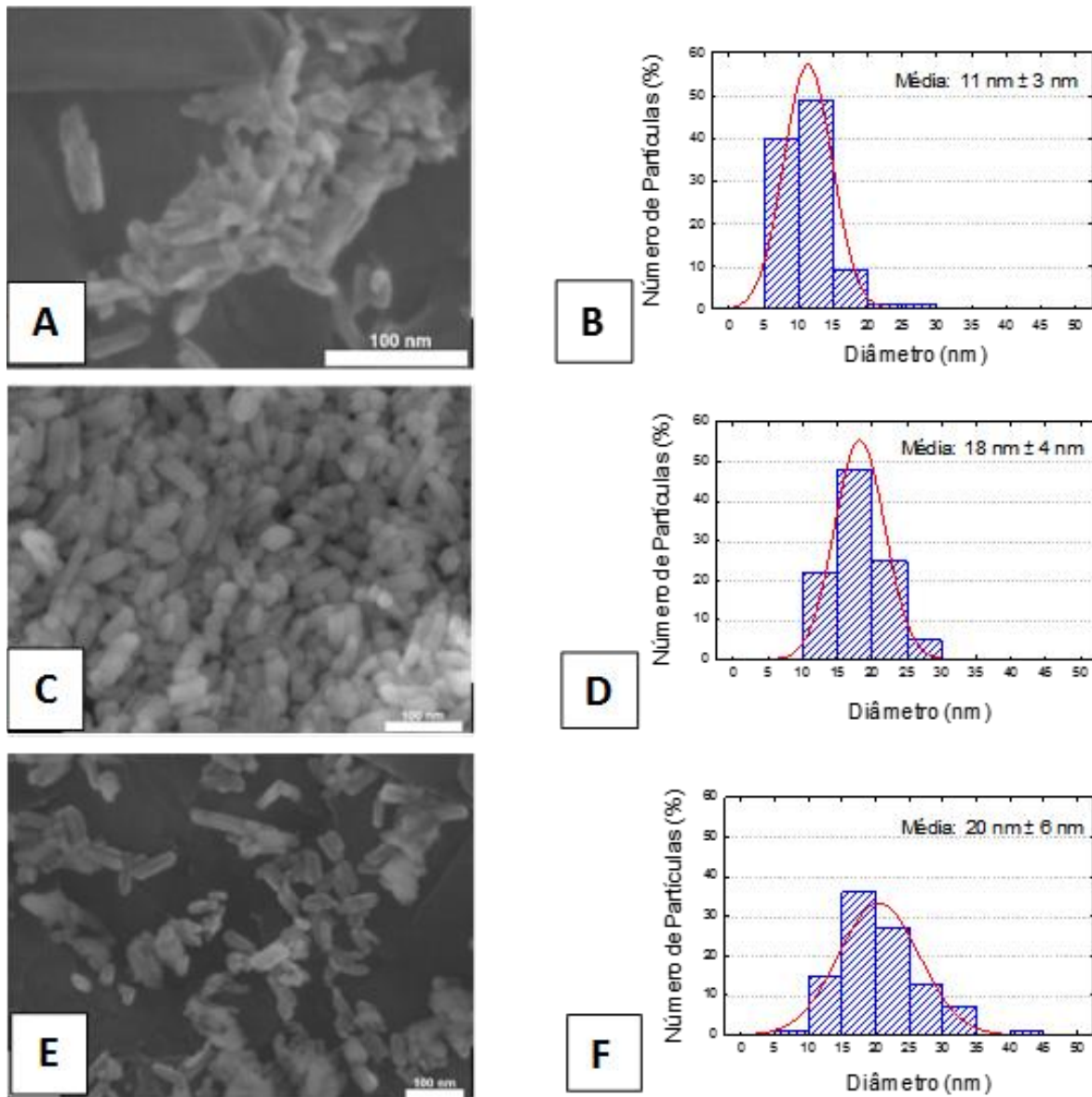


Figura 9 - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das nanopartículas de HAP obtidas por: Coprecipitação (A), método hidrotérmal 2 horas sem o dispersante PMAA (C) e método hidrotérmal 2 horas com PMAA (E). Os respectivos histogramas do diâmetro das partículas estão apresentados em B, D e F, respectivamente (Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017)).

Costa et al. (2009) e Maciel et al. (2003) relatam que o tipo de material, na forma de pó e o método de síntese adotado são características determinantes para maior ou menor aglomeração das partículas. No caso do presente trabalho, as amostras foram obtidas em meio aquoso sem a adição de dispersantes, onde ocorrem interações entre as partículas. Observa-se que as nanopartículas de HAP Coprecipitada (Figura 9 A) apresentaram-se altamente agregadas/aglomeradas e menos cristalinas.

Para as nanopartículas de HAP hidrotermal sem o dispersante PMAA (Figura 9 C) foi possível observar a formação de bastonetes nanoestruturados bem definidos, com diâmetros que variaram de 10 a 30 nm, sendo que a maior parte da população de nanopartículas (em torno de 50%) encontra-se em uma faixa de diâmetro médio entre 15 a 20 nm. Houve uma redução mínima dos aglomerados/agregados de bastonetes nanoestruturados em relação aos mostrados na Figura 9 A.

De acordo com o histograma obtido (Figura 9 D) observou-se que a distribuição de tamanho é relativamente homogênea. Além disso, as etapas de ressolubilização/recristalização ocorreram de forma homogênea, durante a hidrotermalização.

As nanopartículas de HAP Hidrotermal com o dispersante PMAA (Figura 9 E), apresentaram maior dispersão das nanopartículas quando comparadas às nanopartículas sem o tensoativo. Observou-se bastonetes nanoestruturados com diâmetro médio variando entre 5 a 45 nm, sendo quase 40% das partículas com diâmetro médio entre 15 a 20 nm (Figura 9 F). O histograma ainda indicou uma faixa mais estreita do tamanho e redução significativa da presença de partículas aglomeradas/agregadas, além da morfologia, a qual mostrou-se melhor definida. Desta forma, observa-se um discreto aumento das nanopartículas de HAP na presença do PMAA, com um valor do diâmetro médio igual a  $20 \pm 6$  nm.

Trabalhos encontrados na literatura (SANTOS, 2013), a respeito da morfologia e formação cristalina das nanopartículas de HAP, corroboram com o presente estudo onde a faixa obtida do diâmetro médio de aglomerados de bastonetes de HAP após o tratamento hidrotermal foi de 12 a 26 nm. (LIU et al., 2003) obtiveram valores de diâmetro médio entre 8 a 20 nm, com o tratamento hidrotérmico operado a temperatura de 140°C no período de 24 horas. André et al., 2012 e Salarian et al., 2009 observaram que o diâmetro das nanopartículas de HAP aumentou com o aumento do período de tratamento hidrotermal. Salarian et al. (2009) ainda destacam que com a aplicação de surfactantes, tais como brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e polietilenoglicol 400 (PEG 400) como surfactante catiônico e co-surfactante não-iônico, respectivamente, ocasionaram um aumento no tamanho das nanopartículas de HAP em condições hidrotérmicas.

### 5.1.2 Difractometria de Raios-X

A Figura 10 apresenta os difratogramas de Raio- X das nanopartículas de HAP Coprecipitada e HAP Hidrotermal sem e com o dispersante PMAA, as quais evidenciam a formação HAP monofásica com estrutura hexagonal de acordo com a ficha JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) n° 09-432.

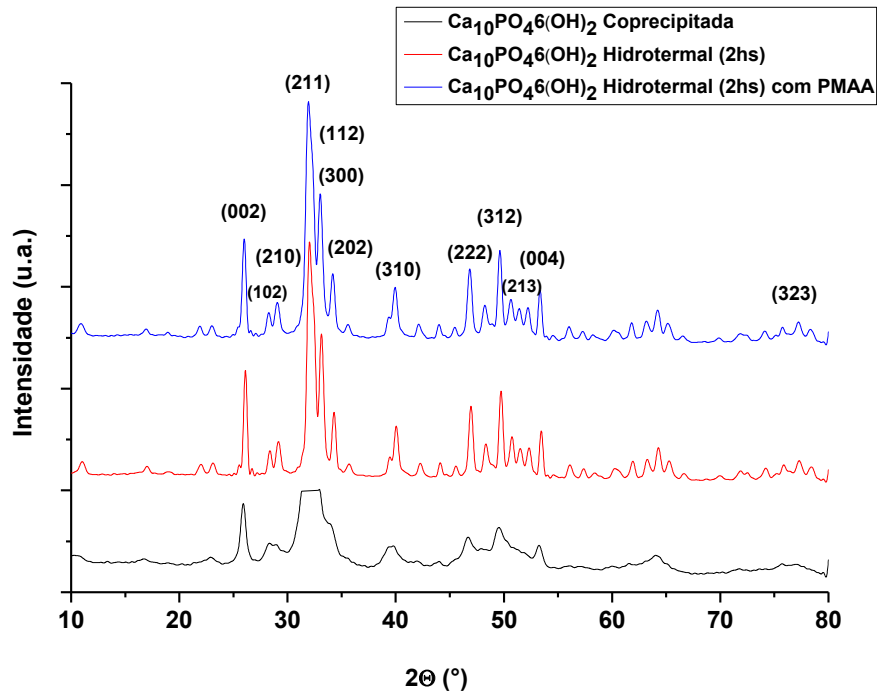


Figura 10 - Difratomogramas de raios -X das nanopartículas de HAP obtidas por Coprecipitação, Hidrotermalização por 2 horas e Hidrotermalização por 2 horas com dispersante PMAA. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).

Para as nanopartículas de HAP hidrotermal sem e com o dispersante PMAA observou-se uma melhor definição dos picos difratados, resultantes do processo hidrotérmico que favoreceu a cristalização da HAP, quando comparadas com a amostra sem hidrotermalização. Este fato pode ser confirmado, principalmente visualizando os picos (211) e (300). Em nenhuma das situações analisadas foram observadas fases secundárias.

Resultados semelhantes foram obtidos nos trabalhos de Mobasherpour et al., 2007, Sanosh et al., 2009 e Santos, 2013, indicando maior cristalinidade nas amostras tratadas termicamente.

### 5.1.3 Método de Brunner-Emmet-Teller (BET) e Potencial Zeta

A Tabela 2 apresenta os valores obtidos de diâmetro médio (nm), potencial Zeta (mV) e da área superficial específica ( $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ ) das nanopartículas de HAP.

Tabela 2 - Valores do diâmetro médio das partículas (nm), potencial Zeta (mV) e da área superficial ( $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ ) obtidos para as nanopartículas de HAP coprecipitada, HAP hidrotermal (2 horas) e HAP hidrotermal (2 horas) com o dispersante PMAA.

	DM (nm)	AS ( $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ )	Potencial Zeta (mV)
HAP Coprecipitada	11±3	118	-28
HAP Hidrotermal sem PMAA	18±4	55	-21
HAP Hidrotermal com 100 $\mu\text{L}$ PMAA	20±6	79	-26

De acordo com o método BET a área superficial foi significativamente maior para as nanopartículas de HAP coprecipitada quando comparada aos valores obtidos para as nanopartículas de HAP hidrotermalizadas, uma vez que as nanopartículas coprecipitadas apresentaram menor diâmetro médio e portanto, maior valor de área superficial específica.

Todas as amostras de HAP dispersas em água ultrapura apresentaram valores de potencial zeta menores, em módulo, que 30 mV, os quais revelaram uma estabilidade intermediária com processo de aglomeração seguida de precipitação (Motskin et al. (2009)). Da mesma forma, Oliveira, Paris e Ribeiro (2013) e Kong, Ma e Boey (2002) notaram que para as amostras de HAP tratadas termicamente apresentaram uma diminuição nos valores de área superficial e um sutil crescimento do diâmetro das partículas, quando comparadas aos nanobastonetes de HAP Coprecipitada deste trabalho.

### 5.1.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para confirmar a formação de fase das nanopartículas de HAP e do ZnO, realizou-se a análise espectroscópica pela técnica de FTIR das nanopartículas sintetizadas.

A Figura 11 apresenta os espectros obtidos para as nanopartículas de HAP submetidas, ou não, ao processo de hidrotermalização a 150°C por 2 horas, com e sem o dispersante PMAA.

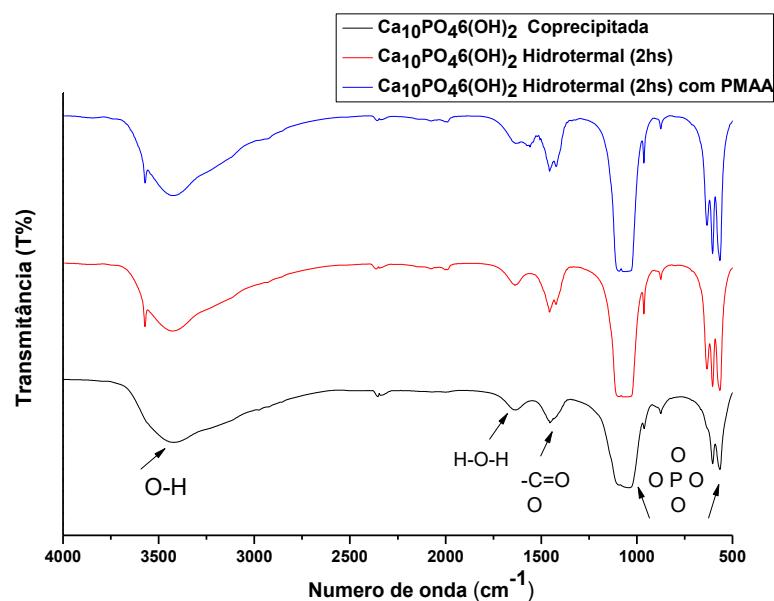


Figura 11 - Espectros na região do infravermelho (FTIR) das nanopartículas de HAP coprecipitada e HAP hidrotermal (2 horas) sem e com o dispersante PMAA. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).

De acordo com a literatura, os espectros obtidos mostraram que as bandas características correspondentes estão devidamente presentes nos espectros da Figura 11.

Não houve diferença significativa entre os espectros da HAP, principalmente com relação ao espectro da HAP Hidrotermal com o dispersante PMAA. Este fato indica que na fase de lavagem e centrifugação do material houve remoção do composto tensoativo aderido na superfície das nanopartículas, como desejado.

Pode-se identificar que as bandas em  $469\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_2$ , vibração angular simétrica), na região entre  $660$  e  $520\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ , vibração angular assimétrica), em  $964\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_1$ , vibração axial simétrica) e na região entre  $1100$  e  $1022\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ , vibração axial assimétrica) são características do grupo  $(\text{PO}_4)^{3-}$  presente na HAP e foram observadas em todos os espectros.

A banda em  $469\text{ cm}^{-1}$  e a presença de três “ombros” na vibração  $\nu_4$  é um indicativo da formação de HAP pura (REHMAN; BONFIELD, 1997).

Pode-se confirmar a presença dos íons hidroxila na rede cristalina da apatita através da presença da banda em  $3571\text{ cm}^{-1}$  que é característica da vibração de estiramento simétrico do grupo OH ( $\nu_L$ , modo de oscilação) (MOBASHERPOUR et al., 2007).

Slósarczyk, Paszkiewicz e Paluszkiwicz (2005) indicam que as bandas largas são correspondentes aos modos de estiramento do grupo OH das moléculas de água ( $\nu_1$  e  $\nu_3$ ),

na região compreendida entre 3500 - 3000  $\text{cm}^{-1}$ . Já, a banda em torno de 1728  $\text{cm}^{-1}$  é correspondente ao modo de deformação das moléculas de água ( $\nu_2$ ).

Para as nanopartículas de HAP hidrotermal, observou-se que a banda em 1340  $\text{cm}^{-1}$ , apresentou-se mais definida, a qual é característica da vibração axial simétrica ( $\nu_3$ ) do grupo  $(\text{CO}_3)^{2-}$ , assim como relatado por Slószarczyk, Paszkiewicz e Paluszkiewicz (2005). Essa banda indica a possibilidade do grupo  $(\text{CO}_3)^{2-}$  estar adsorvido na superfície das partículas ou atuar como substituinte do grupo de  $(\text{PO}_4)^{3-}$  na rede da HAP.

Liu et al. (2003) explicam que a presença desta banda pode estar relacionada com a adsorção de dióxido de carbono atmosférico ao longo do processo de síntese, além de ter a capacidade de substituir outros grupos como o  $(\text{PO}_4)^{3-}$ .

Em geral, todas as bandas características da HAP coprecipitada e hidrotermais estão de acordo com a literatura (MONTAZERI; JAHANDIDEH; BIAZAR, 2011; OLIVEIRA et al., 2010; REHMAN; BONFIELD, 1997; RIGO; GEHRKE; CARBONARI, 2007).

## **5.2 Bioensaios de nanotoxicidade para as nanopartículas de HAP**

Estudos com baixas concentrações de HAP foram realizados, não evidenciando efeito tóxico significativo para as microalgas. O Apêndice A apresenta as curvas de crescimento algáceo em função do tempo, em horas, o Apêndice B, os gráficos das variáveis dependentes, velocidade do crescimento e duração da fase lag, e o Apêndice C as tabelas referentes aos parâmetros estimados com os valores do teste t-student. Os valores de IC50% não foram calculados, pois não houve inibição no crescimento da microalga *P. subcapitata*.

### **5.2.1 Curvas de Crescimento**

As curvas de crescimento da microalga *P. subcapitata* foram plotadas usando o modelo proposto por Baranyi e Roberts (1994), o qual também é usado para representar o crescimento bacteriano (GARCIA et al., 2009).

O software DMFit foi a ferramenta implementada para este modelo e usada para gerar os ajustes das curvas de crescimento algáceo. Van Impe et al. (2005) listou várias vantagens deste modelo, tais como: facilidade de uso, pode ser aplicado na ocorrência de



mudanças dinâmicas no ambiente; bons ajustes nas curvas e a maioria dos parâmetros são biologicamente interpretáveis.

As Figuras 12, 13 e 14 mostram os ajustes das curvas de crescimento algáceo, em triplicatas, da microalga *P. subcapitata*, em função do tempo, em horas, para as nanopartículas de HAP coprecipitada, HAP hidrotermal (2 horas) e HAP hidrotermal (2 horas) com o dispersante PMAA, comparando com as amostras controles, respectivamente. Para estes bioensaios foram utilizadas concentrações maiores ( $50 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $100 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $250 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $500 \text{ mg L}^{-1}$  e  $750 \text{ mg L}^{-1}$ ) de nanopartículas de HAP.

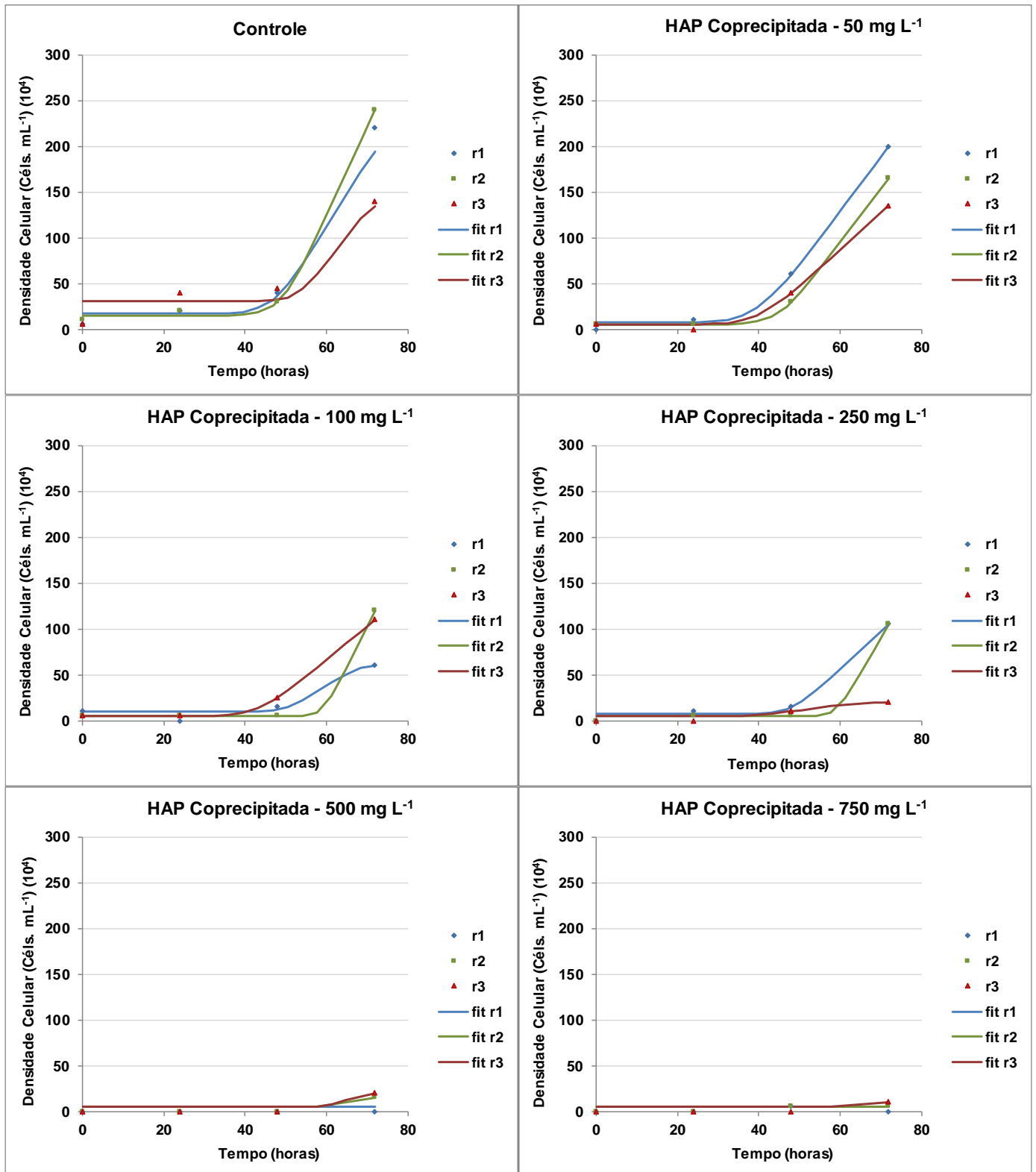


Figura 12 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao nanofertilizante de HAP Coprecipitada, para as distintas concentrações e para o respectivo controle. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).

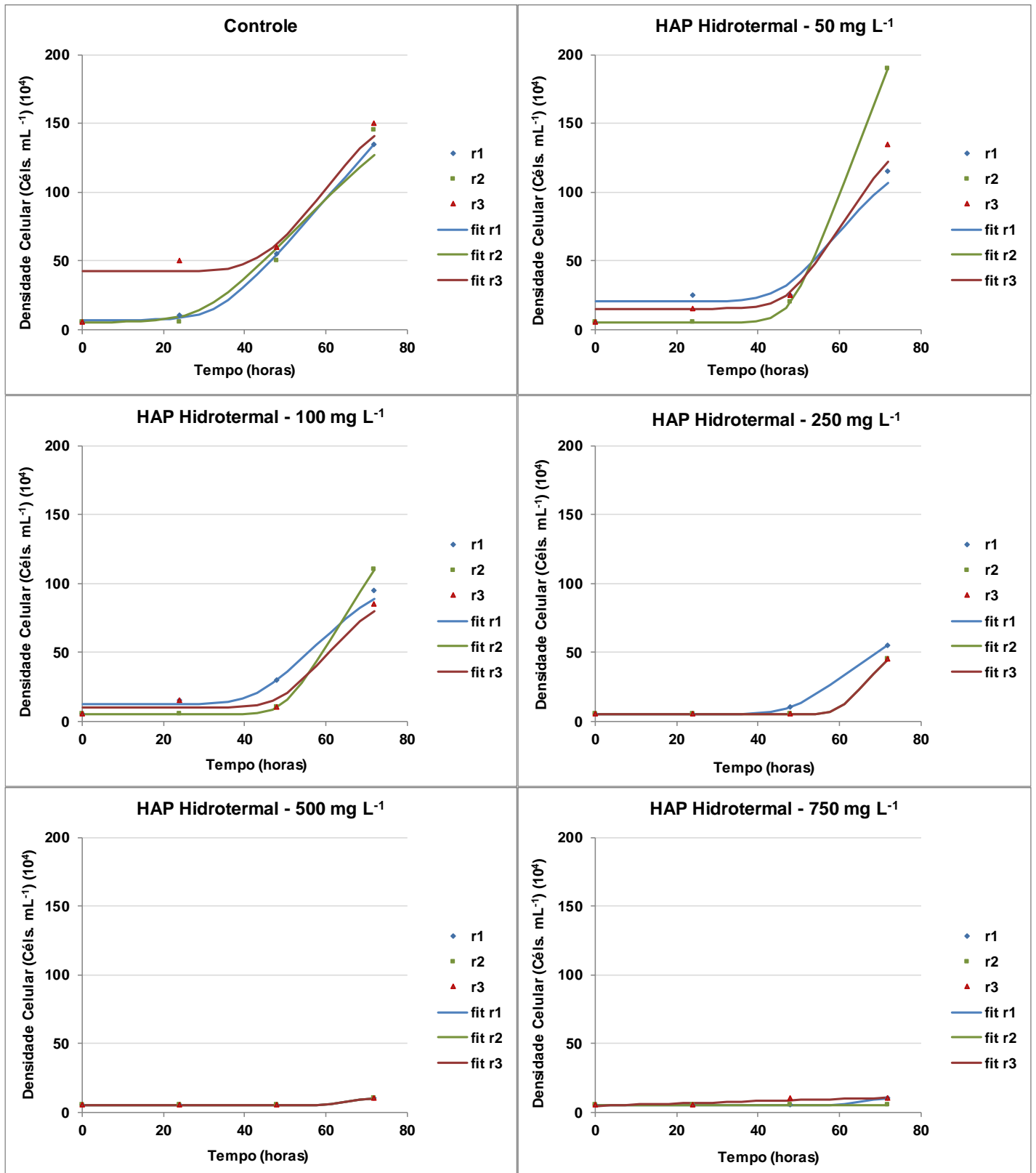


Figura 13 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao nanofertilizante de HAP Hidrotermal (2 horas), para as distintas concentrações e para o respectivo controle. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).

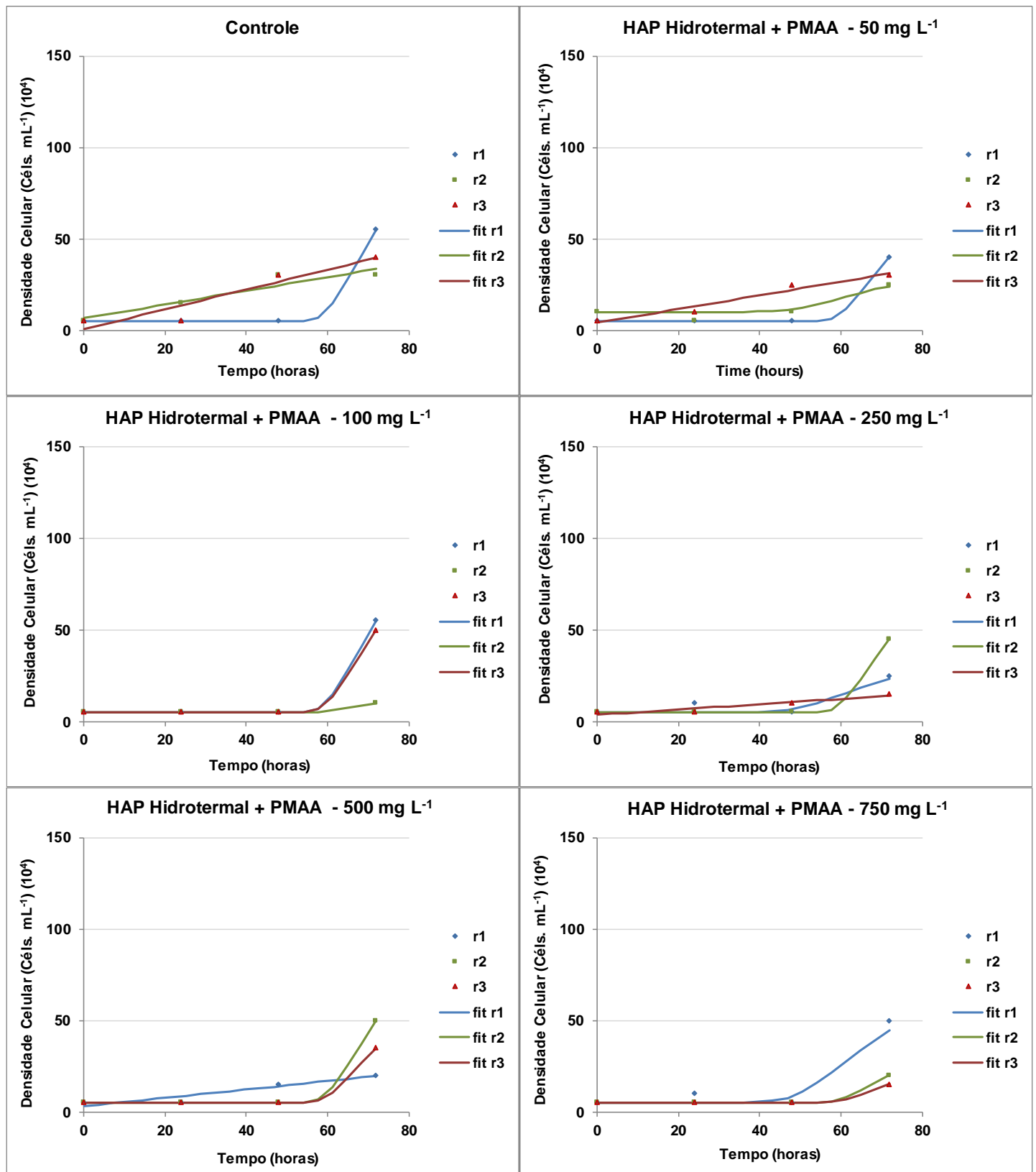


Figura 14 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao nanofertilizante de HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA, para as distintas concentrações e para o respectivo controle. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).

Em geral, as curvas de crescimento da *P. subcapitata* expostas às nanopartículas de HAP (Figuras 12, 13 e 14) mostraram os melhores ajustes nos tratamentos de 50 mg L<sup>-1</sup> a 250 mg L<sup>-1</sup>, com valores de R<sup>2</sup> acima de 0,9 para as triplicatas.

Não foi observado crescimento algáceo para a réplica r1 na concentração de 500 mg L<sup>-1</sup> e para as réplicas r1 and r2 da concentração 750 mg L<sup>-1</sup> indicando um possível efeito tóxico para a microalga.

Algumas similaridades nas curvas de crescimento das nanopartículas de HAP Coprecipitada (Figura 12) e Hidrotermal (Figura 13) podem ser observadas, exceto para a curva da réplica r2 em 750 mg L<sup>-1</sup> de concentração, a qual não houve crescimento algáceo, nem valor de R<sup>2</sup>. Provavelmente, este tratamento causou algum efeito tóxico para a microalga, decrescendo a densidade celular.

De acordo com a Figura 14, as curvas de crescimento algáceo para as nanopartículas de HAP Hidrotermal com PMAA apresentaram um comportamento similar aos controles, com valores elevados de R<sup>2</sup> (0,8). Este fato mostra que o crescimento algáceo nas nanopartículas de HAP Hidrotermal com PMAA foi maior quando comparado ao crescimento nas nanopartículas de HAP Coprecipitada (Figura 12) e HAP Hidrotermal sem o PMAA (Figura 13).

A Figura D.2 apresenta as curvas de crescimento de *P. subcapitata* quando exposta ao dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA) e seu respectivo controle (meio de cultura W.C.) para os bioensaios de HAP em elevadas concentrações. Embora o controle-positivo, dispersante PMAA, apresentou toxicidade extremamente alta para a *P. subcapitata*, não houve interferência para os resultados de nanotoxicidade das nanopartículas de HAP, não falseando os efeitos de toxicidade, uma vez que o dispersante foi totalmente removido da superfície das nanopartículas de HAP Hidrotermal com PMAA, após o processo de lavagem das mesmas. Estes resultados corroboram com as análises de FTIR realizadas.

De um modo geral, as baixas concentrações utilizadas dos 3 tipos de nanopartículas de HAP apresentaram resultados similares aos respectivos controles, principalmente para a HAP Hidrotermal com PMAA. Porém, para as altas concentrações de HAP houve uma tendência à inibição do crescimento algáceo, exceto para as nanopartículas de HAP Hidrotermal com PMAA. Além disso, os aspectos de toxicidade mencionados acima ressaltam que as nanopartículas de HAP não causaram o processo de eutrofização no intervalo de concentração empregado nos experimentos realizados.

## 5.2.2 Análises dos parâmetros das curvas de crescimento

A Figura 15 apresenta a velocidade do crescimento algáceo ( $\text{céls.mL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) da *P. subcapitata* em função da concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para as diferentes amostras de HAP e a duração da fase lag (hours) para cada bioensaio, respectivamente.

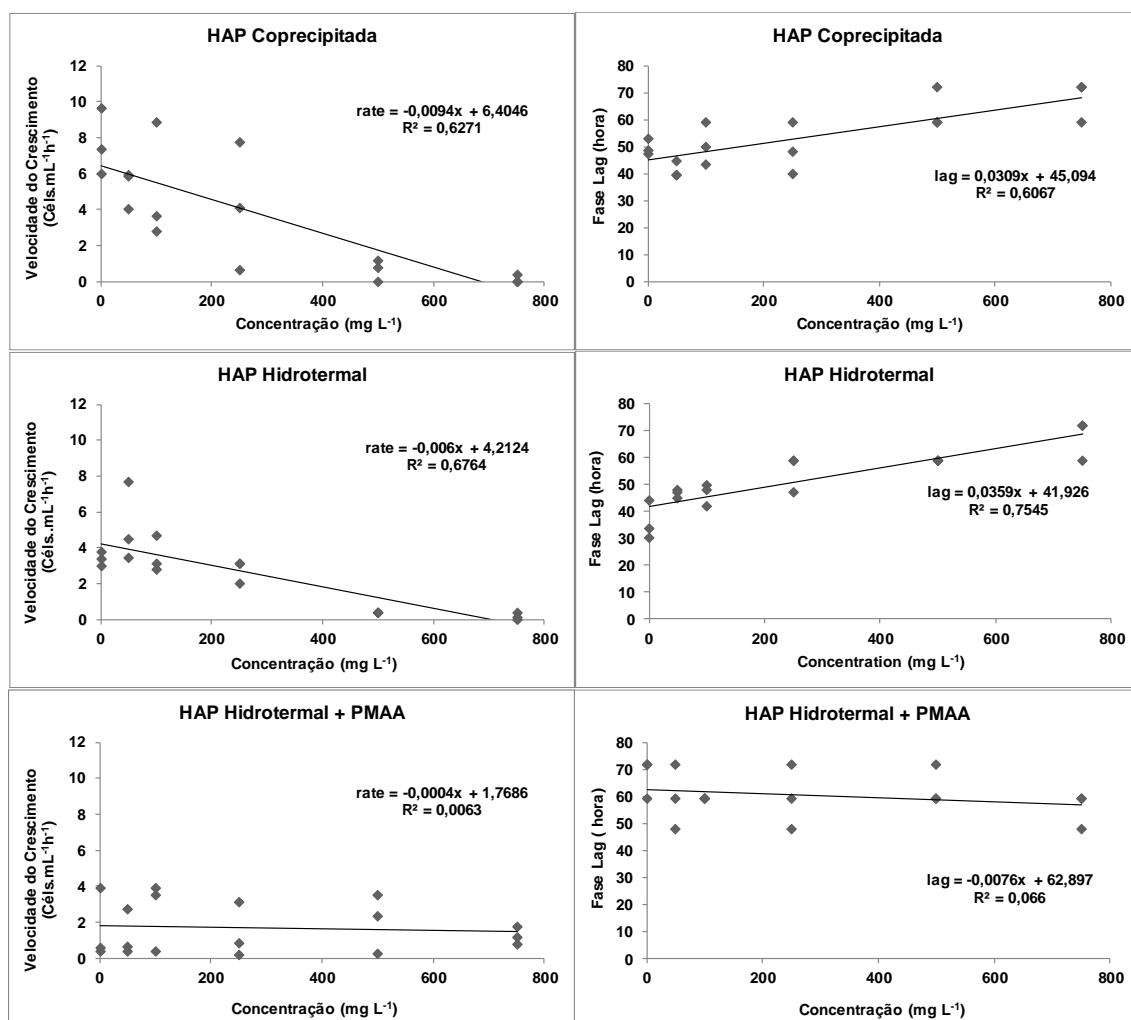


Figura 15 - Velocidade do crescimento ( $\text{céls.mL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) e duração da fase lag (horas) da *P. subcapitata* em função da concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para as nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal (2 horas) e HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA, respectivamente. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).

As nanopartículas de HAP Coprecipitada e HAP Hidrotermal sem PMAA diminuíram a velocidade do crescimento algáceo com o aumento da concentração de cada nanopartícula, conforme ilustrado na Figura 15. Consequentemente, a duração da fase lag aumentou para ambas as amostras, em altas concentrações, indicando que a fase lag está relacionada com a concentração das nanopartículas de HAP.

Entretanto, as nanopartículas de HAP Hidrotermal com PMAA não apresentaram fase lag em função da concentração, uma vez que o crescimento da microalga foi constante.

As curvas de crescimento algáceo auxiliam para entender como o crescimento é afetado pela variação de alguns parâmetros.

A influência da concentração das diferentes nanopartículas de HAP nas curvas de crescimento da microalga (velocidade de crescimento e duração da fase lag) foi avaliada usando regressão linear. De acordo com a o modelo de regressão linear para as variáveis dependentes, velocidade do crescimento e fase lag, respectivamente (Tabelas 3 e 4) indicam os intervalos de confiança e o teste t-student dos coeficientes de regressão para os distintos bioensaios.

Tabela 3 - Parâmetros estimados para a variável dependente velocidade do crescimento para as nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal (2 horas) e HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA. Tabela retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).

Modelo	Variável Dependente: Velocidade do crescimento	Coeficientes	95% Intervalo de Confiança		Valor de p - teste-t
			Limite inferior	Limite superior	
HAP Coprecipitada	Constante	6	5	8	< 0.001
	Concentração	-0,0094	-0,0132	-0,0056	< 0.001
HAP Hidrotermal	Constante	4	3	5	< 0.001
	Concentração	-0,0060	-0,0082	-0,0038	< 0.001
HAP Hidrotermal + PMAA	Constante	2	0,743	3	0,002
	Concentração	-0,0004	-0,0031	0,0023	0,755

Tabela 4 - Parâmetros estimados para a variável dependente fase lag para as nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal (2 horas) e HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA. Tabela retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).

Modelo	Variável dependente: Fase lag	Coeficientes	95% Intervalo de Confiança		Valor de p - teste-t
			Limite inferior	Limite superior	
HAP Coprecipitada	Constante	45	40	50	< 0.001
	Concentração	0,0309	0,0177	0,0441	< 0.001
HAP Hidrotermal	Constante	42	38	46	< 0.001
	Concentração	0,0359	0,0250	0,0467	< 0.001
HAP Hidrotermal + PMAA	Constante	63	57	69	< 0.001
	Concentração	-0,0076	-0,0229	0,0076	0,303

Os coeficientes angulares das curvas de regressão linear estimados para a HAP Coprecipitada e HAP Hidrotermal foram significativos, em concordância com o teste-t, onde a diminuição da velocidade do crescimento com o aumento da concentração foi observada. O mesmo não se aplicou para a HAP Hidrotermal com PMAA ( $p=0.755$ ), mostrando que não houve relação entre a velocidade do crescimento e a concentração das nanopartículas.

Os parâmetros da variável dependente fase lag estimados pelas curvas de regressão linear para a HAP Coprecipitada e HAP Hidrotermal foram significativas, de acordo com o teste-t, onde foi observado o aumento da fase lag com o aumento das concentrações de nanopartículas. Em contrapartida, a HAP Hidrotermal com PMAA mostrou uma fase lag constante com valor de  $p=0.303$ , não evidenciando relação entre a fase lag e a concentração de nanopartículas.

O cálculo do valor de IC50% é usado para estimar os efeitos tóxicos para as diferentes espécies de microalgas, considerando as propriedades das nanopartículas, tais como área superficial, solubilidade, tamanho e estabilidade química em suspensão. Os valores de 72h-IC50 calculados para as nanopartículas de HAP estavam consistentes com as análises da velocidade de inibição do crescimento algáceo.

Os valores de 72h-IC50 encontrados para a HAP Coprecipitada e HAP Hidrotermal foram  $340 \text{ mg L}^{-1}$  e  $350 \text{ mg L}^{-1}$ , respectivamente, sem diferença significativa entre eles, conforme observado pelos dados experimentais relacionados à velocidade de inibição do crescimento algáceo e a duração da fase lag.

Em contrapartida, a HAP Hidrotermal com PMAA apresentou um coeficiente angular não significativo, de acordo com o teste-t ( $p=0.755$ ), evidenciando que a velocidade de inibição do crescimento da microalga apresentou um comportamento constante de crescimento no intervalo de concentração estudado. Portanto, estes resultados mostraram que os efeitos tóxicos para a velocidade de inibição do crescimento algáceo são insignificantes dentro da faixa empregada.

Similarmente à velocidade de inibição do crescimento (Tabela 4), não houve relação significativa ( $p=0.303$ ) entre a duração da fase lag com o aumento da concentração das nanopartículas de HAP Hidrotermal com PMAA.

A fase lag mostrou um comportamento praticamente constante para o crescimento algáceo em relação a concentração (Tabela 4). Para as outras amostras, os coeficientes angulares foram significativos de acordo com os valores do teste-t e positivos, os quais demonstraram um aumento na duração da fase lag em função da concentração.

De acordo com a literatura, as nanopartículas de óxido de cobre (CuO), óxido de zinco (ZnO) e óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) indicam maiores efeitos tóxicos quando comparados as nanopartículas de HAP (ARUOJA et al., 2009; CLÉMENT; HUREL; MARMIER, 2013; FRANKLIN et al., 2007). Este fato sugere que as nanopartículas de HAP têm elevado potencial para aplicação como nanofertilizante (especialmente as



nanopartículas de HAP Hidrotermal com PMAA), quando comparadas ao potencial das nanopartículas metálicas.

### 5.2.3 Análise da Estabilidade de carga superficial das nanopartículas de HAP no meio de cultivo W.C.

Os valores de potencial zeta das diferentes nanopartículas de HAP dispersas em meio de cultura W.C. foram também aferidas para as concentrações de 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup>, 250 mg L<sup>-1</sup>, 500 mg L<sup>-1</sup> e 750 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 5).

Tabela 5 - Valores do potencial zeta (mV) para as amostras de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal sem PMAA e HAP Hidrotermal com PMAA dispersas em 100 mL do meio de cultura W.C.

Nanopartículas HAP + 100 mL Meio de Cultivo W.C.	Potencial Zeta (mV)				
	Concentrações de HAP (mg L <sup>-1</sup> )				
	50 mg L <sup>-1</sup>	100 mg L <sup>-1</sup>	250 mg L <sup>-1</sup>	500 mg L <sup>-1</sup>	750 mg L <sup>-1</sup>
HAP Coprecipitada	-16,1	-7,25	-4,07	-0,34	-1,86
HAP Hidrotermal (2 horas)	-5,00	-3,75	-3,05	-2,95	-3,40
HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA	-22,30	-22,00	-23,10	-23,45	-24,60

A análise da estabilidade de carga superficial para as nanopartículas de HAP mostraram elevada instabilidade de carga para as amostras de HAP coprecipitada e HAP hidrotermal sem PMAA em todas as concentrações.

Em contrapartida, as nanopartículas de HAP Hidrotermal com PMAA, mostraram-se significativamente mais estáveis em suspensão do meio de cultivo W.C., para todas as concentrações utilizadas.

### 5.2.4 Comportamento do crescimento e análises morfológicas das microalgas

O efeito de sombreamento pode contribuir para o efeito nanotoxicológico nas microalgas, uma vez que a redução da intensidade luminosa pode afetar o processo fotossintético no metabolismo e afetar o crescimento algáceo (ARUOJA et al., 2009; GONG et al., 2011; LEE; AN, 2013; ZAMANI et al., 2014).

Além disso, a solubilidade das nanopartículas é uma característica importante que influencia o potencial tóxico em microalgas (FRANKLIN et al., 2007; VAN HOECKE et al., 2008).

Investigações anteriores (SANTOS, 2013) demonstraram que as nanopartículas de HAP Coprecipitada apresentaram maior solubilidade em água quando comparada às nanopartículas de HAP Hidrotermal.

De forma similar, no presente trabalho, as nanopartículas de HAP Coprecipitada mostraram maior solubilidade no meio de cultura W.C., as quais aumentam a biodisponibilidade de fósforo para a *P. subcapitata*, induzindo o crescimento algáceo em maior extensão. Entretanto, as nanopartículas de HAP Hidrotermal com e sem o PMAA apresentaram menor solubilidade em relação às nanopartículas de HAP Coprecipitada para ambos os meios aquosos, água ultrapura e meio de cultura W.C. como uma possível consequência da maior dimensão das nanopartículas, elevada cristalinidade e menor estado de aglomeração, as quais diminuíram a solubilidade do fósforo para a microalga.

A Figura 16 (A, B e C), (D, E e F) e (G, H e I) mostra fotos dos recipientes-teste através de imagens do microscópio óptico, em aumento de 40×, durante a contagem celular do crescimento de *P. subcapitata* no meio de cultura W.C. em concentrações aleatórias de HAP Coprecipitada e HAP Hidrotermal sem e com o dispersante PMAA, respectivamente, a fim de comprovar o estado de aglomeração das nanopartículas e o comportamento do crescimento das microalgas sobre as nanopartículas e no meio de cultura W.C., evidenciando a biodisponibilidade do fósforo, além de destacar o efeito de sombreamento presente.

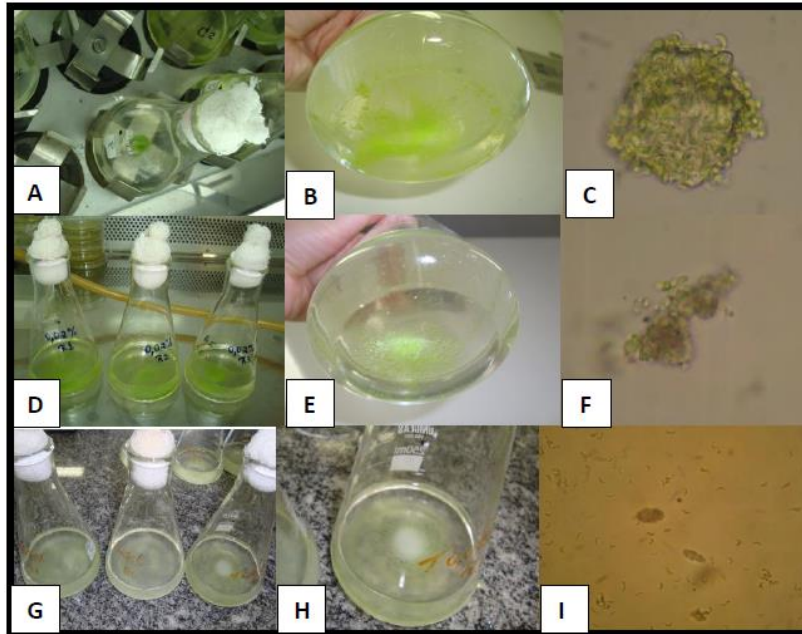


Figura 16 (A, B e C); (D, E e F) e (G, H e I) - Comportamento do crescimento de *P. subcapitata* quando exposta às nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal sem PMAA e HAP Hidrotermal com PMAA, respectivamente. As Figuras 16 (C, F e I) representam imagens de microscopia óptica das microalgas nas amostras de HAP Coprecipitada, Hidrotermal sem PMAA e Hidrotermal com PMAA, respectivamente.

A análise morfológica provou ser uma ferramenta valiosa para avaliar os efeitos tóxicos gerados pela interação com as variadas nanopartículas para as mais diferentes espécies de microalgas, incluindo *Chlorella sp.* (JI; LONG; LIN, 2011), *Phaeodactylum tricornutum* (WANG et al., 2016), *Dunaliella tertiolecta* (OUKARROUM et al., 2012), *Chlorella pyrenoidosa* (LEI et al., 2016), *Chlamydomonas reinhardtii* (WANG et al., 2008), *Pseudokirchneriella subcapitata* (ARUOJA et al., 2009; FRANKLIN et al., 2007).

Neste trabalho, as análises morfológicas revelaram que uma maior quantidade de células soltas e de alta densidade celular ocorreram para as nanopartículas hidrotermais, especialmente para as nanopartículas com PMAA.

As nanopartículas de HAP Coprecipitada em elevadas concentrações diminuíram o crescimento e a reprodução das microalgas, conseqüentemente diminuíram as densidades celular.

Resultados similares à inibição do crescimento algáceo foram obtidos por Aruoja et al. (2009), quanto ao comportamento do crescimento de *P. subcapitata* quando exposta a materiais óxidos (TiO<sub>2</sub>, CuO and ZnO) com morfologias nano e granel.

Resultados descritos por Schwab et al. (2011) também observaram que a inibição do crescimento de *Chlorella vulgaris* and *P. subcapitata* foi altamente influenciada pelo

efeito de sombreamento de nanotubos de carbono (CNT) e pela aglomeração das células algais dentro dos CTN.

As imagens de MEV das células de *P. subcapitata* expostas a HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal sem PMAA e HAP Hidrotermal com PMAA foram mostradas nas Figuras 17 (A, B e C), respectivamente. As imagens revelam, em uma base qualitativa, mudanças morfológicas causadas nas células algais quando expostas as distintas nanopartículas de HAP.

Em geral, a Figura 17A mostrou que em maiores concentrações de HAP Coprecipitada aumentou a aglomeração entre as nanopartículas com as microalgas (visualizar nos círculos vermelhos). Outras alterações morfológicas podem ser observadas, tais como estreitamento, alongamento e aumento de volume das células, induzindo a destruição da camada de mucilagem e o vazamento de material intracelular (visto em retângulos verdes e triângulos azuis, respectivamente).

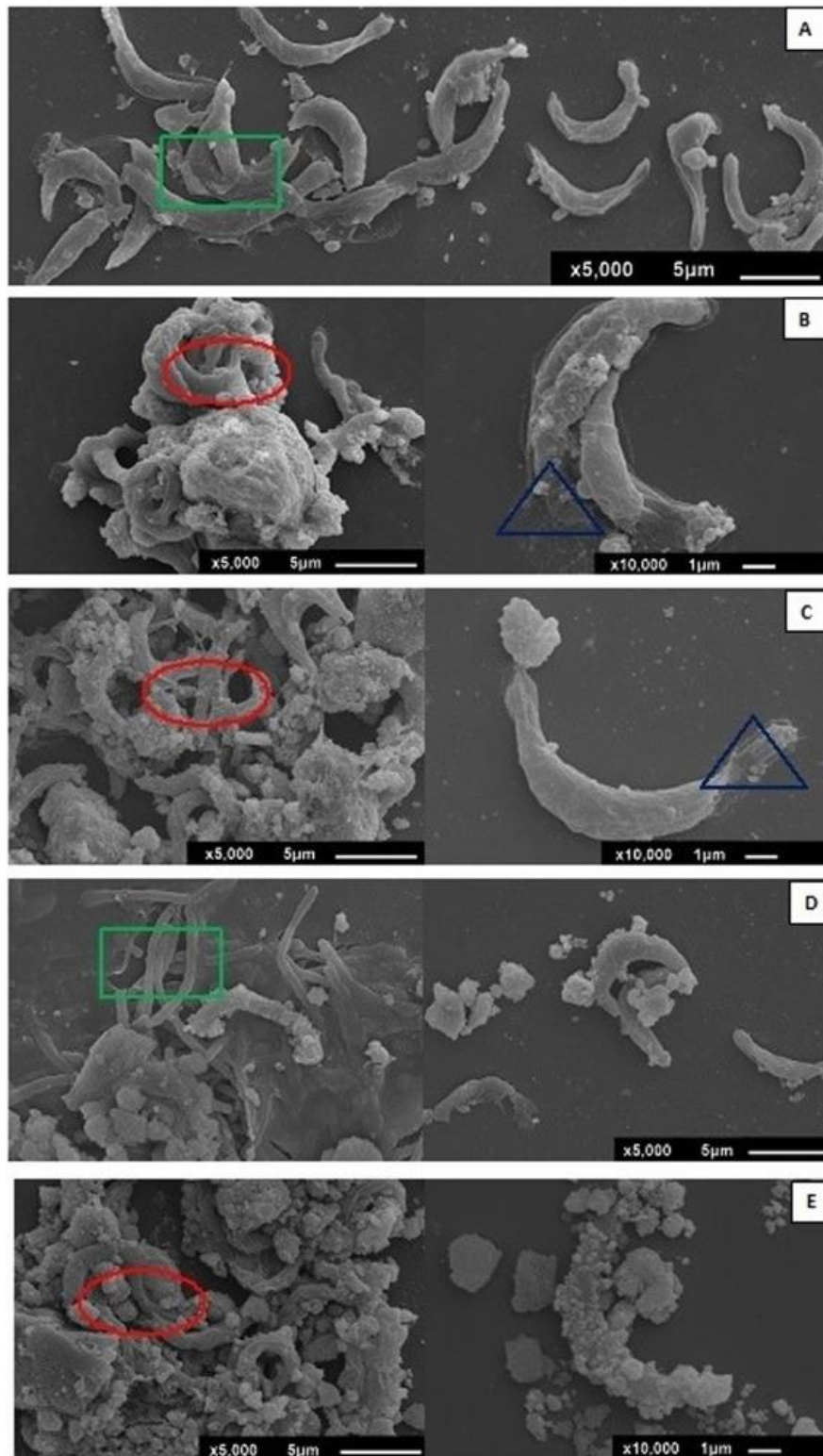


Figura 17 A - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (a),  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (b),  $250 \text{ mg L}^{-1}$  (c) and  $750 \text{ mg L}^{-1}$  (d) da HAP Coprecipitada, respectivamente. Circulos vermelhos indicam aglomeração entre as nanopartículas com as células de microalgas.

Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravazamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).

A Figura 17 B mostra que a exposição das microalgas a elevadas concentrações de HAP Hidrotermal sem PMAA produziu uma maior aglomeração (círculos vermelhos) de células de algas e a coalescência das nanopartículas (triângulos azuis), causando a destruição intracelular das células mucilaginosas, diminuição do comprimento das células e aumento do alongamento das células (retângulos verdes).

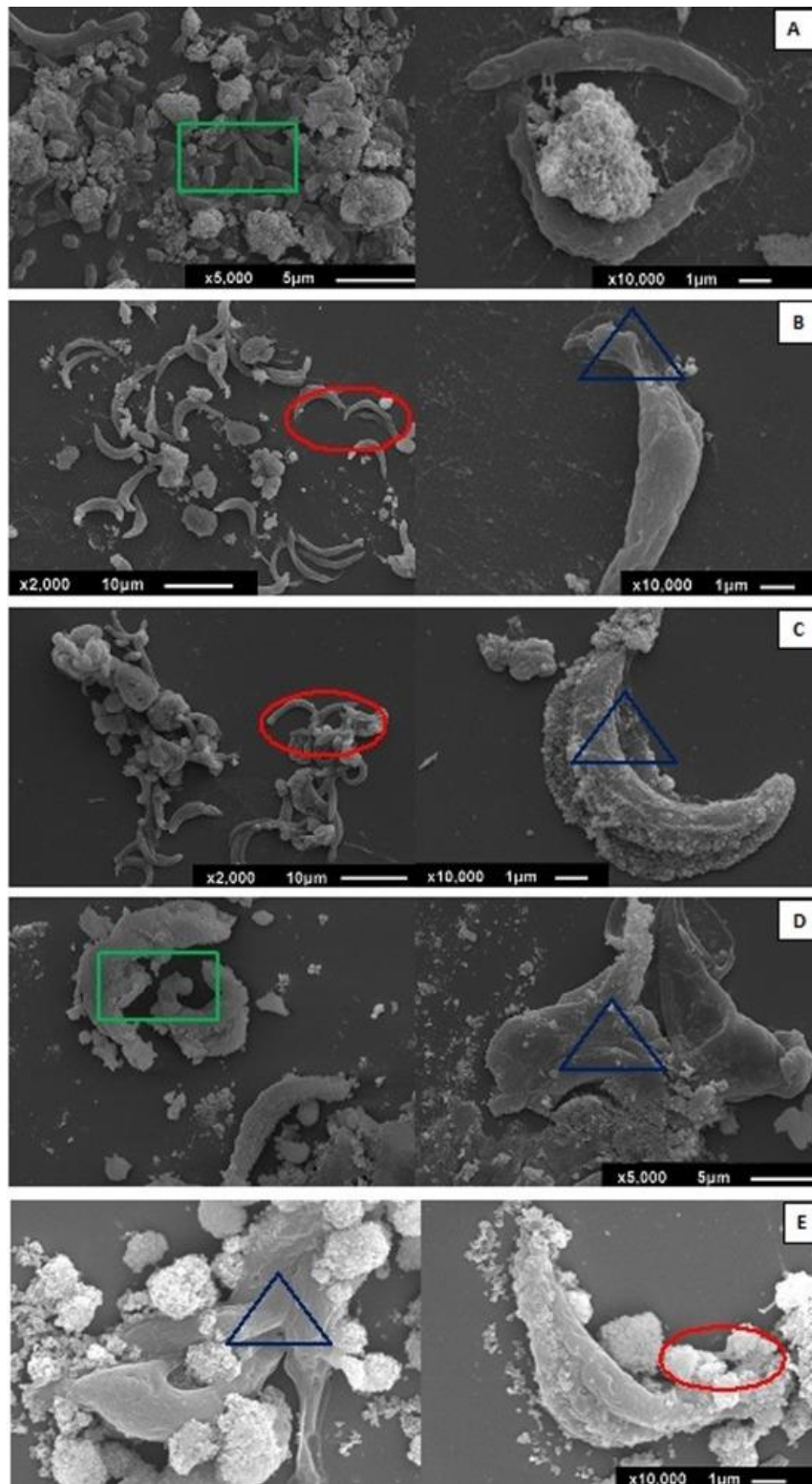


Figura 17 B - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (a),  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (b),  $250 \text{ mg L}^{-1}$  (c) and  $750 \text{ mg L}^{-1}$  (d) da HAP Hidrotermal sem PMAA, respectivamente. Circulos vermelhos indicam aglomeração entre as nanopartículas com as células de microalgas.

Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravazamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).

A morfologia das microalgas expostas às nanopartículas de HAP Hidrotermal com PMAA, destacada na Figura 17 C, parece estar menos afetada, uma vez que as nanopartículas permanecem mais dispersas no meio de cultura W.C., reduzindo assim a aglomeração (círculos vermelhos) e o efeito de sombreamento. Apenas algumas células apresentaram aumento de volume celular, enquanto outras apresentaram alguma deformação sutil, e outras mostraram-se mais alongadas (retângulos verdes). As mucosas que envolvem as células algais aparentaram estar menos danificadas em comparação com os efeitos causados nas algas expostas às outras nanopartículas em meio W.C. (Vistas em triângulos azuis).



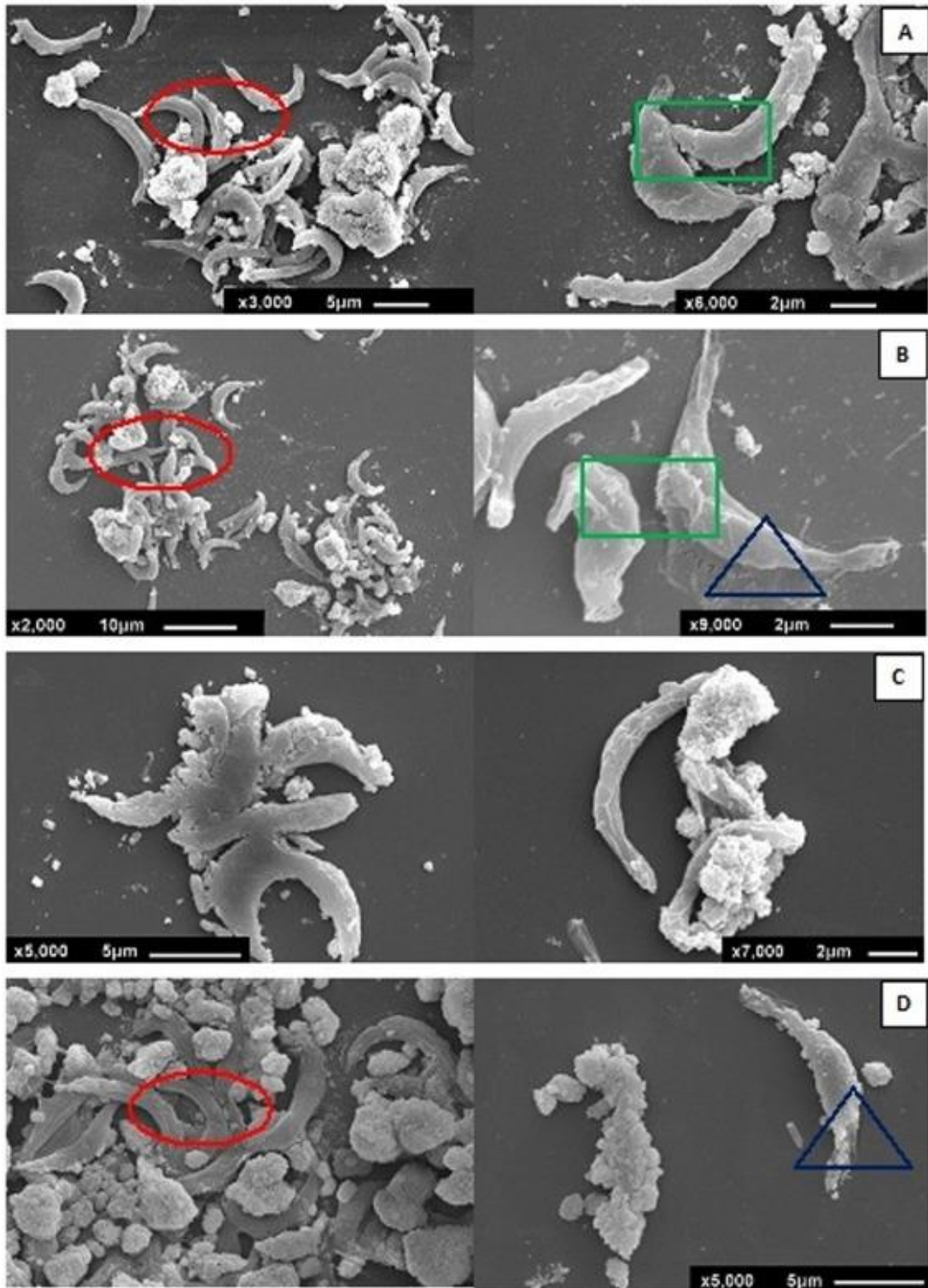


Figura 17 C - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de 50 mg L<sup>-1</sup> (a), 100 mg L<sup>-1</sup> (b), 250 mg L<sup>-1</sup> (c) and 750 mg L<sup>-1</sup> (d) da HAP Hidrotermal com PMAA, respectivamente. Circulos vermelhos indicam aglomeração entre as nanopartículas com as células de microalgas.

Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravazamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular. Figura retirada de PEREIRA et al. (2017), com permissão da Elsevier (2017).

### **5.2.5 Análise de EDS dos bioensaios de nanotoxicidade**

Na Figura 18, têm-se o mapeamento do EDS mostrando a distribuição dos elementos constituintes cálcio (Ca), fósforo (P) e oxigênio (O) para as amostras dos bioensaios de HAP Coprecipitada para todos os tratamentos.

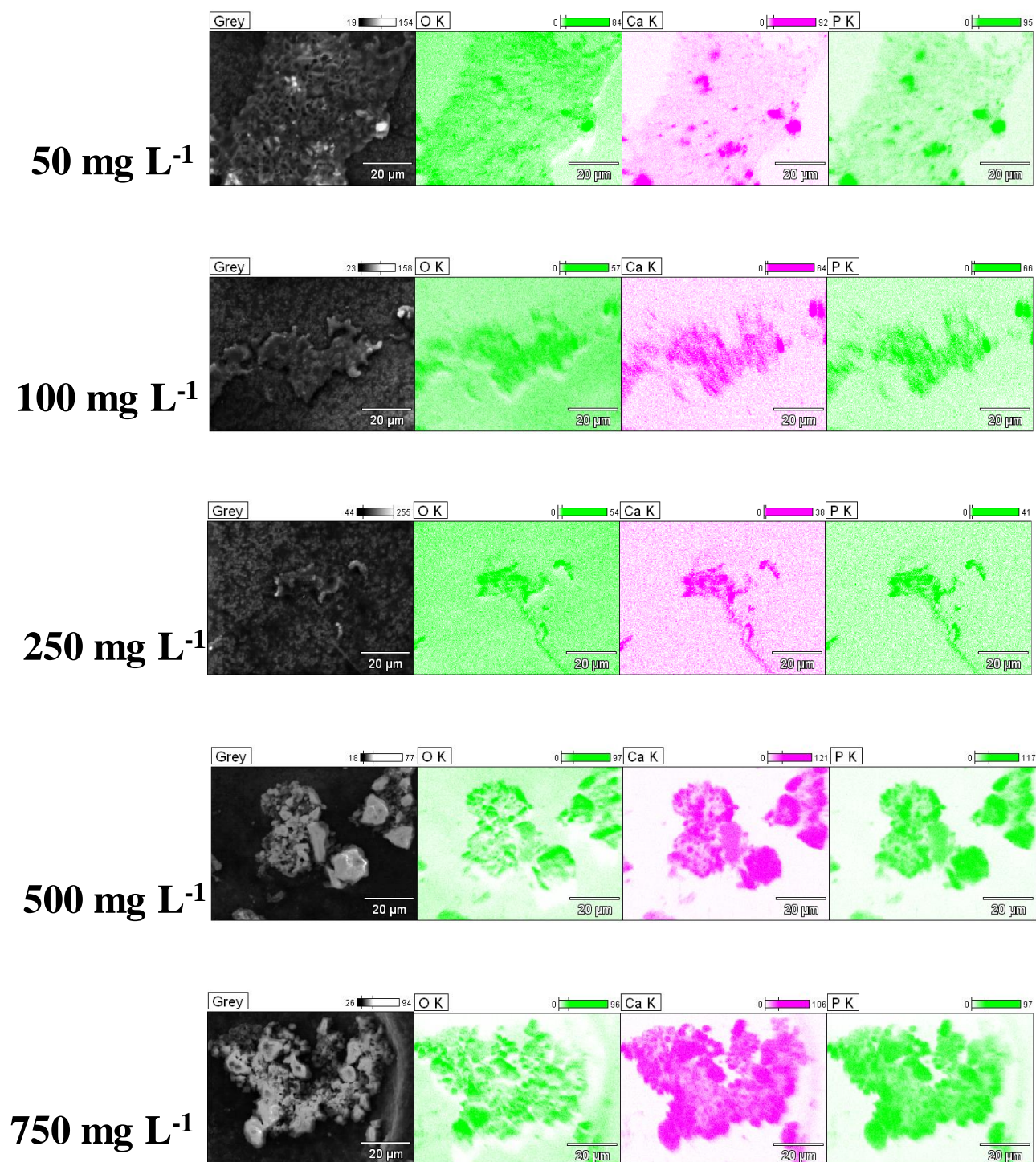


Figura 18 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da HAP coprecipitada, fósforo (P), cálcio (Ca) e oxigênio (O) nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup>, 250 mg L<sup>-1</sup>, 500 mg L<sup>-1</sup> e 750 mg L<sup>-1</sup>.

No tratamento 50 mg L<sup>-1</sup> de HAP Coprecipitada observou-se que na maior parte da amostra, onde está localizada uma elevada densidade de microalgas praticamente não há P, Ca e O oriundos do material, apenas em algumas regiões pontuais, exceto o O que apresentou uma distribuição mais homogênea.

A distribuição destes elementos nos tratamentos 100 mg L<sup>-1</sup> e 250 mg L<sup>-1</sup> de HAP Coprecipitada mostraram-se similares em maior quantidade por toda a região selecionada. Para ambos os tratamentos, o O apresentou-se por toda a região focada, porém ainda em maior concentração sobre as algas e o material.

Nos tratamentos 500 mg L<sup>-1</sup> e 750 mg L<sup>-1</sup> a maior distribuição destes elementos se deu mais sobre as nanopartículas de HAP que sobre as microalgas, evidenciando que as elevadas concentrações deste material caracterizam a sua presença. O elemento O permaneceu por toda a região selecionada.

Em seguida têm-se o mapeamento do EDS mostrando a distribuição dos elementos constituintes (Ca, P e O) para as amostras dos bioensaios de HAP Hidrotermal sem PMAA para todos os tratamentos (Figura 19).



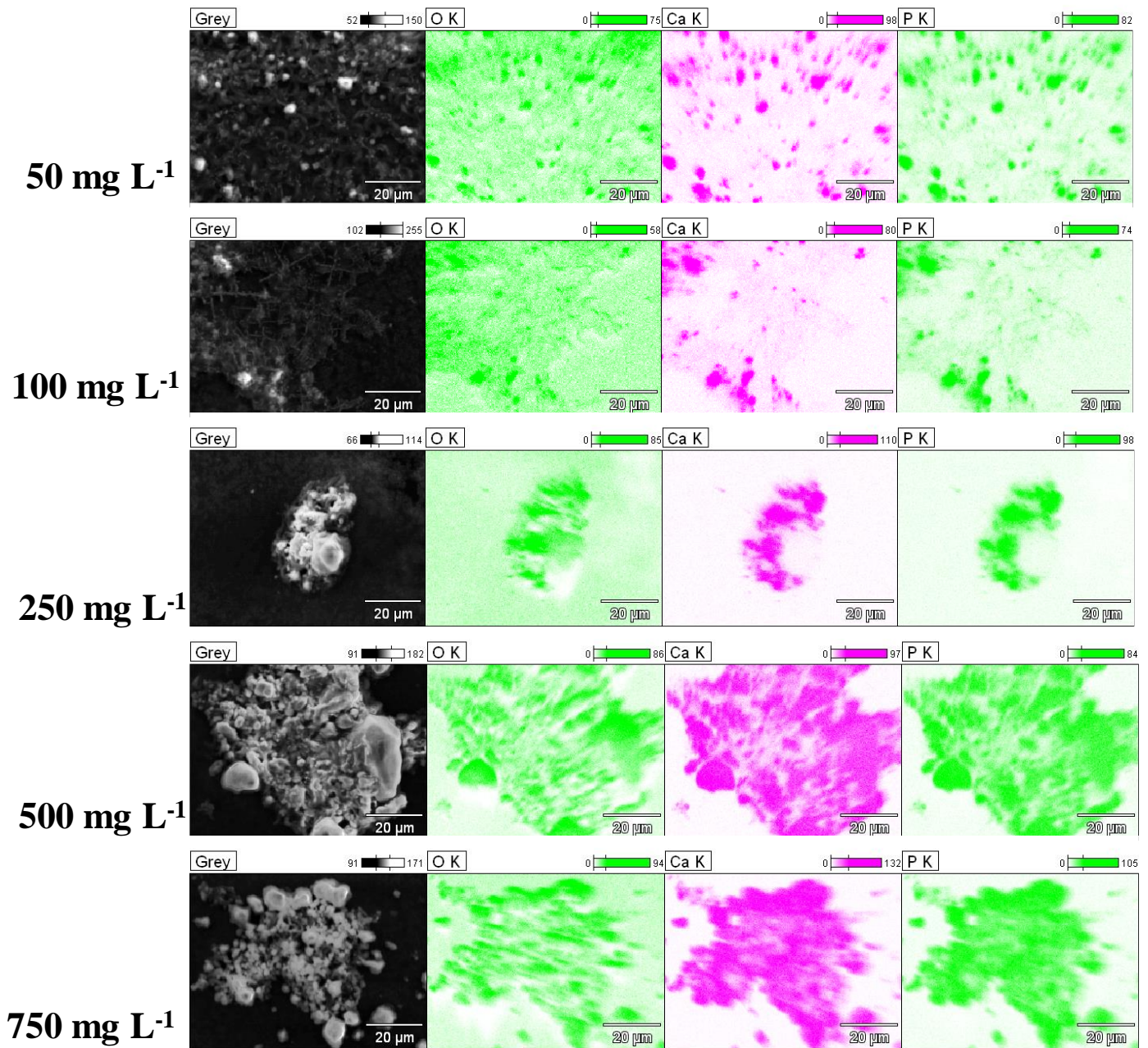


Figura 19 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da HAP hidrotermal sem PMAA, fósforo (P), cálcio (Ca) e oxigênio (O) nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup>, 250 mg L<sup>-1</sup>, 500 mg L<sup>-1</sup> e 750 mg L<sup>-1</sup>.

O mapeamento de EDS para os tratamentos da amostra de HAP Hidrotermal sem PMAA mostra que desde a concentração de  $50 \text{ mg L}^{-1}$  a  $750 \text{ mg L}^{-1}$  as regiões mais pontuadas e escuras representam elevada deposição do material, e as regiões mais claras evidenciam a presença das microalgas.

É facilmente observado que os elementos como P, Ca e O são oriundos das nanopartículas hidrotermais sem PMAA.

Os resultados do mapeamento do EDS para as amostras de HAP Hidrotermal 2 horas com PMAA estão apresentados na Figura 20, destacando a distribuição dos elementos constituintes do nanofertilizante de HAP (Ca, P e O) para cada tratamento.

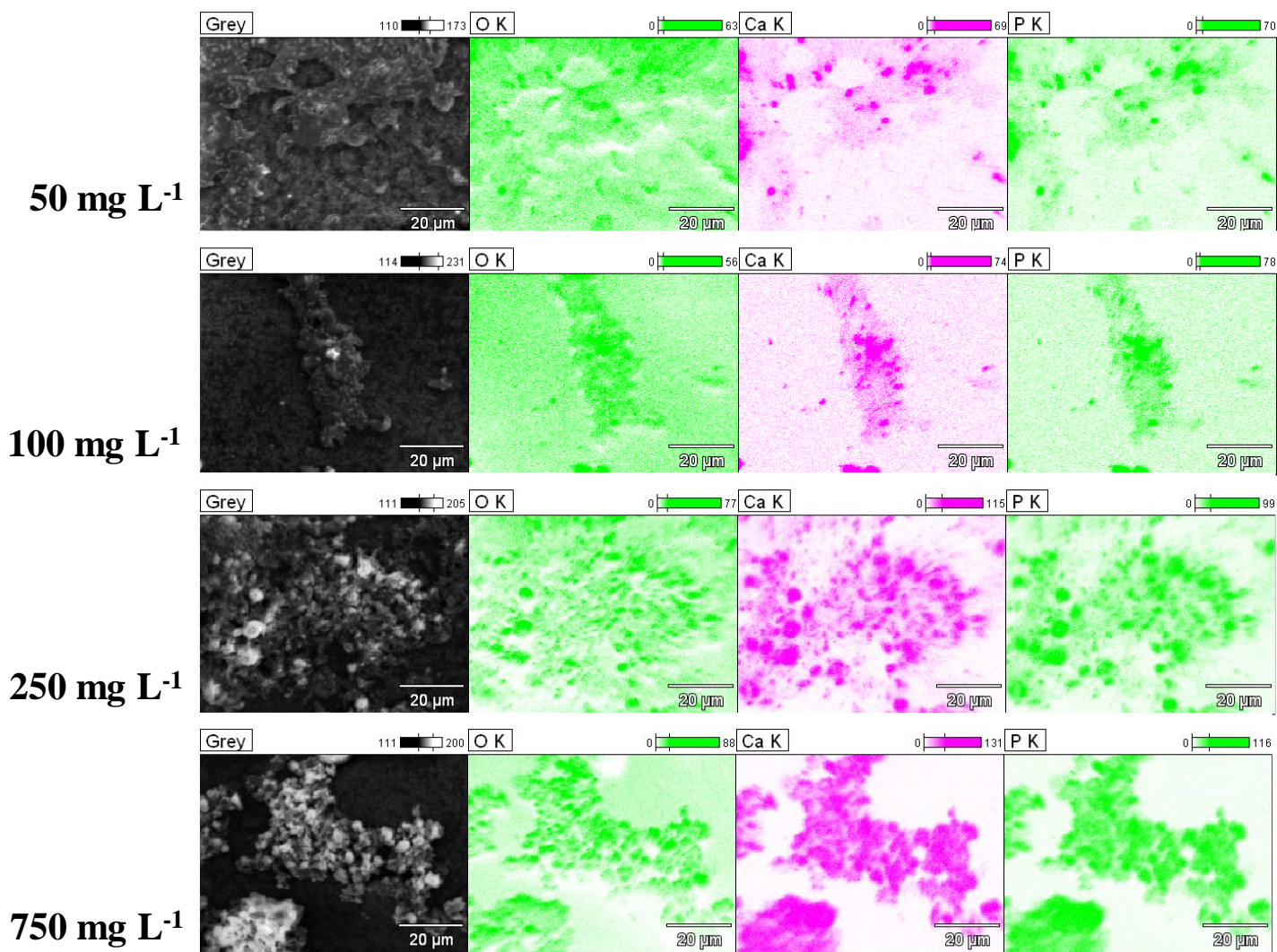


Figura 20 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da HAP hidrotermal com PMAA, fósforo (P), cálcio (Ca) e oxigênio (O) nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup>, 250 mg L<sup>-1</sup>, 500 mg L<sup>-1</sup> e 750 mg L<sup>-1</sup>.

Conforme visualizado na Figura 20 (A, B, C e D) as regiões mais intensas indicam os elementos constituintes P, Ca e O, provenientes em maior concentração do nanofertilizante HAP Hidrotermal com PMAA para todos os tratamentos.

Observou-se que as nanopartículas estão mais dispersas por toda a amostra. O elemento O se encontra em maior abundância em todos os tratamentos e tanto o P como o Ca estão em concentração considerável sobre as células algáceas.



## Capítulo 6 - Nanofertilizante de ZnO - Resultados e Discussões

### 6.1 Caracterização morfológica e estrutural das nanopartículas de ZnO

#### 6.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura com Fonte de Emissão de Campo (MEV-FEG)

Nas Figuras 21 (A, B), 22 (A, B), 23 (A, B), 24 (A, B), 25 (A, B), 26 (A, B) e 27 (A, B) estão as imagens de microscopia eletrônica obtidas para as nanopartículas de ZnO Coprecipitada, ZnO Hidrotermal 30 minutos, ZnO hidrotermal 30 minutos com PMAA, ZnO hidrotermal 2 horas e ZnO hidrotermal 2 horas com PMAA e os respectivos histogramas de distribuição do tamanho médio das partículas.

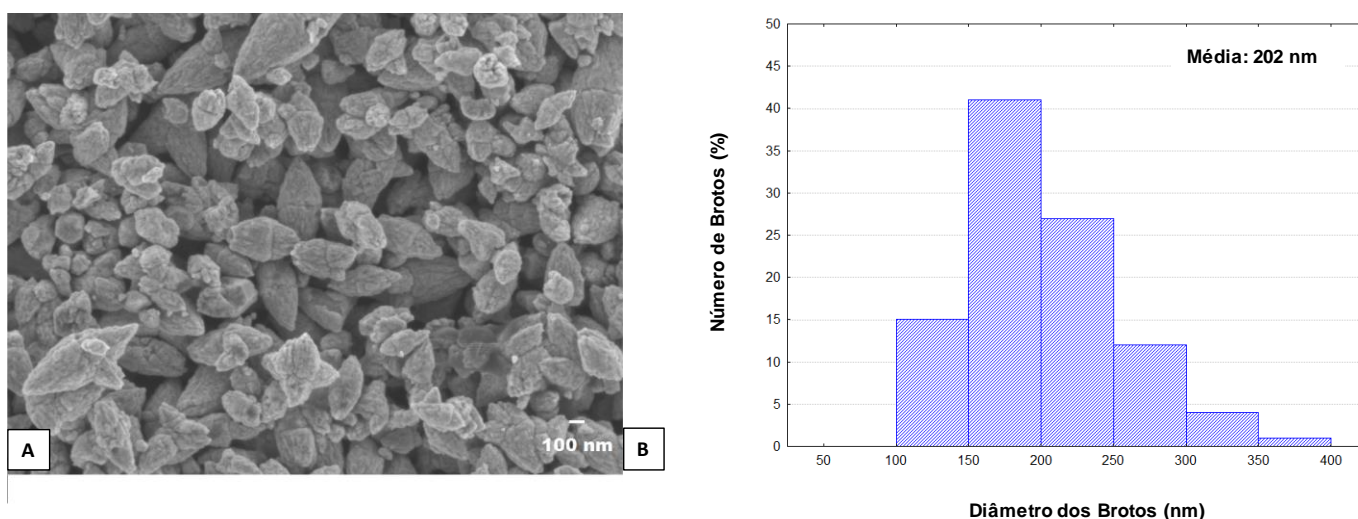


Figura 21 (A, B) - Imagem de microscopia eletrônica da amostra de ZnO na forma de pó obtida a partir do método de Coprecipitação (Figura 21A) e o histograma de distribuição do diâmetro médio das partículas, em morfologia de brotos (Figura 21B), respectivamente.

A micrografia evidenciou formação de aglomerados/agregados, com morfologia de brotos contendo várias nanopartículas aderidas entre si. O diâmetro médio obtido foi de 202 nm representando 40% das partículas na faixa de tamanho entre 150 e 200 nm.

Nota-se em maiores detalhes a coalescência de várias partículas, resultando em aglomerados de partículas, que apresentam variação considerável no tamanho.

Para definir com maior exatidão a morfologia das diferentes nanopartículas de ZnO sintetizadas, com a finalidade de selecionar e padronizar as amostras para os bioensaios de nanotoxicidade, foram realizadas as sínteses hidrotérmicas de 30 minutos e 2 horas sem e com o dispersante PMAA.

As variações de tamanho e morfologia observadas são oriundas do fato das sínteses serem realizadas em meio básico, no qual os processos de solubilização/recristalização ocorreram em tempos diferentes ao longo do processo hidrotérmico.

Do mesmo modo, o trabalho de Oliveira (2009) constatou que quando as partículas são sintetizadas em meio aquoso, há formação de nanoestruturas diferenciadas ao se aumentar o tempo do processo hidrotermal. Entretanto, a síntese realizada em um intervalo de tempo menor faz com que as nanopartículas formadas cresçam a partir do núcleo de ZnO formando nanoplacas mais lisas cujos tamanhos podem variar significativamente.

Nos trabalhos de Libanori (2011) e Umar et al. (2009) observou-se que algumas nanopartículas de ZnO cresceram mais rapidamente que outras, o que resultou em morfologia do tipo facetada, a qual é característica da fase típica hexagonal wurtzita do ZnO.

Oliveira (2009) obteve nanopartículas esféricas de ZnO com diâmetro entre 20 a 30 nm, porém quando ocorreu formação de aglomerados esféricos, estas apresentaram diâmetros entre 50 e 100 nm, aproximando-se mais da faixa de valores encontrados para a amostra de ZnO hidrotermal do presente trabalho. Por outro lado, o autor ressalta que as nanoplacas e nanobastões que se formaram por meio da deposição de nanopartículas esféricas apresentaram tamanhos maiores, variando de 150 a 450 nm o tamanho das nanoplacas e os nanobastões com diâmetro de 30 a 40nm e comprimento entre 150 e 300 nm.

As análises de MEV/FEG mostraram que a síntese hidrotérmica de 30 minutos com e sem o PMAA apresentou morfologia de placas e a síntese hidrotérmica de 2 horas com e sem PMAA confirmaram a morfologia de arranjos florais, definitivamente.

A Figura 22 (A, B) mostra a micrografia das amostras de ZnO Hidrotermal por 30 minutos em morfologia de placas sem a adição do dispersante PMAA e o histograma de distribuição do diâmetro médio das placas, respectivamente.

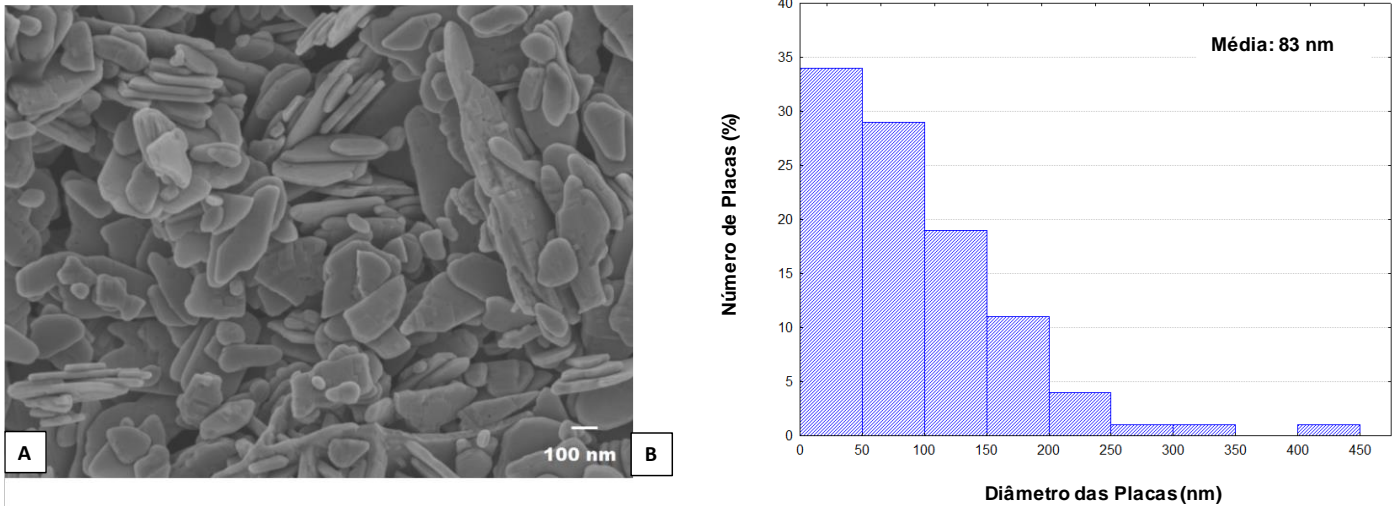


Figura 22 (A, B) - Imagem de microscopia eletrônica da amostra de ZnO Hidrotermal por 30 minutos sem PMAA na forma de pó, e histograma de distribuição do diâmetro médio das partículas, em morfologia de placas, respectivamente.

Como esperado, observou-se que a síntese hidrotérmica de 30 minutos sem PMAA apresentou a formação de nanoplacas facetadas e de superfície lisa mais agregadas entre si, com diâmetro médio de 83 nm, apresentando a maioria das partículas um diâmetro de até 50 nm.

A Figura 23 (A, B) mostra a micrografia das amostras de ZnO Hidrotermal por 30 minutos com o dispersante PMAA e o histograma de distribuição do diâmetro médio das placas, respectivamente.

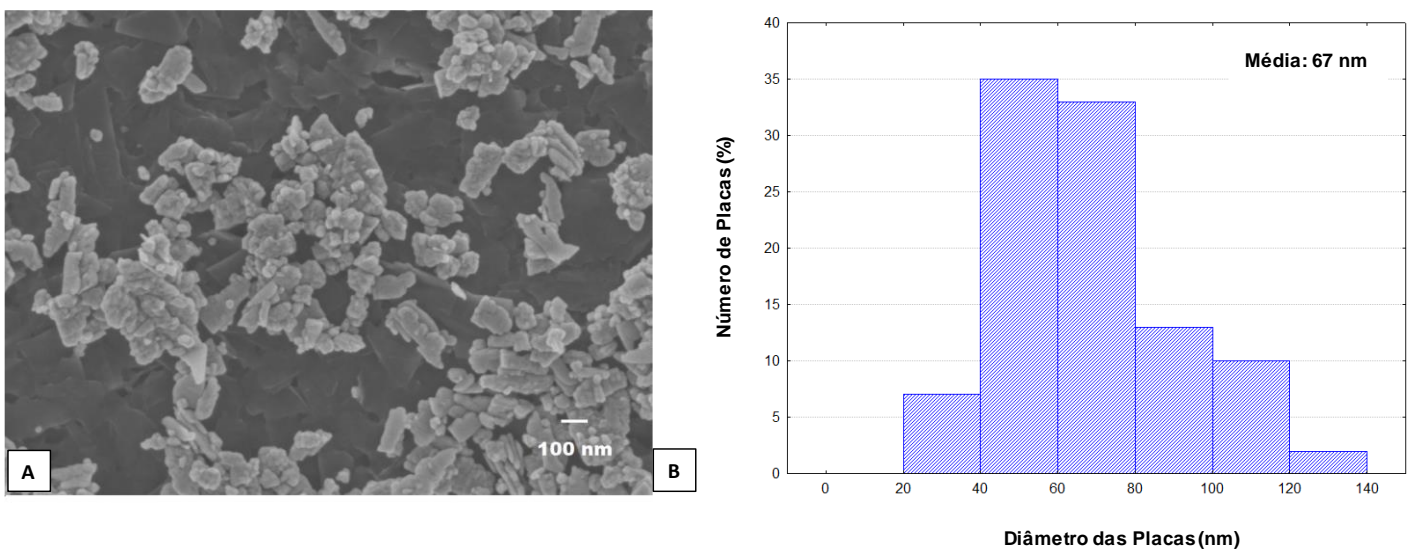


Figura 23 (A, B) - Imagem de microscopia eletrônica da amostra de ZnO Hidrotermal por 30 minutos com PMAA na forma de pó, e o histograma de distribuição do diâmetro médio das partículas, em morfologia de placas, respectivamente.

Conforme observado, a síntese com o dispersante PMAA foi eficiente para a desaglomeração das partículas e maior dispersão entre elas, apresentando diâmetro médio de 67 nm, sendo 35% entre o diâmetro de 40 a 60 nm. A morfologia se manteve em nanoplacas.

A Figura 24 (A, B) mostra a micrografia das amostras de ZnO Hidrotermal por 2 horas sem o dispersante PMAA com morfologia floral e seu respectivo histograma do diâmetro médio dos arranjos florais (agregados de partículas) e das partículas.

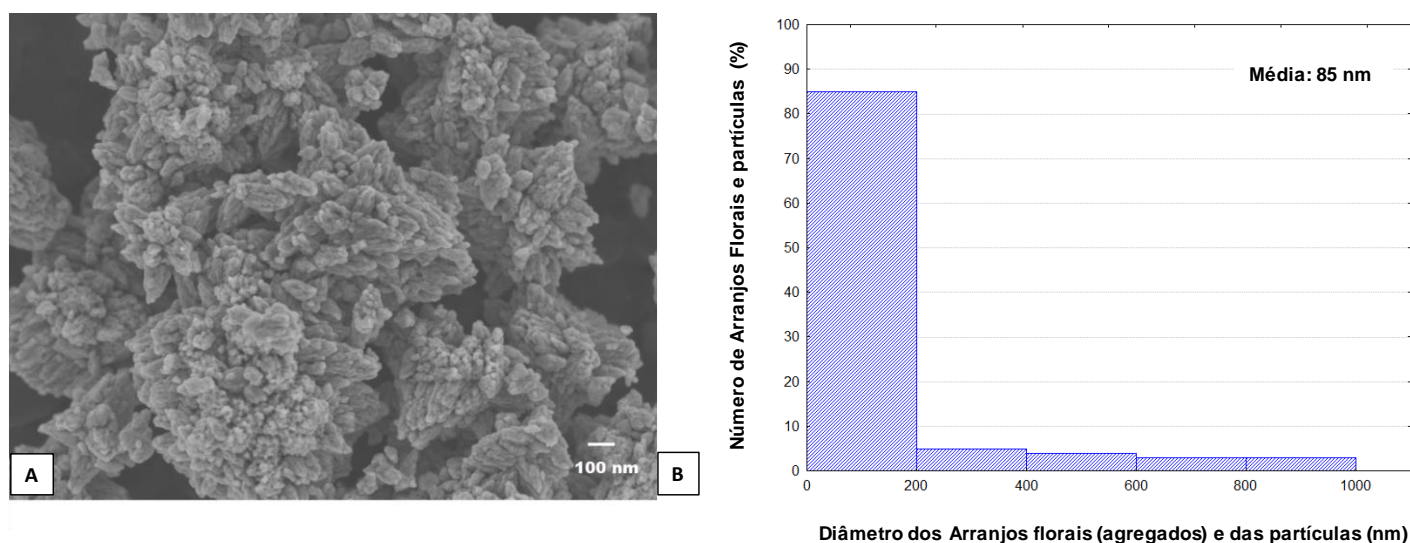


Figura 24 (A, B) - Imagem de microscopia eletrônica da amostra de ZnO Hidrotermal por 2 horas sem PMAA na forma de pó, e o histograma de distribuição do diâmetro médio dos arranjos florais (agregados de partículas) e das partículas, respectivamente.

Após várias repetições realizadas para a síntese de 2 horas sem o PMAA, foi possível obter uma formação mais definida de partículas em arranjos florais agregados entre si, com diâmetro médio de 85 nm (Figura 24 B), evidenciando uma distribuição heterogênea com grande variação no tamanho, evidenciando a existência de partículas menores e agregados de partículas. Esta morfologia indica um estágio intermediário entre a formação de brotos coprecipitados e nanoplacas hidrotermais.

A Figura 25 (A, B) evidencia um arranjo floral individual, formado por facetas florais de ZnO, a partir de partículas menores, com comprimento médio 23 nm, sendo 70% com comprimento de até 20 nm.

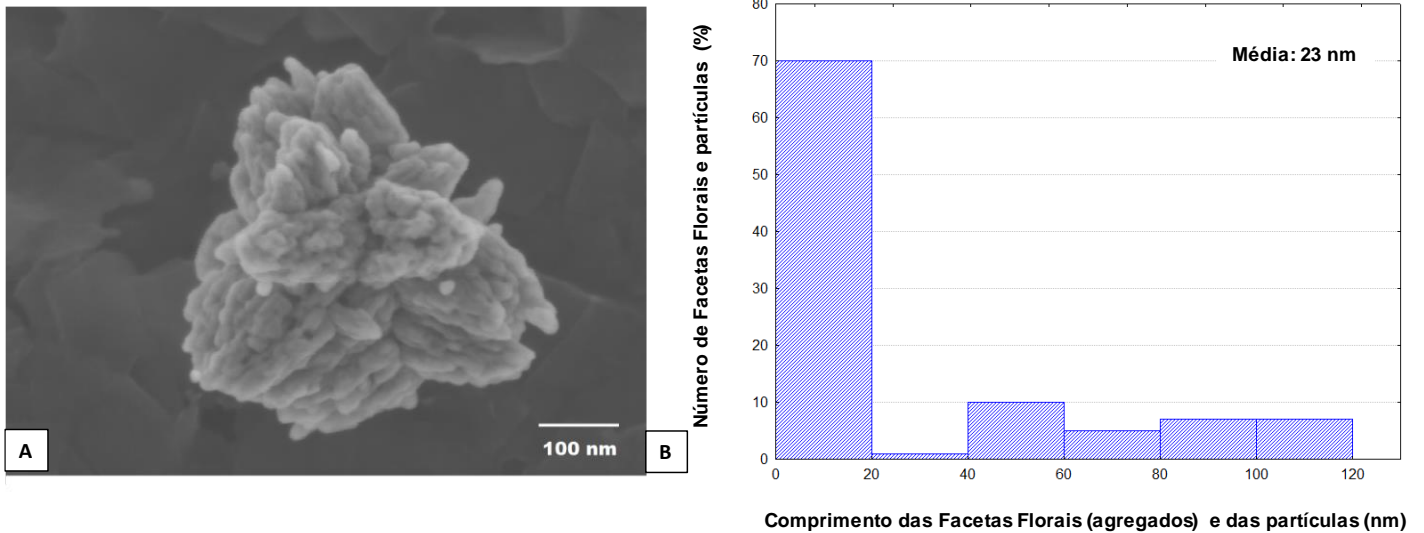


Figura 25 (A, B) - Imagem de microscopia eletrônica de um arranjo floral de ZnO Hidrotermal por 2 horas sem PMAA na forma de pó, e o histograma de distribuição do comprimento médio das facetas florais (agregados de partículas) e das partículas menores, respectivamente.

A Figura 26 (A, B) mostra a micrografia eletrônica das amostras de ZnO Hidrotermal por 2 horas com o dispersante PMAA em morfologia floral e seu respectivo histograma de distribuição do diâmetro médio destes arranjos e das partículas menores.

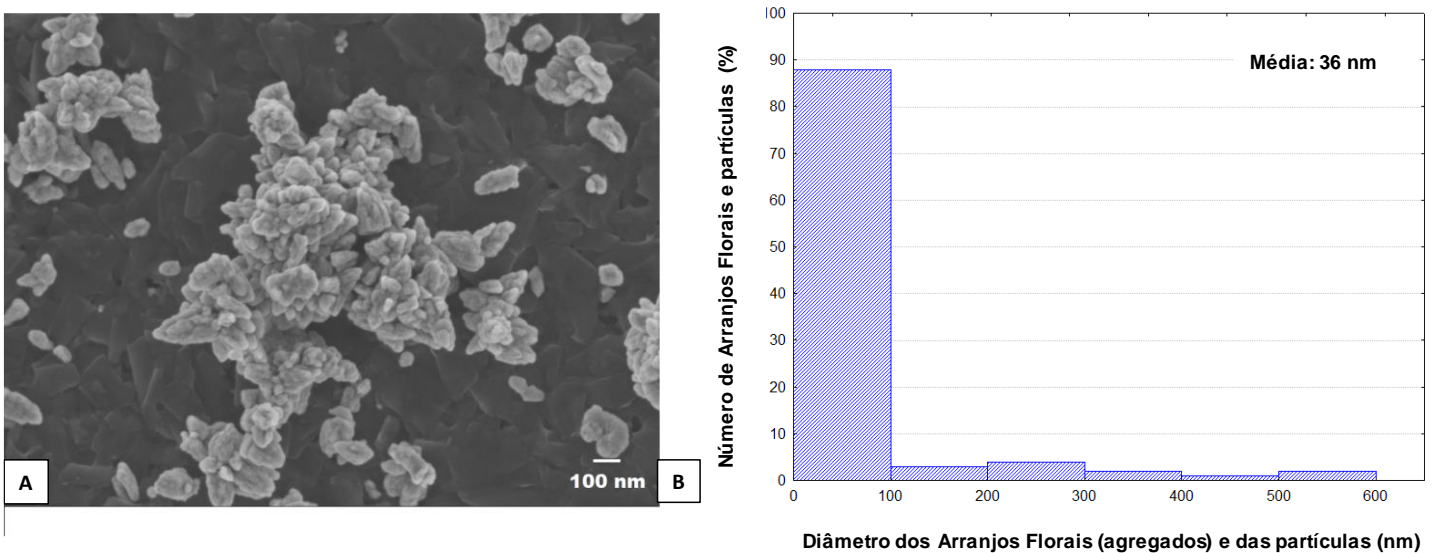


Figura 26 (A, B) - Imagem de microscopia eletrônica da amostra de ZnO Hidrotermal por 2 horas com PMAA na forma de pó, e o histograma de distribuição do diâmetro médio dos arranjos florais (agregados de partículas) e das partículas, respectivamente.

A ação do dispersante PMAA para a síntese hidrotérmica no período de 2 horas mostrou-se bastante eficaz, desaglomerando consideravelmente os arranjos florais



obtidos (Figura 26A), porém houve uma leve distorção na morfologia floral, a qual se mostrou um pouco irregular quando comparada a síntese sem o PMAA. O diâmetro médio obtido foi de 36 nm, evidenciando uma distribuição heterogênea, uma vez que houve a formação dos agregados de partículas e das partículas menores (Figura 26B).

Observou-se que o diâmetro médio dos arranjos florais diminuiu para a amostra de ZnO tratada termicamente quando comparado com o valor obtido para a amostra sem o PMAA.

A Figura 27 (A, B) apresenta uma unidade individual em formato de flor e seu respectivo histograma de distribuição do comprimento médio das facetas florais de ZnO, e das partículas menores para a amostra de ZnO Hidrotermal por 2 horas com PMAA.

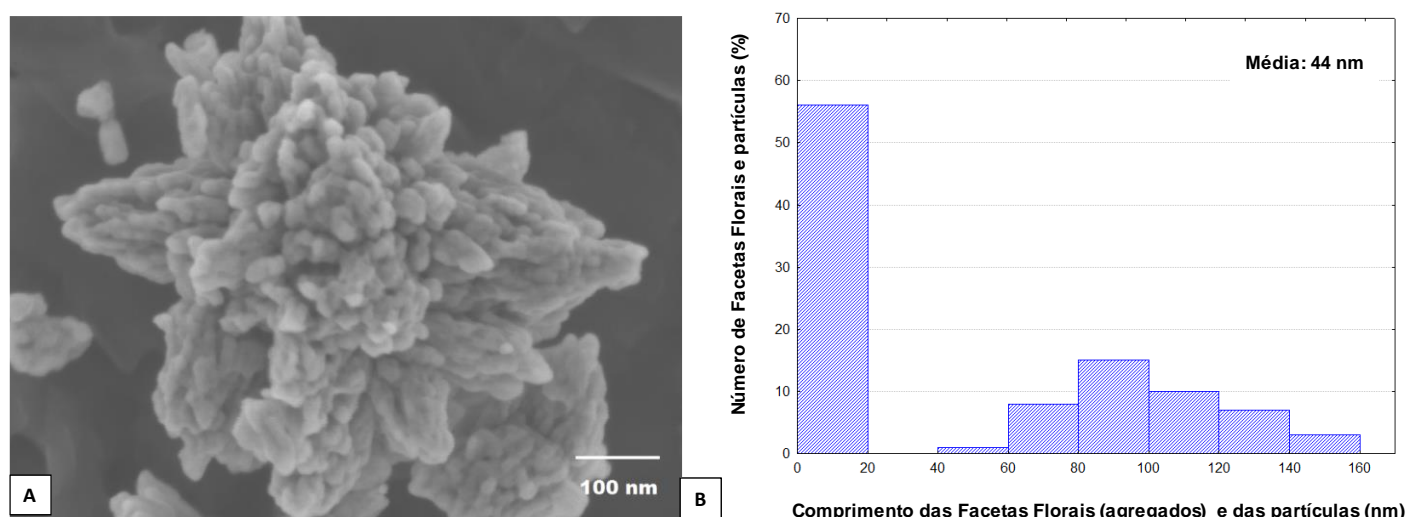


Figura 27 (A, B) - Imagem de microscopia eletrônica de um arranjo floral individual de ZnO Hidrotermal por 2 horas com PMAA na forma de pó, e o histograma de distribuição do comprimento médio das facetas florais (agregados de partículas) e das partículas menores, respectivamente.

O arranjo floral individual de nanopartículas de ZnO tratadas termicamente com PMAA mostrou melhor definição em sua morfologia e apresentou um comprimento médio das facetas florais e das partículas menores de 44 nm, evidenciando um aumento quando comparado ao comprimento das facetas florais sem ação do dispersante. De forma similar as amostras sem PMAA, a maioria das partículas que formam estas facetas apresentaram comprimento de até 20 nm.

No trabalho de Motoc et al. (2015), também obteve-se nanopartículas de ZnO por meio de um processo hidrotérmico simples, o qual resultou em nanoestruturas com morfologia floral. O diâmetro encontrado para a maioria das partículas foi em torno de

10 nm, sendo consideravelmente menor que o diâmetro obtido para os arranjos florais deste trabalho.

### 6.1.2 Difractometria de Raios-X

Pode-se observar nos difratogramas de Raio- X das amostras sintetizadas que houve a formação de ZnO monofásico com estrutura hexagonal de acordo com a ficha cristalográfica JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) n°36-1451. Os picos cristalográficos obtidos estão relacionados à célula unitária hexagonal do tipo wurtzita, com grupo espacial  $P63mc$  (186).

A Figura 28 apresenta os difratogramas das nanopartículas de ZnO Coprecipitado (morfologia de brotos), ZnO Hidrotermal 30 minutos com morfologia de placas, ZnO hidrotermal 30 minutos com PMAA ainda em morfologia de placas, ZnO hidrotermal 2 horas com morfologia floral e ZnO hidrotermal 2 horas com PMAA em morfologia floral também, respectivamente.

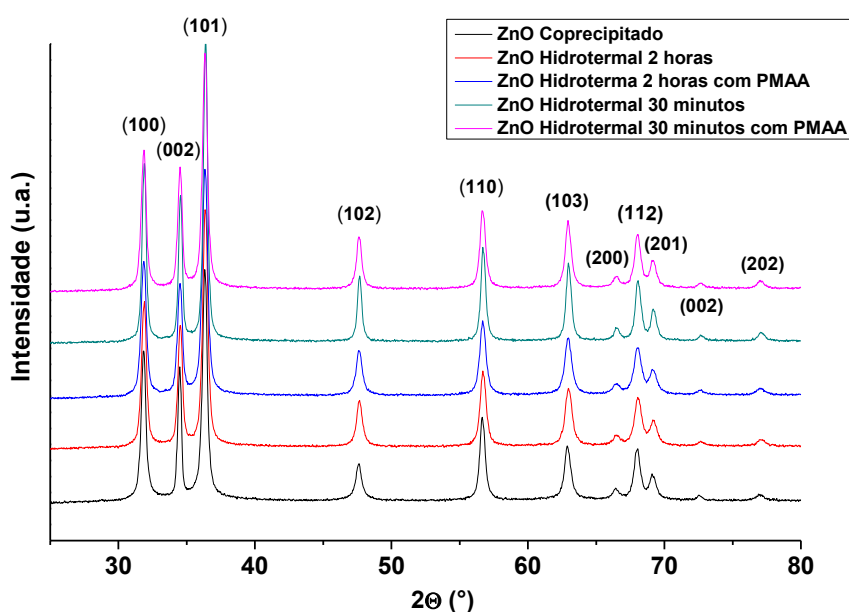


Figura 28 - Difractometria de raios-X das amostras de ZnO Coprecipitada e Hidrotermais nos períodos de 30 minutos e 2 horas, com e sem o dispersante PMAA, respectivamente.

Todos os picos de difração estão bem definidos, indicando a formação da fase cristalina com uma alta organização. Esse resultado indica que o ZnO pode ser obtido facilmente em curto tempo pelo método hidrotermal.

As estruturas cristalográficas para o ZnO obtidas nos trabalhos de Libanori (2011), Oliveira (2009) e Quirino et al. (2014) foram bastante similares às encontradas neste estudo. Da mesma forma, a análise deste estudo corroborou com os picos cristalográficos encontrados nas amostras do trabalho de Feltrin (2010).

### 6.1.3 Método de Brunner-Emmet-Teller (BET) e Potencial Zeta

A Tabela 6 apresenta os valores obtidos do potencial Zeta (mV), da área superficial específica ( $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ ) e do diâmetro (DM) e comprimento médios (CM) (nm) das nanopartículas de ZnO Coprecipitado, ZnO Hidrotermal por 30 minutos com e sem PMAA e ZnO Hidrotermal 2 horas com e sem PMAA, respectivamente.

Tabela 6 - Valores da área superficial específica (AS) ( $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ ), do diâmetro (DM) e comprimento (CM) médios (nm) e do potencial Zeta (mV) obtidos para as nanopartículas de ZnO coprecipitado, ZnO hidrotermal (30 minutos) com e sem PMAA e ZnO hidrotermal (2 horas) com e sem PMAA, respectivamente.

	AS ( $\text{m}^2\text{g}^{-1}$ )	DM (nm)	DM (nm) - Arranjos florais	CM (nm) - Facetas florais	Potencial Zeta (mV)
ZnO Coprecipitado	11	202	-	-	28
ZnO Hidrotermal (30 minutos)	11	83	-	-	27
ZnO Hidrotermal (30 minutos) com PMAA	11	67	-	-	24
ZnO Hidrotermal (2 horas)	12	-	85	23	26
ZnO Hidrotermal (2 horas) com PMAA	10	-	36	44	26

Os valores de área superficial específica para todas as nanopartículas mostraram-se adequadas conforme o esperado, ressaltando a síntese hidrotérmica 2 horas com o PMAA, com o menor valor de área obtido, sendo  $10 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ .

No trabalho de Quirino et al. (2014), a área superficial para a síntese hidrotérmica de ZnO no período de 30 minutos a  $100^\circ \text{C}$  com morfologia de flores apresentou-se mais elevada quando comparada a encontrada neste trabalho, sendo de  $18,06 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ .

Segundo os autores, este valor pode estar relacionado com a formação de aglomerados que resultam em flores e esferas lamelares, os quais estão na escala micrométrica, com diâmetros menores que  $3 \mu\text{m}$ . Zhang et al. (2011) obtiveram nanopartículas com valor de área superficial igual a  $1,866 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ . Nota-se que o aumento da temperatura e o maior intervalo de tempo de tratamento hidrotérmica tende a diminuir a área superficial das partículas.

O trabalho de Miao et al. (2014) estudando a aplicação de nanopartículas de ZnO comercial para degradação fotocatalítica heterogênea obteve um valor de AS de  $20,2 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ , corroborando com o tamanho de partícula que foi de  $40 \text{ nm}$ .



No estudo de Fang et al. (2015), as amostras de ZnO sintetizadas para fins de processos fotocatalíticos obtiveram valores de AS entre 3 a 6 m<sup>2</sup>g<sup>-1</sup>. Neste mesmo estudo, observou-se que quanto mais ácido o pH, mais estável se tornava a partícula em suspensão (carga superficial de 30mV), enquanto que para pH básico, os valores de Zeta se tornavam negativos, atingindo até -30mV.

A análise de potencial Zeta das nanopartículas de ZnO em suspensão mostrou elevada estabilidade de carga superficial, sendo o valor obtido para as nanopartículas de ZnO coprecipitado próximo de  $\pm 30\text{mV}$  (MOTSKIN et al., 2009), seguido das nanopartículas hidrotermais 30 minutos com morfologia de placas sem PMAA e ambas as nanopartículas hidrotermais com morfologia de arranjos florais. As nanopartículas de ZnO hidrotermal 30 minutos com PMAA apresentaram menor estabilidade, conforme expresso na Tabela 6.

Estes valores indicam uma suspensão mais estável que os valores encontrados por Libanori (2011), cujo valor de potencial zeta encontrado para as nanopartículas de ZnO foi em torno de -4,0mV, indicando considerável instabilidade de carga superficial ácida, devido ao método de síntese da polimerização de complexos.

De acordo com a análise do histograma de distribuição, o valor do diâmetro médio foi maior para as nanopartículas de ZnO coprecipitado quando comparado aos valores das nanopartículas de ZnO hidrotermais, por conta do crescimento rápido e morfologia obtidos, já mencionados anteriormente.

Segundo descrito na tabela acima, os valores do diâmetro médio das partículas apresentaram-se coerentes para as amostras coprecipitada e hidrotermais 30 minutos com e sem PMAA na morfologia de nanoplacas, sendo os valores obtidos para a síntese hidrotérmica de 30 minutos mais próximos.

Para a amostra de ZnO hidrotermal 2 horas sem PMAA, em morfologia de arranjos florais, o diâmetro médio foi de 85 nm, sendo que para a síntese de 2 horas com o dispersante obteve um valor abaixo da metade do diâmetro para os arranjos florais sem PMAA (36 nm).

Pode-se observar na Tabela 6 que, o comprimento médio das facetas florais sintetizadas sem PMAA foi menor que o valor encontrado para as facetas florais da síntese com o PMAA. Este fato evidencia que a utilização do PMAA pode ter influenciado no aumento do tamanho destas estruturas. Os resultados expressos pela Tabela 6 indicaram uma caracterização mais precisa para os 5 nanofertilizantes

sintetizados, afim de se avaliar as dimensões das nanoestruturas e a estabilidade de carga superficial.

#### 6.1.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A Figura 29 apresenta os espectros de FTIR para as nanopartículas de ZnO coprecipitado, e para as nanopartículas que foram submetidas ao processo hidrotérmal à 150°C, ZnO hidrotérmicos (30 minutos) com e sem PMAA e ZnO (2 horas) com e sem PMAA, respectivamente.

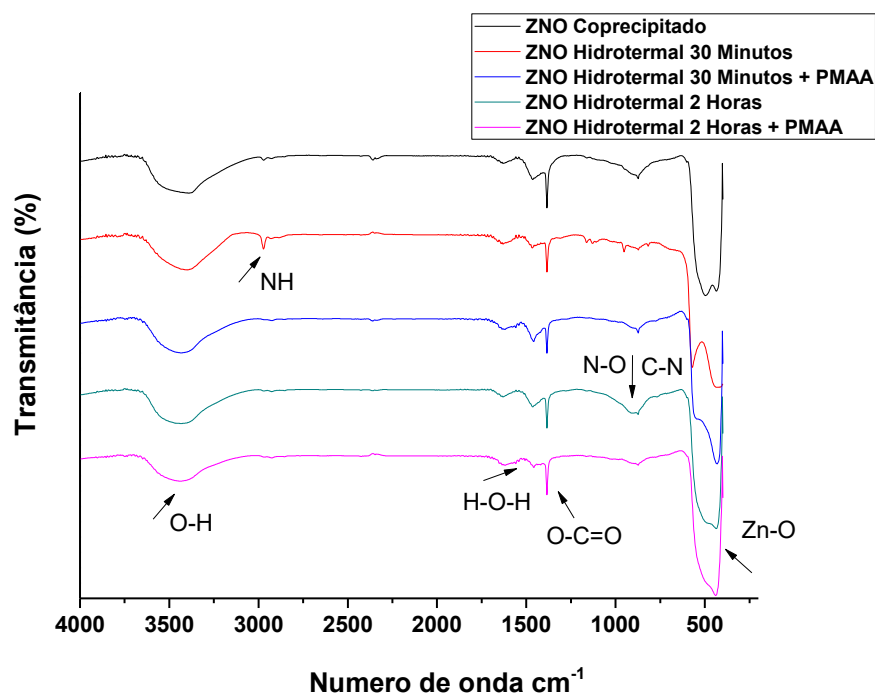


Figura 29 - Espectros na região do infravermelho (FTIR) das nanopartículas de ZnO coprecipitado, ZnO Hidrotérmico (30 minutos) com e sem PMAA e ZnO Hidrotérmico (2 horas) com e sem PMAA.

De acordo com a literatura, os espectros de FTIR para as nanopartículas de ZnO obtidos indicam que as bandas características correspondentes estão devidamente presentes nos espectros da Figura 29.

Com relação aos espectros obtidos das nanopartículas de ZnO Coprecipitado e ZnO Hidrotérmicos com e sem PMAA para ambos os períodos de tratamento hidrotérmico, pode-se observar a presença da banda característica do estiramento da ligação Zn-O na região entre 520 e 550  $\text{cm}^{-1}$  (GIRALDI et al., 2011).

A amostra de ZnO Coprecipitada apresentou uma banda na região de 3650 a 3300  $\text{cm}^{-1}$ , correspondente a deformação axial simétrica e assimétrica do grupo O-H, mais pronunciada que as bandas encontradas para as amostras de ZnO hidrotermais.

Entre as regiões 3250  $\text{cm}^{-1}$  e 3600  $\text{cm}^{-1}$  observou-se bandas largas referentes aos estiramentos do grupo O-H. Segundo Ferreira (2009) isso pode ocorrer devido a estruturas O-H de naturezas diferentes no material, como a água que é adsorvida na superfície do material ou água ligada na matriz inorgânica.

A região de aproximadamente 3600  $\text{cm}^{-1}$  apresenta um desdobramento, o qual indica que na superfície e entre as camadas internas das partículas há presença de moléculas de água.

A banda na região em aproximadamente 1630  $\text{cm}^{-1}$ , a qual corresponde a deformação angular simétrica do grupo H-O-H, está mais evidente nas amostras de ZnO Hidrotermal que na amostra de ZnO Coprecipitado (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010).

Observou-se a formação de bandas não identificadas e não esperadas nos espectros das amostras de ZnO, não pertencentes a estrutura cristalina de ZnO. Provavelmente estas bandas surgiram devido a uma eventual contaminação do material ou dos reagentes precursores utilizados na síntese, resultando em recristalização de subprodutos gerados como resultado final da síntese.

Por volta de 1000  $\text{cm}^{-1}$  há duas bandas que podem ser de ligações de N-O e/ou C-N e a banda próxima a 1500  $\text{cm}^{-1}$  mostra a formação de compostos carbonatados, como  $(\text{CO}_3)^{2-}$ .

Segundo Costa et al. (2009) bandas existentes na faixa entre 3640 e 3250  $\text{cm}^{-1}$  indicam a presença de vibrações de estiramento do grupo NH. O autor ressalta que banda entre 750 e 400  $\text{cm}^{-1}$  pode ser atribuída a ligação ZnO, mostrando a formação do óxido de zinco, assim como encontrado nos espectros do presente estudo.

Hussain e Rahman (2006) também encontraram resultados similares para os espectros obtidos de ZnO, os quais apresentaram co-adsorção de  $\text{N}_2\text{O}$  e CO sobre a estrutura cristalina de ZnO.

Os importantes resultados obtidos pela análise de FTIR encontrados neste trabalho evidenciaram a formação dos compostos de ZnO de forma coerente com os resultados descritos pela literatura.

## **6.2 Bioensaios de nanotoxicidade para as nanopartículas de ZnO**

### **6.2.1 Curvas de Crescimento**

As curvas de crescimento da microalga *P. subcapitata* foram plotadas usando o modelo proposto por Baranyi e Roberts (1994) com o auxílio do software DMFit para gerar os ajustes das curvas de crescimento algáceo.

As Figuras 30, 31, 32, 33 e 34 mostram os ajustes das curvas de crescimento algáceo, em triplicatas, da microalga *P. subcapitata*, em função do tempo, em horas, para as nanopartículas de ZnO coprecipitada, ZnO hidrotermal (30 minutos) sem e com PMAA e ZnO hidrotermal (2 horas) sem e com PMAA, comparando com as amostras controles, respectivamente.

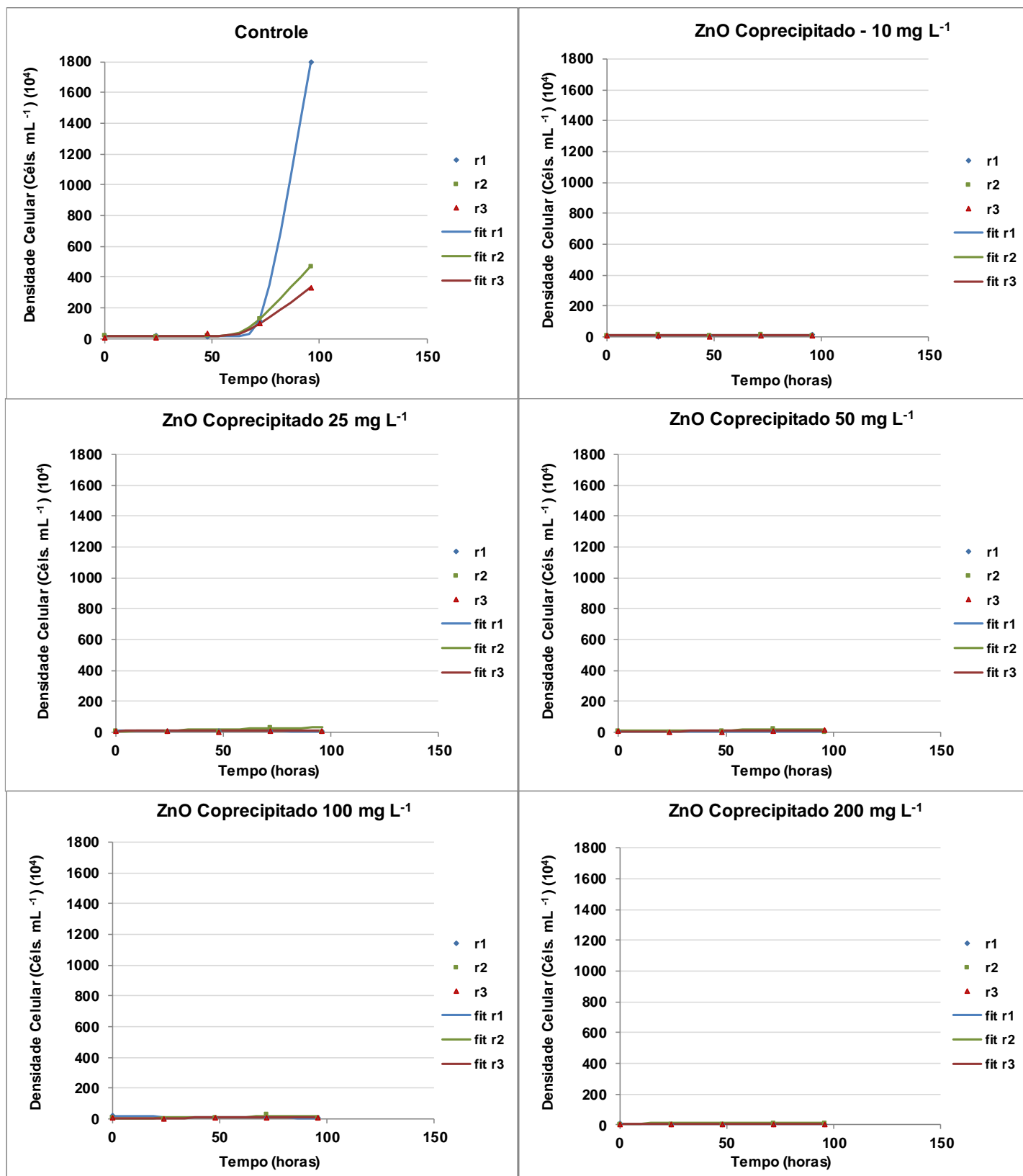


Figura 30 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao nanofertilizante de ZnO Coprecipitado, para as distintas concentrações e para o respectivo controle.

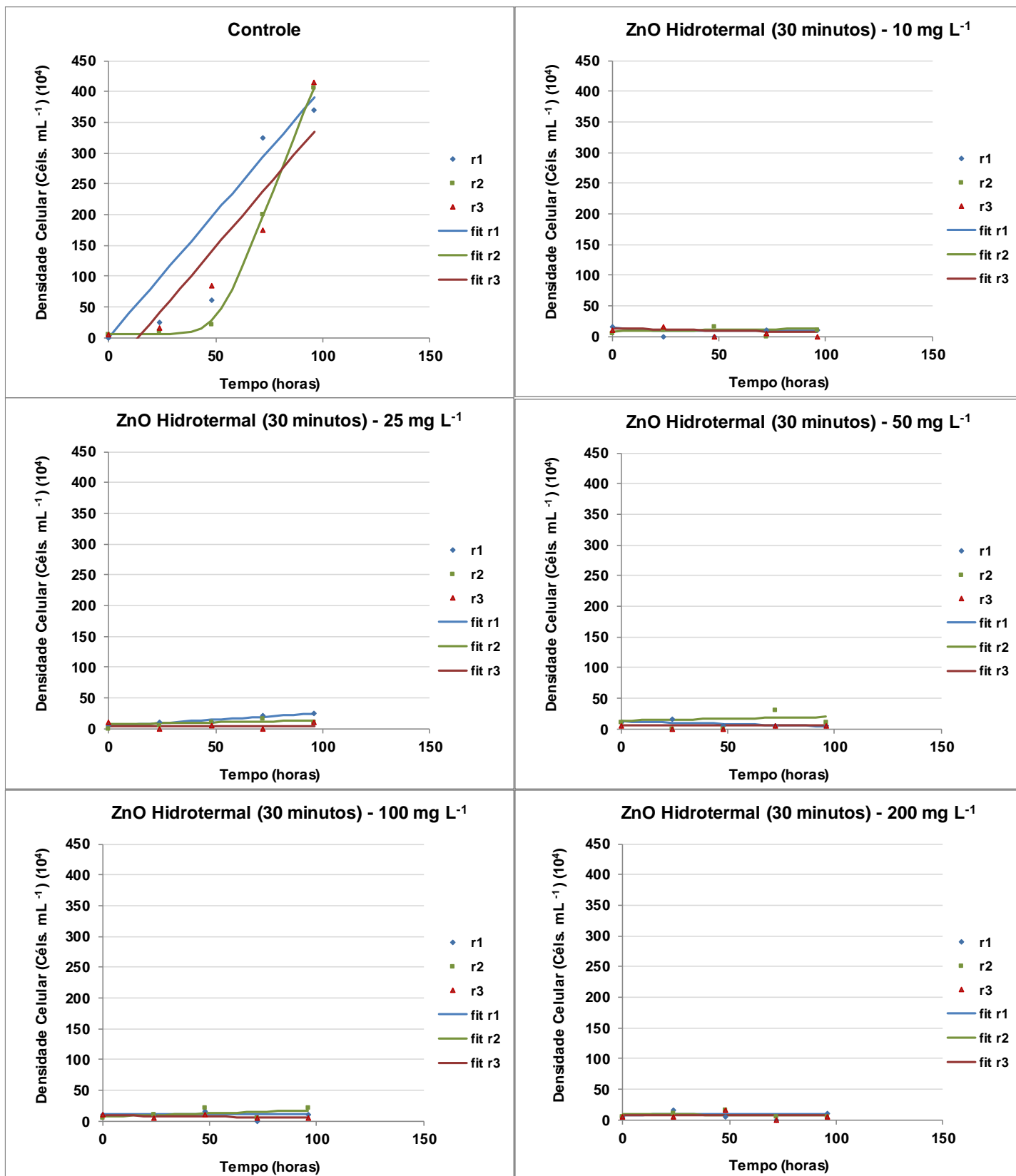


Figura 31 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao nanofertilizante de ZnO Hidrotermal (30 minutos) sem PMAA, para as distintas concentrações e para o respectivo controle.

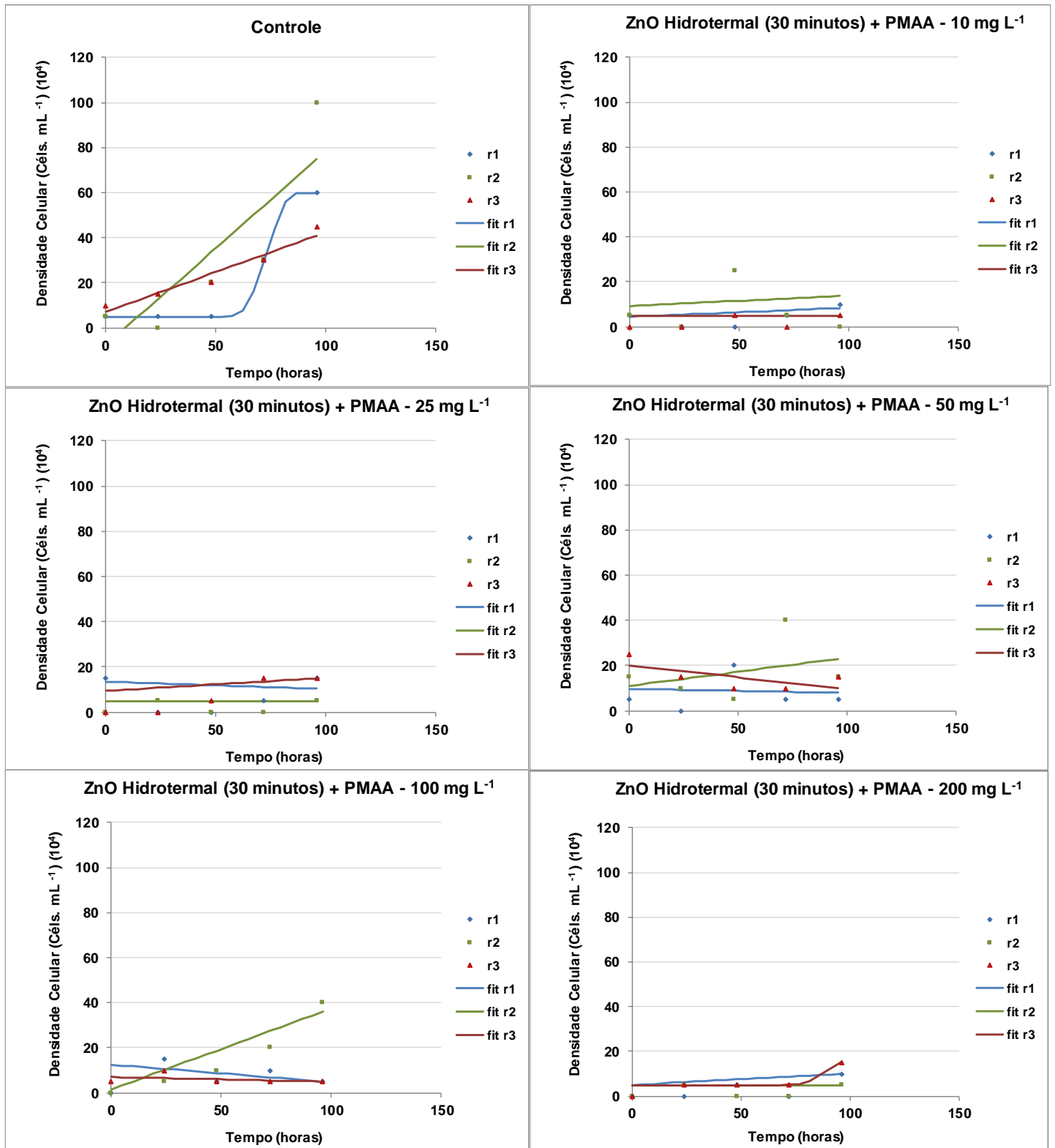


Figura 32 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao nanofertilizante de ZnO Hidrotermal (30 minutos) com PMAA, para as distintas concentrações e para o respectivo controle.

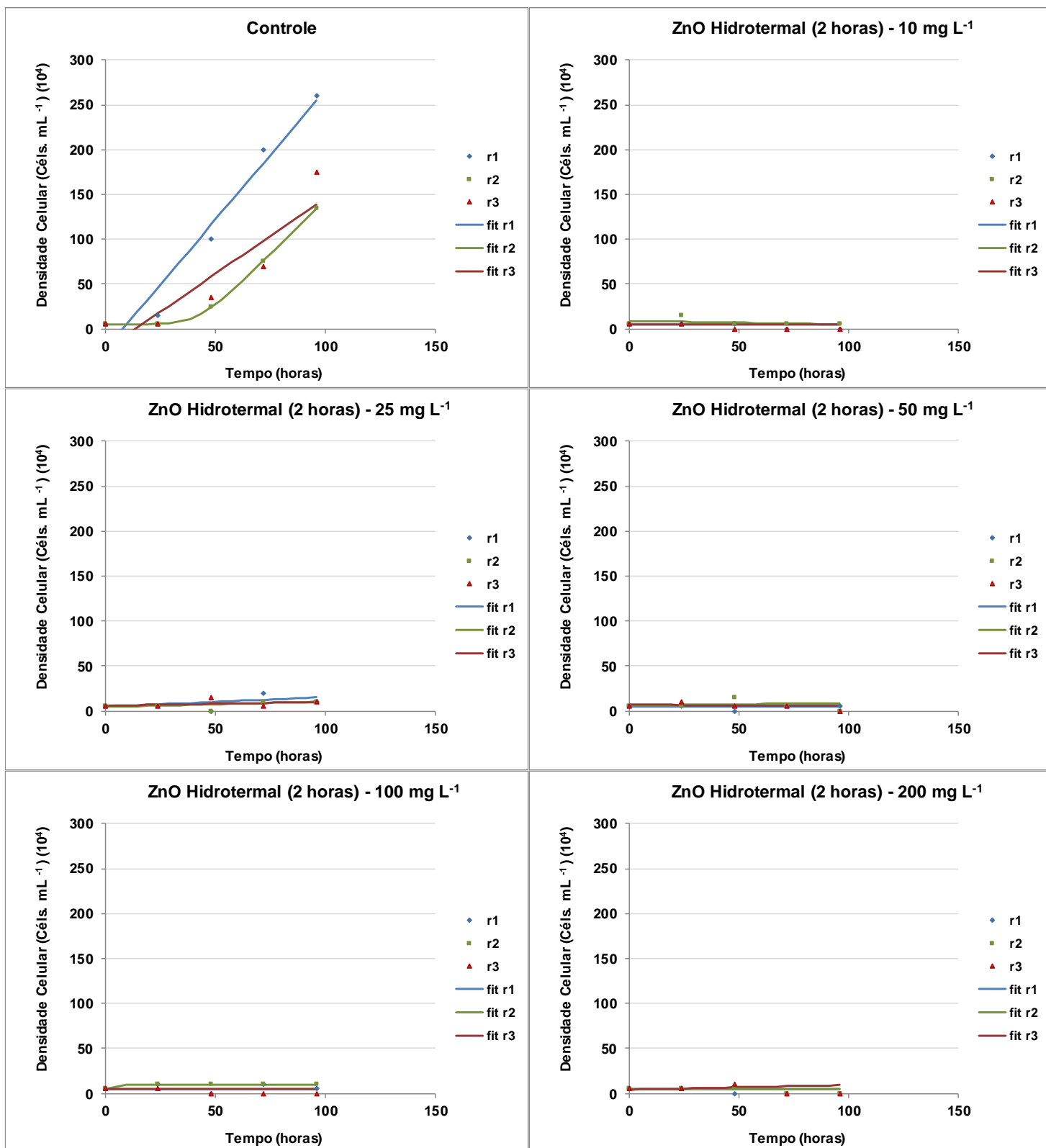


Figura 33 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao nanofertilizante de ZnO Hidrotermal (2 horas) sem PMAA, para as distintas concentrações e para o respectivo controle.



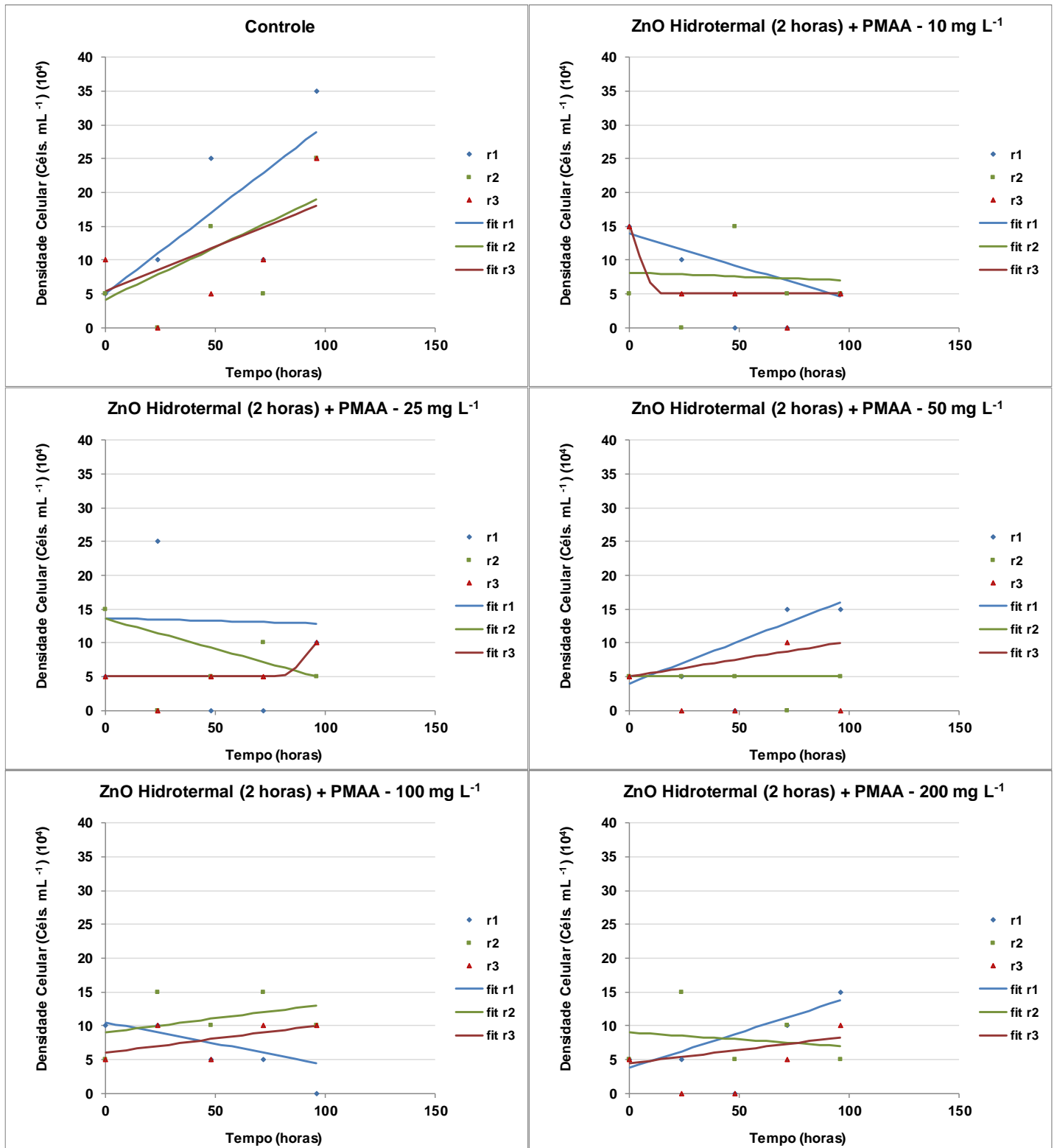


Figura 34 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao nanofertilizante de ZnO Hidrotermal (2 horas) com PMAA, para as distintas concentrações e para o respectivo controle.

Em geral, as curvas de crescimento da *P. subcapitata* expostas às nanopartículas de ZnO (Figuras 30 a 34) não foram facilmente ajustadas para todas as triplicatas das concentrações empregadas.

Observou-se que as densidades celulares foram mais próximas de seus respectivos controles para as nanoplacas de ZnO hidrotermal com PMAA, assim como para os arranjos florais de ZnO hidrotermal com PMAA, evidenciando menor efeito tóxico para as microalgas.

Entretanto, para todas as nanopartículas de ZnO estudadas houve elevada inibição do crescimento algáceo, atingindo maior valor de densidade celular de 40 céls.mL<sup>-1</sup> na replica r2 em 100 mg L<sup>-1</sup> referente ao bioensaio de ZnO hidrotermal (30 minutos) com PMAA.

As Figuras E.1 e E.2 apresentam as curvas de crescimento de *P. subcapitata* quando exposta ao dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA) e seus respectivos controles (meio de cultura W.C.) para os bioensaios de ZnO hidrotermal (30 minutos) com PMAA e ZnO hidrotermal (2 horas) com PMAA. Embora o controle-positivo, dispersante PMAA, apresentou toxicidade extremamente alta para a *P. subcapitata*, não houve interferência para os resultados de nanotoxicidade das nanopartículas de ZnO, não falseando os efeitos de toxicidade, uma vez que o dispersante foi totalmente removido da superfície das nanopartículas, sendo confirmados com as análises de FTIR realizadas.

Estudos com nanopartículas de óxido de cobre (CuO), óxido de zinco (ZnO), óxido de titânio (TiO<sub>2</sub>) e óxido de sílica (SiO<sub>2</sub>) têm comprovado o quanto são tóxicas para as células de *P. subcapitata*, assim como para as demais espécies de microalgas, como os relatados em Aruoja et al. (2009), Clément, Hurel e Marmier (2013), Franklin et al. (2007), Machado e Soares (2014), Van Hoecke (2008) e Wang et al. (2008).

O trabalho de Ji, Long e Lin (2011) avalia a toxicidade das nanopartículas de Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, SiO<sub>2</sub>, ZnO, and TiO<sub>2</sub> para a espécie de microalga *Chlorella* sp. Os experimentos com o ZnO mostraram maior inibição do crescimento das microalgas para as partículas na forma nano do que na forma a granel, em concentrações menores que 50 mg L<sup>-1</sup>.

## 6.2.2 Análises dos parâmetros das curvas de crescimento

A Figura 35 apresenta a velocidade do crescimento algáceo ( $\text{céls.mL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) da *P. subcapitata* em função da concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para as diferentes nanopartículas de ZnO.

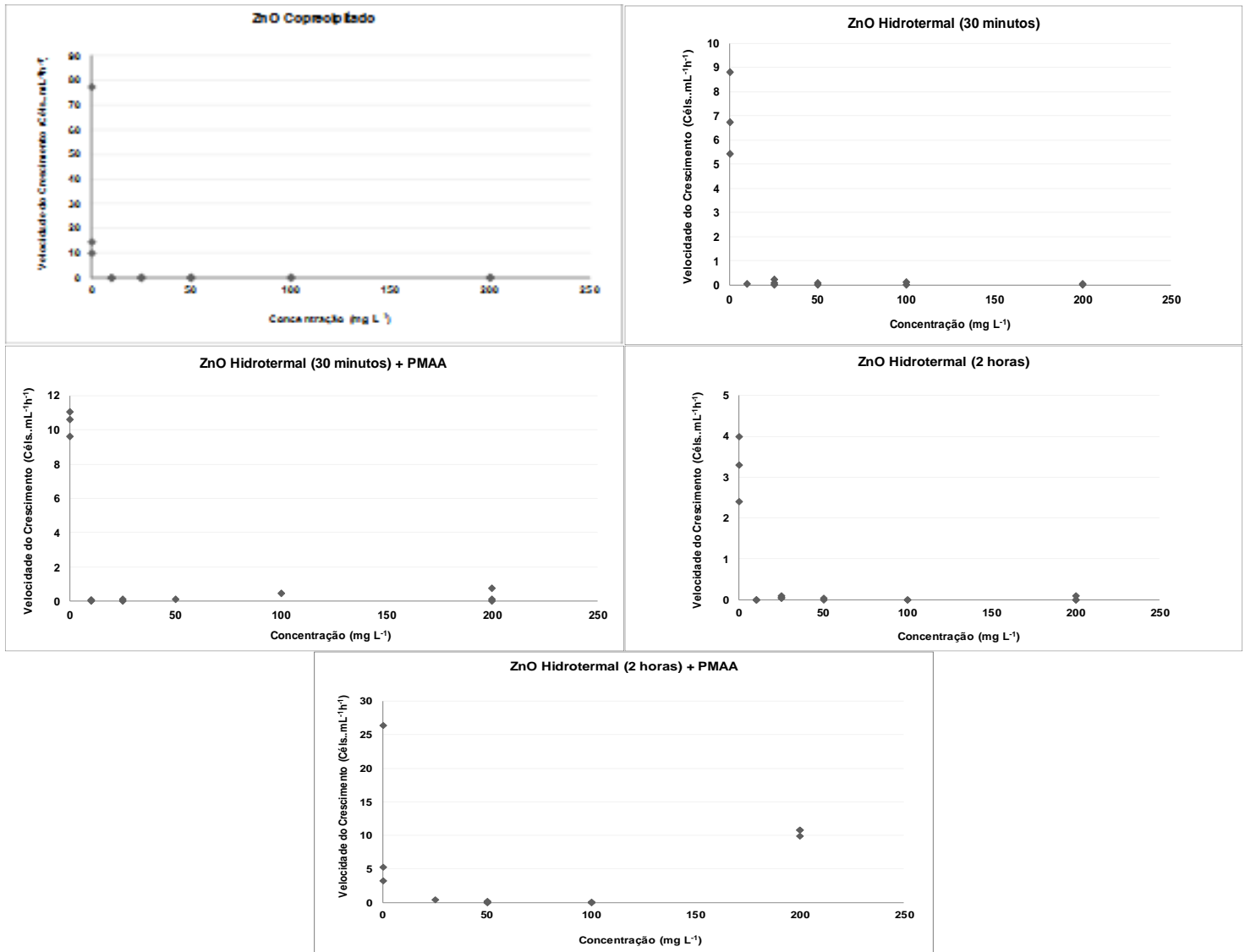


Figura 35 - Velocidade do crescimento ( $\text{céls.mL}^{-1}\text{h}^{-1}$ ) da *P. subcapitata* em função da concentração ( $\text{mg L}^{-1}$ ) para as nanopartículas de ZnO Coprecipitada, ZnO Hidrotermal (30 minutos), ZnO Hidrotermal (30 minutos) com PMAA, ZnO Hidrotermal (2 horas) e ZnO Hidrotermal (2 horas) com PMAA, respectivamente.

O comportamento da velocidade do crescimento para a microalga mostrou que não foi possível realizar os ajustes por regressão linear a partir das curvas de crescimento.

Observou-se que para as nanopartículas hidrotermais com PMAA houve um sutil aumento na velocidade do crescimento algáceo de algumas réplicas, porém não foi possível o ajuste adequado.

Diante do acentuado efeito tóxico para as microalgas não foi possível avaliar o comportamento da duração da fase lag. O modelo de regressão linear não conseguiu estimar e avaliar o comportamento das variáveis dependentes de forma esperada, principalmente para a duração da fase lag, uma vez que a inibição da velocidade do crescimento foi extremamente alta. Por isso, não foi possível se obter os intervalos de confiança e os valores estatísticos através do teste t-student para os distintos bioensaios.

Os valores de 72h-IC50 não foram obtidos para todos os bioensaios, uma vez que não houve a fase lag de crescimento algáceo.

### 6.2.3 Análise da Estabilidade de carga superficial das nanopartículas de ZnO no meio de cultivo W.C.

Os valores de potencial zeta das diferentes nanopartículas de ZnO dispersas em meio de cultura W.C. foram também aferidas para as concentrações de 10 mg L<sup>-1</sup>, 25 mg L<sup>-1</sup>, 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup> (Tabela 7).

Tabela 7 - Valores do potencial zeta (mV) para as amostras de ZnO Coprecipitado, ZnO Hidrotermal (30 minutos) e ZnO Hidrotermal (2 horas) sem e com PMAA dispersas em 100 mL do meio de cultura W.C.

Nanopartículas ZnO + 100 mL Meio de Cultivo W.C.	Potencial Zeta (mV)				
	Concentrações de ZnO (mg L <sup>-1</sup> )				
	10 mg L <sup>-1</sup>	25 mg L <sup>-1</sup>	50 mg L <sup>-1</sup>	100 mg L <sup>-1</sup>	200 mg L <sup>-1</sup>
ZnO Coprecipitada	-27,33	-25,40	-26,37	-25,40	-28,03
ZnO Hidrotermal (30 minutos)	-28,70	-26,80	-27,28	-23,30	-26,29
ZnO Hidrotermal (30 minutos) com PMAA	-27,38	-29,37	-28,42	-23,60	-27,52
ZnO Hidrotermal (2 horas)	-25,94	-25,93	-20,02	-20,63	-18,97
ZnO Hidrotermal (2 horas) com PMAA	-28,17	-30,43	-30,62	-30,20	-30,60

De modo geral, os valores de potencial zeta apresentados para as nanopartículas de ZnO mostraram-se com uma estabilidade moderada, destacando as nanopartículas hidrotermais com PMAA, em morfologias de arranjos florais e placas.

As nanopartículas de ZnO hidrotermal (2 horas) sem o dispersante apresentaram maior instabilidade a partir de 50 mg L<sup>-1</sup>.

#### 6.2.4 Comportamento do crescimento e análises morfológicas das microalgas

As imagens de MEV das células de *P. subcapitata* expostas às nanopartículas de ZnO Coprecipitado, ZnO Hidrotermal (30 minutos) sem e com PMAA e ZnO Hidrotermal (2 horas) sem e com PMAA foram mostradas nas Figuras 36 (A, B, C, D e E), respectivamente. De forma qualitativa, foram observadas mudanças morfológicas causadas nas células algais quando expostas ao nanofertilizante de ZnO.

As distintas nanopartículas de ZnO causaram o efeito de sombreamento para as células algáceas, contribuindo para o efeito nanotoxicológico, de forma a acentuar a diminuição do processo fotossintético e favorecer a inibição do crescimento (ARUOJA et al., 2009; GONG et al., 2011; LEE; AN, 2013; ZAMANI et al., 2014).

De um modo geral, observou-se a formação de um filme de nanopartículas de ZnO no meio dos bioensaios para todas as amostras sintetizadas.

A Figura 36 A mostra as imagens de MEV das microalgas para o bioensaio de ZnO Coprecipitado.

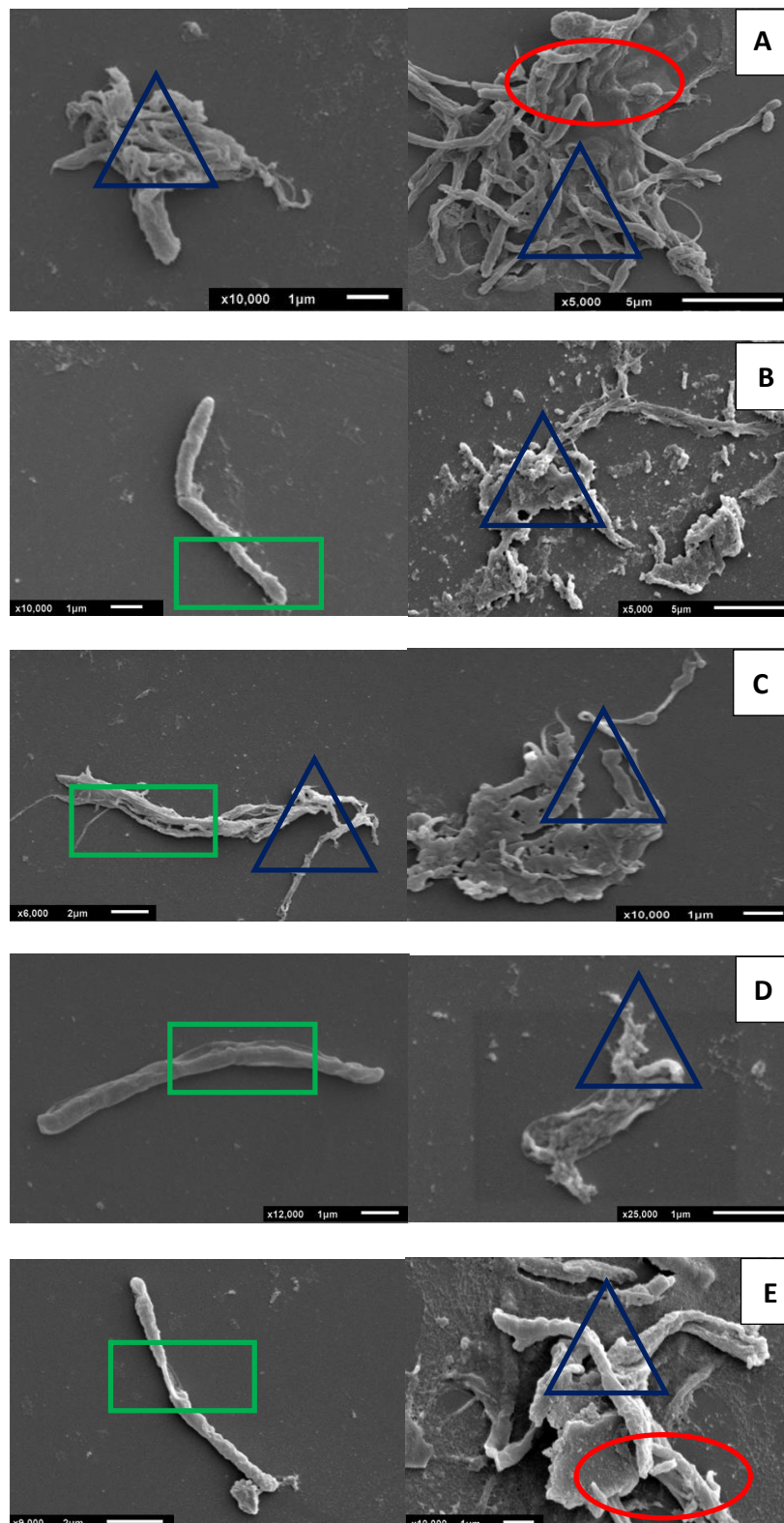


Figura 36 A - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de 10 mg L<sup>-1</sup> (a), 25 mg L<sup>-1</sup> (b), 50 mg L<sup>-1</sup> (c) 100 mg L<sup>-1</sup> (d) e 200 mg L<sup>-1</sup> (e) de ZnO Coprecipitado, respectivamente. Circulos vermelhos indicam aglomeração entre as nanopartículas com as células de microalgas. Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravazamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular.

As alterações morfológicas das células algais observadas para esta amostra mostraram que houve grande tendência ao alongamento e estreitamento celular (retângulos verdes), assim como destruição da camada mucilaginosa e extravazamento do material intracelular (triângulos azuis) para todos tratamentos.

Notou-se alguns pontos de aglomeração das células (círculo vermelho) entre si e com o material nos tratamentos de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  e  $200 \text{ mg L}^{-1}$ .

A Figura 36 B apresenta as imagens do MEV para as microalgas presentes no bioensaio de ZnO Hidrotermal (30 minutos) em morfologia de placas.

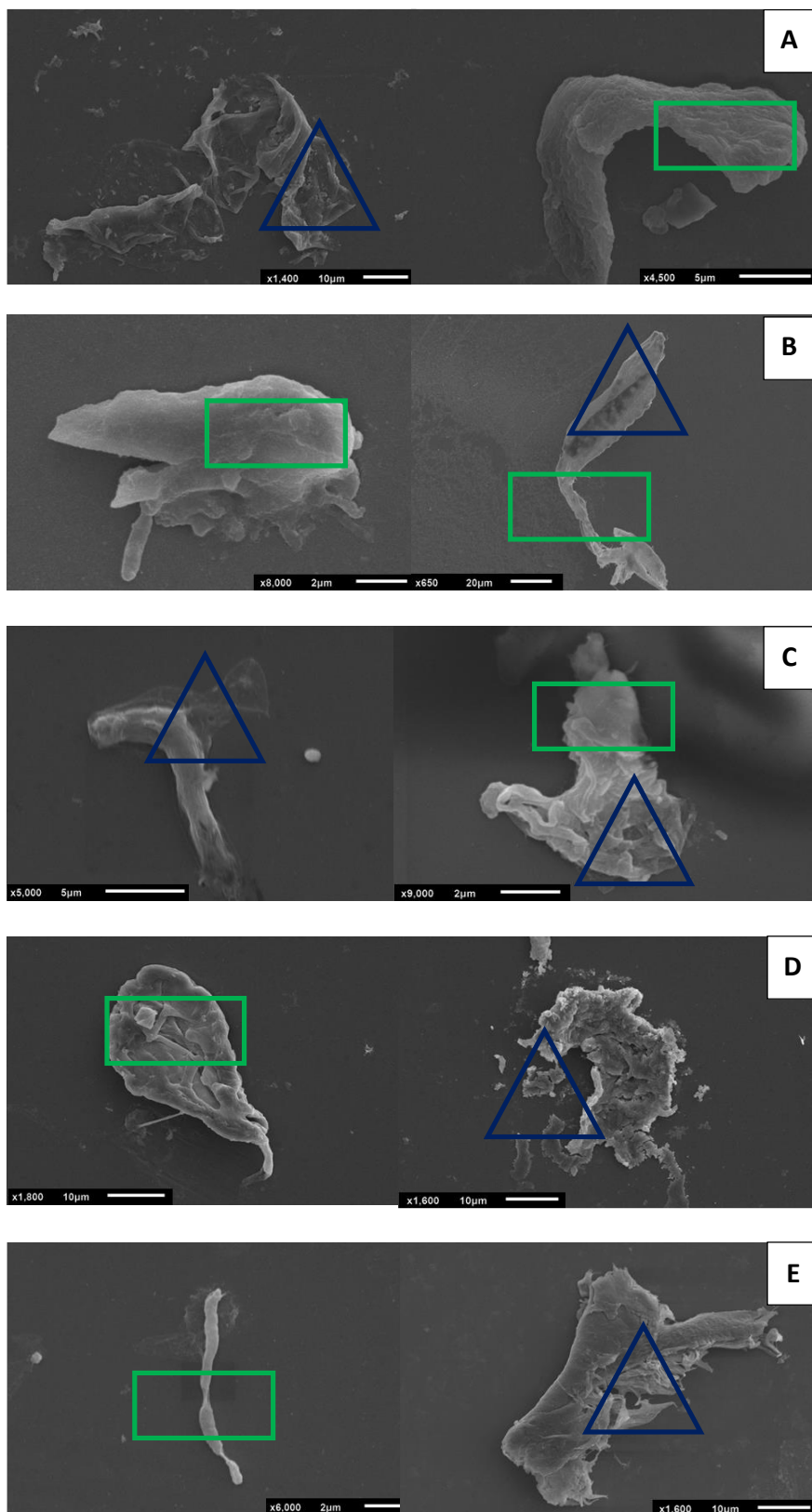


Figura 36 B - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de 10 mg L<sup>-1</sup> (a), 25 mg L<sup>-1</sup> (b), 50 mg L<sup>-1</sup> (c) 100 mg L<sup>-1</sup> (d) e 200 mg L<sup>-1</sup> (e) de ZnO Hidrotermal (30 minutos), respectivamente.

Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravasamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular.



As células de *P. subcapitata* apresentaram predominantemente alterações morfológicas tais como alongamento e estreitamento celular (retângulos verdes), aumento no volume celular (retângulos verdes) para a maioria das células e, destruição da camada mucilaginosa, assim como o extravazamento do material intracelular (triângulos azuis) para todos tratamentos.

A Figura 36 C mostra as imagens de MEV para as microalgas referentes ao bioensaio de ZnO Hidrotermal (30 minutos) com PMAA, em morfologia de placas.

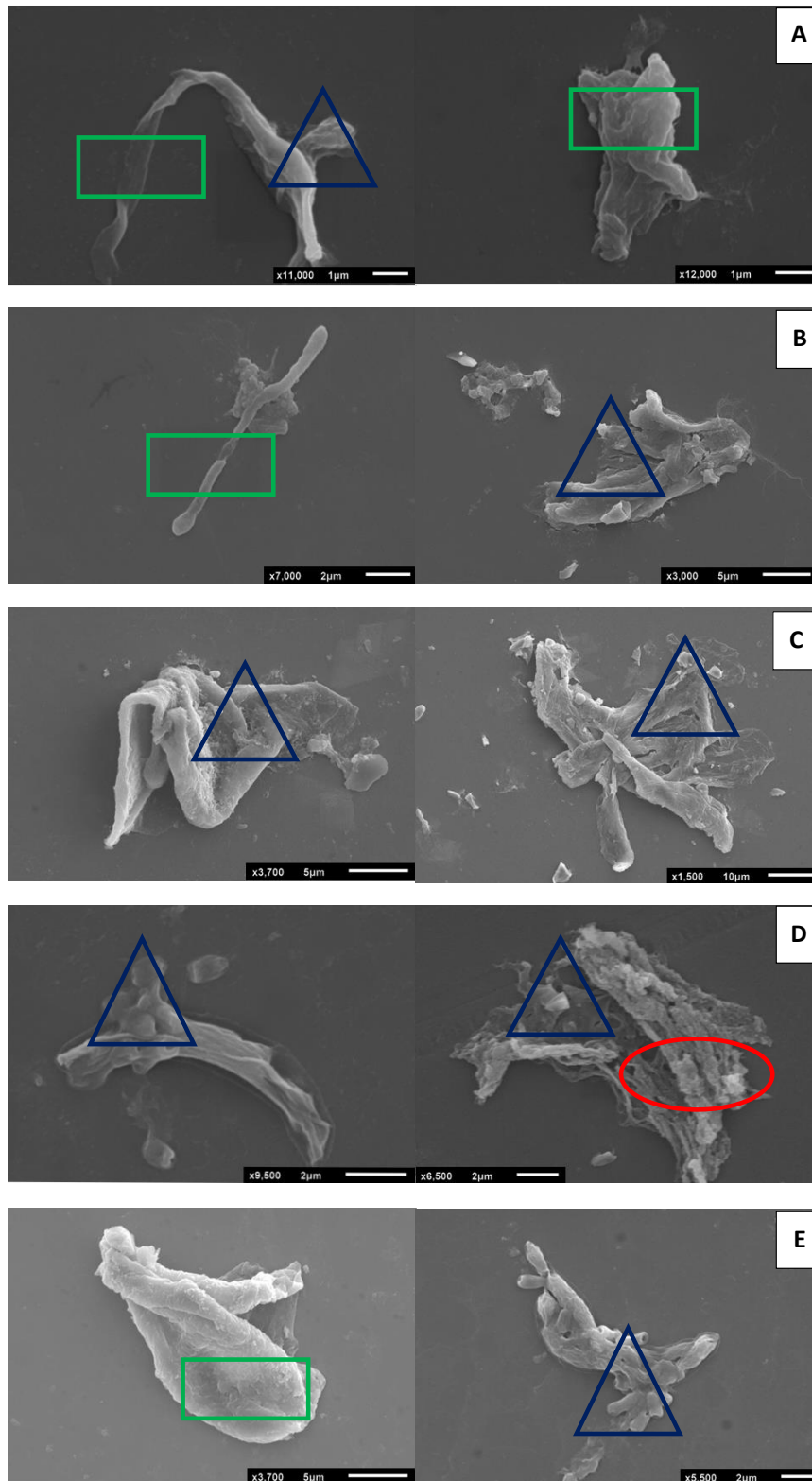


Figura 36 C - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de  $10 \text{ mg L}^{-1}$  (a),  $25 \text{ mg L}^{-1}$  (b),  $50 \text{ mg L}^{-1}$  (c)  $100 \text{ mg L}^{-1}$  (d) e  $200 \text{ mg L}^{-1}$  (e) de ZnO Hidrotermal (30 minutos) com PMAA, respectivamente. Circulos vermelhos indicam aglomeração entre as nanopartículas com as células de microalgas. Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravasamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular.

Para o bioensaio de ZnO com morfologia de placas dispersas, as imagens de MEV mostraram vários tipos de deformações celulares distintos, tais como alongamento e estreitamento celular (retângulos verdes), aumento no volume celular (retângulos verdes), destruição da camada mucilaginosa assim como o extravazamento do material intracelular (triângulos azuis) para todos tratamentos. No tratamento de 100 mg L<sup>-1</sup> foi observado regiões com aglomerados de células destruídas (círculo vermelho).

Na Figura 36 D têm-se as imagens de MEV para as microalgas do bioensaio de ZnO Hidrotermal (2 horas), em morfologia de arranjos florais.

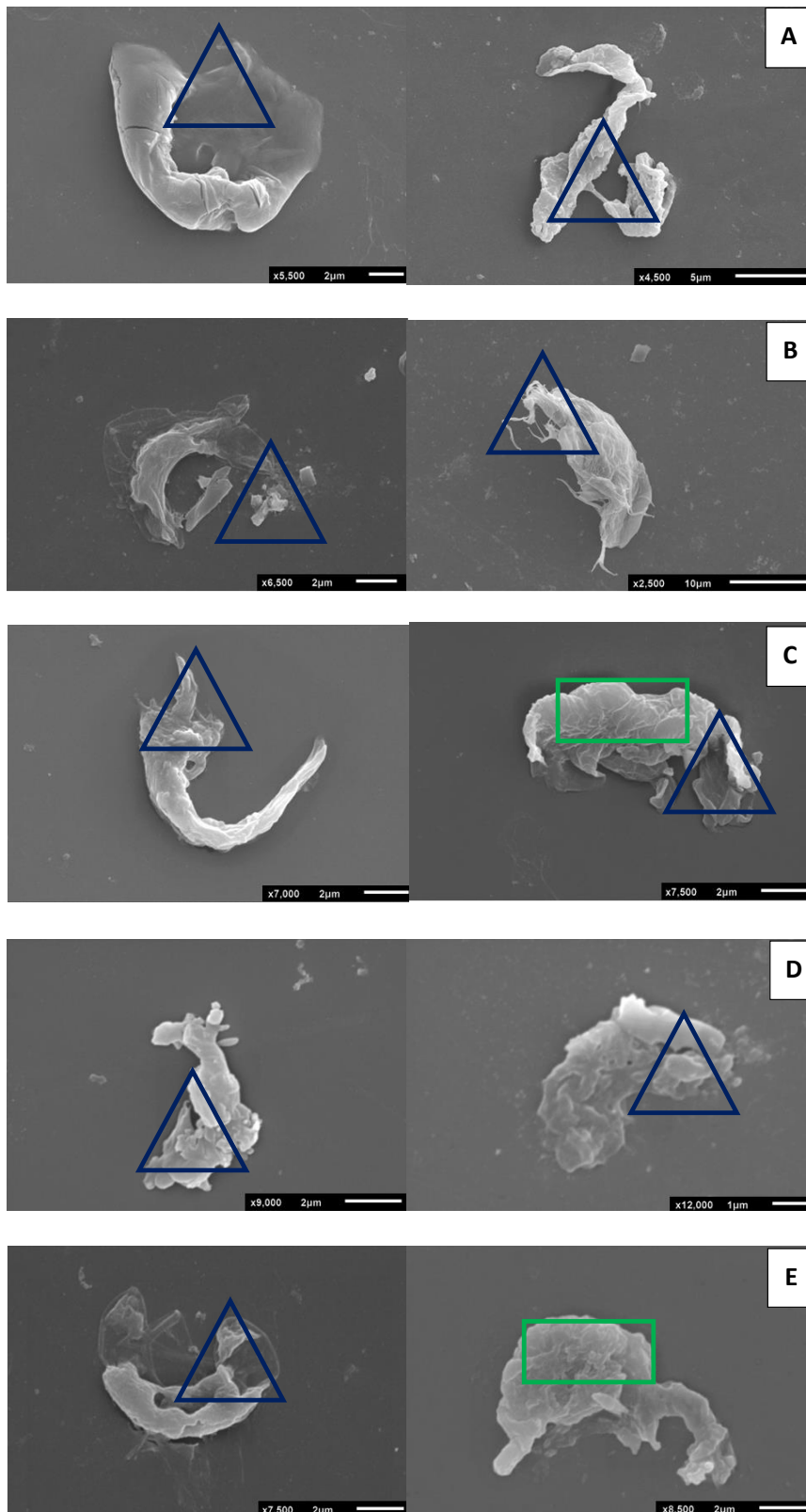


Figura 36 D - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de 10 mg L<sup>-1</sup> (a), 25 mg L<sup>-1</sup> (b), 50 mg L<sup>-1</sup> (c) 100 mg L<sup>-1</sup> (d) e 200 mg L<sup>-1</sup> (e) de ZnO Hidrotermal (2 horas), respectivamente.

Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravazamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular.

Neste bioensaio as células das microalgas apresentaram-se altamente destruídas, com danos na camada mucilaginosa e extravazamento de material intracelular (triângulos azuis), além de aumento no volume celular (retângulo verde).

A Figura 36 E revela as alterações morfológicas das células algáceas através imagens de MEV para o bioensaio de ZnO Hidrotermal (2 horas) com PMAA, em morfologia de arranjos florais mais dispersos.

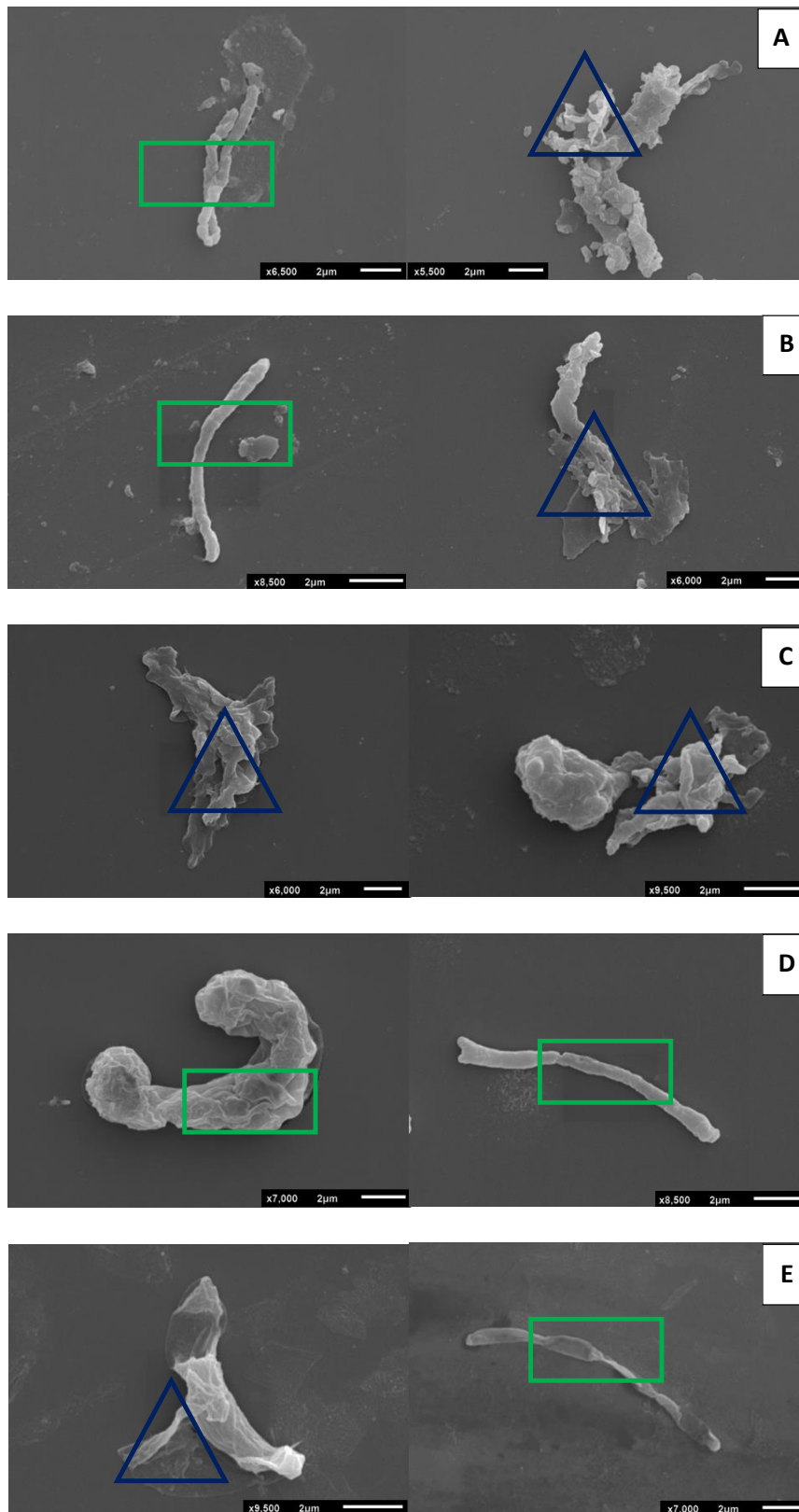


Figura 36 E - Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) da morfologia das microalgas quando expostas aos tratamentos de 10 mg L<sup>-1</sup> (a), 25 mg L<sup>-1</sup> (b), 50 mg L<sup>-1</sup> (c) 100 mg L<sup>-1</sup> (d) e 200 mg L<sup>-1</sup> (e) de ZnO Hidrotermal (2 horas) com PMAA, respectivamente. Triângulos azuis mostram a destruição da camada de mucilagem das células e extravazamento do material intracelular. Retângulos verdes indicam alongamento e/ou estreitamento e/ou aumento do volume celular.

Para este bioensaio observou-se predominantemente efeitos de estreitamento e alongamento (retângulos verdes) nas células algais, com poucas apresentando aumento no volume celular (retângulo verde).

Outra alteração morfológica relevante foi a destruição da camada de mucilagem com extravazamento do material intracelular (triângulos azuis).

A literatura aponta a importância de se avaliar as alterações morfológicas por microscopia eletrônica para as células de diferentes espécies de microalgas quando são expostas as mais variadas nanopartículas (ARUOJA et al., 2009; FRANKLIN et al., 2007; JI; LONG; LIN, 2011; LEI et al., 2016; OUKARROUM et al., 2012; WANG et al., 2016; 2008).

### **6.2.5 Análise de EDS dos bioensaios de nanotoxicidade**

Em geral, as análises de EDS para todas as amostras evidenciaram a formação de um filme de ZnO sobre as células e nanopartículas. Notou-se alguns agregados/aglomerados de nanopartículas e praticamente não foi possível visualizar com nitidez as células algais no meio de cultivo.

Na Figura 37 têm-se o mapeamento do EDS mostrando a distribuição dos elementos constituintes (Zn e O) para as amostras dos bioensaios de ZnO Coprecipitado para todos os tratamentos.



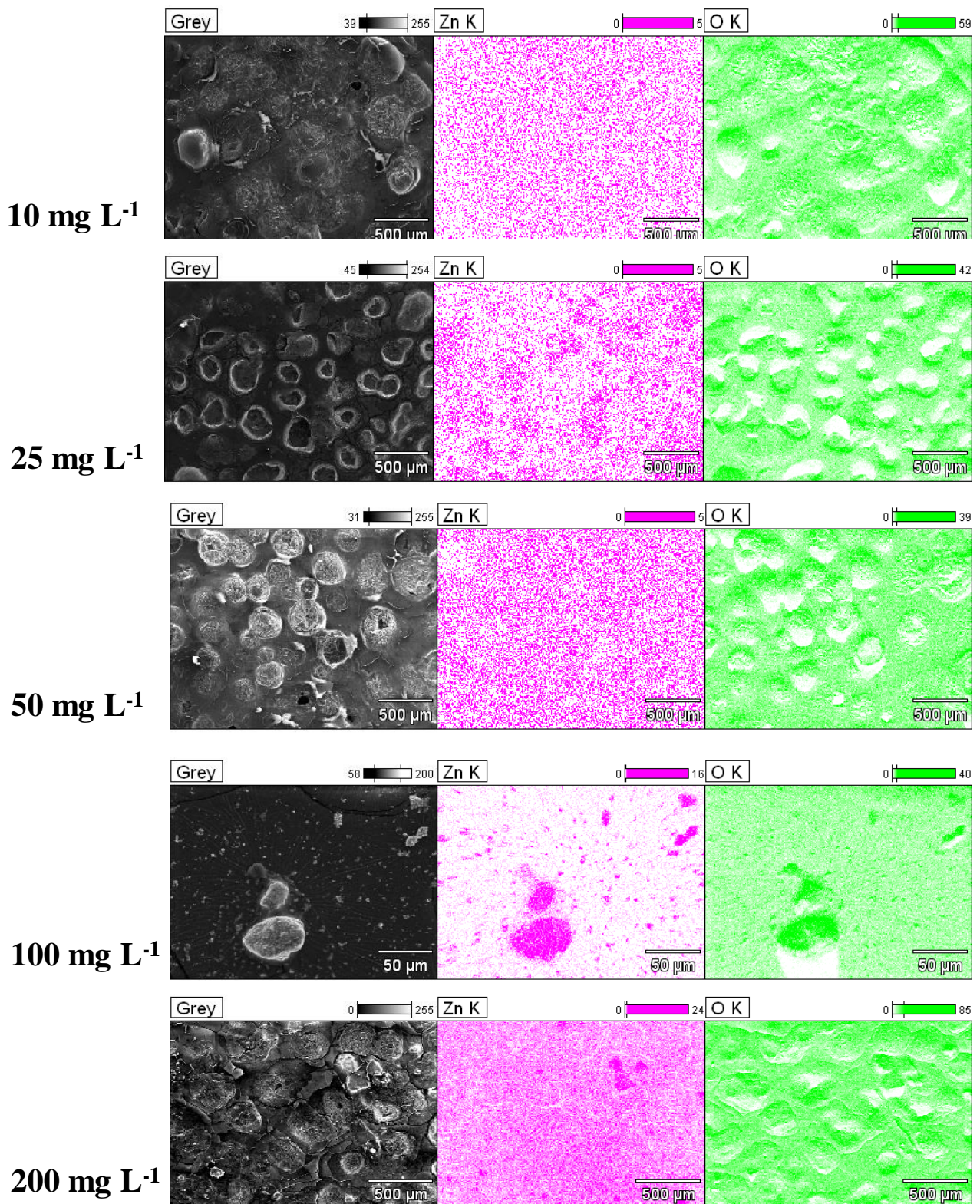


Figura 37 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da ZnO Coprecipitado, Zn e O nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 10 mg L<sup>-1</sup>, 25 mg L<sup>-1</sup>, 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup>.



O mapeamento das amostras coprecipitadas apresentou-se com uma distribuição homogênea com relação aos elementos Zn e O, principalmente nas primeiras concentrações e na última concentração de ZnO.

Na Figura 38 têm-se o mapeamento do EDS mostrando a distribuição dos elementos constituintes (Zn e O) para as amostras dos bioensaios de ZnO Hidrotermal (30 minutos) para todos os tratamentos.

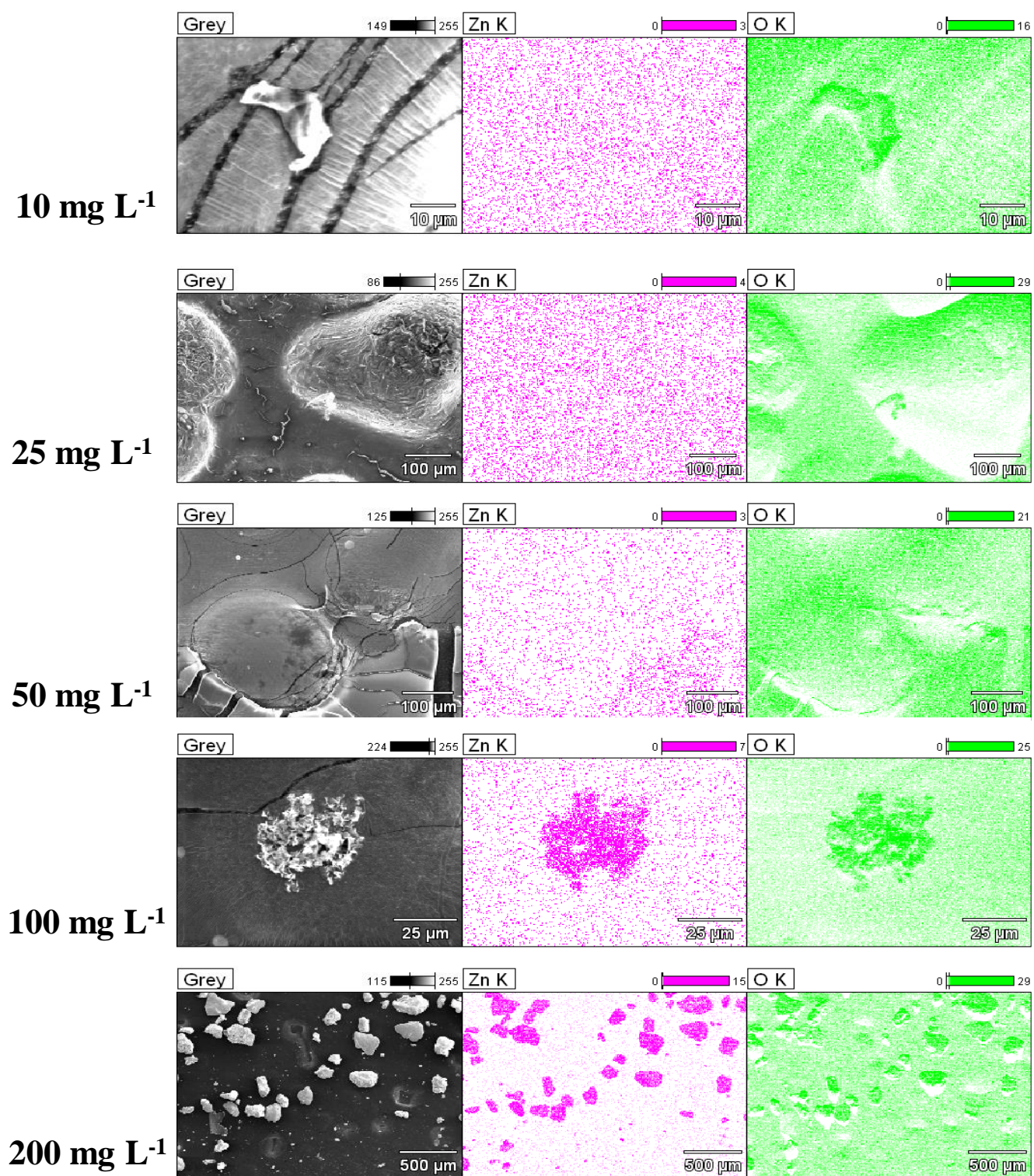


Figura 38 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da ZnO Hidrotermal (30 minutos), Zn e O nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 10 mg L<sup>-1</sup>, 25 mg L<sup>-1</sup>, 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup>.

O mapeamento dos elementos mostrou que o Zn apareceu de forma homogênea, em uma espécie de filme para as três primeiras concentrações e de forma mais intensa nas concentrações de  $100 \text{ mg L}^{-1}$  e  $200 \text{ mg L}^{-1}$ .

Da mesma forma, para o O o mapeamento foi similar para as últimas concentrações, e para a concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

Na Figura 39 têm-se o mapeamento do EDS mostrando a distribuição dos elementos constituintes (Zn e O) para as amostras dos bioensaios de ZnO Hidrotermal (30 minutos) com PMAA para todos os tratamentos.

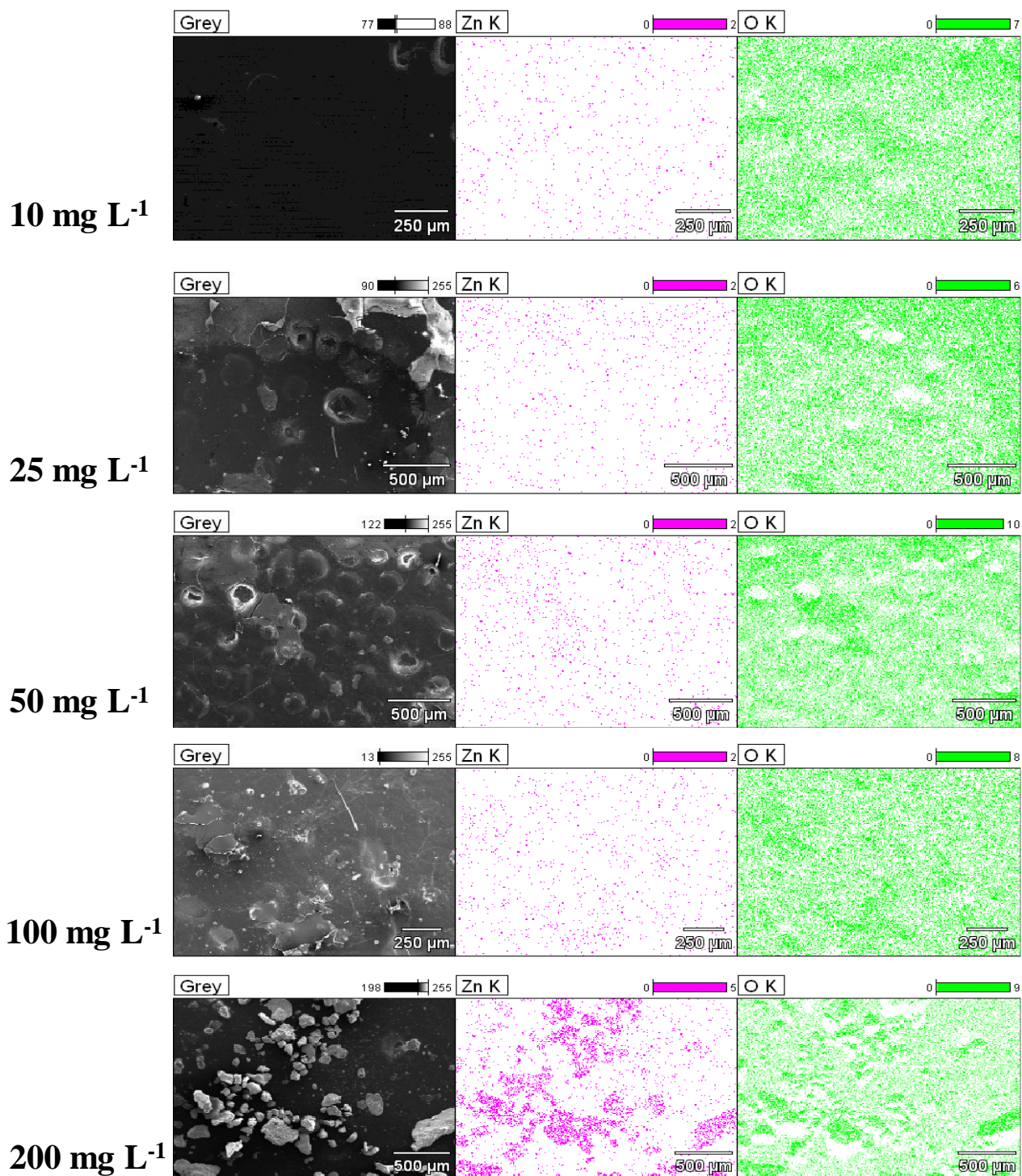


Figura 39 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da ZnO Hidrotermal (30 minutos) com PMAA, Zn e O nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 10 mg L<sup>-1</sup>, 25 mg L<sup>-1</sup>, 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup>.

O mapeamento para ambos os elementos químicos mostrou-se homogêneo para os tratamentos de 10 a 100 mg L<sup>-1</sup>, destacando maior concentração do nanofertilizante no mapeamento de 200 mg L<sup>-1</sup>.

Na Figura 40 têm-se o mapeamento do EDS mostrando a distribuição dos elementos constituintes (Zn e O) para as amostras dos bioensaios de ZnO Hidrotermal (2 horas) para todos os tratamentos.



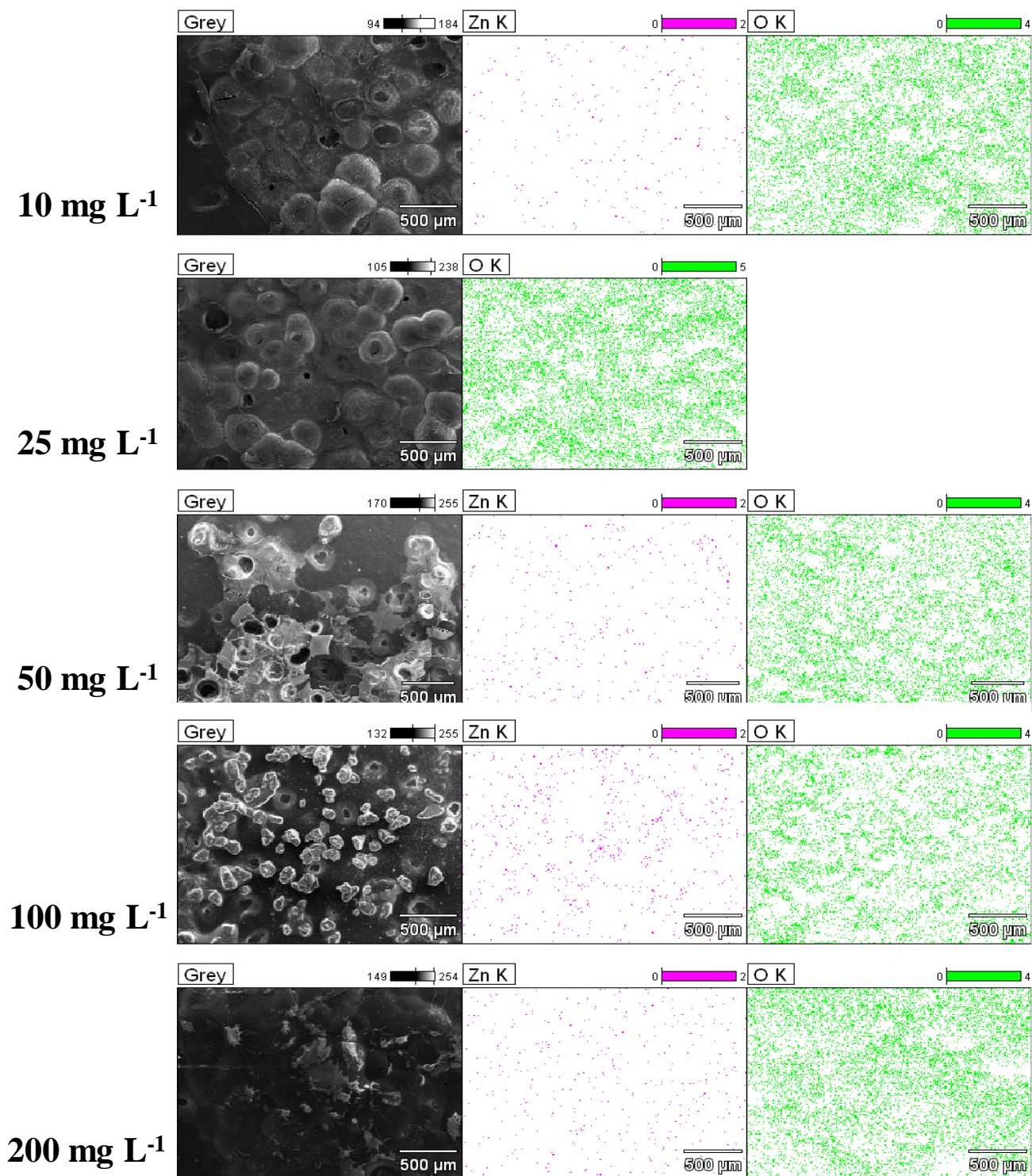


Figura 40 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da ZnO Hidrotermal (2 horas), Zn e O nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 10 mg L<sup>-1</sup>, 25 mg L<sup>-1</sup>, 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup>.

O mapeamento dos elementos mostrou uma distribuição homogênea para todos os tratamentos deste bioensaio, como se formasse um filme de ZnO por toda a amostra.

Na Figura 41 têm-se o mapeamento do EDS mostrando a distribuição dos elementos constituintes (Zn e O) para as amostras dos bioensaios de ZnO Hidrotermal (2 horas) com PMAA para todos os tratamentos.

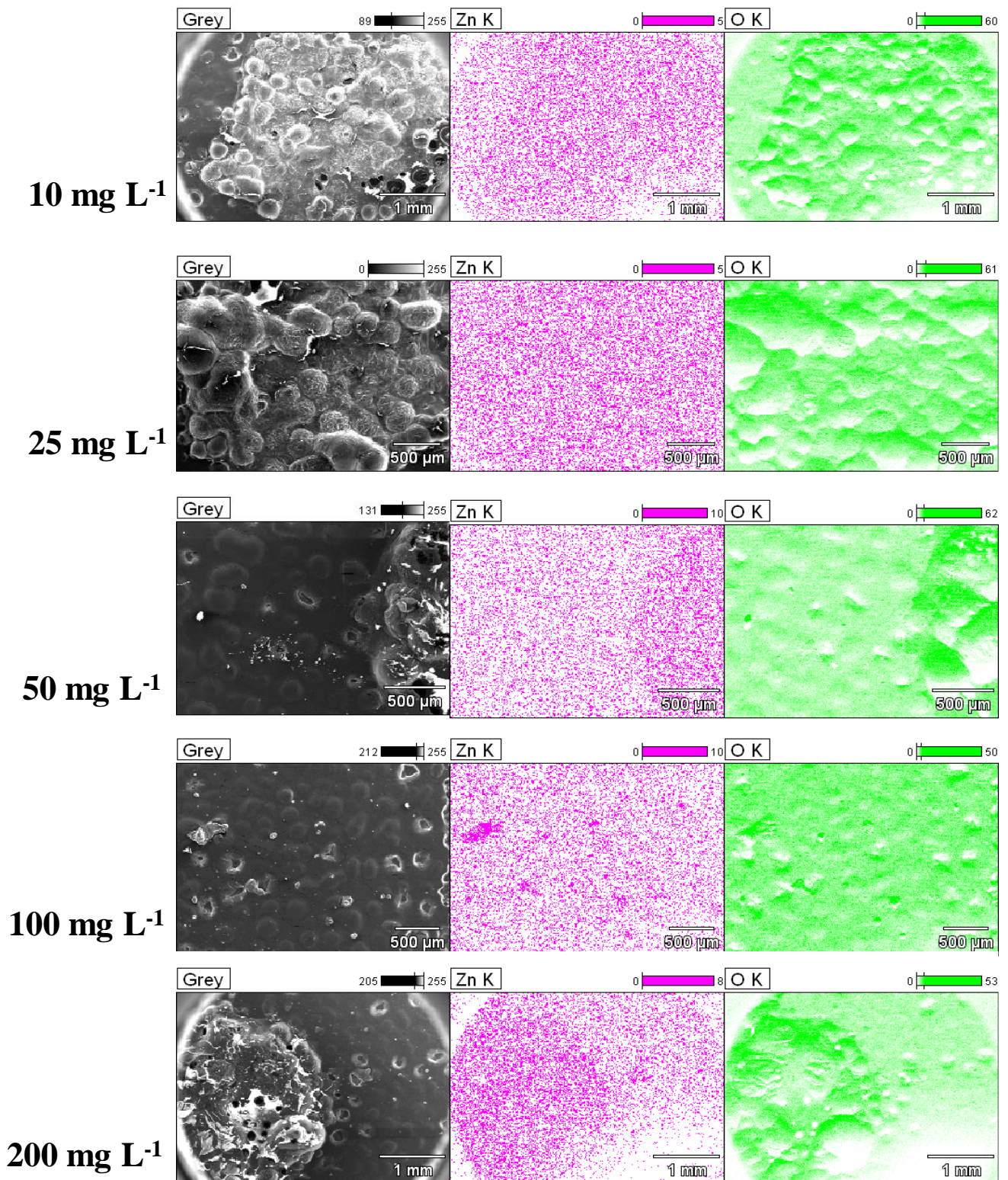


Figura 41 - Mapeamento do EDS identificando a distribuição dos elementos constituintes da ZnO Hidrotermal (2 horas) com PMAA, Zn e O nos bioensaios de nanotoxicidade para as concentrações de 10 mg L<sup>-1</sup>, 25 mg L<sup>-1</sup>, 50 mg L<sup>-1</sup>, 100 mg L<sup>-1</sup> e 200 mg L<sup>-1</sup>.



Para o bioensaio de ZnO hidrotermal com PMAA em morfologia de arranjos florais foi possível observar um mapeamento dos elementos de interesse mais heterogêneo quando comparado ao mapeamento da amostra anterior, destacando para as concentrações de 50 e 200 mg L<sup>-1</sup>.

“As nuvens mudam sempre de posição, mas são sempre nuvens no céu. Assim devemos ser todo dia, mutantes, porém leais com o que pensamos e sonhamos; lembre-se, tudo se desmancha no ar, menos os pensamentos.”

(Paulo Beleki)

## Capítulo 7 - Conclusões Finais

A atual pesquisa de doutorado investigou os possíveis efeitos nanotoxicológicos para a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, representante da base da cadeia trófica aquática, quando exposta ao nanofertilizante de HAP, composta pelo macronutriente P e ao nanofertilizante de ZnO, com fonte do micronutriente Zn. O intuito de sintetizar e caracterizar estes fertilizantes nanoestruturados visa uma aplicação mais eficiente e sustentável para as culturas agrícolas, não impactando o meio ambiente, especialmente os corpos de água. A partir dos resultados referentes às características físico-químicas, estruturais e morfológicas de ambos os nanofertilizantes foi possível, juntamente com os resultados dos bioensaios de nanotoxicologia, chegar às seguintes conclusões:

Em relação aos resultados com a HAP:

- Os nanobastões de HAP Coprecipitada e Hidrotermal sem o dispersante PMAA apresentaram elevada toxicidade para a microalga *P. subcapitata*, quando comparados aos nanobastões de HAP mais dispersos com a ação do PMAA;

- As análises das curvas de crescimento para a HAP Hidrotermal com PMAA não apresentaram relação da velocidade do crescimento e da duração da fase lag com o aumento das concentrações, revelando baixa toxicidade;

- As imagens de MEV das amostras de HAP Coprecipitada e Hidrotermal sem PMAA mostraram as alterações morfológicas para as células algais, tais como a deformação, estreitamento, alongamento, aumento do volume celular, destruição da camada de mucilagem, vazamento de material intracelular;

- O efeito de sombreamento foi bastante pronunciado pelas nanopartículas, dificultando o processo químico da fotossíntese necessária para a sobrevivência das microalgas;

- Os nanobastões de HAP Hidrotermal dispersos com PMAA apresentaram um baixo efeito tóxico para as microalgas, não havendo indicações do processo de eutrofização, mostrando elevado potencial para o uso sustentável em culturas agrícolas.

Em relação aos resultados do ZnO:

- Em geral, as nanopartículas de ZnO mostraram-se extremamente tóxicas para as microalgas, atingindo densidade celular máxima de  $40 \text{ céls.mL}^{-1}$  ;

- As curvas de crescimento algáceo, em triplicatas, para as nanopartículas de ZnO hidrotermal com PMAA nas morfologias de placas e arranjos florais apresentaram um aumento nas densidades celulares se comparadas às curvas para as outras nanopartículas;

- A variável dependente velocidade do crescimento algáceo não apresentou ajustes adequados a partir da análise de regressão linear;

- Além do efeito de sombreamento, as análises morfológicas das células algais expostas às nanopartículas de ZnO revelaram maior incidência de destruição da camada de mucilagem e extravasamento do material intracelular, além de algumas variações no volume celular;

- Os estudos com as distintas nanopartículas de ZnO evidenciam, dentro do intervalo de concentrações empregados, que todas as amostras, inclusive aquelas tratadas hidrotérmicamente com o dispersante PMAA, apresentaram elevado efeito tóxico para a espécie *P. subcapitata*.

Deste modo, os resultados obtidos sugerem que nanoestruturas de HAP obtidas por coprecipitação + tratamento hidrotérmico com o dispersante PMAA tem maior potencial para aplicações agrícolas como fertilizante, devido ao fato de apresentar menor toxicidade para as microalgas da espécie *P. subcapitata* comparado as duas amostras de HAP testadas. Já, as nanoestruturas de ZnO apresentaram alta toxicidade para as microalgas em todas as concentrações avaliadas, uma vez que a inibição do crescimento algáceo foi muito elevada.

## **Capítulo 8: Perspectivas de trabalhos futuros**

Como perspectivas para trabalhos futuros, propõe-se:

- \* Realizar bioensaios de nanotoxicidade em diferentes faixas de concentrações para ambos os nanofertilizantes, afim de se avaliar com mais precisão a nanotoxicidade causada por estes e o limite de concentração devidamente aceitável para o ambiente aquático;

- \* Empregar outros organismos-teste representativos das cadeias tróficas aquática e terrestre, visando compreender melhor o comportamento dos nanofertilizantes dispostos nos ecossistemas e os efeitos nanotoxicológicos gerados para a biota;

- \* Realizar análises mais específicas para avaliar as alterações no metabolismo das células algais, tais como análises de genotoxicidade e de estresse oxidativo a partir da quantificação das espécies reativas de oxigênio (ROS), investigando com mais precisão os efeitos tóxicos diretos e indiretos;

- \* Testar outros métodos de síntese para a obtenção de nanofertilizantes de macro e micronutrientes, variando as suas características e propriedades físico-químicas, estruturais e, especialmente as morfológicas, afim de se obter um nanoproduto menos tóxico ao ambiente e conseqüentemente à saúde humana.

## **Publicações bibliográficas durante o período da tese**

### **Artigos em periódicos indexados:**

PEREIRA, F. F. et al. Investigation of nanotoxicological effects of nanostructured hydroxyapatite to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 138–147, 2017. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2017.06.008.

### **Resumos em congressos e conferências:**

PEREIRA, F. F.; PARIS, E. C. ; FERREIRA, M. D. ; BRESOLIN, J. D. ; FOSCHINI, M. M. ; CORREA, D. S. . Synthesis and nanotoxicology evaluation of the hydroxyapatite nanofertilizer. **In: Workshop in Environmental Nanotechnology**, 2016, Sorocaba, SP. II Workshop in Environmental Nanotechnology, 2016.

PEREIRA, F. F.; PARIS, E. C. ; FERREIRA, M. D. ; CORREA, D. S. . Estudo da nanotoxicidade de hidroxiapatita nanoestruturada visando aplicação em fertilizantes. **In: V Simpósio de Biotecnologia da UFSCar**, 2016, São Carlos. V Simpósio de Biotecnologia da UFSCar, 2016.

PEREIRA, F. F.; PARIS, E. C. ; CORREA, D. S. ; FERREIRA, M. D. . Nanotoxicological effect of the coprecipitated Hydroxyapatite for aquatic microorganism. **In: XIV Encontro da SBPMat**, 2015, Rio de Janeiro. XIV Encontro da SBPMat, 2015.

PEREIRA, F. F.; CORREA, D. S. ; FERREIRA, M. D. ; PARIS, E. C. . 'Obtenção de hidroxiapatita nanoestruturada com aplicação para fertilizante e avaliação de aspectos de nanotoxicidade. **In: VIII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio e a IV Escola Avançada de Nanotecnologia**, 2014, Juíz de Fora - MG. VIII Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, 2014.

PEREIRA, F. F.; CORREA, D. S. ; FERREIRA, M. D. ; PARIS, E. C. . Avaliação da nanotoxicidade ambiental de hidroxiapatita nanoestruturada aplicada como fertilizante mineral. **In: Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária - Ciência, Inovação**

e Mercado 2014, 2014, São Carlos. Simpósio Nacional de Instrumentação Agropecuária - Ciência, Inovação e Mercado 2014, 2014. p. 475-478.

PEREIRA, F. F.; CORREA, D. S. ; FERREIRA, M. D. ; PARIS, E. C. . Síntese e caracterização de nanoestruturas baseadas em óxido de zinco e hidroxiapatita visando aplicações em fertilizantes e avaliação de aspectos de nanotoxicidade. **In: IV Simpósio de Biotecnologia da UFSCar**, 2013, São Carlos. IV Simpósio de Biotecnologia da UFSCar, 2013.

## Referências Bibliográficas

- ABO ENIN, H. A. Nanotechnology-a review article. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 29, n. 1, p. 247–257, 2014.
- ALCARDE, J. C.; GUIDOLIN, J. A.; LOPES, A. S. **Boletim técnico n. 3. -Os adubos e a eficiência das adubações**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://www.anda.org.br/multimidia/boletim\\_03.pdf](http://www.anda.org.br/multimidia/boletim_03.pdf)>. Acesso em: 15 jun. 2017.
- ALVES, L. R.; DOS REIS, A. R.; GRATÃO, P. L. Heavy metals in agricultural soils: From plants to our daily life. **Científica**, v. 44, n. 3, p. 346, 18 jul. 2016.
- ANDRÉ, R. S. et al. Structural evolution of Eu-doped hydroxyapatite nanorods monitored by photoluminescence emission. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 531, p. 50–54, 2012.
- ARAUJO, T. S. **Produção de Hidroxiapatita Pura e Dopada para Aplicação em Biosensores - PDF**. [s.l.] Universidade Federal de Sergipe, 2006.
- ARUOJA, V. et al. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO<sub>2</sub> to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Science of the Total Environment**, v. 407, n. 4, p. 1461–1468, fev. 2009.
- ARUOJA, V. **Algae *Pseudokirchneriella subcapitata* in environmental hazard evaluation of chemicals and synthetic nanoparticles**. [s.l.] Estonian University of Life Sciences, 2011.
- BARANYI, J.; ROBERTS, T. A. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. **International Journal of Food Microbiology**, v. 23, n. 3–4, p. 277–294, 1994.
- BARRADO, C. M. Desenvolvimento de célula hidrotérmica para obtenção de compostos nanocristalinos de alta pureza. 2008.
- BATLEY, G. E.; KIRBY, J. K.; MCLAUGHLIN, M. J. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 854–862, 19 mar. 2013.
- BAUN, A. et al. Ecotoxicity of engineered nanoparticles to aquatic invertebrates: a brief review and recommendations for future toxicity testing. **Ecotoxicology (London, England)**, v. 17, n. 5, p. 387–95, 2008.
- BECARO, A. A. et al. Polyethylene Films Containing Silver Nanoparticles for Applications in Food Packaging: Characterization of Physico-Chemical and Anti-Microbial Properties. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 15, n. 3, p. 2148–2156, 2015.
- BENITES, V. M. **Tecnologias para o aumento de eficiência de fertilizantes e identificação de fontes alternativas de nutrientes para a agricultura brasileira (Rede FertBrasil)**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/solos/busca-de-projetos/-/projeto/29458/tecnologias-para-o-aumento-de-eficiencia-de-fertilizantes-e-identificacao-de-fontes-alternativas-de-nutrientes-para-a-agricultura-brasileira-rede-fertbrasil>>. Acesso em: 15 jun. 2017.
- BERTOLDI, F. C.; SANT’ANNA, E.; OLIVEIRA, B. J. L. REVISÃO: BIOTECNOLOGIA DE MICROALGAS. **B.CEPPA**, v. 26, n. 1, p. 9–20, 2008.
- BHABRA, G. et al. Nanoparticles can cause DNA damage across a cellular barrier. **Nature Nanotechnology**, v. 4, n. 12, p. 876–883, 5 dez. 2009.
- BISWAS, P.; WU, C.-Y. Nanoparticles and the environment. **Journal of the Air & Waste Management Association (1995)**, v. 55, n. 6, p. 708–46, jun. 2005.
- BLAISE, C. Microbiotesting: An Expanding Field in Aquatic Toxicology. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 40, n. 1–2, p. 115–119, maio 1998.
- BLAISE, C.; VASSEUR, P. Algal Microplate Toxicity Test. In: **Small-scale Freshwater Toxicity Investigations**. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2005. p.

137–179.

BLEEKER, E. A. J. et al. Considerations on the EU definition of a nanomaterial: Science to support policy making. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 65, n. 1, p. 119–125, fev. 2013.

BOLIK, M.; KOOP, H. U. Identification of embryogenic microspores of barley (*Hordeum vulgare* L.) by individual selection and culture and their potential for transformation by microinjection. **Protoplasma**, v. 162, n. 1, p. 61–68, 1991.

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**, 2013.

BORTOLIN, A. et al. Nanocomposite PAAm/methyl cellulose/montmorillonite hydrogel: Evidence of synergistic effects for the slow release of fertilizers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 31, p. 7431–7439, 2013.

BROWN, H. **Zinc oxide : properties and applications**. New York: International Lead Zinc Research Organization, 1976.

BURDA, C. et al. **Chemistry and properties of nanocrystals of different shapes** **Chemical Reviews**, 2005.

BYRAPPA, K.; OHACHI, T. **Crystal growth technology**. [s.l.] William Andrew Pub., 2003.

CEREJEIRA, M. J. et al. **Ensaio biológico para avaliação da toxicidade das amostras de água**. Projecto Agro24. **Anais...2005**

CETESB, C. D. T. D. S. A. **Decisão de Diretoria nº 195-2005-E: valores orientadores para solos e águas subterrâneas no Estado de São Paulo**. Disponível em: <<https://www.agsolve.com.br/pdf/artigos/novatabelacetesb2005.pdf>>. Acesso em: 16 jun. 2017.

CHATTOPADHYAY, S. Toxic Effect of Metal Ions Volatile Organic Compounds Studying the Nature Relationship Regional Estimation of Flood Quantile. 2016.

CHELONI, G.; MARTI, E.; SLAVEYKOVA, V. I. Interactive effects of copper oxide nanoparticles and light to green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic toxicology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 170, p. 120–8, jan. 2016.

CHINNAMUTHU, C. R.; BOOPATHI, P. M. Nanotechnology and Agroecosystem. **The Madras Agricultural Journal**, v. 96, n. June, p. 17–31, 2009.

CHISLOCK, M. F. et al. Eutrophication : Causes , Consequences , and Controls in Aquatic Ecosystems. **Nature Education Knowledge**, n. 4, p. 1–8, 2013.

CLÉMENT, L.; HUREL, C.; MARMIER, N. Toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to cladocerans, algae, rotifers and plants - Effects of size and crystalline structure. **Chemosphere**, v. 90, n. 3, 2013.

CONAMA. Resolução n 357. **Diário Oficial**, n. 53, p. 58–63, 2005.

CONTRERAS, J. E.; RODRIGUEZ, E. A.; TAHA-TIJERINA, J. **Nanotechnology applications for electrical transformers? A review** **Electric Power Systems Research**, 2017.

COSTA, A. C. F. M. et al. Hidroxiapatita : Obtenção , caracterização e aplicações. **Revista eletrônica de Materiais e Processos**, v. 3, p. 29–38, 2009.

CUNHA, S. M. et al. **Síntese de hidroxiapatita por precipitação homogênea**. XVI Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciências dos Materiais. **Anais...Porto Alegre: 2004** Disponível em:

<<http://repositorio.ipen.br:8080/xmlui/handle/123456789/17457?show=full>>. Acesso em: 15 jun. 2017

CUSHING, B. L.; KOLESNICHENKO, V. L.; O'CONNOR, C. J. Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles. **Chemical Reviews**, v. 104, n. 9,



p. 3893–3946, 2004.

DAWSON, K. A. ; et al. Title The need for in situ characterisation in nanosafety assessment : funded transnational access via the QNano research infrastructure The need for in situ characterisation in nanosafety assessment: Funded Transnational Access via the QNano research infrastructure. **Publication information Nanotoxicology**, v. 7, n. 3, p. 346–349, 2013.

DEMAZEAU, G. **Solvothermal and hydrothermal processes: The main physico-chemical factors involved and new trends**. Research on Chemical Intermediates. **Anais...**2011

ELLIOTT, J. C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates. **Studies in Organic Chemistry**, v. 18, p. 404, 1994.

FABREGA, J. et al. **Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment****Environment International**, 2011.

FANG, J. et al. Surface defects control for ZnO nanorods synthesized by quenching and their anti-recombination in photocatalysis. **Applied Surface Science**, v. 332, p. 47–54, mar. 2015.

FARCAL, L. et al. Comprehensive In Vitro Toxicity Testing of a Panel of Representative Oxide Nanomaterials: First Steps towards an Intelligent Testing Strategy. **PLOS ONE**, v. 10, n. 5, p. e0127174, 21 maio 2015.

FAYIGA, A. O.; NWOKE, O. C. Phosphate rock: origin, importance, environmental impacts, and future roles. **Environmental Reviews**, v. 24, n. 4, p. 403–415, dez. 2016.

FELTRIN, C. W. **Síntese e propriedades do ZnO: correlação entre propriedades estruturais e atividade fotocatalítica**. [s.l.] Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

FERREIRA, J. M. F. **Preparação de óxidos de zinco e manganês, via precipitação em solução homogênea, para utilização na agricultura como adubo foliar**. Lorena: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 1 abr. 2009.

FRANKLIN, N. M. et al. Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl<sub>2</sub> to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. **Environmental Science & Technology**, v. 41, n. 24, p. 8484–8490, 2007.

FREDERICKSON, C. J.; KOH, J.-Y.; BUSH, A. I. The neurobiology of zinc in health and disease. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 6, n. 6, p. 449–462, 13 jun. 2005.

FULMER, M. T. et al. Measurements of the solubilities and dissolution rates of several hydroxyapatites. **Biomaterials**, v. 23, n. 3, p. 751–755, fev. 2002.

GALLETTI, A. et al. Effects of titanium dioxide nanoparticles derived from consumer products on the marine diatom *thalassiosira pseudonana*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, n. 20, p. 21113–21122, 2016.

GARCIA, D. et al. **Predicting mycotoxins in foods: A review****Food Microbiology**, 2009.

GEORGE, T. S.; HINSINGER, P.; TURNER, B. L. Phosphorus in soils and plants ??? facing phosphorus scarcity. **Plant and Soil**, v. 401, n. 1–2, 2016.

GIRALDI, T. R. et al. Annealing effects on the photocatalytic activity of ZnO nanoparticles. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 11, n. 4, p. 3635–40, abr. 2011.

GONG, N. et al. Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. **Chemosphere**, v. 83, n. 4, p. 510–516, 2011.

GOUVEIA, D. S. Obtenção de pós-nanométricos de hidroxiapatita sintetizados com magnésio utilizando ultrassom em Tecnologia Nuclear. **Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares**, p. 129, 2008.

GUILLARD, R. R. L.; LORENZEN, C. J. Yellow-green algae with chlorophyllide C. **Journal of Phycology**, v. 8, n. 1, p. 10–14, 1972.

GUO, J.; SELBY, K.; BOXALL, A. B. A. Effects of Antibiotics on the Growth and Physiology of Chlorophytes, Cyanobacteria, and a Diatom. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 71, n. 4, p. 589–602, 2016.

GUZMÁN, K. A. D.; TAYLOR, M. R.; BANFIELD, J. F. Environmental risks of nanotechnology: National nanotechnology initiative funding, 2000-2004. **Environmental Science and Technology**, v. 40, n. 5, p. 1401–1407, 2006.

HARTMANN, N. B. et al. Algal testing of titanium dioxide nanoparticles-Testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability. **Toxicology**, v. 269, n. 2–3, p. 190–197, 2010.

HAYGARTH, P. M.; JARVIS, S. C. Transfer of Phosphorus from Agricultural Soil. In: [s.l: s.n.]. p. 195–249.

HECKRATH, G. et al. Phosphorus Leaching from Soils Containing Different Phosphorus Concentrations in the Broadbalk Experiment. **Journal of Environment Quality**, v. 24, n. 5, p. 904, 1995.

HEWITT, P. G. **Física conceitual**. 9. ed. Porto Alegre: Bookman, 2008.

HUSSAIN, G.; RAHMAN, M. M. An infrared study of co-adsorption of N<sub>2</sub>O and CO on ZnO. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 64, n. 4, p. 880–885, jul. 2006.

ISHERWOOD, K. **O uso de fertilizantes minerais eo meio ambiente**. [s.l: s.n.].

JI, J.; LONG, Z.; LIN, D. Toxicity of oxide nanoparticles to the green algae *Chlorella* sp. **Chemical Engineering Journal**, v. 170, n. 2–3, p. 525–530, jun. 2011.

JOHARI, M. S. Evaluation of several mathematical models for fitting the growth of the algae *Dunaliella tertiolecta*. **Asian**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2014.

KALLQUIST, T. et al. Chronic toxicity of the Sava River (SE Europe) sediments and river water to the algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Water Research**, v. 42, n. 8–9, p. 2146–2156, 2008.

KAPPE, C. O.; DALLINGER, D.; MURPHREE, S. S. **Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists: Strategies, Instruments, and Protocols**. [s.l: s.n.].

KARUNARATNE, V.; KOTTEGODA, N.; DE ALWIS, A. Nanotechnology in a world out of balance. **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 40, n. 1, 1 abr. 2012.

KATZNELSON, J. Phosphorus in the soil-plant-animal ecosystem - An introduction to a model. **Oecologia**, v. 26, n. 4, p. 325–334, 1977.

KHAN, S. H.; FULEKAR, M. H.; PATHAK, B. Nanotoxicology - Health and Environmental Impacts: A Review. **J. Environ. Nanotechnol**, 2015.

KIRKBY, E. A.; RÖMHELD, V. Micronutrientes na fisiologia de plantas- Funções, Absorção e Mobilidade. **Informações agronômicas**, v. 118, n. 2, p. 1–24, 2007.

KLEIN, C.; AGNE, S. A. A. Fósforo: De Nutriente À Poluente! **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 8, n. 8, p. 1713–1721, 2013.

KONG, L. B.; MA, J.; BOEY, F. Nanosized hydroxyapatite powders derived from coprecipitation process. **Journal of Materials Science**, v. 37, n. 6, p. 1131–1134, 2002.

KOOKANA, R. S. et al. Nanopesticides: Guiding principles for regulatory evaluation of environmental risks. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 4227–4240, 2014.

KORSHIKOV, O. A. **Pidklas Protokokovi (Protococcineae Bakyol?ni (Vacuolales) ta Protokokovi (Protococcales)**. *Viznachnik prisnovodnihk vodorostey Ukrainskykoi RSR*. **Anais...Kiev**: 1953

KOTTEGODA, N. et al. A green slow-release fertilizer composition based on urea-

modified hydroxyapatite nanoparticles encapsulated wood. **Current Science**, v. 101, n. 1, p. 73–78, 2011.

KOUTSOPOULOS, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: a review study on the analytical methods. **Journal of biomedical materials research**, v. 62, n. 4, p. 600–12, 2002.

KRUG, H. F. Nanosafety Research-Are We on the Right Track? **Angewandte Chemie International Edition**, p. n/a-n/a, 2014.

KUNDURU, K. R. et al. Nanotechnology for water purification: applications of nanotechnology methods in wastewater treatment. In: **Water Purification**. [s.l: s.n.]. p. 33–74.

KWEH, S. W. K.; KHOR, K. A.; CHEANG, P. Production and characterization of hydroxyapatite (HA) powders. **Journal of Materials Processing Technology**, v. 89–90, p. 373–377, 1999.

LAPIDO-LOUREIRO, F. E. DE V.; MELAMED, R.; NETO, J. DE F. Fertilizantes , agroindústrias e Sustentabilidade. v. 1, p. 655, 2009.

LEE, R. E. **Phycology**. [s.l.] Cambridge University Press, 1989.

LEE, W. M.; AN, Y. J. Effects of zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles on green algae under visible, UVA, and UVB irradiations: No evidence of enhanced algal toxicity under UV pre-irradiation. **Chemosphere**, v. 91, n. 4, p. 536–544, 2013.

LEI, C. et al. Toxicity of iron-based nanoparticles to green algae: Effects of particle size, crystal phase, oxidation state and environmental aging. **Environmental Pollution**, v. 218, p. 505–512, 2016.

LEWIS, P. A. et al. **Short-term methods for estimating the chronic toxicity of effluents and receiving waters to freshwater organisms**. 3. ed. [s.l: s.n.].

LI, B.; BRETT, M. T. The influence of dissolved phosphorus molecular form on recalcitrance and bioavailability. **Environmental Pollution**, v. 182, p. 37–44, 2013.

LIBANORI, G. S. DO N. Avaliação da atividade catalítica de óxidos cerâmicos na conversão de óleos vegetais. 4 fev. 2011.

LIN, D. et al. The influence of dissolved and surface-bound humic acid on the toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to *Chlorella* sp. **Water Research**, v. 46, n. 14, p. 4477–4487, 2012.

LIU, J. et al. The influence of pH and temperature on the morphology of hydroxyapatite synthesized by hydrothermal method. **Ceramics International**, v. 29, n. 6, p. 629–633, 2003.

LIU, R.; LAL, R. Synthetic apatite nanoparticles as a phosphorus fertilizer for soybean (*Glycine max*). **Scientific Reports**, v. 4, p. 5686, 2014.

LIU, R.; LAL, R. **Potentials of engineered nanoparticles as fertilizers for increasing agronomic productions** **Science of the Total Environment**, 2015.

LIU, Y. et al. Nanoparticles in wastewaters: Hazards, fate and remediation. **Powder Technology**, v. 255, p. 149–156, 2014.

LONG, Z. et al. Systematic and Quantitative Investigation of the Mechanism of Carbon Nanotubes' Toxicity toward Algae. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 15, p. 8458–8466, 7 ago. 2012.

LOU, Z. et al. First-principles study of the adsorption of lysine on hydroxyapatite (100) surface. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 11, p. 4911–4916, mar. 2012.

MA, Q. Y.; LOGAN, T. J.; TRAINA, S. J. Lead Immobilization from Aqueous Solutions and Contaminated Soils Using Phosphate Rocks. **Environmental Science & Technology**, v. 29, n. 4, p. 1118–1126, abr. 1995.

MACHADO, M. D.; SOARES, E. V. Development of a short-term assay based on the evaluation of the plasma membrane integrity of the alga *Pseudokirchneriella*

subcapitata. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 95, n. 4, p. 1035–1042, 2012.

MACHADO, M. D.; SOARES, E. V. Modification of cell volume and proliferative capacity of *Pseudokirchneriella subcapitata* cells exposed to metal stress. **Aquatic Toxicology**, v. 147, p. 1–6, 2014a.

MACHADO, M. D.; SOARES, E. V. Modification of cell volume and proliferative capacity of [*i*]Pseudokirchneriella subcapitata[/*i*] cells exposed to metal stress. **Aquatic Toxicology**, v. 147, p. 1–6, 2014b.

MACIEL, A. P. , PARO, F. , LONGO, E. R. LEITE, E. Dióxido de estanho nanoestruturado como sensor de NO<sub>x</sub> (Nanostructured tin dioxide as a NO<sub>x</sub> gas sensor). **Cerâmica**, p. 163–167, 2003.

MAMANI, J. B. **Estrutura e propriedades de nanopartículas preparadas via sol-gel**. São Paulo: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, 2 jul. 2009.

MARCONI, G. P. S. **Avaliação da ecotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio e prata**. [s.l.] Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, 2011.

MAYO, M. J. et al. Surface chemistry effects on the processing and superplastic properties of nanocrystalline oxide ceramics. **Nanostructured materials**, v. 11, p. 271–282, 1999.

MERCANTE, L. A. et al. Electrospinning-based (bio)sensors for food and agricultural applications: A review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 91, p. 91–103, 2017.

MEULENKAMP, E. A. Synthesis and Growth of ZnO Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 102, n. 29, p. 5566–5572, 1998.

MIAO, J. et al. Heterogeneous photocatalytic degradation of mordant black 11 with ZnO nanoparticles under UV-Vis light. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 4, p. 1636–1641, 1 jul. 2014.

MIHINDUKULASURIYA, S. D. F.; LIM, L. T. Nanotechnology development in food packaging: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 40, n. 2, p. 149–167, 2014.

MILANI, N. et al. Dissolution kinetics of macronutrient fertilizers coated with manufactured zinc oxide nanoparticles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 16, p. 3991–3998, 2012.

MIR, M. et al. XRD, AFM, IR and TGA study of nanostructured hydroxyapatite. **Materials Research**, v. 15, n. 4, p. 622–627, 2012.

MOBASHERPOUR, I. et al. Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by using precipitation method. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 430, n. 1–2, p. 330–333, 2007.

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

MOHAMED, M. S. et al. Kinetics and modeling of microalga *Tetraselmis* sp. FTC 209 growth with respect to its adaptation toward different trophic conditions. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 30–41, 2014.

MONTALVO, D. et al. Agronomic Effectiveness of Zinc Sources as Micronutrient Fertilizer. In: [s.l.: s.n.]. p. 215–267.

MONTAZERI, N.; JAHANDIDEH, R.; BIAZAR, E. Synthesis of fluorapatite-hydroxyapatite nanoparticles and toxicity investigations. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 197–201, 2011.

MOORE, M. N. Do nanoparticles present ecotoxicological risks for the health of the

aquatic environment? **Environment International**, v. 32, n. 8, p. 967–976, 2006.

MORARU, C. I. et al. **Food technology**. [s.l.] Institute of Food Technologists, 2003.

MOREIRA-SANTOS, M.; SOARES, A. M. V. M.; RIBEIRO, R. An in situ bioassay for freshwater environments with the microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 59, n. 2, p. 164–173, 2004.

MOTOC, A. M. et al. In-situ synthesis and attachment of colloidal ZnO nanoparticles inside porous carbon structures. **Materials Chemistry and Physics**, v. 161, p. 219–227, jul. 2015.

MOTSKIN, M. et al. Hydroxyapatite nano and microparticles: Correlation of particle properties with cytotoxicity and biostability. **Biomaterials**, v. 30, n. 19, p. 3307–3317, 2009.

MOURÃO, H. A. J. L. et al. **Nanoestruturas em fotocatalise: Uma revisão sobre estratégias de síntese de fotocatalisadores em escala nanométrica** *Química Nova*, 2009.

NAIR, R. et al. **Nanoparticulate material delivery to plants** *Plant Science*, 2010.

NEL, A. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. **Science**, v. 311, n. 5761, p. 622–627, 2006.

NÉMERY, J.; GARNIER, J. Biogeochemistry: The fate of phosphorus. **Nature Geoscience**, v. 9, n. 5, p. 343–344, 11 abr. 2016.

NKEBIWE, P. M. et al. **Fertilizer placement to improve crop nutrient acquisition and yield: A review and meta-analysis** *Field Crops Research*, 2016.

NYGAARD, G. **Taxonomic Designations of the Bioassay Alga NIVA-CHL 1 (“Selenastrum Capricornutum”) and Some Related Strains**. [s.l.] Council for Nordic Publications in Botany, 1986.

OBBERDORSTER, G. et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 2, n. 1, p. 8, 6 out. 2005.

OECD. 201, Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. **Guideline for testing chemicals**, n. March, p. 1–26, 2006.

OECD. OECD Guidelines for the testing of Chemicals. Freshwater alga and cyanobacteria, Growth inhibition test. **Report OECD**, 2011a.

OECD. **OECD Guidelines for the testing of Chemicals. Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test** *Organisation for Economic Cooperation and Development*, 2011b.

OLAIZOLA, M. **Commercial development of microalgal biotechnology: From the test tube to the marketplace**. *Biomolecular Engineering. Anais...*2003

OLIVEIRA, A. C. **Toxicidade de elementos-traços para consumidores primários na presença de exopolissacarídeos produzidos por organismos fitoplanctônicos (Chlorophyceae e Cyanophyceae)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2007.

OLIVEIRA, M. A. R.; PARIS, E. C.; RIBEIRO, C. Avaliação do potencial de uso da hidroxiapatita para fertilização de solos. **Química Nova**, p. 790–792, 2013.

OLIVEIRA, A. L. M. DE. Nanoestruturas de Óxido de Zinco obtidas pelo Método Hidrotermal de Microondas Doméstico. 18 mar. 2009.

OLIVEIRA, S. V. et al. **Análise no Infravermelho da Hidroxiapatita**. VI CONGRESSO NACIONAL DE ENGENHARIA MECÂNICA – CONEM. **Anais...**Campina Grande – Paraíba: Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, 2010

OUKARROUM, A. et al. Inhibitory effects of silver nanoparticles in two green algae, *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 78, p. 80–85, abr. 2012.

PARTHASARATHI, T. **Phytotoxicity of nanoparticles in agricultural crops**. Proceedings of the International Conference on Green Technology and Environmental Conservation, GTEC-2011. **Anais...IEEE**, dez. 2011 Disponível em: <<http://ieeexplore.ieee.org/document/6167641/>>. Acesso em: 15 jun. 2017

PATIL, S. S. et al. Nanoparticles for environmental clean-up: A review of potential risks and emerging solutions. **Environmental Technology & Innovation**, v. 5, p. 10–21, abr. 2016.

PEREIRA, F. F. et al. Investigation of nanotoxicological effects of nanostructured hydroxyapatite to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 144, p. 138–147, 2017.

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

PETERSEN, E. J. et al. Adapting OECD Aquatic Toxicity Tests for Use with Manufactured Nanomaterials: Key Issues and Consensus Recommendations. **Environmental Science & Technology**, v. 49, n. 16, p. 9532–9547, 18 ago. 2015.

PRINTZ, H. **Kristianiatraktens Protococcoideer**. Den Matematisk-naturvitenskapelige Klasse. **Anais...1914**

QU, X.; ALVAREZ, P. J. J.; LI, Q. Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. **Water Research**, v. 47, n. 12, p. 3931–3946, 2013.

QUIRINO, M. R. et al. Obtenção do óxido de zinco através do método hidrotérmico assistido por micro-ondas. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 9, n. 2, p. 106–111, 2014.

RAJ, M. **Project to develop nano herbicides**. Disponível em: <<http://www.thehindu.com/todays-paper/project-to-develop-nano-herbicides/article3093480.ece>>. Acesso em: 15 jun. 2017.

REHMAN, I.; BONFIELD, W. Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1–4, 1997.

RESOLUÇÃO NO; 357, D. 17 D. M. D. 2005. **Resolução n. 357, de 17 de março de 2005.Ministério do Meio Ambiente**, 2005. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/res/res05/res35705.pdf>>. Acesso em: 15 jun. 2017

RIGO, E. C. DA S.; GEHRKE, S. A.; CARBONARI, M. Síntese e caracterização de hidroxiapatita obtida pelo método da precipitação. **Revista Dental Press Periodontia Implantologia**, v. 1, n. 3, p. 39–50, 2007.

ROUND, F. E. **Biologia das Algas**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1983.

SADEGHZADEH, B. A review of zinc nutrition and plant breeding. **Journal of soil science and plant nutrition**, v. 13, n. ahead, p. 905–927, 2013.

SADIQ, I. M. et al. Studies on toxicity of aluminum oxide (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) nanoparticles to microalgae species: *Scenedesmus* sp. and *Chlorella* sp. **J Nanopart Res**, 2011.

SALARIAN, M. et al. Surfactant-assisted synthesis and characterization of hydroxyapatite nanorods under hydrothermal conditions. **Materials Science Poland**, v. 27, p. 961–971, 2009.

SANOSH, K. P. et al. Synthesis of nano hydroxyapatite powder that simulate teeth particle morphology and composition. **Current Applied Physics**, v. 9, n. 6, p. 1459–1462, 2009.

SANTOS, M. F. **Sistemas baseados em amido termoplástico: pectina contendo hidroxiapatita nanoestruturada visando liberação de fósforo em meio aquoso**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, 2013.

SCHIERZ, A. et al. Fate of single walled carbon nanotubes in wetland ecosystems. **Environ. Sci.: Nano**, v. 1, n. 6, p. 574–583, 3 set. 2014.

SCHIPPER, W. **Phosphorus: Too big to fail** *European Journal of Inorganic Chemistry*, 2014.

SCHWAB, F. et al. Are carbon nanotube effects on green algae caused by shading and agglomeration? **Environmental Science and Technology**, v. 45, n. 14, p. 6136–6144, 2011.

SEGURA, T.; SHEA, L. D. Materials for Non-Viral Gene Delivery. **Annual Review of Materials Research**, v. 31, n. 1, p. 25–46, 28 ago. 2001.

SERPONE, N.; DONDI, D.; ALBINI, A. Inorganic and organic UV filters: Their role and efficacy in sunscreens and suncare products. **Inorganica Chimica Acta**, v. 360, n. 3, p. 794–802, 2007.

SERRANO, E.; RUS, G.; GARCIA-MARTINEZ, J. **Nanotechnology for sustainable energy** *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2009.

SHVEDOVA, A.; PIETROIUSTI, A.; KAGAN, V. Nanotoxicology ten years later: Lights and shadows. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 299, p. 1–2, 15 maio 2016.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. [s.l.] Grupo Gen - LTC, 2010.

ŚLÓSARCZYK, A.; PASZKIEWICZ, Z.; PALUSZKIEWICZ, C. **FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods**. *Journal of Molecular Structure. Anais...* 2005

SŌMIYA, A.; HISHINUMA, K.; AKIBA, T. A new materials processing---hydrothermal processing. **Bulletin of Materials Science**, v. 18, n. 6, p. 811–818, 1995.

TAJ, A.; ZARRIN. **THE EFFECT OF PHOSPHORUS AND SULFUR NANOFERTILIZERS ON THE GROWTH AND NUTRITION OF OCIMUM BASILICUM IN RESPONSE TO SALT STRESS** *JOURNAL OF CHEMICAL HEALTH RISKS (JCHR)*, , 2016. Disponível em: <<http://en.journals.sid.ir/ViewPaper.aspx?ID=484018>>. Acesso em: 3 maio. 2017

TARAFDAR, J. C.; SHARMA, S.; RALIYA, R. Nanotechnology: Interdisciplinary science of applications. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 3, p. 219–226, 2013.

TEVATIA, R.; DEMIREL, Y.; BLUM, P. Kinetic modeling of photoautotrophic growth and neutral lipid accumulation in terms of ammonium concentration in *Chlamydomonas reinhardtii*. **Bioresource Technology**, v. 119, p. 419–424, 2012.

TOH, A. G. G. et al. Engineering microfluidic concentration gradient generators for biological applications. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 16, n. 1–2, p. 1–18, 24 jan. 2014.

U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY OFFICE OF WATER. **Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms**. 4. ed. [s.l.: s.n.].

UMAR, A. et al. Growth of Highly *c* -Axis-Oriented ZnO Nanorods on ZnO/Glass Substrate: Growth Mechanism, Structural, and Optical Properties. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 33, p. 14715–14720, 20 ago. 2009.

UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **Ecological Effects Test Guidelines: OPPTS 850.5400 : Algal Toxicity, Tiers I and II**. [s.l.] U.S. Environmental Protection Agency, Prevention, Pesticides and Toxic Substances, 1996.

VAN HOECKE, K. et al. Ecotoxicity of Silica Nanoparticles To the Green Alga *Pseudokirchneriella Subcapitata*: Importance of Surface Area. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, n. 9, p. 1948–1957, 2008.

VAN IMPE, J. F. et al. **Towards a novel class of predictive microbial growth models.** International Journal of Food Microbiology. **Anais...**2005

VIDOTTI, E. C.; ROLLEMBERG, M. D. C. E. **Algas: Da economia nos ambientes aquáticos à bioremediação e à química analítica** *Química Nova*, 2004.

WANG, D. et al. Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: The nanoparticles, the ions, or a combination of both? **Journal of Hazardous Materials**, v. 308, p. 328–334, 2016a.

WANG, J. et al. Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Chemosphere**, v. 73, n. 7, p. 1121–1128, 2008.

WANG, W.-X. Incorporating exposure into aquatic toxicological studies: An imperative. **Aquatic Toxicology**, v. 105, n. 3–4, p. 9–15, out. 2011.

WANG, Y. et al. TiO<sub>2</sub> nanoparticles in the marine environment: Physical effects responsible for the toxicity on algae *Phaeodactylum tricornutum*. **Science of the Total Environment**, 2016b.

WANG, Z. et al. Environmental processes and toxicity of metallic nanoparticles in aquatic systems as affected by natural organic matter. **Environmental Science: Nano**, v. 3, n. 2, p. 240–255, 2016c.

WONG, S. W. Y. et al. Toxicities of nano zinc oxide to five marine organisms: influences of aggregate size and ion solubility. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 396, n. 2, p. 609–618, 10 jan. 2010.

ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Aquática: Princípios e Aplicações.** [s.l: s.n.].

ZAMANI, H. et al. Influence of PbS nanoparticle polymer coating on their aggregation behavior and toxicity to the green algae *Dunaliella salina*. **Aquatic Toxicology**, v. 154, p. 176–183, set. 2014.

ZHANG, L. et al. Hydrothermal synthesis of hierarchical nanoparticle-decorated ZnO microdisks and the structure-enhanced acetylene sensing properties at high temperatures. **Sensors & Actuators: B. Chemical**, v. 158, p. 144–150, 2011.

ZHAO, J. et al. Mechanistic understanding toward the toxicity of graphene-family materials to freshwater algae. **Water Research**, v. 111, p. 18–27, mar. 2017.



## Apêndice A

Curvas de Crescimento da microalga *P. subcapitata* em função do tempo, em horas, para as nanopartículas de HAP coprecipitada, HAP hidrotermal (2 horas) e HAP hidrotermal (2 horas) com o dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA), comparando com as amostras controles, respectivamente.

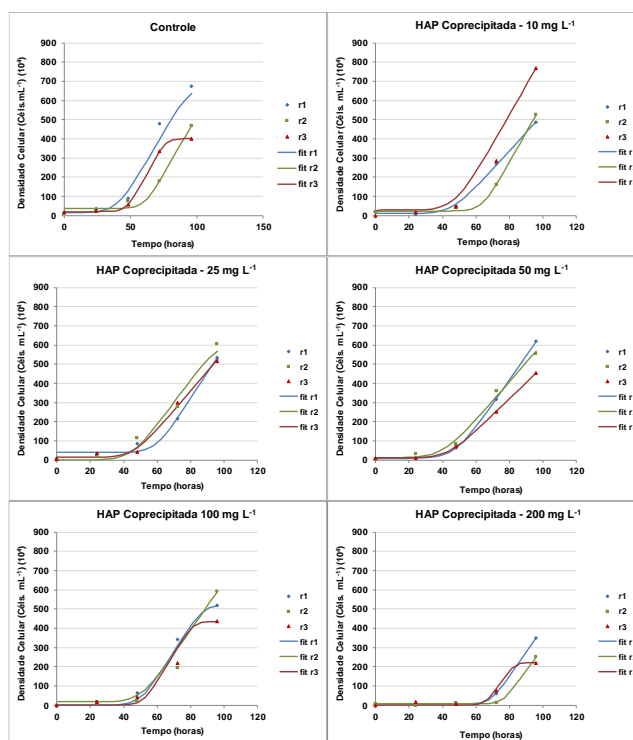


Figura A.1 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao nanofertilizante de HAP Coprecipitada, para as distintas concentrações e para o respectivo controle.

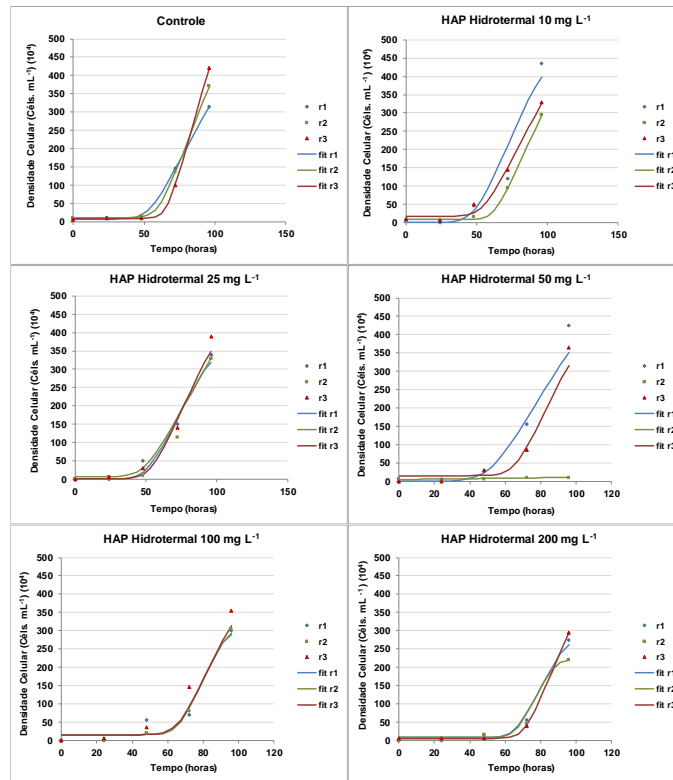


Figura A.2 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao nanofertilizante de HAP Hidrotermal, para as distintas concentrações e para o respectivo controle.

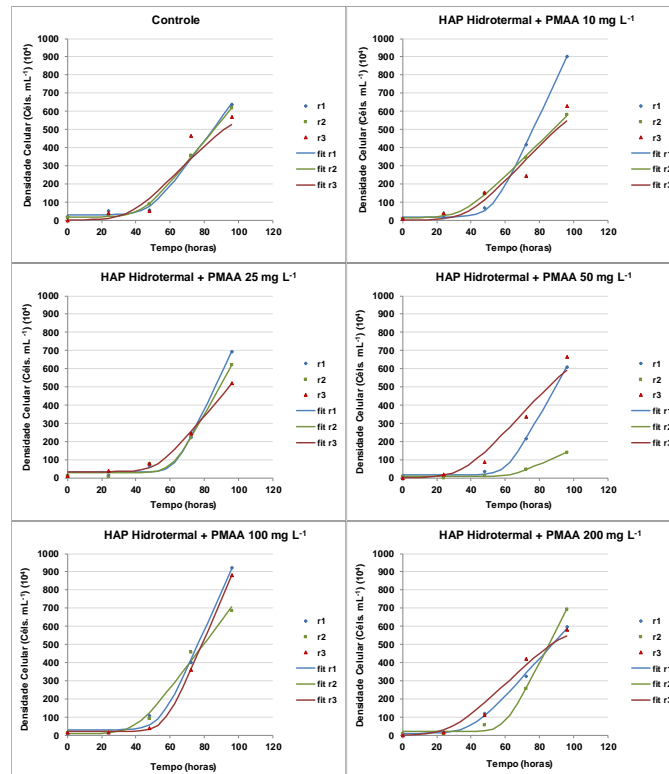


Figura A.3 - Curvas de Crescimento (triplicatas) da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao nanofertilizante de HAP Hidrotermal com PMAA, para as distintas concentrações e para o respectivo controle.

## Apêndice B

Gráficos das variáveis dependentes, velocidade do crescimento algáceo (céls.mL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) da *P. subcapitata* em função da concentração (mg L<sup>-1</sup>) para as baixas concentrações das nanopartículas de HAP coprecipitada, HAP hidrotermal (2 horas) e HAP hidrotermal (2 horas) com PMAA, e a duração da fase lag (hours) para cada bioensaio, respectivamente.

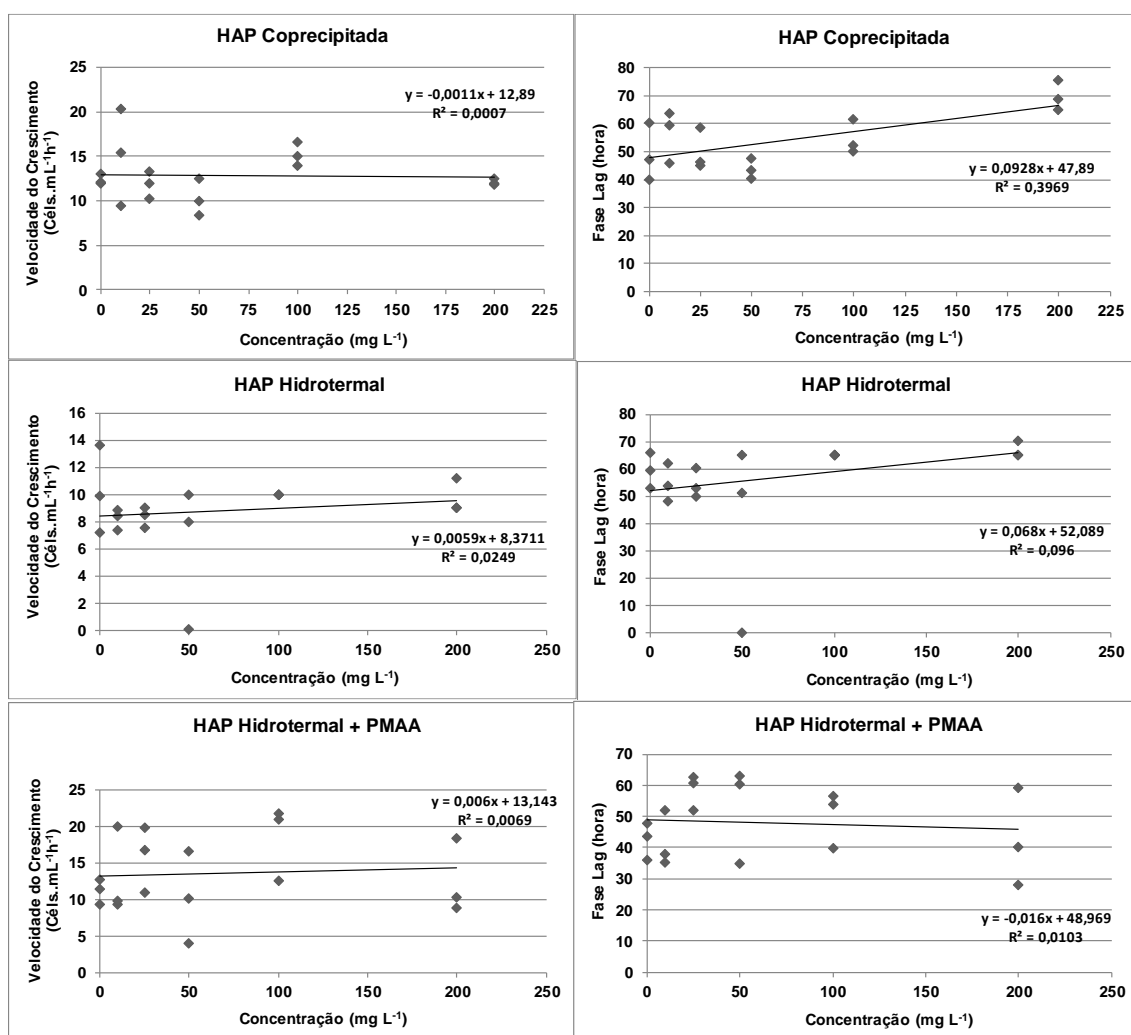


Figura B.1 - Velocidade do crescimento (céls.mL<sup>-1</sup>h<sup>-1</sup>) e duração da fase lag (horas) da *P. subcapitata* em função da concentração (mg L<sup>-1</sup>) para as nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal (2 horas) e HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA, respectivamente.

## Apêndice C

Parâmetros estimados para as variáveis dependentes, velocidade do crescimento algáceo e duração da fase lag para as nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal (2 horas) e HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA, em baixas concentrações, respectivamente.

Tabela C.1 - Parâmetros estimados para a variável dependente velocidade do crescimento para as nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal (2 horas) e HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA.

Modelo	Variável Dependente: Velocidade do crescimento	Coeficientes	95% Intervalo de Confiança		Valor de p - teste-t
			Limite inferior	Limite superior	
HAP Coprecipitada	Constante	12,9	10,9	14,9	<0,001
	Concentração	-0,0011	-0,0022	0,0020	0,915
HAP Hidrotermal	Constante	8,4	6,5	10,2	<0,001
	Concentração	0,0059	-0,0014	0,0025	0,532
HAP Hidrotermal + PMAA	Constante	13,1	9,6	16,7	<0,001
	Concentração	0,0060	-0,0321	0,0440	0,743

Tabela C.2 - Parâmetros estimados para a variável dependente duração da fase lag para as nanopartículas de HAP Coprecipitada, HAP Hidrotermal (2 horas) e HAP Hidrotermal (2 horas) com PMAA.

Modelo	Variável Dependente: Fase Lag	Coeficientes	95% Intervalo de Confiança		Valor de p - teste-t
			Limite inferior	Limite superior	
HAP Coprecipitada	Constante	48	42	54	<0,001
	Concentração	0,0093	0,0032	0,0015	0,005
HAP Hidrotermal	Constante	56	52	60	<0,001
	Concentração	0,0068	0,0018	0,0099	0,008
HAP Hidrotermal + PMAA	Constante	49	41	57	<0,001
	Concentração	-0,0160	-0,0991	0,0672	0,689

## Apêndice D

Curvas de crescimento de *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA) (Controles-Positivo) e seus respectivos controles para os bioensaios com baixas concentrações de nanopartículas de HAP (Figura D.1) e para os bioensaios com altas concentrações de nanopartículas de HAP (Figura D.2).

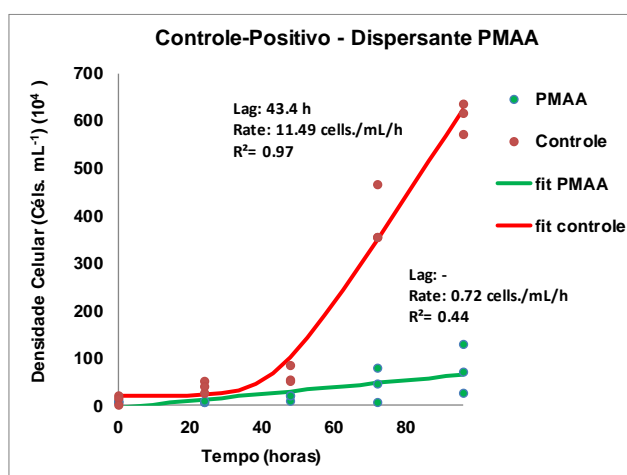


Figura D.1 - Curvas de Crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA) (Controles-Positivo) e seu respectivo controle para o bioensaio de HAP Hidrotermal com PMAA em baixas concentrações.

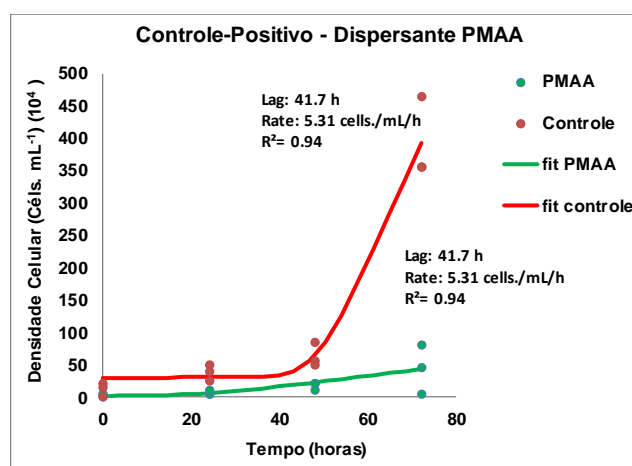


Figura D.2 - Curvas de Crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA) (Controles-Positivo) e seu respectivo controle para o bioensaio de HAP Hidrotermal com PMAA em altas concentrações.

## Apêndice E

Curvas de crescimento de *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA) (Controles-Positivo) e seus respectivos controles para os bioensaios com baixas concentrações de nanopartículas de ZnO, em morfologia de placas e arranjos florais, respectivamente.

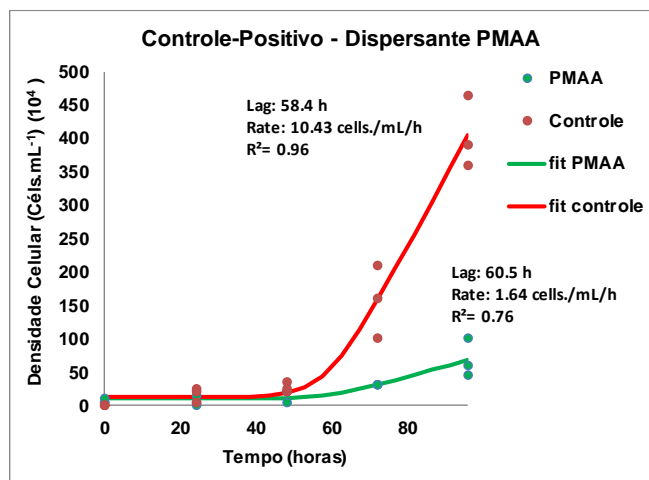


Figura E.1 - Curvas de Crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA) (Controles-Positivo) e seu respectivo controle para o bioensaio de ZnO Hidrotermal (30 minutos) com PMAA, em morfologia de placas.

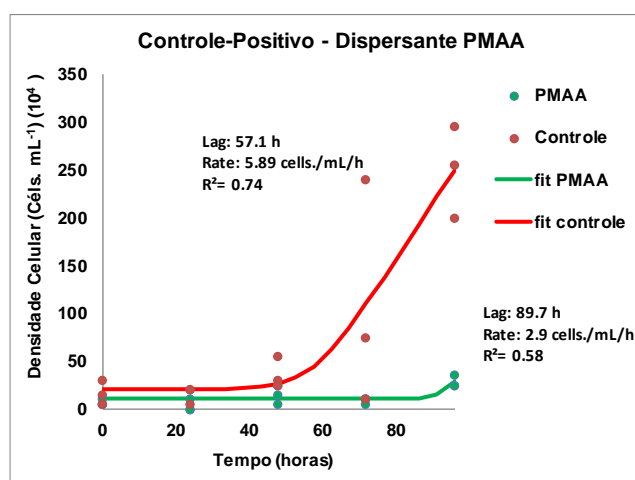


Figura E.2 - Curvas de Crescimento da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* quando exposta ao dispersante polimetacrilato de amônio (PMAA) (Controles-Positivo) e seu respectivo controle para o bioensaio de ZnO Hidrotermal (2 horas) com PMAA, em morfologia de arranjos florais.

## Anexo

### ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Jun 20, 2017

This Agreement between Mrs. Flávia Pereira ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4132870226543
License date	Jun 20, 2017
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Ecotoxicology and Environmental Safety
Licensed Content Title	Investigation of nanotoxicological effects of nanostructured hydroxyapatite to microalgae Pseudokirchneriella subcapitata
Licensed Content Author	Flávia F. Pereira, Elaine C. Paris, Joana D. Bresolin, Milene M. Foschini, Marcos D. Ferreira, Daniel S. Corrêa
Licensed Content Date	Oct 1, 2017
Licensed Content Volume	144
Licensed Content Issue	n/a
Licensed Content Pages	10
Start Page	138
End Page	147
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	6
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	Yes
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Order reference number	
Original figure numbers	Figures 1, 2, 3, 4, 5 and 6
Title of your thesis/dissertation	SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DA NANOTOXICIDADE DE NANOESTRUTURAS DE ÓXIDO DE



ZINCO E HIDROXIAPATITA VISANDO APLICAÇÕES EM FERTILIZANTES

Expected completion date	Jun 2017
Estimated size (number of pages)	130
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Requestor Location	Mrs. Flávia Pereira Rua Luiz Vaz de Toledo Piza, 130 Apto. 112 Jardim Lutfalla São Carlos, SP 13.560-520 Brazil Attn: Mrs. Flávia Pereira
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

**INTRODUCTION**

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

**GENERAL TERMS**

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.

3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:

"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."

4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.

5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at [permissions@elsevier.com](mailto:permissions@elsevier.com)). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.

6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.

7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.

8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.

9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.

10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.

11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.

12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).

13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.

14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

#### **LIMITED LICENSE**

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.

16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text

must be included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com> . All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

**Posting licensed content on Electronic reserve:** In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

**Preprints:**

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

**Accepted Author Manuscripts:** An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
  - via their non-commercial person homepage or blog
  - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
  - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
  - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
  - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
  - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
  - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do

- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

**Published journal article (JPA):** A published journal article (PJA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

**Subscription Articles:** If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version.

Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

**Gold Open Access Articles:** May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above: Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. **Thesis/Dissertation:** If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

### **Elsevier Open Access Terms and Conditions**

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

**Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:**

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated. The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

**Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:**

**CC BY:** The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

**CC BY NC SA:** The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

**CC BY NC ND:** The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

**20. Other Conditions:**

v1.9

Questions? [customercare@copyright.com](mailto:customercare@copyright.com) or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

