

Analisando as imagens de microscopia ótica, observa-se que não houve mudança significativa na morfologia das células expostas aos nanocompósitos (Fig. 2c) em relação às células mantidas em contato com o controle negativo (Fig. 2a). Já a imagem obtida para o controle positivo (Fig. 2b) apresentou uma clara diminuição da quantidade e mudança da forma das células, passando a ter uma forma aproximadamente esférica, mostrando o efeito tóxico do fenol, como esperado. Estes resultados indicam que as nanofibras de PVA/TiO₂ (20 %) não possuem efeito citotóxico. JIN *et al.* [5] pesquisaram a citotoxicidade das nanopartículas de TiO₂ anatase frente às células de fibroblastos de camundongos (L929). Os autores verificaram que estas nanopartículas foram significativamente citotóxicas para as células de fibroblastos [5]. Logo, as nanofibras de PVA e PVA/TiO₂ precisam ser melhores estudadas em relação à sua toxicidade.

4 CONCLUSÃO

Os testes preliminares de citotoxicidade das nanofibras de PVA e PVA/TiO₂ anatase frente às células de fibroblastos bovinos (linhagem 3446 GIR) indicaram que estes materiais não são citotóxicos. Entretanto, para obter resultados conclusivos, estes materiais precisam ser melhores avaliados quanto a sua toxicidade.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, FAPESP e CAPES.

REFERÊNCIAS

- [1] COSTA, R. G. F.; RIBEIRO, C.; MATTOSO, L. H. C. Morphological and Photocatalytic Properties of PVA/TiO₂ Nanocomposite Fibers Produced by Electrospinning. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology (Print)*, v. 10, p. 5144-5152, 2010.
- [2] CHUN, J. Y.; KANG, H. K.; JEONG, L.; KANG, Y. O.; OH, J. E.; YEOC, I. S.; JUNG, S. Y.; PARK, W. H.; MIN, B. M. Epidermal cellular response to poly(vinyl alcohol) nanofibers containing silver nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 78, p. 334-342, 2010.
- [3] Biological evaluation of medical devices - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. ISO 10993-5, 2009.
- [4] NOZAKI, C. M. A.; MARQUES, F. C. R.; DINIZ, M. A. I.; MARQUES, M. M.; MARCHI, J. Avaliação da citotoxicidade de membranas de colágeno visando à aplicação como biomaterial. In: *Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais*, Natal – R.N., 2012.
- [5] JIN, C. Y.; ZHU, B.S.; WANG, X.F.; LU, Q.H. Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells. *Chemical Research in Toxicology*, v. 21, p. 1871-1877, 2008.

OBTENÇÃO DE HIDROXIAPATITA NANOESTRUTURADA COM APLICAÇÃO PARA FERTILIZANTE E AVALIAÇÃO DE ASPECTOS DE NANOTOXICIDADE

*Flávia Fontes Pereira^{1,2}, Daniel Souza Corrêa^{1,2}, Marcos David Ferreira^{1,2},
Elaine Cristina Paris¹

¹Embrapa Instrumentação, São Carlos, São Paulo. ²Universidade Federal de São Carlos, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, São Carlos, SP.

*flabio08@gmail.com

Classificação: Estudo dos aspectos de segurança em nanotecnologia.

Resumo

O estudo tem por objetivo sintetizar e caracterizar hidroxiapatita nanoestruturada visando aplicação como nanofertilizante e avaliar a nanotoxicidade ambiental utilizando como organismo-teste a micro-

alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. As nanopartículas de HAP foram sintetizadas pelo método de Coprecipitação seguida de Hidrotermalização por 2 horas a 150°C. Após caracterização estrutural e morfológica das nanopartículas de HAP, bioensaios de nanotoxicidade aguda foram realizados com duração de 72 horas. Os resultados mostraram que o crescimento algáceo foi inibido na amostra de HAP Coprecipitada, enquanto que na amostra de HAP Hidrotermal o crescimento foi próximo ao controle. Variações nas concentrações e no tamanho das partículas evidenciaram diferentes comportamentos para o crescimento das microalgas.

Palavras-chave: Nanopartículas; Fertilizante; Hidroxiapatita; Nanotoxicidade; Microalgas.

OBTAINING HYDROXYAPATITE NANOSTRUCTURED WITH APPLICATION FOR FERTILIZER AND EVALUATION OF ASPECTS OF NANOTOXICITY

Abstract

The study aims to synthesize and characterize nanostructured hydroxyapatite aiming their application as nanofertilizer and evaluate environmental nanotoxicity using as test organism microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. HAP nanoparticles were synthesized by Coprecipitation method followed by Hydrothermalization in 2 hours at 150°C. After structural and morphological characterization of the nanoparticle PAH, bioassay of acute nanotoxicity were carried with duration of 72 hours. The results showed that the algal growth was inhibited in the sample of Coprecipitated PAH, while for the sample of PAH Hydrothermal growth was close to the control. Changes in the concentrations and particle size showed different behaviors for the development of algae.

Keywords: Nanoparticles; Fertilizer; Hydroxyapatite; Nanotoxicity; Microalgae.

1 INTRODUÇÃO

Com o crescimento da indústria de nanomateriais manufaturados surgiu a preocupação sobre a possibilidade da entrada destes no meio ambiente, ocasionando impacto final para a biota. Quando inseridos no ambiente natural, os nanomateriais sofrem alterações no tamanho da partícula, na forma, na carga de superfície e no controle crítico da biodisponibilidade (BATLEY *et al.*, 2011). Estrutura, composição, concentrações, solubilidade e maior área superficial influenciam na toxicidade de nanopartículas (TAYLOR, K. M. and BANFIELD, J. F., 2006; MAYO *et al.*, 1999).

As nanopartículas de hidroxiapatita (HAP) que podem atuar como fertilizante nanoestruturado são uma alternativa promissora para substituir os fertilizantes convencionais uma vez que apresentam inúmeras vantagens, dentre elas, regular a liberação de nutrientes, além de serem mais eficientes que os adubos convencionais, amenizarem a produção de resíduos, e conseqüentemente os custos de proteção ambiental (TARAFDAR, *et al.*, 2013; CHINNAMUTHU and MURUGESA BOOPATHI, 2009).

Gong *et al.* (2011) evidencia que em nanotoxicologia, a toxicidade nos recursos hídricos é consideravelmente mais vulnerável à contaminação por nanomateriais, apresentando grande potencial tóxico, especialmente para as microalgas. Aruoja (2009 e 2011) e Oliveira (2007) relatam que as microalgas são de grande importância ecológica como produtores primários na cadeia trófica aquática.

Portanto, a presente pesquisa tem por objetivo sintetizar, caracterizar a HAP nanoestruturada como nanofertilizante e investigar em sua totalidade o seu comportamento quando disposta no ambiente aquático e os efeitos tóxicos gerados para a microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

As nanopartículas de HAP foram obtidas empregando-se o método de Coprecipitação por via úmida. Desta maneira, foram feitas suspensões baseadas na hidrólise do sal dos íons de interesse (Ca^{2+} e P^{5+}). Inicialmente, foram preparadas soluções aquosas de nitrato de cálcio e de fosfato de amônio. A seguir, gotejou-se a solução de fosfato de amônio à solução de nitrato de cálcio sob fluxo constante de gás nitrogênio. Durante esse processo de síntese, controlou-se o pH do meio reacional com a adição do hidróxido de amônio, a fim de que fosse mantido em um valor igual a 11. Após o término da síntese o precipitado foi transferido para um recipiente de teflon acoplado a um forno hidrotermal e submetido ao aquecimento de 150°C por 2 horas. O precipitado resultante foi lavado várias vezes até atingir o pH neutro, centrifugado e seco em estufa. As amostras de HAP foram analisadas pela técnica de difração de raios-X (DRX), utilizando um difratômetro da Shimadzu, modelo XRD-6000, sendo as condições operacionais com ângulo variando de 5° a 80° (2 θ) e velocidade de 1°/min. Para a determinação da morfologia das nanopartículas foi utilizado a microscopia eletrônica de varredura com emissão de campo

(MEV-FEG) em um microscópio JEOL, modelo JSM-6701F.

Bioensaios de nanotoxicidade aguda com a microalga *P. subcapitata* foram realizados para amostras de HAP Coprecipitada e HAP Hidrotermal no período de 72 horas. A norma utilizada foi a preconizada pela OECD, 2011, com algumas adaptações.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Figura 1 apresenta os difratogramas das amostras de HAP Coprecipitada e HAP Hidrotermal. Obteve-se a HAP monofásica com estrutura hexagonal de acordo com a ficha JCPDS (*Joint Committee on Powder Diffraction Standards*) nº 09-432.

Para a amostra de HAP hidrotermal nota-se uma melhor definição dos picos difratados, resultado do processo hidrotérmico de 2 horas, o qual favoreceu o processo de cristalização da HAP, quando comparada a amostra sem hidrotermalização.

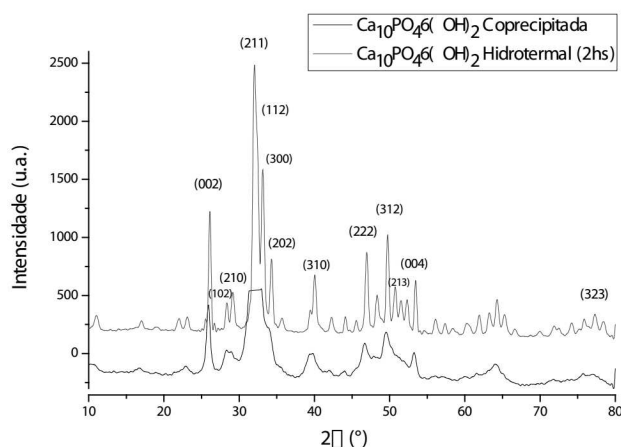


Figura 1. Difratogramas de raios-X das amostras de HAP obtidas por Coprecipitação e Hidrotermalização.

Na Figura 2 foi possível observar a formação de bastonetes nanoestruturados por toda a amostra de HAP Hidrotermal, com diâmetros médios que variaram entre 10 a 30 nm, sendo a faixa predominante acima de 20% de nanopartículas com diâmetro médio entre 16 a 18 nm. A amostra apresentou aglomerados/agregados, porém as nanopartículas mostraram-se mais definidas com relação ao contorno da área superficial. De acordo com o histograma obtido observou-se que a distribuição de tamanho foi homogênea, assim como os processos de nucleação e crescimento de partículas. Não houve a possibilidade de calcular a distribuição do diâmetro das partículas para a amostra de HAP Coprecipitada, devido à morfologia acentuadamente aglomerada do material.

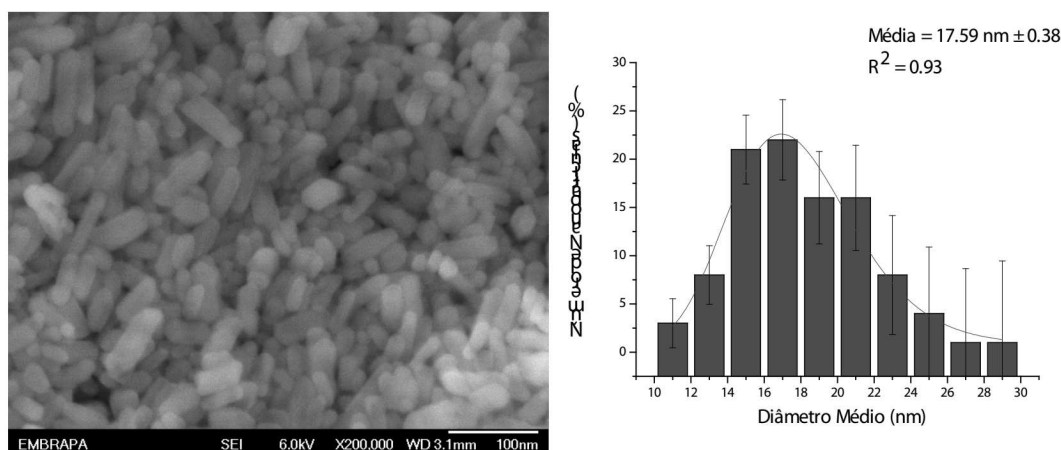


Figura 2. Imagem obtida por microscopia eletrônica da amostra de HAP hidrotermal (2 horas) e a respectiva distribuição do diâmetro médio das partículas.

A Figura 3A apresenta as curvas de crescimento algáceo dos 5 tratamentos comparados ao controle ao longo das 72 horas de bioensaio com nanopartículas de HAP Coprecipitada. Pode-se observar

que as concentrações mais baixas de HAP aumentaram a densidade celular das microalgas, enquanto que as concentrações mais altas diminuíram a densidade ao longo deste período.

Para o bioensaio com a HAP Hidrotermal em menores concentrações (Figura 3B) notou-se um aumento geral nas densidades celulares das microalgas, as quais foram mais próximas ao controle. As menores densidades obtidas ocorreram quando as microalgas foram expostas em concentrações mais elevadas de nanopartículas, conforme ilustrado abaixo.

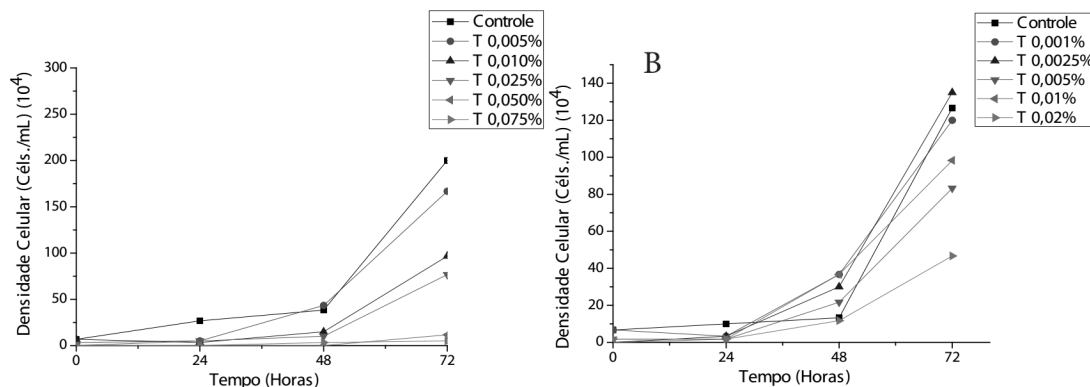


Figura 3. Curvas de Crescimento da microalga *P. subcapitata* referente ao controle e aos respectivos tratamentos no período de 72 horas de bioensaio com a HAP Coprecipitada (A) e HAP Hidrotermal (B).

Um efeito semelhante ocorreu no trabalho de Wang, *et al.*, 2008 para o crescimento da microalga *Chlamydomonas reinhardtii* quando exposta em concentrações elevadas de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2) e quantum dots (QDs).

4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as nanopartículas de HAP Coprecipitada devido apresentarem menor diâmetro, maior área superficial, elevada formação de aglomerados/agregados e maior solubilidade, quando em altas concentrações apresentaram toxicidade para a microalga *P. subcapitata*. Visualmente observou-se o crescimento algáceo predominante sobre os precipitados da HAP. Em contrapartida, as nanopartículas de HAP Hidrotermal em menores concentrações, com maior diâmetro e menor área superficial, não evidenciaram toxicidade ou estimulação do crescimento algáceo significativos. Observou-se uma distribuição mais homogênea do crescimento algáceo, o qual se deu tanto sobre o material precipitado quanto por todo meio de cultivo. Portanto, as variações no tamanho, na concentração, a presença de aglomerados/agregados e a solubilidade de nanopartículas de HAP resultaram em diferentes comportamentos para o crescimento de *P. subcapitata*.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de doutorado concedida. Processo N° 2013/17528-8.

REFERÊNCIAS

ARUOJA, V.; DUBOURGUIER, H.C.; KASEMETS, K.; KAHRU, A. Toxicity of nanoparticles of CuO, ZnO and TiO_2 to microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Science of the total environment*, v. 407, p. 1461 – 1468, 2009.

ARUOJA, V. Algae *Pseudokirchneriella subcapitata* in environmental hazard evaluation of chemicals and synthetic nanoparticles. 2011. 114f. Thesis for applying for the degree of Doctor of Philosophy in Environmental Protection, Estonian University of Life Sciences, Tartu, 2011.

BATLEY, G. E.; GRAEME, 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, 2013.

CHINNAMUTHU, C.R.; MURUGESA BOOPATHI, P. Nanotechnology and Agroecosystem. Madras Agric. J., Coimbatore, v. 96, n.1-6, p. 17-31, 2009.

GONG, N.; SHAO, K.; FENG, W.; LIN, Z.; LIANG, C.; SUN, Y. Biototoxicity of nickel oxide nanoparticles and bio-remediation by microalgae *Chlorella vulgaris*. Chemosphere, v.83, p. 510-516, 2011.

MAYO, M.J.; SEIDENSTICKER, J.R.; HAGUE, D.C.; CARIM, A.H. Surface chemistry effects on the processing and super plastic properties of nanocrystalline oxide ceramics. Nanostruct. Mater, v. 11, n.2, p. 271-282, 1999.

OLIVEIRA, A. C. Toxicidade de elementos-traços para consumidores primários na presença de exopolissacarídeos produzidos por organismos fitoplanctônicos (Chlorophyceae e Cyanophyceae). 2007. 183p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia Ambiental) – Escola de Engenharia de São Carlos – EESC/USP, São Carlos, 2007.

ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT. Guidelines for the testing of chemicals – Freshwater Alga and Cyanobacteria, Growth Inhibition Test. OECD guidelines for testing of chemicals 201, Paris, France, 2011.

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

TAYLOR, K. M.; BANFIELD, J. Environmental Risks of Nanotechnology: National Nanotechnology Initiative Funding, 2000-2004. Environ. Sci. Technol., v.40, p. 1401-1407, 2006.

WANG, J.; ZHANG, X.; CHEN, Y.; SOMMERFELD, M.; HU, Q. Toxicity assessment of manufactured nanomaterials using the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Chemosphere, v. 73, p. 1121-1128, 2008.