

JOANA CASTELLO PEREIRA

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM
DIFERENTES SUSPENSÕES**

LISBOA, 2010

UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DOS MATERIAIS

**ESTUDO DO COMPORTAMENTO DE
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM
DIFERENTES SUSPENSÕES**

JOANA CASTELLO PEREIRA

Dissertação efectuada na Faculdade de Ciências e
Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa para
a obtenção do grau de Mestre em engenharia de
Materiais

Orientadora – Prof. Doutora Isabel Ferreira

Co-Orientadora – Prof. Doutora Ana Picado

LISBOA, 2010

AGRADECIMENTOS

Com a entrada de Bolonha, o tempo de desenvolvimento do projecto final de curso foi drasticamente diminuído, o que conseqüentemente induziu um ritmo de trabalho frenético na recolha e interpretação de resultados. Por estas razões seria impossível atingir os objectivos estipulados sem a contribuição de determinadas pessoas.

Tenho por isso a agradecer, em primeiro lugar, à minha orientadora Prof. Dra. Isabel Ferreira, sempre munida de positivismo e energia contagiantes, pelo apoio e interesse tanto a nível pessoal como profissional. À minha co-orientadora Dra. Ana Picado pela sua total disponibilidade e interesse demonstrado no meu trabalho.

À Prof. Dra. Elvira Fortunato e Prof. Dr. Rodrigo Martins por me darem a oportunidade e privilégio de executar este trabalho e pelo uso das instalações de Excelência CENIMAT/I3N e CEMOP.

Ao Prof. Dr. Braz Fernandes pelos ensaios de DRX e pela sua disponibilidade e paciência no esclarecimento de dúvidas relacionadas com o método. Agradeço por esta mesma razão ao Dr. Elamurugu Elagovan e em especial à Dra. Joana Vaz Pinto pela sua resiliência e originalidade com vista a obtenção de bons resultados. Ao Prof. Dr. João Pedro Veiga pelos ensaios de FRX e boa disposição. Ao Dr. Luis Pereira, Dr. Pedro Barquinha pelos ensaios de SEM e ao Dr. Tito Busani não só de SEM como também de AFM.

À Prof. Dra. Teresa Cidade pelo tempo e equipamentos disponibilizados para os testes reológicos e ao meu colega e amigo Gonçalo Pereira pela ajuda nesta etapa.

Um especial obrigado ao Dr. Mário Diniz pelo uso do equipamento de Ultra-sons, pela sua colaboração e esclarecimento de dúvidas.

À Prof. Dra. Luísa Corvo (INETI - UNFAB) por ter disponibilizado o equipamento de DLS. Ao Dr. António Alves de Matos (Hospital Curry Cabral - CESAM) pelos ensaios em TEM e esclarecimento de dúvidas. Ao Dr. José Brito pelo interesse mostrado e ajuda disponibilizada.

Ao Eng. Hugo Lisboa pela sua ajuda no estudo e elaboração de suspensões e por se ter revelado um amigo inesperado. Ao Eng. Vitor Figueiredo pela sua contribuição na resolução de problemas. Ao Frederico Malheiro pela sua sempre presente amizade e ajuda no tratamento de dados. À Ana Baptista pelas sessões de *Brainstorming*.

Quero também agradecer a todos os membros não mencionados do grupo MEO pelo apoio e ambiente agradável no local de trabalho. Foi um privilégio trabalhar convosco.

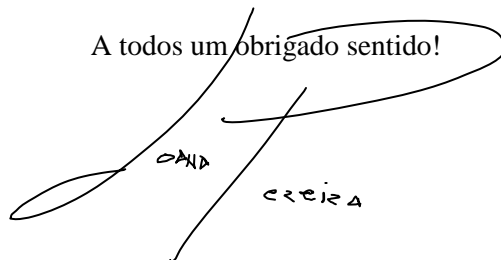
A nível pessoal quero agradecer a todos os meus amigos e família pelo apoio directo ou indirecto demonstrado ao longo destes meses, por terem sido por vezes um porto de abrigo por outras fontes de inspiração. Em especial quero agradecer à minha avó Lourdes, pelo seu coração

imenso, pela sua preocupação, pelo seu amor, pela sua contribuição na pessoa e adulto que sou hoje. Quero também agradecer aos meus pais, pela profunda fé que sempre depositaram nas minhas potencialidades, pela vontade de fazer sempre mais e melhor, pela compreensão, pelo investimento, pela lição de vida, pela liberdade, pelos princípios, pelo amor incondicional, que mesmo não estando presentes, estão sempre comigo.

Não posso deixar de mencionar o meu profundo agradecimento pelas amizades de contornos eternos daqueles que comigo iniciaram e percorreram a etapa académica que agora finda, Adriana Nogueira, Bruno Brás, Sofia Cruz e Margarida Luz. Agradeço também a dois dos colegas que conheci pelo caminho e que pela sua amizade e companheirismo se distinguiram Gonçalo Pereira e Diana Gaspar.

Aos que num dado momento, através das suas acções mudaram rumos, simbolizaram etapas ou estiveram presentes em momentos cruciais tenho a agradecer ao Dírrio Candeias pela pessoa que é e pelo que representou na minha vida, à família Candeias por todo o apoio, carinho e compreensão à Carmen Bastos, à Helena Esteves, ao Guilherme Lopes e ao Vasco Matos (por tudo).

A todos um obrigado sentido!



Dírrio
Candeias

RESUMO

Neste trabalho procurou caracterizar-se diferentes suspensões de nanopartículas de dióxido de titânio. Embora estas partículas já estejam a ser incorporadas numa variada gama de produtos do mercado, desde cosméticos, dentífricos, tintas, etc., a avaliação do seu efeito toxicológico nos ecossistemas e na saúde dos seres humana e animal começa agora a dar os primeiros passos. Neste trabalho pretendeu-se fazer um estudo preliminar do comportamento das nanopartículas de TiO_2 quando em suspensão aquosa, tendo em vista futuros estudos de ecotoxicologia.

A dinâmica das nanopartículas em suspensão é um campo em que os métodos de caracterização não estão otimizados, sendo necessário recorrer a diferentes técnicas para se poder obter uma informação o mais fiável e reprodutível possível. Uma vez que algumas dessas técnicas são complexas e/ou intrusivas, neste trabalho optou-se por fazer uma primeira caracterização das diferentes suspensões, através da espectroscopia do visível. Deste modo pretendeu-se avaliar o tempo de sedimentação das nanopartículas, medindo a transmitância da suspensão ao longo do tempo.

Foram preparadas diferentes suspensões com o objectivo de avaliar uma vasta gama de possibilidades visando situações reais de introdução das nanopartículas nos meios aquáticos. Assim foi estudado o efeito de: a) pH; b) várias qualidades de água; c) acetona e álcoois como solventes; d) efeito de diferentes dispersantes; e) iluminação com Ultravioletas.

Neste estudo avaliou-se o tempo de sedimentação das nanopartículas em suspensão e o próprio sedimento. Para tal recorreu-se a variadas técnicas tais como SEM, TEM, XRD e XRF para a caracterização quer do pó de partida quer do sedimento. As partículas em suspensão foram dispersadas com ultra-sons tendo-se realizado um estudo prévio do efeito do tempo e frequência do sonicator nas características ópticas das suspensões.

Verificou-se que independentemente do meio utilizado as nanopartículas apresentaram sempre tendência a sedimentar, porém o tempo de sedimentação teórico calculado por tratamento de dados obtidos por espectroscopia do visível originou tempo de sedimentação entre as 8 e as 431 horas.

Os resultados obtidos por SEM e DRX mostraram que os factores estudados não causaram alterações estruturais nas nanopartículas de dióxido de titânio. Pela espectroscopia do visível obteve-se uma aproximação do tempo de sedimentação para todas as amostras estudadas.

ABSTRACT

The main goal of this work was to characterize different suspension types of TiO₂ nanoparticles to support future ecotoxicological studies. While common in many industries (cosmetic, paint, toothpaste, etc.), these nanoparticles still have unknown effects on both public health and the environment and ecotoxic studies are only now beginning.

As the techniques used to characterize the suspensions of nanoparticles have yet to be optimized for these specific water dynamics, it was necessary to use different methods that could guarantee reliable and reproducible results. As some of these techniques are complex or intrusive, the initial approach focused on using visible spectroscopy to determine the sedimentation rate of the nanoparticles by measuring the suspension transmittance over time.

The suspensions were prepared taking into account real aquatic ecosystems and ecotoxicological conditions. Different parameters were used to accomplish this, namely: pH; different types of water; solvents (acetone and alcohol); surfactants and UV illumination.

Aside from measuring the sedimentation time, the sediment was also studied by using several techniques, such as SEM, TEM, DRX and XRF. The suspended particles were dispersed using ultrasounds. Thanks to a preliminary study the influence of various sonicator settings such as the variation of the application time and frequencies were understood.

The results have shown that these nanoparticles tend to sediment no matter the solvent used, although the sedimentation time calculated using visible spectroscopy may vary from 8 to 431 hours. SEM and XRD images didn't show any relevant structural alterations in any of the samples.

NOMENCLATURA

AFM	Microscopia de Forças Atômicas / Atomic Force Microscopy
BET	Técnica para medição da superfície de área de nanopartículas por absorção de Azoto (Brunauer – Emmett - Teller)
CDO	Comprimento de onda (λ)
$d_H/D(H)$	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS	Análise por Dispersão Dinâmica da Luz/ Dynamic Light Scattering
DPDWS	Espectroscopia Difusa de Densidade de Onda/ Diffused Photon Density Wave Spectroscopy
EDS	Espectroscopia de Dispersão de Energia / Energy Dispersive X-Ray Spectroscopy
ELS	Dispersão Electroforética da Luz / Electrophoretic Light Scattering
ERSAR	Entidade Reguladora de Serviços de Águas e Resíduos
FCS	Espectroscopia de Correlação de Fluorescência /Fluorescence correlation spectroscopy
FDA	Food and Drugs Administration (U.S.A)
FIB	Feixe de iões Focalizado/Focus Ion Beam
FFF	Fracionamento por efeito de campo/ Flow Field Fractionation
FWHM	Largura do pico a meia altura / Full Width at Half Maximum
GST	Glutadiona S-Transferase
ISO	International Organization for Standardization
NTA	Análise de Localização de Nanopartículas /Nanoparticle Tracking Analysis
LC50	Concentração para a qual ocorre 50% de mortalidade
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
PCQA	Programa de Controlo de Qualidade
PCS	Espectroscopia de Correlação Fotónica / Photon Correlation Spectroscopy
T	Transmitância Directa
T	Tempo
TEM	Microscopia Electrónica de Transmissão/ Transmission Electron Microscopy

US EPA	United States Environmental Protection Agency
SAXS	Espectroscopia de Raios-X por incidência Rasante / Smal angle X-Ray Scattering
SEM	Microscopia Electrónica de Varrimento/ Scanning Electron Microscopy
XAFS	Espectroscopia de estrutura fina de absorção de raios-X /Extended X-ray absorption fine structure
DRX	Difracção de Raio-X/X-Ray Difraction
XRF	Fluorescência de Raio-X/ X- Ray Fluorescence

CONTEÚDO

RESUMO	III
ABSTRACT	V
NOMENCLATURA	VII
Índice de Figuras	XI
Índice de Tabelas.....	XIII
Objectivos	1
Prologo	3
1. Introdução	5
1.1 Nanotecnologia	5
1.1.1 Contexto Histórico	5
Dióxido de titânio (TiO ₂)	6
1.1.2 Aplicações	6
1.1.3 Impacto.....	8
1.1.4 Problemática da Caracterização	12
1.2 Técnicas Experimentais.....	19
1.2.1 Análise por Dispersão Dinâmica da Luz	19
1.2.2 Difracção de Raios-X	20
1.2.3 Espectroscopia do Visível/Ultravioleta	21
1.2.4 Fluorescência de Raios-X.....	22
1.2.5 Microscopia electrónica de Transmissão	22
1.2.6 Microscopia Electrónica de Varrimento.....	22
1.2.7 Microscopia de Forças Atómicas	23
1.2.8 Ultra-Sonicação	24
1.2.9 Potencial Zeta	24
1.2.10 Brunauer – Emmett - Teller (BET)	25
1.2.11 Espectroscopia de fluorescência de correlação (FCS).....	25
2. Análise e Discussão de Resultados	27
2.1 Nanopartículas de TiO ₂ em pó.....	27
2.2 Nanopartículas de TiO ₂ em Suspensão	30
2.2.1 Influência de dispersantes	33
2.2.2 Influência do pH.....	42
2.2.3 Influência da exposição à radiação Ultra-Violeta	51
2.2.4 Estudo das matrizes aquosas	57
2.2.5 Estudo da influência do Solvente	67

2.3 Análise comparativa das amostras controle	73
2.4 Influência dos parâmetros do Sonicador	75
3. Conclusão.....	79
Perspectivas futuras.....	82
Anexos.....	85
Anexo 1 – Estudos ecotoxicológicos	85
Anexo 2 – Limitações e Vantagens.....	87
Anexo 3 – Análise da Dispersão Dinâmica da Luz.....	88
Referências.....	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura cristalina apresentada pela a) Anatase b) Rutilo [10].....	6
Figura 2 – Áreas onde as nanopartículas do TiO ₂ já são incorporadas em produtos comercializados.....	8
Figura 3 – Influência do pH no potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico do TiO ₂ Adaptado de [31].....	13
Figura 4 – Influência da força iónica nas nanopartículas de TiO ₂ . [31].....	14
Figura 5 – Diferença entre agregados e aglomerados. Adaptado de [32].....	15
Figura 6- esquema da interacção da radiação com uma amostra cristalina.....	20
Figura 7 – Imagem de AFM de nanopartículas de TiO ₂ (Cenimat).....	24
Figura 8 – Esquema exemplificativo do Potencial Zeta adaptado de [43].....	25
Figura 9 – Difractograma das nanopartículas de TiO ₂	29
Figura 10 – Imagem de TEM das nanopartículas de TiO ₂	29
Figura 11 – Transmitância vs comprimento de onda para diferentes tempos da amostra D2.....	34
Figura 12 - Transmitância Total ao longo do tempo para o conjunto das amostras D para o comprimento de onda de 800nm.....	35
Figura 13 - Evolução da suspensão D2 ao longo do tempo.....	35
Figura 14 -Transmitância Directa das amostras D vs Tempo para o comprimento de onda de 800nm.....	36
Figura 15 - Aspecto dos sedimentos das amostras D.....	37
Figura 16 - Difractogramas obtidos para as amostras com diferentes tensioactivos.....	38
Figura 17 – Imagens de SEM da amostra D3 amplificada a)10000x e b)200000x; Amostra D4 amplificada a)1000x e b) 200000x.....	40
Figura 18 – Evolução do Diâmetro Hidrodinâmico com diferentes pH.....	44
Figura 19 – Transmitância directa vs comprimento de onda para diferentes tempos da amostra D2.....	44
Figura 20 – Transmitância Total ao longo do tempo para o conjunto das amostras P para o comprimento de onda de 800nm.....	45
Figura 21 – Imagem das suspensões P passadas 5 horas após sonicação.....	46
Figura 22 – Aspecto do sedimento das amostras P.....	46
Figura 23 - Espectros de DRX obtidos para as amostras P e o espectro das nanopartículas em pó.....	47
Figura 24 – a) amostra P4 b) amostra P7 c) Amostra P8 (50x) d) Amostra P10 (10x).....	48
Figura 25 - Transmitância vs comprimento de onda para diferentes tempos da amostra U2.....	51
Figura 26 - Transmitância Total ao longo do tempo para o conjunto das amostras U para o comprimento de onda de 900nm.....	52
Figura 27 – Difractograma obtido para as amostras U.....	53
Figura 28 – Imagens obtidas por SEM da amostra U1 com ampliação a)10000x b) 500000x e da U2 com ampliação a) 10000x b) 200000x.....	54
Figura 29 – Imagens obtidas por SEM da amostra U3 com ampliação a)10000x b) 500000x...	54
Figura 30 - Transmitância vs comprimento de onda para diferentes tempos da amostra W4.....	58
Figura 31 – Transmitância Directa ao longo do tempo para o conjunto das amostras W para o comprimento de onda de 800nm.....	59
Figura 32 – Aspecto do sedimento apresentado pelas amostras W.....	60
Figura 33 – Difractograma obtido por DRX para as amostras W4, W5, W6 e P25 da Degussa.	61
Figura 34 – Difractograma obtido por DRX para as amostras W2 e W3.....	62

Figura 35 – Formação de bolhas na amostra W2 ampliada 50kx e 100kx respectivamente.....	63
Figura 36 – Imagem obtida por SEM da amostra W6 a) antes de exposta a UV e b) depois de exposta aos UV	63
Figura 37 – Imagem de SEM das amostras W ampliadas 50000x.....	64
Figura 38 - Transmitância vs comprimento de onda para diferentes tempos da amostra W4.....	68
Figura 39 - Transmitância Total ao longo do tempo para o conjunto das amostras M para o comprimento de onda de 800nm.	68
Figura 40 – Aspecto do sedimento das amostras M.....	69
Figura 41 – Difractogramas obtidos para as amostras M.....	70
Figura 42 – Imagens obtidas por SEM das amostras M todas com ampliação de 50000x excepto a M3 (48000x).....	71
Figura 43 – Imagens de M3 e M5 coalescidas e M1 não coalescida ampliadas 200000x	72
Figura 44 - Espectro da Transmitância directa das amostras M12, W11,W12, U11 e U12.....	73
Figura 45 – Transmitância Directa vs Comprimento de Onda no momento inicial.....	74
Figura 46 – T vs CDO ao fim de 5h para todas as suspensões menos W11 (4h).....	74
Figura 47 – Sonicação a 20,40,60,80 e 100% de amplitude total de suspensões com concentração de : a)50µg/l b)100 µg/l c) 200µg/l d) 0µg/l (referência)	76
Figura 48 - – Dados recolhidos da sonicação de suspensões com concentrações de 0,50,100,200 µg/ml a 20% da amplitude total.	77
Figura 49 – Dados recolhidos da sonicação de suspensões com concentrações de 0,50,100,200 µg/ml a diferentes amplitudes.	78
Figura 50 – Limitações de técnicas utilizadas na caracterização de nanomateriais retirado de [36].....	87
Figura 51 - Intensidade típica para pequenas e grandes partículas, adaptado de [38].....	88
Figura 52 – Coeficiente de Correlação vs Tempo para partículas grande e para partículas pequenas Adaptado de [38].....	89

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados obtidos por Fluorescência de Raio-X.....	28
Tabela 2 – Resultados do tratamento da imagem de TEM.....	30
Tabela 3 – Tabela-resumo das amostras D efectuadas.....	33
Tabela 4 – Dados obtidos por DLS para as amostras D	34
Tabela 5 – Modelo matemático das transmitâncias directas das amostras D ao longo do tempo ($\lambda=800\text{nm}$), sendo T_{REF} a transmitância apresentada pela referência e respectivos valores de tempo para a sedimentação total.	37
Tabela 6 – Cálculo das dimensões das cristalites.....	39
Tabela 7 – Tratamento estatístico das imagens obtidas por SEM.....	41
Tabela 8 – Tabela-Resumo dos componentes das soluções-padrão utilizadas.....	43
Tabela 9 - Dados obtidos por DLS para as amostras D	43
Tabela 10 – Equações que representam a variação dos pontos experimentais de T ($\lambda=800\text{nm}$) vs t e tempo necessário para a sedimentação total das nanopartículas em suspensão	45
Tabela 11 – Cálculo das cristalites para as amostras P.	47
Tabela 12 – Dados obtidos por tratamento estatístico das amostras P	49
Tabela 13 – Tabela-resumo das amostras U efectuadas.....	51
Tabela 14 – Modelação matemática das Transmitâncias Directas das amostras U ao longo do tempo ($\lambda=900\text{nm}$).....	52
Tabela 15 – Cálculo das cristalites das amostras U.....	53
Tabela 16 - Dados obtidos por tratamento estatístico das amostras U	55
Tabela 17 – Tabela-Resumo das suspensões elaboradas para o estudo das matrizes aquosas....	57
Tabela 18 – Equações de ajuste dos pontos experimentais de T vs t e valores calculados para o tempo de sedimentação total das nanopartículas.....	59
Tabela 19 – Cálculo das cristalites para as amostras W.....	62
Tabela 20 - Dimensões médias obtidas a partir do tratamento estatístico das imagens obtidas por SEM das amostras W	65
Tabela 21 - Compilação das amostras elaboradas para o estudo do Solvente.....	67
Tabela 22 - – Dados obtidos por DLS para as amostras M.....	67
Tabela 23 - Equação que melhor se ajusta aos valores experimentais de T vs t para as amostras M ($\lambda=800\text{nm}$) e calculo do tempo necessário para que as nanopartículas sedimentem completamente	69
Tabela 24 - Cálculo das dimensões das cristalites.	70
Tabela 25 - Dimensões medias obtidas a partir do tratamento estatístico das imagens obtidas por SEM das amostras M.	72
Tabela 26 – Resumo de alguns estudos toxicologicos do TiO_2 . legenda p.p. – dimensões da partícula primária; a – dimensões dos aglomerados. Referências [30,34,45-56]	85

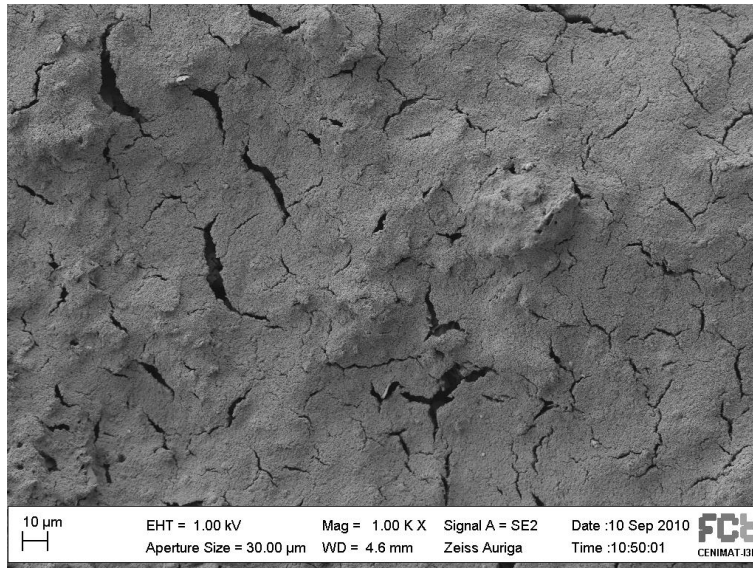
OBJECTIVOS

O objectivo deste trabalho centra-se na caracterização do comportamento das nanopartículas de dióxido de titânio em suspensão do ponto de vista da Engenharia. Procura-se, por conseguinte, fornecer um parecer crítico a respeito das técnicas laboratoriais utilizadas.

Neste trabalho pretendeu-se avaliar vários aspectos da dinâmica das nanopartículas de TiO_2 em suspensão que possam ser utilizados em futuros estudos de toxicologia. Uma vez que a caracterização de suspensões de nanopartículas está ainda muito pouco consolidada, o trabalho aqui realizado ambiciona dar um contributo para o entendimento do comportamento do TiO_2 em meio aquoso. Assim pretendeu-se estudar o impacto de vários factores na aglomeração, tempo de sedimentação e sedimento destas nanopartículas. Os factores estudados foram o pH, exposição à radiação ultravioleta, dispersantes, matrizes aquosas e solventes.

Para a caracterização das suspensões de partículas recorreu-se às técnicas de Dispersão Dinâmica da Luz e Espectroscopia do Visível/Ultravioleta. O sedimento foi caracterizado por Difracção de Raios-X e Microscopia Electrónica de Varrimento.

PROLOGO



Que vemos nesta imagem? Um deserto inóspito ou uma terra fértil em possibilidades? Antes de podermos responder a esta pergunta, é necessário aprofundar, não só o estudo do comportamento destas partículas como o seu impacto no meio ambiente.

1. INTRODUÇÃO

1.1 NANOTECNOLOGIA

Nanotecnologia consiste na arte e ciência de manipular a matéria à escala molecular e atômica. Mais especificamente é descrita como o desenvolvimento e aplicação de materiais e estruturas com dimensões nanométricas. [1] Atendendo a esta definição, considera-se incluído na categoria qualquer estrutura que possua pelo menos uma das suas dimensões igual ou inferior a 100 nm. Se esta regra se verificar para as suas três dimensões então estamos na presença de uma nanopartícula.[2]

1.1.1 CONTEXTO HISTÓRICO

There is Plenty Room at the Bottom, dizia Richard P. Feynman há pouco mais de 50 anos durante uma palestra de contornos históricos. Nesta palestra Feynman descreveu todo o conceito, as necessidades de novas ferramentas e conceitos físicos, sem nunca utilizar o termo Nanotecnologia.[3] O termo em si foi definido num artigo escrito por Norio Taniguchi da Universidade de Ciências de Tóquio em 1974 e descrito como um processo de separação consolidação e deformação de materiais, átomo por átomo ou por molécula.[4,5]

Em 1986 Eric Drexler, um dos grandes impulsionadores da área e criador do Instituto *Foresight*, editou o primeiro livro aprofundando o assunto, de seu nome *Engines of Creation: the coming Era of Nanotechonology*. [5]

A década de 80 revelou-se surpreendentemente próspera com as invenções do Microscópios de Efeito de Túnel (1981), do Microscópio de Força Atômica (1986) e pelos desenvolvimentos no estudo de colóides. Para fechar a década de 80 em grande, a IBM apresentou uma imagem do seu logótipo escrito à escala atômica (1989). A descoberta dos fulerenos e dos nanotubos de carbono foram também importantes para consolidar esta nova ciência em desenvolvimento e serviram como catalizador para a descoberta de muitas outras nanopartículas e pontos quânticos. [5]

A evolução da nanotecnologia não se tem cingido apenas à criação e melhoramento dos equipamentos ou à descoberta de novos materiais. Novos conceitos físicos como a nanoelectrónica, nanomecânica e nanofotónica têm sido desenvolvidos numa tentativa de criar uma base científica para esta nova tecnologia. À nanoescala, forças como a da gravidade, perdem significância enquanto, tensões superficiais e forças de Van der Waals, se tornam dominantes. Porém, o comportamento destes novos materiais não é ainda completamente compreendido e, as ferramentas e métodos de caracterização, apresentam muitas limitações. Há por isso ainda muito para investigar não só a nível dos materiais como dos métodos em si até se poder dominar por completo esta nova tecnologia.[6]

DIÓXIDO DE TITÂNIO (TiO_2)

O titânio é o nono elemento mais comum da crosta terrestre existindo naturalmente na forma de Ilmenite ($FeTiO_3$) e Rutilo (TiO_2) de onde são extraídos. A maioria das suas aplicações utiliza-o na sua forma oxidada. [7,8]

O dióxido de titânio apresenta-se na forma de três polimorfos distintos, dois de natureza tetragonal (Anatase e Rutilo) e um muito mais raro de estrutura ortorrômbica (Broquite). A Anatase e o Rutilo apresentam ambos o mesmo sistema cristalino mas a Anatase forma pirâmides com o eixo vertical mais longo que o Rutilo. (Figura 1) Este último apresenta dureza e densidade superior. O TiO_2 tem um índice de refração de 2,5 na forma de anatase e 2,6 na forma de rutilo, o que o torna ideal como pigmento branco opaco.[8,9]

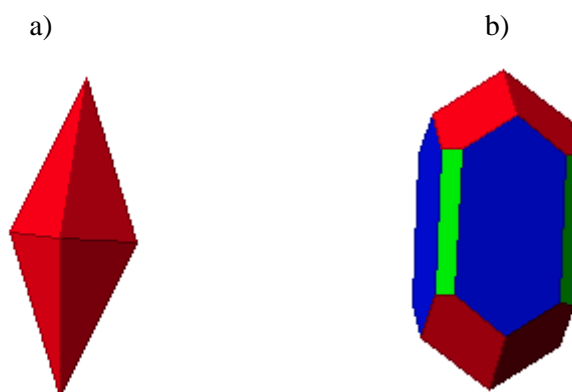


Figura 1 – Estrutura cristalina apresentada pela a) Anatase b) Rutilo [10]

1.1.2 APLICAÇÕES

O dióxido de titânio começou a ser produzido comercialmente por volta dos anos 20, mas ganhou rapidamente expressão como substituto dos pigmentos à base de chumbo. Hoje em dia 70% da sua produção é mesmo utilizada para este fim. Em termos de quantidade produzida encontra-se no Top 50 da lista de produtos químicos mundial. [9] Isto corresponde a 5,2 milhões de toneladas por ano.[11] Apesar de em 2009 apenas 2,5% deste valor ter correspondido ao TiO_2 nanoestruturado, espera-se um aumento para 10% em 2010. [12]

As suas aplicações abrangem as mais diversas áreas como por exemplo as indústrias alimentar, cosmética, do papel, farmacêutica, das tintas, dos plásticos, têxtil. Em todas estas indústrias já existem registos de produtos que contêm nanopartículas de TiO_2 . [13]

Em 1966 foi adicionado à lista da FDA (Food and Drugs Administration) como um aditivo corante alimentar. É por esta razão aplicado em laticínios, doces e coberturas. Porém é também utilizado para maximizar o sabor de certos alimentos como vegetais secos, nozes, sementes, sopas, mostarda, cerveja e vinho. Por ser transparente à nanoescala é aplicado em vários alimentos para retirar a humidade e oxigénio. [13]

O seu comportamento face exposição a radiação ultravioleta, torna-o o candidato ideal para protectores solares. Esta propriedade também é muito explorada na indústria dos plásticos e

tintas como método de prevenir a sua descoloração e deterioração. [9]

As suas propriedades fotocatalíticas foram descobertas por Akira Fujishima em 1967 e publicadas em 1972. Esta propriedade foi descoberta quando Fujishima expos à luz um eléctrodo de dióxido de titânio e um contra eléctrodo de platina submersos numa solução aquosa. Ao fazê-lo observou a libertação de pequenas bolhas do eléctrodo que mais tarde confirmou serem de oxigénio e que as libertadas pelo contra eléctrodo eram de produção de hidrogénio. [14,15] O TiO₂ ao ser iluminado por uma radiação suficientemente energética ($\lambda < 360\text{nm}$), gera excitação de electrões que saltam para a banda de condução e buracos são gerados na banda de valência. Ao utilizar um contra-eléctrodo de prata é possível criar um gradiente electronegativo capaz de causar a electrólise da água. [14]

Este processo aparentava ser uma fonte limpa e económica de hidrogénio para fins energéticos, porém a sua eficiência energética, quando usada radiação solar, era de apenas 0,3%, o que levou ao desenvolvimento de outras aplicações.[14] Descobriu-se que a fotocatalise do TiO₂ poderia ser usada como meio de decompor compostos prejudiciais. Ao aplicar o TiO₂ em paredes e chão de salas de operação, e expondo-as a luz ultravioleta o número de bactérias nestas superfícies e no ar diminuía drasticamente. Desde então o TiO₂ tem sido utilizado em azulejos com propriedades anti-bacterianas e em sistemas de purificação do ar. O TiO₂, como purificador de ar, pode ser utilizado na degradação de pequenas quantidades de composto como carbonos hidratados, aldeídos, compostos halogenados, compostos de enxofre, nitrogénio e vários compostos inorgânicos.[14,16,17]

Com a crescente preocupação com a qualidade do ar dentro de edifícios, tem-se vindo a desenvolver materiais de construção com TiO₂ incorporado, como vidros, azulejos, tintas, papel de parede e até mesmo cimento. O TiO₂ é utilizado nestas aplicações em nanopartículas ou em filmes finos nanométricos para maximizar o seu comportamento fotocatalítico. Também têm sido desenvolvidas aplicações exteriores por exemplo o cimento branco BiancoTX Millennium, utilizado na construção de escolas e igrejas em Itália.[17]

Em 1995 foi descoberto um novo fenómeno relacionado com a fotocatalise: colocando o TiO₂ sobre uma superfície vítrea e expondo-o à radiação ultravioleta criaram-se zonas super-hidrofílicas a par com zonas super-hidrofóbicas. Este fenómeno foi posteriormente explicado quando se verificou por AFM que a radiação ultravioleta removera parte dos átomos de oxigénio da superfície, estas áreas eram hidrofílicas e tinham dimensões de 30x50nm.[18] Esta propriedade faz com que a tensão superficial entre a gota e a superfície seja muito baixa em relação ao ar, levando à criação de uma fina camada de água sobre a superfície, quando exposta a radiação UV. Esta camada dificulta a aderência de outros elementos e torna as superfícies facilmente laváveis. A hidrofília fotoinduzida nestas superfícies com TiO₂, aliada às suas propriedades fotocatalíticas deram origem a aplicações como as superfícies autolimpantes e

superfícies que não embaciam. Alguns exemplos já em fase de comercialização consistem em fachadas, vidros que se limpam com as águas da chuva, levando a uma maior economia de produtos químicos de limpeza. Uma outra aplicação interessante prende-se com o uso do TiO_2 no arrefecimento de edifícios, isto é, incorporando as nanopartículas de TiO_2 nas fachadas de edifícios e instalando um mecanismo de dispersão de água é possível criar uma camada de água com cerca de 0,1mm. Estudos preliminares mostraram uma redução de 15^0 C em vidro e uma redução de 40 a 50^0 C em vidros escuros contribuindo para uma redução dos gastos energéticos. [18]

Existem também registos de estudos sobre aplicações a nível da medicina que não se restringem à sua acção bactericida, foi também estudada a sua eficiência na luta contra o cancro. [19]

Para além das aplicações na purificação do ar é também possível utilizar estas partículas na purificação de águas residuais e solos contaminados com pesticidas. Estas aplicações tiram partido da formação de radicais activos na superfície do TiO_2 quando em contacto com a água. [20,21] Na presença de radiação ultravioleta a adição de nanopartículas de TiO_2 consegue diminuir em 70% a quantidade total de compostos orgânicos. [22]

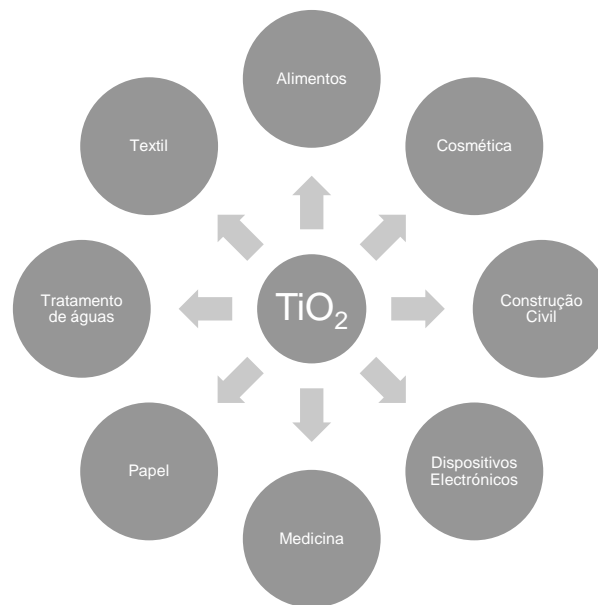


Figura 2 – Áreas onde as nanopartículas do TiO_2 já são incorporadas em produtos comercializados.

1.1.3 IMPACTO

Embora o ser humano tenha estado desde sempre exposto a partículas ultrafinas (cinza vulcânica, tempestades de areia) e o corpo humano esteja perfeitamente qualificado para responder a estas ameaças, o número e variedade de nanopartículas sintéticas tem aumentado exponencialmente desde a era industrial. Este aumento está fortemente relacionado com o aumento de doenças cardiovasculares, respiratórias, cancros e índice de mortalidade.[23]

As partículas de TiO_2 com diâmetros superiores a 100nm são consideradas

biologicamente inertes tanto para animais como humanos, porém o mesmo não é necessariamente aplicável às partículas de diâmetros inferiores.

O crescimento exponencial da comercialização dos produtos com nanopartículas de TiO₂ incorporadas, levanta questões quanto ao impacto que estas poderão ter nos ecossistemas ou mesmo na saúde pública que têm de ser respondidas a curto prazo.

Efeitos na Saúde Pública

Se por um lado as ínfimas dimensões e imensa área superficial das nanopartículas lhes conferem novas propriedades, por outro, é necessário ter em conta que esta mesma característica torna-as da mesma ordem de grandeza ou mesmo inferior que as células. Existe por isso o perigo destas partículas se infiltrarem por endocitose ou fagocitose em estruturas biológicas básicas e causarem danos a diferentes níveis.[23]

A exposição a estes materiais pode dar-se das mais diversas formas, por ingestão, por inalação ou mesmo por absorção da pele. Por exemplo, estima-se que nos países desenvolvidos cada pessoa ingira cerca de 10¹² partículas por dia, sendo estas maioritariamente de TiO₂ e silicatos provenientes da indústria alimentar. Estas partículas não se dissolvem e acabam por se acumular no organismo. [23]

Outro estudo em que foram administradas doses elevadas de TiO₂ a ratos mostrou que se acumulava em diversos órgãos como o fígado, rins, baço e pulmões. Estes resultados apontam a necessidade de se estudar mais atentamente os efeitos adversos nestes órgãos, tendo também em conta outros meios de exposição. [11]

Quanto à absorção do TiO₂ pela pele (tendo em conta aplicações como os protectores solares e produtos cosméticos) os resultados obtidos são muito díspares, não foi por isso possível chegar consenso. [11] Isto leva a crer que parâmetros como as dimensões das partículas utilizadas, a sua estrutura, aglomeração e duração do ensaio podem interferir com os resultados.[23,24] A maioria dos estudos levados a cabo têm durações curtas entre 24 e 48 horas porém, existe uma clara necessidade de estudar os efeitos a longo prazo. Wu (2009) e a sua equipa tentou suprir esta necessidade elaborando um estudo in vitro e com cobaias vivas durante 30 a 60 dias. As cobaias usadas foram porcos e ratos sem pêlo. Surpreendentemente todas as nanopartículas usadas (com dimensões entre 9 e 60nm) foram absorvidas pela pele, causando mesmo alguns efeitos adversos nos ratos. Para mais informações consultar a referência [24].

Embora tenha sido provada uma clara relação entre a inalação de nanopartículas de TiO₂ e cancro do pulmão em ratos [25], o mesmo ainda não foi comprovado para humanos pois o número de estudos neste campo é muito reduzido. Foi porém observado que estas partículas se acumulam nos pulmões dos ratos e são dificilmente removidas por acção dos macrofagos. Este mesmo mecanismo ocorre em humanos com outros tipos de nanopartículas de comportamentos semelhantes ao TiO₂ como o SiO₂ [26]. Estudos in vitro mostraram que as nanopartículas de

TiO₂ quando inaladas levam a uma diminuição na expressão de certos receptores de vírus e bactérias, o que origina uma diminuição das defesas do indivíduo.[23] A informação existente levou a que o TiO₂ fosse colocado na lista da *International Agency for Research on Cancer* (IARC) como um possível carcinogénio. Esta instituição alertou também quanto aos riscos que os trabalhadores em exposição constante e directa estão sujeitos nas unidades fabris. [11]

Efeitos no Ambiente

O aumento na produção destas partículas leva a uma maior exposição ambiental vinda de variadas fontes, nomeadamente: derrames durante a produção e o transporte, resíduos de produção (líquidos, sólidos ou gasosos), desgaste perdas durante o ciclo de vida dos produtos, perdas provenientes das lixeiras no fim de vida do produto.[27] Disto é um bom exemplo o estudo de Kaegi et al. (2008) dado ter comprovado que nanopartículas sintéticas de TiO₂ utilizadas na pintura de fachadas de edifícios expostas às condições climáticas conseguem libertar-se por acção das chuvas e infiltrar-se em ambientes aquáticos, embora ainda seja difícil quantificar a sua concentração no meio. [7]

Estas razões têm levado à multiplicação do número de estudos do impacto destas nanopartículas nos últimos anos. A maioria destes trabalhos encontra-se focalizada nas consequências da exposição de nanopartículas, sendo o número de estudos com vista ao desenvolvimento de ferramentas e abordagens de caracterização significativamente menor. [28] É por isso fundamental desenvolver ferramentas de diagnóstico capazes de caracterizar e quantificar em tempo útil as nanopartículas em sistemas reais.

Os ensaios ecotoxicológicos pretendem prever as consequências a curto e longo prazo no caso de determinada substância química entrar em contacto com o meio ambiente. São por isso uma forma de quantificar o perigo intrínseco de determinado produto. Os ensaios a curto prazo têm como objectivo determinar apenas a taxa de sobrevivência de determinado organismo enquanto os testes a longo prazo ou crónicos, procuram conhecer as consequências da exposição prolongada a doses não letais (geralmente a nível de crescimento e reprodução). [2]

A toxicidade aquática é o primeiro passo a executar para se proceder ao estudo de análise de determinado produto. [2]

Um esforço significativo tem sido feito com vista a criar uma base legal adequada à classificação, fabrico, manipulação, distribuição e tratamento de resíduos de nanomateriais. Para tal a Comissão Europeia iniciou o projecto “Nanociências e Nanotecnologia: Um plano de acção para a Europa 2005-2009” com vista a financiar estudos, sobretudo de análise de risco, facilitem a tomada de decisões. E, apesar do número de estudos ecotoxicológicos ter crescido exponencialmente há ainda um longo caminho a percorrer.

Na Europa, a organização *Water Framework Directive* (WFD), responsável por manter um bom equilíbrio químico e ecológico das águas de superfície, afirma que é impossível num

futuro próximo definir limites para as nanopartículas nestas águas. Tal deve-se a uma extensa falta de conhecimentos dos seus efeitos toxicológicos, degradabilidade, bioacumulação em ambientes aquáticos e pelas questões levantadas em relação á validade dos testes e métodos utilizados. Embora o número de estudos sobre ecotoxicologia de nanopartículas feitas pelo homem tenha vindo a aumentar os dados apresentam-se inconsistentes e não suficientemente sistemáticos para se poder tirar conclusões sólidas quanto ao perigo que estas representam para o ambiente.[27]

A necessidade de homogeneizar os parâmetros dos estudos sobre nanopartículas, levou a que a OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) lançasse uma série de seis directivas como resposta ao problema. Nestas directivas é possível consultar uma lista de nanomateriais já em fase de produção que necessitam urgentemente de ser estudados (entre eles o TiO₂), bem como algumas directivas sobre que propriedades se devem os investigadores debruçar (agregação, solubilidade, fases cristalinas, tamanho de partícula, distribuição, potencial zeta, propriedades fotocatalíticas, etc..) e em que condições devem ser efectuados os ensaios toxicológicos.[29]

Os primeiros testes toxicológicos são geralmente levados a cabo em algas, crustáceos ou peixes, por serem a base da cadeia alimentar.

No caso do TiO₂ não existem muitos estudos para determinação do LC50 (concentração mínima para a qual ocorre 50% de mortalidade) com peixes pois estas aglomeram e sedimentam muito rapidamente. Por conseguinte é muito difícil manter uma concentração elevada o suficiente para atingir uma toxicidade letal. Com concentrações de 10mg/l não é possível prevenir a aglomeração das partículas mesmo com extensos tempos de sonicação ou com adição de dispersantes. [22] Já no caso dos ensaios com algas, a aglomeração pode aumentar a toxicidade do TiO₂ uma vez que acaba por as envolver. [30]

No Anexo1 encontram-se resumidos alguns resultados de estudos levados a cabo para averiguar a toxicidade das nanopartículas de TiO₂. Apesar de ainda não haver consenso nos resultados, nota-se nos trabalhos mais recentes esforços na homogeneização dos parâmetros de testes, pelo uso de directivas como as ISO, US EPA, OECD. Nota-se também uma gradação da importância adquirida pela etapa de caracterização das partículas em seco e em suspensão. Técnicas como SEM, DRX, DLS e BET têm sido utilizadas para este fim.

Um estudo recente tratou estatisticamente, embora de maneira simplista, os resultados obtidos em ensaios ecotoxicológicos nos quais foram utilizados diferentes organismos. Neste estudo foi tido o cuidado de escolher ensaios em que foram usadas as directivas da OECD, no entanto não foram consideradas qualquer tipo de variações nas características das nanopartículas. As conclusões retiradas foram que, apesar da toxicidade do TiO₂ variar com o organismo, estas nanopartículas são nocivas ao meio ambiente em concentrações dos 10 e 100

mg/l. Os parâmetros utilizados no tratamento estatístico foram o LC50 que corresponde à concentração no meio capaz de matar metade da população em estudo. As concentrações LC50 obtidas foram de 67,7±10mg/l para os crustáceos, 603±4mg/l para as bactérias, 65,5±4mg/l para as algas, 300±4mg/l para os peixes, 80,1±1mg/l para os nematódeos e 20000±1mg/l para as leveduras. Não apresentou contudo toxicidade para os ciliados. [30]

A grande maioria dos estudos ecotoxicológicos em meios aquáticos é efectuada em organismos de água doce, porém é possível encontrar alguns estudos em água do mar (ambiente mais complexo). Estes estudos apesar de poucos, alertam para alterações comportamentais significativas (maior dispersão e sedimentação rápida) induzidas pela salinidade do meio (elevada concentração iónica). [2]

Atendendo às necessidades de caracterização aferidas, procurou-se no presente trabalho caracterizar, por diferentes métodos, nanopartículas de TiO₂ em diferentes meios, nomeadamente em água do mar, água do rio, meio de cultura e meio de teste de Daphinas (elaborados segundo as directivas da OECD) água da torneira e a água ultrapura (tradicionalmente mais utilizada).

Contudo, ainda não existe uma ferramenta ideal para medir nanopartículas em meios naturais, (i.e. rios, mares, solos), e apesar do esforço para tentar adaptar as ferramentas e técnicas existentes tal ainda não é possível. As dificuldades na caracterização devem-se principalmente a dois factores: a) a concentração esperada de nanopartículas sintéticas no meio é muito baixa (ng/l) e encontra-se abaixo do limite de medida de muitos equipamentos; b) a existência de partículas naturais capazes de adulterar os resultados obtidos (especialmente nos métodos de análise quantitativa de determinado metal). [22]

1.1.4 PROBLEMÁTICA DA CARACTERIZAÇÃO

Como se pôde observar pelos resultados toxicológicos descritos, ainda não é possível chegar a consenso sobre a toxicidade das nanopartículas nomeadamente as de TiO₂. Este facto pode ser explicado por a toxicidade destes materiais ser afectada por um grande número de factores, nomeadamente, as dimensões e forma da partícula, a sua área superficial específica, a concentração, a polidispersibilidade e diversos parâmetros do meio (pH/concentração iónica, composição, etc.). Torna-se por isso fundamental, proceder a uma boa caracterização das partículas e do seu comportamento no meio de teste antes de estudar a sua toxicidade. Vários estudos têm sido feitos numa tentativa de se compreender o comportamento de nanopartículas como as de TiO₂ em suspensão.

No estudo de Jingkun et al (2009) procurou caracterizar-se o comportamento das

nanopartículas de TiO_2 (P25 da Degussa) em meios com diferentes pH (Figura 3) e concentrações iónicas (Figura 4). Estudou também o impacto da adição de um dispersante e a eficiência do uso de ultra-sons. Os parâmetros estudados foram o grau de aglomeração (por DLS) e a carga superficial (por ELS). Numa primeira etapa as partículas foram expostas a uma variação de pH entre 3,4 e 10,4 (por adição de NaOH e HCl) enquanto a força iónica da suspensão foi mantida constante a 0,001M (por adição de NaCl). Numa segunda etapa, manteve-se o pH 4 e alterou-se a força iónica por adição de NaCl (0,0001 – 0,001M). [31]

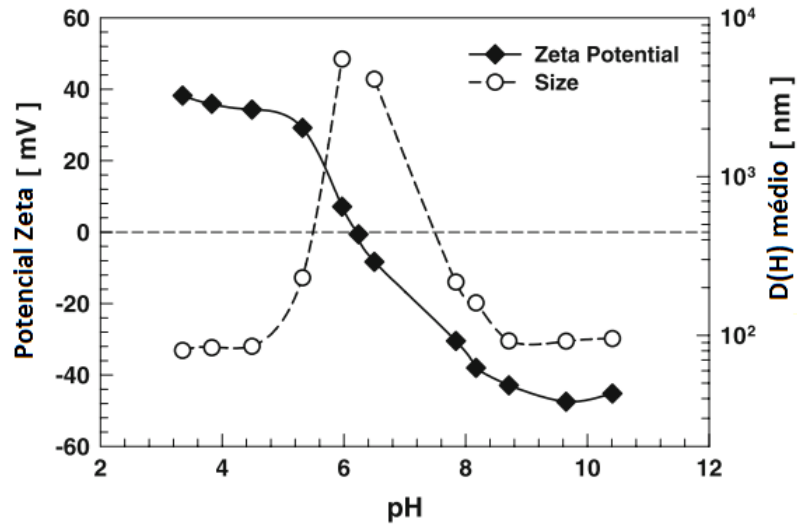


Figura 3 – Influência do pH no potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico do TiO_2 Adaptado de [31]

O ponto isoelétrico da suspensão ocorreu para valores de pH6. Para valores afastados deste pH (inferiores a 4,2 e superiores a 8,2) as forças repulsivas mostraram-se dominantes sobre as de Van der Waals o que resultou em inibição da aglomeração. Para valores próximos deste ponto a aglomeração mostrou-se muito intensa, saindo mesmo fora dos limites de medição do equipamento. [31]

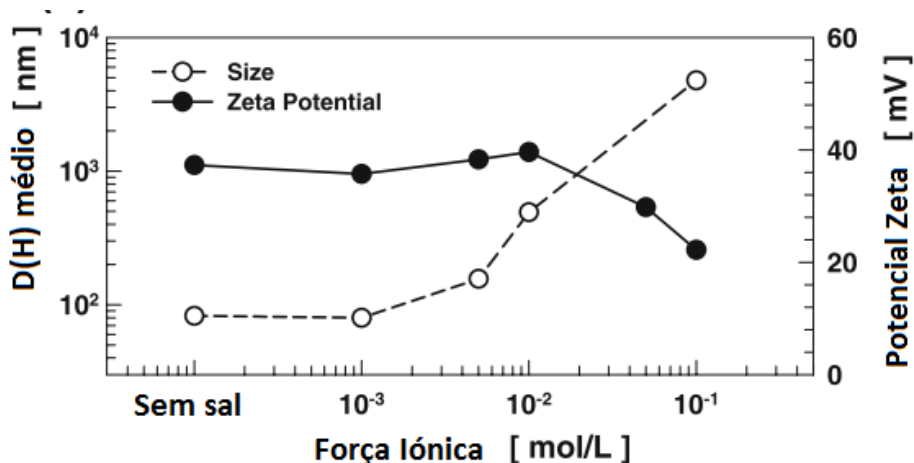


Figura 4 – Influência da força iónica nas nanopartículas de TiO_2 . [31]

O potencial zeta consiste numa diferença de potencial entre o plano de cisão da camada interior e exterior da camada eléctrica dupla que envolve a partícula e a concentração de um ponto no meio. Com adições de sal superiores a 0,01M a concentração de iões do meio mostrou elevada um suficiente para diminuir significativamente esta diferença de potencial o que levou à compressão da camada e consequente aglomeração (aumento do diâmetro hidrodinâmico). Posto isto, o D(H) era de 90nm mostrando uma clara dominância das forças electrostáticas repulsivas sobre as atractivas inibindo a aglomeração, porém a 0,1M o resultado obtido foi oposto, as forças atractivas dominantes levaram a um claro aumento da aglomeração (aprox.7000nm). Outra questão importante é que a adição de apenas 0,005M levou a um aumento de 66nm de diâmetro, o que sugere uma enorme susceptibilidade a este factor. Este estudo foi levado a cabo para suspensões com concentrações de 50, 100 e 200 μ g/ml onde se obtiveram resultados coerentes entre si. [31]

Quanto ao estudo da sonicação o tempo mínimo necessário para atingir a dispersão máxima foi de cerca de 120 segundos para a sonicação por sonda com potência 750W (20kHz).

Estudos toxicológicos utilizam muitas vezes suspensões com força iónica de 0,1M. A aglomeração é por isso um mecanismo comum passível de criar problemas tanto nos estudos toxicológicos como à aplicação de métodos de caracterização das nanopartículas. Este factor aumenta normalmente com a concentração de nanopartículas entre outros factores do meio. [2]

Tratamento das amostras - Aglomeração

De modo a contornar as dificuldades descritas acima é necessário proceder ao tratamento das amostras antes de se passar à etapa de caracterização.

Existem diversas alternativas para a evitar ou minimizar a aglomeração, por exemplo, com a adição de solventes ou dispersantes, uso de ultra-sons ou agitação. A aglomeração das nanopartículas pode ser classificada de duas formas tendo em conta as forças que estão a actuar:

aglomeração e agregação. No primeiro caso as partículas encontram-se ligadas por forças fracas (forças de Van der Waals), mas no segundo as suas ligações já são de cariz químico, e consequentemente mais fortes. (Figura 5) Os métodos referidos acima conseguem diminuir a aglomeração mas não a agregação. [31]

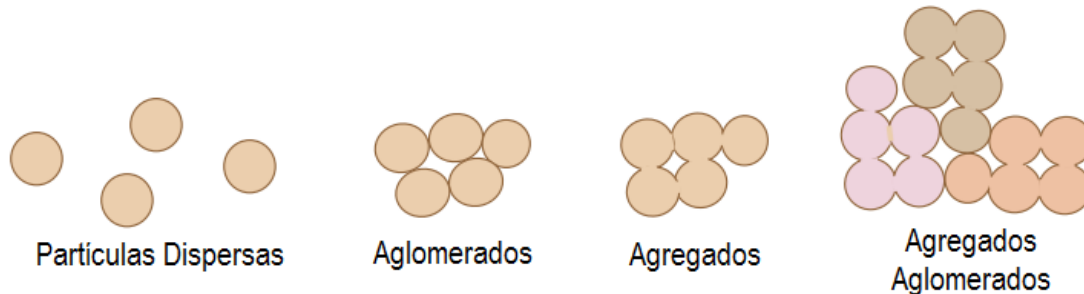


Figura 5 – Diferença entre agregados e aglomerados. Adaptado de [32]

A adição de solventes ou dispersante é bastante eficiente na dispersão de nanopartículas, a carga iónica da solução é fundamental. Nesta categoria estão incluídos solventes como acetona e álcool, agentes dispersantes ou até mesmo o uso de diferentes pH. Porém, é preciso ter em conta que o objectivo subjacente ao trabalho é a sua posterior aplicabilidade em estudos de toxicologia das nanopartículas de TiO_2 . Assim o excesso de aditivos pode levar a alterações morfológicas das partículas e alterar os resultados toxicológicos.[2] Existem porém aditivos orgânicos naturais muito eficientes na dispersão de nanopartículas. No caso das nanopartículas de TiO_2 o ácido flúvico (presente em muitos sistemas aquáticos - p.e. rios) mostrou-se muito eficiente. Para além de resolver o problema da aglomeração é ambientalmente relevante. [33]

Os ultra-sons são largamente usados para a dispersão de partículas, em testes toxicológicos, evitando assim o recurso a aditivos tóxicos. Apesar de relativamente eficientes na dispersão dos aglomerados, podem causar danos na superfície das nanopartículas. Em muitos casos o efeito da sonicação não é permanente pois pode levar a nova aglomeração das partículas quando a suspensão fica em repouso. As suspensões de água ultra-pura não apresentam problemas mas quando se usam matrizes em água não purificada a sonicação pode induzir a formação de espécies de oxigénio reactivas. Porém, a agitação por meio de agitadores magnéticos é pouco eficiente, demorando muito tempo, podendo também causar danos na superfície das partículas. [2]

Por vezes utiliza-se uma etapa de filtração para se ter a certeza que não existem aglomerados acima de uma determinada dimensão. Mas este método está longe de ser o ideal uma vez que altera a concentração da solução e não impede que as partículas voltem a aglomerar novamente.[2]

Não sendo possível afirmar qual o melhor método, torna-se necessário analisar cuidadosamente caso a caso e escolher o que mais se adequa, podendo mesmo recorrer-se a

vários.

No presente trabalho foi estudado o efeito de diferentes solventes, tensioactivos e pH em conjugação com a Ultrasonicação.

Porém, a aglomeração do meio pode também ser um factor de a estudar. Um método utilizado neste tipo de estudo é por Análise de Difraccção Dinâmica da Luz (DLS)[34] embora um trabalho recente tenha sugerido o uso de uma nova técnica para esta monitorização. Neste estudo Jun Tanguchi e a sua equipa criaram um método denominado de Espectroscopia Difusa de Densidade de Onda (DPDWS). Este método estima propriedades ópticas de suspensões concentradas pela atenuação e desfasamento que a radiação sofre ao atravessar o meio. Neste método de difracção da luz em vez de ser usado um feixe a luz é modelada na forma de uma esfera coerente. A experiência levada a cabo durante o processo de gelificação de leite conseguiu medir com sucesso aglomerados desde os 100 nm e os 800nm. [35]

Métodos de Caracterização

As medidas de caracterização e quantificação de nanopartículas são afectadas pelo tamanho e natureza das partículas, concentração da amostra e propriedades da solução e pelos princípios fundamentais do método aplicado.

As características mais usualmente medidas antes do início do estudo toxicológico para o TiO₂ são a medição do tamanho primário da partícula, área de superfície específica, cristalinidade, morfologia e potencial zeta. O seu efeito nos organismos é normalmente estudado através de técnicas de imagem para a identificação das nanopartículas nos organismos.

O cruzamento de dados, obtidos por diferentes técnicas laboratoriais, tem-se mostrado produtivo na caracterização destas nanopartículas e tem por sua vez estimulado as colaborações entre cientistas de diferentes áreas. [22]

Para a medição do tamanho da partícula é muito comum o uso de métodos baseados na difracção de radiação, sendo mais comum o DRX. Estes métodos apresentam como principal vantagem, uma perturbação mínima das partículas no meio e a amostra não necessita de preparação especial. [36]

A medição de propriedades físicas da partícula pode ser feita por diferentes métodos. Técnicas como Microscopia Electrónica (TEM,SEM), Espectroscopia de Fluorescência de Correlação (FCS), Centrifugação e DLS medem o diâmetro hidrodinâmico, (Fraccionamento por efeito de campo) FFF o volume, potencial zeta e a mobilidade electroforética a carga superficial, DRX e TEM-EDS a estrutura cristalina, BET a área superficial. Quando á analise das propriedades químicas é possível utilizar o TEM-EDX para a composição elementar de partículas individuais, (Difraccção de Raios-X) XRF para a sua composição e quantificação e

DLS e AFM para medir a aglomeração. [37]

Estes são apenas alguns métodos possíveis, pois para além da adaptação e melhoramento dos métodos existentes, novos métodos como a Análise de Localização de Nanopartículas (NTA) têm sido desenvolvidos.

Todavia, nenhum destes métodos provou nos dias de hoje ser ideal na caracterização das nanopartículas, cada um tem as suas limitações. Neste trabalho procurou-se fazer um levantamento das vantagens e desvantagens de algumas das técnicas existentes.

1.2 TÉCNICAS EXPERIMENTAIS

1.2.1 ANÁLISE POR DISPERSÃO DINÂMICA DA LUZ

A técnica de Dispersão Dinâmica da Luz (DLS) é utilizada na medição do tamanho de partículas na região sub-micrométrica geralmente em meios líquidos. O seu princípio de funcionamento baseia-se na medição do movimento browniano das partículas. Este movimento ocorre quando as moléculas do meio líquido colidem com as partículas em suspensão, por esta razão as partículas de dimensões maiores possuem um movimento mais lento que as menores. O cálculo das dimensões das partículas não é por isso directo (Ver Anexo 2) e é influenciado por diferentes factores como a temperatura a que se encontra a amostra (pois esta interfere directamente na viscosidade do meio causando maior ou menor atrito). A temperatura tem por isso de se manter estável para que as correntes de convecção não adulterem os resultados. Outros factores que fazem variar a velocidade de difusão no meio são a força iónica do meio.

É importante ter em conta que a medida adquirida não corresponde às partículas em si nem mesmo aos agregados, corresponde sim ao *Diâmetro Hidrodinâmico* por elas formado. Este diâmetro corresponde ao de uma esfera que possui o mesmo coeficiente de difusão translacional que a partícula/agregado em si. Este coeficiente é influenciado pela partícula em si a sua superfície, pela concentração e o tipo de iões do meio. O diâmetro Hidrodinâmico é então calculado através da equação de Stokes-Einstein:

$$d(H) = \frac{kT}{3\pi\eta D} \quad (\text{Equação 1})$$

Com k sendo a constante de Boltzmann, T a temperatura absoluta, η a viscosidade do meio e D o coeficiente de difusão translacional.[38]

É uma técnica muito versátil e difundida em muitos laboratórios químicos. É bastante simples de operar, rápida na obtenção de resultados e tem um nível de perturbação mínimo para a amostra. Apresenta porém algumas limitações: a) as partículas em suspensão devem ser idealmente monodispersas, b) idealmente as partículas devem ser esféricas e c) é afectada pela aglomeração. [2]

A questão da polidispersão é explicada pela relação descrita no Anexo 2. Isto é a intensidade da luz difractada está dependente das dimensões da partícula numa relação de expoente 6. Se a amostra for composta por partículas de 3 e de 30nm, segundo Rayleigh a luz difractada da segunda vai ser 10^6 superior à da primeira. O mesmo ocorre se existirem impurezas de dimensões superiores em suspensão. [2]

As questões b) e c) estão de certo modo interligadas. Este método não mede directamente o tamanho da partícula, mede sim o diâmetro esférico equivalente à dupla camada eléctrica que a rodeia. No caso das partículas estarem aglomeradas, a relação medida é a camada eléctrica dupla do aglomerado. O mesmo ocorre para partículas com morfologias diferentes das

esféricas. Os resultados obtidos por esta técnica necessitam por isso de ser confrontados com a informação existente sobre as partículas em estudo e analisados com espírito crítico. [31] Outra questão fundamental está relacionada com o facto do método se basear no movimento browniano, logo movimentos de natureza não aleatória como a sedimentação poderem camuflar estes movimentos.[38]

Tendo em conta a natureza das nanopartículas de TiO_2 não é possível medir as dimensões das suas partículas por este método, apenas dos seus aglomerados.

Existem ainda outras técnicas baseadas no movimento browniano das partículas, como é o caso da Análise de Localização de Nanopartículas (NTA). Esta técnica recente é utilizada no cálculo da constante de difusão a partir da qual é calculada a sua dimensão. Permite também a visualização das partículas, pois este movimento é contabilizado através da filmagem de um vídeo, o que acaba por ser uma vantagem na análise dos dados. Porém o meio continua a ser afectado pelas condições anteriores. Esta técnica foi aplicada em suspensões dispersas de nanopartículas de TiO_2 com resultados pouco satisfatórios. [37]

1.2.2 DIFRACÇÃO DE RAIOS-X

A difracção de raios-X consiste num método de identificação da estrutura de materiais. Supondo que os átomos do material em estudo se encontram igualmente espaçados a uma determinada distância interplanar d , ao serem expostos à radiação com comprimentos de onda inferiores a d , esta vai ser dispersa em diferentes direcções. Alguns destes fotões vão interagir entre si construtivamente e outros destrutivamente. A maneira como a radiação se dispersa está dependente do comprimento de onda da mesma e da estrutura atómica da amostra cristalina. Na Figura 6 encontra-se esquematizada uma interacção construtiva da radiação com o material. Com base em relações geométricas é possível chegar à lei de Bragg - $n\lambda=2d\text{sen}\theta$. Em que λ corresponde ao comprimento de onda dos fotões incidentes, d à distância interplanar e θ ao ângulo entre o plano dos átomos e o feixe de fotões incidentes. De referir que θ varia entre 0 e 90° .

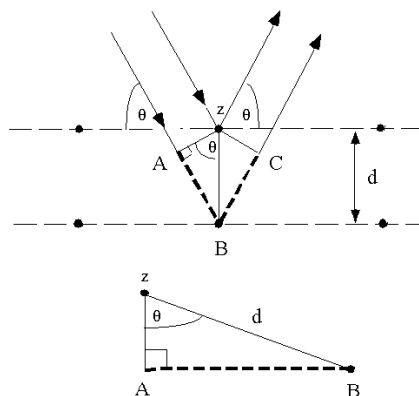


Figura 6- esquema da interacção da radiação com uma amostra cristalina

O erro relativo do método, é dado pela relação $\frac{\Delta d}{d} = -\cot g \Delta \theta$. Pelo que se conclui que quanto maior o ângulo de incidência menor será o erro relativo da medida. Para além do erro matemático existem outros condicionantes experimentais que podem induzir erros mais significativos nas medidas: o correcto posicionamento da amostra, no porta-amostras, a espessura da amostra, a compactação da amostras, são alguns desses factores.

Dos dados de DRX é possível obter uma estimativa das dimensões das cristalites que formam os grãos. Para tal recorreu-se à fórmula de Scherrer, $\tau = \frac{K\lambda}{\beta \cos \theta}$ em que K é o factor de forma, λ o comprimento de onda da radiação incidente, β a largura a meia altura do pico em radianos e θ o ângulo de Bragg. Esta fórmula não é aplicável a grãos com dimensões superiores a 0,1 μ m e o factor de forma varia com a estrutura da cristalite. É no entanto afectada por diferentes factores como por exemplo as especificações do equipamento e as condições de preparação da amostra (espessura, homogeneidade, deformações da rede, polidispersão, etc.).

Este método tem como desvantagem a preparação da amostra pois têm de ser preparadas amostras secas. [22]

1.2.3 ESPECTROSCOPIA DO VISÍVEL/ULTRAVIOLETA

A espectroscopia do visível/ultravioleta consiste numa técnica de caracterização óptica de materiais e baseia-se na interacção entre a radiação e a amostra. Isto é, para um dado comprimento de onda incidente, a técnica consegue quantificar a, Absorvância(A), Reflectância(R) e Transmitância(T), que por sua vez se relacionam entre si através de: $A(\lambda)+T(\lambda)+R(\lambda) = 1$.

O Espectrofotómetro de UV/Vis possui dois tipos de lâmpadas, uma para a radiação visível geralmente de Deutério e outra para a Ultravioleta, de Tungsténio/Halogénio. A luz depois de atravessar um monocromador é dividida em dois feixes, um deles atravessa a amostra em estudo e outro a referência. A quantidade de luz que é transmitida ou reflectida pela amostra é então comparada com a da referência. Os dados obtidos são por isso uma razão entre a radiação que atravessa a amostra e a incidente. Pela lei de Beer-Lambert é possível inferir a concentração de uma dada solução tendo em conta a absorção a um dado comprimento de onda através da relação $A=\alpha dc$. A é absorção, d é a distância percorrida pela luz ao longo do corpo e c a concentração da suspensão e, por fim, α é uma constante dependente do comprimento de onda dada por $\alpha = \frac{4\pi k}{\lambda}$ sendo k o coeficiente de extinção. A Absorvância também pode ser escrita do seguinte modo, $A = -\log\left(\frac{I_1}{I_0}\right)$ sendo I_0 a intensidade do feixe antes de atravessá-la a amostra e I_1 a intensidade depois de atravessa-la. A concentração pode então ser calculada fazendo,

$$c = -\log\left(\frac{I_1}{I_0}\right) \times \frac{\lambda}{d4\pi k} \quad (\text{equação 2})$$

Tem como vantagem ser um equipamento muito comum em laboratórios. Como desvantagem as partículas têm de estar em suspensão e o sinal depende de vários factores. Os resultados são facilmente influenciados por partículas de dimensões superiores.

Para mais detalhes sobre a técnica consultar a referência [39].

1.2.4 FLUORESCÊNCIA DE RAIOS-X

A fluorescência de raios-X é uma técnica importante na identificação qualitativa e quantitativa de elementos químicos, tem como vantagem não ser uma técnica destrutiva e não necessitar de uma preparação especial das amostras. A reprodutibilidade de resultados por esta técnica é muito precisa e rápida (entre 30 segundos a 30 minutos) contudo necessita de padrões adequados. Para mais detalhes sobre a técnica consultar a referência [40]

1.2.5 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISSÃO

Na Microscopia Electrónica de Transmissão um feixe altamente energético (entre os 100kV e os 400kV) de electrões é disparado através da amostra. Com esta técnica é possível atingir resoluções da ordem dos Angstroms tornando possível visualizar a forma como os átomos estão arrançados.

Os electrões primários (do feixe) ao incidirem na amostra podem dar origem a variadas interacções. O TEM está por isso munido de detectores capazes de identificar electrões secundários, retrodifundidos, raio-X característicos mas, especialmente, tem detectores para identificar os electrões transmitidos. A preparação da amostra é por isso fundamental uma vez que esta tem de ser fina o suficiente para se deixar atravessar pelos electrões. Estes electrões incidem num detector com uma chapa de fósforo. As zonas com mais material vão impedir a chegada de electrões transmitidos à chapa, contribuindo para zonas mais escuras. Tal como em fotografia, a chapa consiste num negativo da imagem real. Para mais detalhes sobre a técnica consultar a referência [41]

1.2.6 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE VARRIMENTO

A microscopia Electrónica de Varrimento, tal como a de Transmissão, baseia-se na interacção de um feixe de electrões com a amostra em estudo. A energia do feixe varia entre os 0,5keV e os 50keV, esta intensidade, tal como o diâmetro do feixe, é muito menor que as utilizadas em TEM pois esta técnica retira informação dos electrões reflectidos e não dos transmitidos. Outra diferença fundamental entre as duas técnicas é que, enquanto em TEM o feixe se encontra estático, em SEM este é deflectido com recurso a bobinas. Em termos de resolução, hoje em dia, já é possível atingir os 5Å. A informação obtida por SEM não se restringe apenas a criar uma imagem da amostra, é também capaz de fornecer a sua caracterização elementar. Quando os electrões colidem com a amostra é gerada uma grande variedade de sinais, porém os que fornecem mais informação são os electrões secundários,

electrões retrodifundidos e raios-X. Os electrões secundários são arrancados da superfície do material e são utilizados para gerar a imagem da sua topologia. Os electrões retrodifundidos são electrões do feixe principal que foram deflectidos pelos átomos do interior da amostra. Com eles é também possível criar uma imagem da amostra (embora com menos definição) tendo em conta o número atómico dos elementos que a compõem. Os raios-X emitidos possuem uma energia característica a partir da qual é possível identificar os materiais que compõem a amostra permitindo a sua análise elementar. Este tipo de análise denomina-se de Espectroscopia de Dipersão de Energia (EDS).

Com os novos equipamentos de SEM é possível acoplar um módulo de FIB, o que permitiu o feixe deixar de ter uma funcionalidade passiva, tornando-se uma ferramenta de manipulação e corte da amostra em si. O FIB utiliza um feixe de iões capaz de esculpir a amostra, abrindo todo um mundo de possibilidades no desenvolvimento de dispositivos electrónicos de última geração (análise de falhas, reparação de circuitos, litografia, deposição de material), na investigação de novos materiais ou até mesmo na preparação de amostras para ensaios de TEM.

Para mais detalhes sobre a técnica consultar a referência [41]

1.2.7 MICROSCOPIA DE FORÇAS ATÓMICAS

O microscópio de forças atómicas é largamente utilizado para obter informação sobre a morfologia superficial de sólidos com resolução a nível atómica, nomeadamente para criar imagens, medir e manipular materiais à nanoescala.

A sua grande vantagem face ao microscópio electrónico é poder criar uma imagem 3D (Figura 7) de, qualquer tipo de material (desde que a rugosidade não seja demasiado elevada) sem necessidade de revestimento superficial.

O AFM usa uma sonda colocada na extremidade dum suporte (de comprimento entre os 100 e os 200mm), denominado de *cantilever* em linguagem anglo-saxónica, para mapear, sem contacto físico, a superfície do material analisar. Essa sonda, geralmente de Si ou Si₃N₄ é muito aguçada terminando, idealmente, num átomo. As suas dimensões são de 2 µm de comprimento e menos de 1µm de diâmetro. Ao interagir com a superfície em estudo, as forças de Van der Walls geradas vão originar deflexões do braço. Com recurso a fotodetectores e sensores piezoeléctrico os seus movimentos ascendentes e horizontais podem ser registados. Um feixe LASER incide na ponta da agulha e é reflectido até ao sensor de posição, o que permite registar as variações de altura da ponta (segundo o eixo z). O sensor de posição é extremamente sensível e consegue detectar variações no feixe de apenas 1nm. Como desvantagem apresenta a demora na recolha de informação e a dificuldade em obter-se uma amostra significativa. Informações mais detalhadas podem ser consultadas na referência [42].

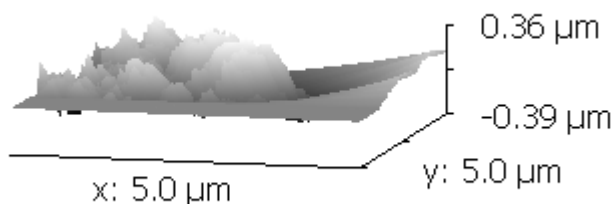


Figura 7 – Imagem de AFM de nanopartículas de TiO₂ (Cenimat)

1.2.8 ULTRA-SONICAÇÃO

A ultra-sonicação causa o efeito de cavitação no líquido. Este efeito pode ser utilizado para diversas aplicações como homogeneização, desintegração ou limpeza. É muito utilizada na indústria para separar partículas coloidais tais como tintas ou mesmo leite. Este efeito consiste na formação de microbolhas numa região de um líquido que se encontra a uma pressão inferior à sua pressão de vapor. Estas bolhas ao rebentarem criam uma onda de choque (cavitação inerte) capaz de danificar objectos como turbinas e hélices. Quando esse colapso não ocorre, a bolha é forçada a oscilar em tamanho e forma (cavitação não inerte). Este é o efeito em que se baseia a ultra-sonicação.

1.2.9 POTENCIAL ZETA

As nanopartículas como em tantos outros materiais, em contacto com a água adquirem uma carga eléctrica superficial. Esta carga superficial afecta a distribuição de iões da solução na sua vizinhança, que por sua vez vai levar ao aumento da concentração de contra iões à sua volta, formando desta forma uma camada eléctrica dupla. (Figura 8) Esta camada é composta por uma região interna em que os iões se encontram ligados fortemente à superfície e uma região externa variável, dependente das forças electrostáticas e da temperatura. O potencial nesta camada exterior decresce com o afastamento da partícula até atingir o valor nulo (potencial zero).

Ao aplicar um campo eléctrico as nanopartículas e a camada interna vão mover-se em unísono, causando um arrasto da camada externa. A interface entre a camada interna e externa, vai sofrer forças contrárias levando ao rompimento das ligações. À região em que este fenómeno ocorre dá-se o nome de plano de quebra. O potencial zeta pode ser definido como a diferença entre potencial eléctrico do plano de quebra e um ponto no fluido da suspensão longe da partícula.

Ao aplicar um campo eléctrico as partículas vão migrar em direcção ao eléctrodo contrário à sua carga. A sua velocidade é proporcional à magnitude do seu potencial zeta. Este método é muito sensível a contaminações. Este valor não pode ser medido directamente mas pode ser calculado a partir de modelos teóricos que têm em conta a viscosidade da suspensão,

entre outros parâmetros, e medidas de mobilidade electroforética . [43]

Ou seja, através da medida de Mobilidade Electroforética é possível calcular o potencial zeta das partículas, isto é, dá-nos uma medida das cargas superficiais da amostra. As partículas têm de estar em suspensão. Esta informação é fulcral no estudo da toxicidade ou na reactividade das nanopartículas. Esta técnica contudo não tem em conta a heterogeneidade das cargas de cada molécula, fornecendo sempre um valor médio. Estudos da variação do potencial zeta do TiO_2 com alterações de pH e força iónica podem ser consultados na seguinte referência [31].

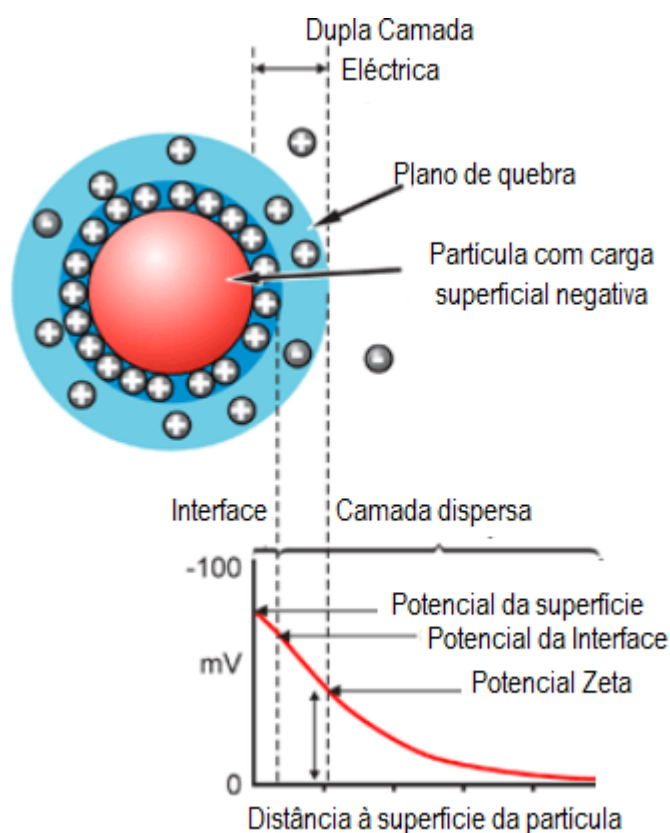


Figura 8 – Esquema exemplificativo do Potencial Zeta adaptado de [43]

1.2.10 BRUNAUER – EMMETT - TELLER (BET)

A técnica de Absorção de N_2 (BET) é muito utilizada em medidas de área específica da superfície das nanopartículas e aparece em praticamente todos os estudos toxicológicos recentes do TiO_2 . Tal como o nome indica esta técnica consiste na medida de absorção de Azoto por parte das nanopartículas. As limitações desta técnica ocorrem para elementos que reagem com o Azoto que estão agregados ou contêm poros. Esta técnica supõe que o Azoto entra em contacto com toda a superfície da amostra e a medida tem de ser efectuada em pós. [22]

1.2.11 ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA DE CORRELAÇÃO (FCS)

O método de Espectroscopia de Fluorescência de Correlação (FCS) é também ele

similar ao DLS, com a diferença que tira partido da radiação incoerente de partículas que possuem fluorescência, pelo que é afectado por factores semelhantes. Quando aplicado o modelo correcto é possível retirar informação não só quanto ao tamanho das partículas como os coeficientes de difusão das nanopartículas, o seu diâmetro hidrodinâmico, concentração média e cinética de reacções. Esta técnica está limitada a partículas com fluorescência ou adicionando marcadores.

Um estudo interessante demonstrou a aplicabilidade deste método em suspensão de TiO_2 na presença de um ácido húmico. Embora o TiO_2 não apresente fluorescência no intervalo de comprimentos de onda entre os 488 e os 514 nanómetros, o ácido utilizado apresenta. Graças à adsorção do ácido à superfície das nanopartículas foi possível tirar partido desta técnica.[37]

Considerações

Resumindo, são necessárias ter em conta algumas considerações ao comparar os resultados obtidos por diferentes métodos, mesmo quando se pretende medir a mesma característica. Por exemplo, ao comparar o tamanho obtido por DLS, BET e DRX tem de se ter atenção que as amostras sofreram preparações diferentes tal como os seus dados. Para DLS utiliza-se suspensões, para BET pó seco e para DRX pó seco ou na forma de uma pasta (passível de criar artefactos). Pelo método DLS não é medido o tamanho de cristalite mas sim o diâmetro hidrodinâmico da partícula/aglomerado obtido através do movimento browniano. É também importante ter em conta que a dimensão da cristalite não corresponde obrigatoriamente à dimensão da partícula podendo ser igual ou inferior, e o diâmetro hidrodinâmico é aproximadamente igual ou superior. No caso do BET as dimensões da partícula também não são obtidas directamente mas sim a partir do cálculo da área superficial, supondo esfericidade por parte da partícula. Todas estas diferenças vão induzir diferentes variações de erro nas medidas. [7] No Anexo 2 é possível consultar uma tabela com limitações e vantagem de um maior número de técnicas.

2. ANÁLISE E DISCUSSÃO DE RESULTADOS

Para melhor estruturar este capítulo optou-se, em primeiro lugar, por criar uma secção onde se descreve a análise das nanopartículas apresentando-se em seguida a caracterização das mesmas em suspensão.

Na caracterização das suspensões foi utilizado o DLS logo após a etapa de sonicação permitindo obter informação sobre o tamanho dos agregados num momento inicial.

Procurou-se também estudar o processo de sedimentação das partículas e o sedimento por elas formado. Os dados foram, por isso, divididos em estudo da sedimentação e estudo do sedimento para cada factor estudado. Os factores estudados foram o pH, a exposição à radiação ultravioleta, diferentes matrizes aquosas, dispersantes e outros solventes.

Como todas as suspensões sofreram uma etapa de sonicação, tornou-se relevante aferir o impacto desta técnica na preparação das amostras.

2.1 NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ EM PÓ

As nanopartículas de TiO₂ utilizadas neste estudo existem no mercado sobre a designação de Aeroxide® TiO₂ P25 e são produzidas pela Degussa. No rótulo, entre outras informações, o produtor certifica que o pó tem uma pureza igual ou superior a 99,5% embora possam existir contaminações de SiO₂ ($\leq 0,200$ wt.%), Al₂O₃ ($\leq 0,300$ wt.%), Fe₂O₃($\leq 0,010$ wt.%), HCl (≤ 0.300 wt.%).

Para confirmação das características das nano nanopartículas de TiO₂ em pó foram utilizados as técnica de FRX, DRX e TEM.

Para a aplicação do método de Fluorescência de Raio-X (FRX) montou-se o porta amostras com auxílio de uma película de Milar (polímero impermeável) tendo especial atenção para não contaminar a amostra. O ensaio foi então realizado num equipamento Axios da PANalytical. Em termos de resultados, obteve-se uma boa contagem, isto é, foi contabilizada 86% da amostra. Os resultados obtidos apontam um elevado nível de pureza (100%), com apenas uma contaminação de 0,06% de Cloro (Cl). O Cloro pode ser contribuição do cadinho em que foi colocada a amostra para análise ou pode ser contribuição do Ácido Clorídrico (HCl), uma das possíveis contaminações presente no rótulo. Este aparelho apresenta como limitação, o facto de não conseguir identificar elementos muito leves, mais especificamente, elementos com massa inferior ao Oxigénio. Tal facto pode explicar a identificação do Cloro mas não do Hidrogénio por parte do equipamento. Os resultados obtidos encontram-se resumidos na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados obtidos por Fluorescência de Raio-X

Quantification of sample TiO₂

R.M.S.:	0.000
Sum before normalization:	86.0 %
Normalised to:	100.0 %
Sample type:	Solid
Correction applied for medium:	Yes
Correction applied for film:	1
Used Compound list:	OXIDES
Results database:	iq+ 37mm he
Results database in:	c:\programas\panalytical\superq\userdata

	Compound Name	Conc. (%)
1	Cl	0.06
2	TiO ₂	100.

Para identificar as fases presentes procedeu-se a um ensaio de Difracção de Raio-X (DRX) com o equipamento X'Pert PRO da PANalytical.

A amostra foi colocada num recipiente próprio para o ensaio de pós em DRX até prefazer o conteúdo do recipiente. O topo foi prensado com auxílio de uma lamela até se obter uma superfície homogénea.

O difractograma obtido (Figura 9) mostra duas fases típicas do dióxido de titânio, nomeadamente a Anatase (65%) e o Rutilo (35%). Foi feito um tratamento matemático com o algoritmo de Rachinger para retirar a contribuição da radiação α_2 . Procedeu-se então ao cálculo o tamanho das cristalites pela fórmula de Scherrer, o factor de forma utilizado foi de 0,9 e o comprimento de onda de 0,15 nm (Cobre α_1). No caso da Anatase utilizou-se o pico centrado no ângulo 2θ igual a $25,4^\circ$ referente aos planos cristalográficos (011) e, no caso do Rutilo, o pico centrado em 27° relacionado com os planos cristalográficos (110). Os valores obtidos foram respectivamente 42nm para a Anatase e 73nm para o Rutilo. É sabido que as dimensões das cristalites não podem ser superiores às dimensões das partículas, o que leva a crer que existem vários factores de erro a majorar estes resultados. Um possível factor para as dimensões de cristalite serem superiores ao do valor dado pelo fornecedor é a polidispersibilidade da amostra.

Estes valores servem meramente como uma estimativa do tamanho da cristalite, que necessita de ser comprovada utilizando outras técnicas de caracterização.

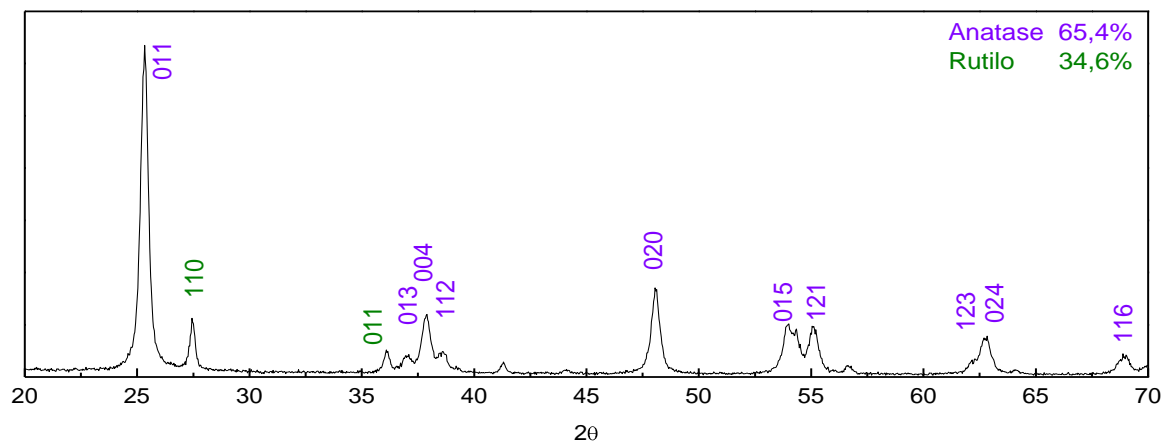


Figura 9 – Difractograma das nanopartículas de TiO₂.

Pela Microscopia Electrónica de Transmissão (TEM) obtiveram-se boas imagens das nanopartículas, apesar de exibirem aglomeração (Figura 10). A amostra consistia numa suspensão de TiO₂ em água ultra pura com uma concentração de 100µg/ml a qual foi sonicada durante 3 minutos a 60% da Amplitude total. Uma gota desta amostra foi colocada numa membrana de Formvar e posteriormente observada ao TEM.

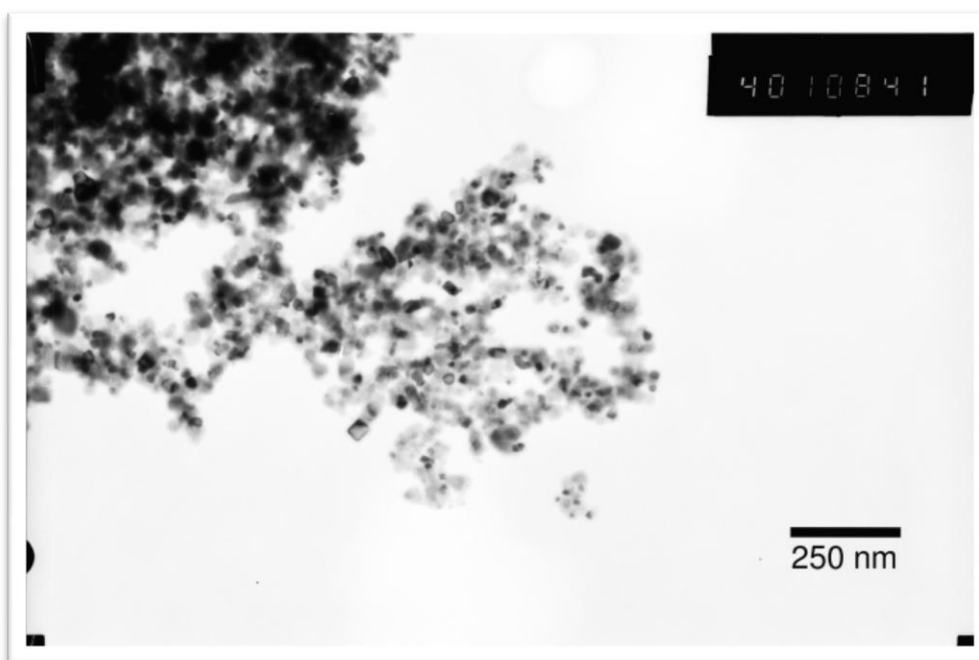
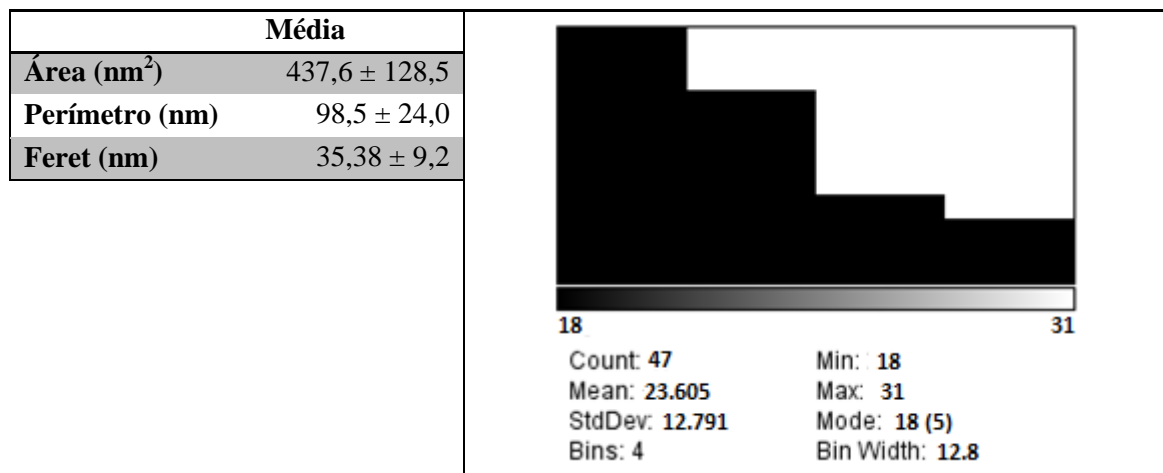


Figura 10 – Imagem de TEM das nanopartículas de TiO₂

Às imagens obtidas por TEM foram aplicados tratamentos estatísticos [44] dos quais se obtiveram a área média das partículas, o perímetro médio e o diâmetro médio de Feret (isto é a distância entre os dois pontos mais distantes da partícula). A partir das áreas obtidas construiu-se uma distribuição. A média dos diâmetros de Feret ronda os 35 nm o que não se encontra muito longe das dimensões médias garantidas pelo fornecedor (21 nm). Quanto à distribuição

observa-se que 75% das partículas têm um diâmetro inferior a 22nm² o que se encontra bastante próximo do valor facultado pelo fornecedor. (Tabela 2).

Tabela 2 – Resultados do tratamento da imagem de TEM (software ImageJ).



2.2 NANOPARTÍCULAS DE TiO₂ EM SUSPENSÃO

Na elaboração das suspensões os reagentes utilizados foram Acetona da Fluka (>99.5%), Etanol Absoluto da Merk (≥ 99.5 %), detergente comum da marca Romar, detergente industrial Triton X-100, sabão líquido (também da Romar) e ácido oxálico. Todas as suspensões possuem a mesma concentração de TiO₂ - 100µg/ml. Foi escolhido um valor fixo para este parâmetro porque a sua variação pode levar a alterações no fenómeno de aglomeração entre outros. O seu valor nominal foi escolhido tendo em conta as concentrações utilizadas num outro estudo sobre a caracterização de nanopartículas de TiO₂ de referência [31], possibilitando assim uma comparação de resultados.

As suspensões têm também em comum uma etapa de sonicacção de duração de 3 minutos com ciclo contínuo e 60% da Amplitude total para o estudo da sedimentação e sedimento. No caso do estudo de DLS as amostras foram sonicadas apenas 1 minuto. Evitando assim um aquecimento excessivo da amostra e facilitando a estabilização da mesma.

Por DLS obteve-se um estimativa das dimensões dos aglomerados, num momento inicial, das suspensões analisadas.

Para o estudo da dinâmica de sedimentação das nanopartículas em suspensão foi utilizada a Espectroscopia do Visível/UV, o equipamento utilizado foi o UV-3101PC da Shimadzu. Obtiveram-se os espectros de transmitância directa entre os comprimentos de onda de 190 e 1500 nm, da transmitância total e reflectância, entre os comprimentos de onda dos 300 e 800 nm, ao longo do tempo. Com base nestes dados construíram-se gráficos das Transmitâncias Directas ao longo do tempo para o comprimento de onda de 800nm com a excepção do estudo dos Ultravioletas em que estes valores foram retirados para 900nm. O critério de escolha destes comprimentos de onda teve em conta a zona que apresentava melhor

discriminação das Transmitâncias. Nestes últimos gráficos utilizaram-se modelos matemáticos de modo a poder descrever a evolução do processo de sedimentação para cada uma das suspensões preparadas.

Uma vez que, com a concentração de TiO_2 utilizada, em quase todas as suspensões, se verificou a sedimentação das nanopartículas, optou-se por tentar analisar também se o sedimento formado era influenciado pelo tipo de solvente utilizado. Nesse estudo utilizaram-se essencialmente as técnicas de SEM e DRX. Para a preparação das amostras de SEM colocou-se uma gota do sedimento directamente em cima de cola de carbono, que, por sua vez, já se encontrava no suporte. A gota foi deixada secar ao ar. No caso do DRX, o sedimento foi colocado em lamelas de vidro e seco ao ar.

2.2.1 INFLUÊNCIA DE DISPERSANTES

Para o estudo do impacto de agentes dispersantes nas suspensões de TiO_2 utilizou-se sabão líquido, detergente da loiça, Ácido Oxálico e Triton X-100.

D1 - À amostra padrão (20 ml de água ultrapura com 2mg de TiO_2) foi adicionada uma gota de sabão, o que corresponde a aproximadamente 0,022ml). Este sabão tem na sua constituição: água, cloreto de sódio, formaldeído, ácido cítrico, Estirenos/Acrilatos, CDEA (cocamida DEA), cocamidopropil betaína, Lauril éter sulfato de sódio, diestearato glicol.

D2 - À solução padrão foram adicionadas 10 mg de Ácido Oxálico Dihidratdo - $(\text{COOH})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. A quantidade de ácido utilizado teve por referência uma receita de uma tinta com nanopartículas de TiO_2 com aplicações electrocrómicas, utilizada recorrendo à tecnologia de Inkjet, em estudo num projecto em desenvolvimento no CENIMAT/I3N.

D3 - A esta amostra foi adicionada uma gota do tensoactivo Triton X-100. Utilizou-se como referência quantitativa uma receita aplicada na produção de células de Grätzel, onde são também utilizadas nanopartículas de TiO_2 .

D4 - A esta amostra foi adicionada uma gota de detergente Romar de limão. Na sua constituição constam apenas 5-15% de tensoactivos aniónicos e menos de 5% de tensoactivos não aniónicos bem como Formaldeido e perfume de limão. Embora os tensoactivos utilizados não tenham sido discriminados pelo fornecedor, dodecanoato de sódio é um agente tensoactivo muito utilizado neste tipo de produtos, tal como o cloreto de sódio. Estes compostos podem ser as fontes de Cloreto de Sódio (NaCl) dos picos captados pela difracção de Raio-X.

Tabela 3 – Tabela-resumo das amostras D efectuadas

Amostra	Aditivo
D1	Sabão Líquido Romar
D2	Ácido Oxálico
D3	Triton X – 100
D4	Detergente Romar

ANÁLISE POR DISPERSÃO DINÂMICA DA LUZ

Com auxílio de uma pipeta foram retirados cerca de 1ml de amostra, colocados numa cuvete própria que foi posteriormente colocada no equipamento ZetasizerNS da Malvern. Procedendo à análise dos diâmetros obtidos, os dispersantes que se mostraram mais eficientes num momento inicial foram o Ácido Oxálico (responsável por um diâmetro hidrodinâmico de 141,8 nm) e o detergente comum da marca Romar (diâmetro hidrodinâmico de 154,2 nm). Porém, a longo prazo, apenas D2 se mostrou verdadeiramente eficiente no que toca a manter as partículas em suspensão. Por outro lado, ao analisar-se as três medidas tiradas num curto intervalo de tempo para cada amostra, observa-se uma tendência crescente mais acentuada para

as amostras D1 e D3, o que sugere que as amostras estão a aglomerar rapidamente. (Tabela 4)

Tabela 4 – Dados obtidos por DLS para as amostras D .

Amostra	Dispersante	Z ₁ (nm)	Z ₂ (nm)	Z ₃ (nm)	Z̄ (nm)
D1	Sabão líquido	643,9	721,1	800,4	721.8
D2	Ácido Oxálico	145,5	140,1	139,7	141.8
D3	Triton X-100	896,2	1044	1122	1020.7
D4	Detergente Romar	156,9	156,7	148,9	154.2

Estudo da Sedimentação

Espectroscopia do Visível/UV

A variação do espectro de transmitância directa (T) com o tempo para a amostra D2 está representado na Figura 11. De realçar que nesta amostra ao fim de três horas os valores de T são praticamente iguais.

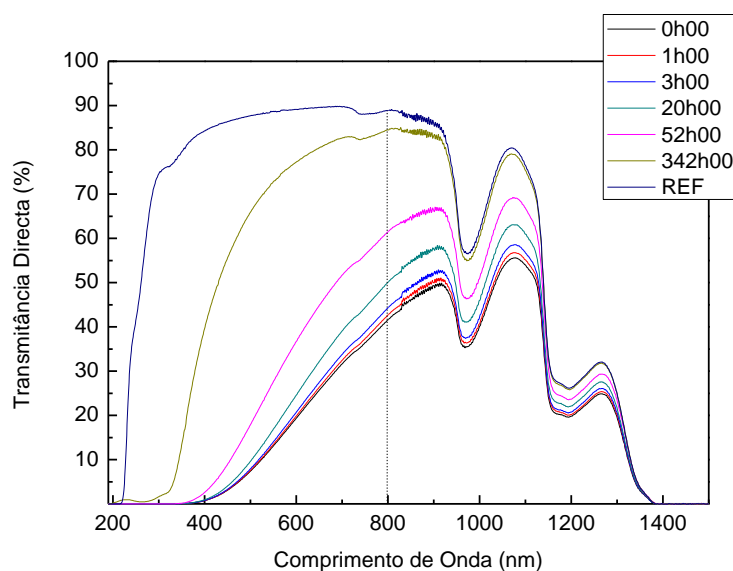


Figura 11 – Transmitância vs comprimento de onda para diferentes tempos da amostra D2

Os valores de transmitância em função do tempo para as amostras estudadas estão representados nos gráficos da Figura 12. Estes valores foram retirados para um comprimento de onda de 800nm Para o período em análise, a amostra D1 é a que apresentam uma sedimentação mais rápida, seguida da amostra D3 e depois da amostra D4.

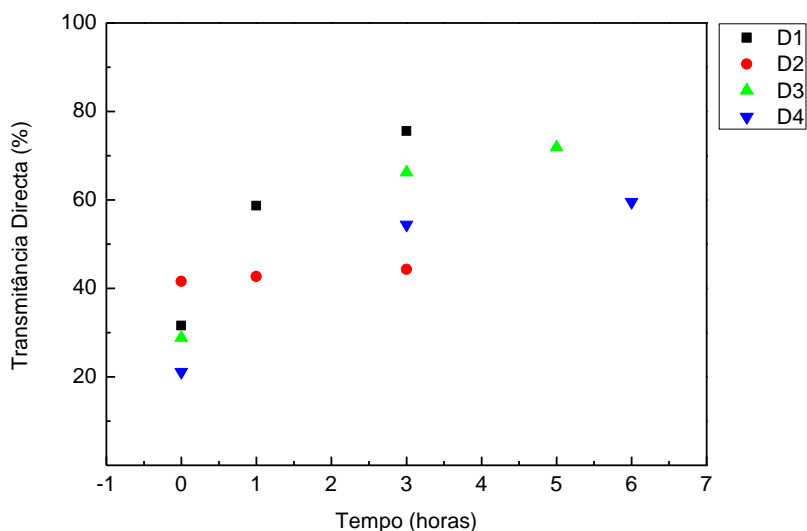


Figura 12 - Transmissão Total ao longo do tempo para o conjunto das amostras D para o comprimento de onda de 800nm.

A amostra D2 sedimenta muito mais lentamente que as suspensões restantes. Este facto foi comprovado por uma análise visual, onde foi notório a presença de partículas em suspensão passados 13 dias. (Figura 13)

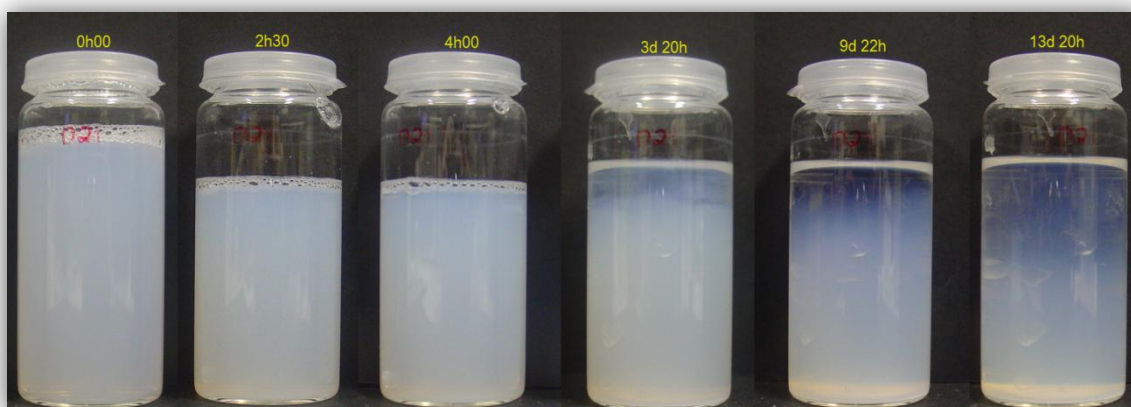


Figura 13 - Evolução da suspensão D2 ao longo do tempo

Nos gráficos da Figura 14, estão representadas as linhas que resultam do ajuste de uma equação aos pontos experimentais. Com esta análise pretendeu-se definir uma variação que possibilitasse estimar a percentagem de pó sedimentado em função do tempo da suspensão. Dos resultados obtidos verificam-se semelhanças entre as amostras D1, D3 e D4, embora D4 apresente um ligeiro atraso comparativamente às outras duas. D2 por sua vez apresenta um andamento muito mais lento. Por exemplo, traçando uma recta ao fim de 5 horas D1, D3 e D4 apresentam transmissões entre os 60 e os 70%. No caso de D2 tal já não se verifica (42%). Neste caso as partículas só entraram no intervalo ao fim de 50h (2d 2h), atingindo os 80% apenas ao fim de 350h (aproximadamente 15 dias). Tendo apenas em conta os diâmetros hidrodinâmicos medidos e supondo que os aglomerados de dimensões superiores sedimentariam

mais rapidamente, seria de esperar que D4 sedimentasse de modo semelhante a D2. Porém tal não se verifica pelo que é possível a existência de outros factores a actuar.

Ordenando por dimensão (nm):

$$D3(1020,7) > D1(721,8) > D4(154,2) > D2(141,2)$$

Ordenando por valores de Transmitância após 5 horas:

$$D1(75\%) > D3(72\%) > D4(60\%) > D2(46\%)$$

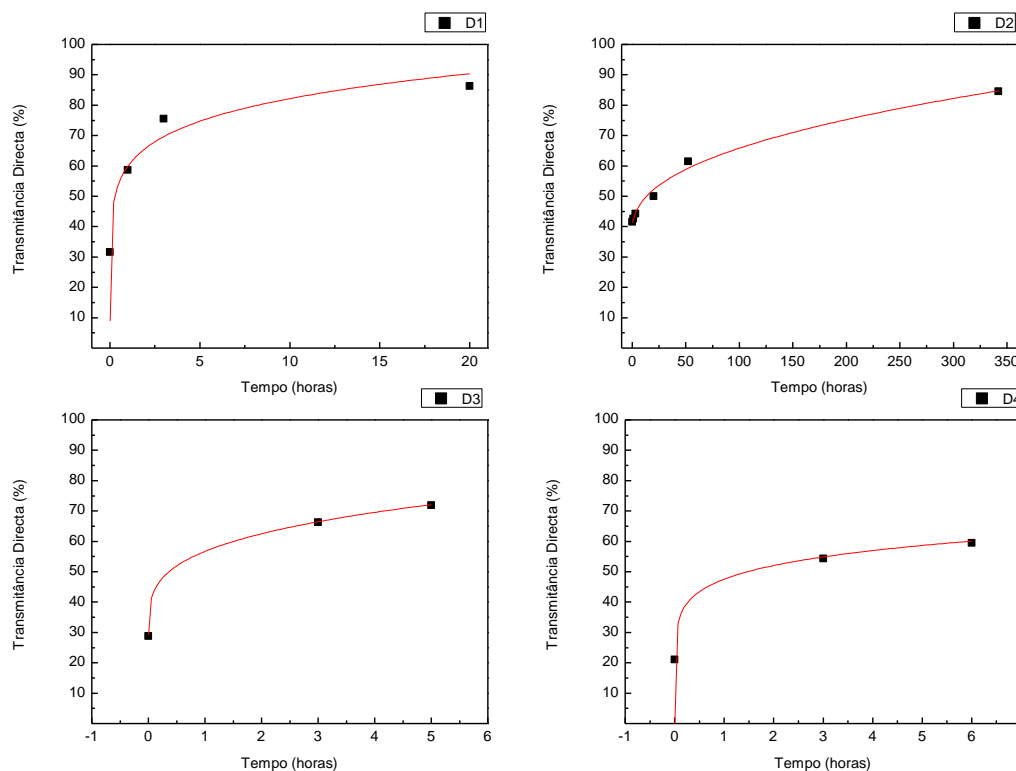


Figura 14 -Transmitância Directa das amostras D vs Tempo para o comprimento de onda de 800nm

Analisando as linhas de tendências obtidas para cada gráfico verifica-se a proximidade entre as amostras D1,D3 e D4.

Através do modelo matemático adaptado, calculou-se o tempo de sedimentação teórico que cada amostra levaria a atingir a Transmitância apresentada pela referência (água e respectivo tensoactivo) para o comprimento de onda de 800nm. Os tempos obtidos apresentaram uma grande disparidade, variando entre menos de um dia e 15 dias. Os agentes tensoactivos que se mostraram mais eficientes a manter as nanopartículas em suspensão foram o ácido oxálico (431 horas \approx 18 dias) e o detergente comercial Romar (119 horas \approx 5 dias). Por sua vez o sabão líquido Romar e o detergente industrial Triton-X100 revelaram valores muito próximos, nomeadamente 18 e 22 horas. Estes dados são coerentes com a análise visual das suspensões. Este facto pode estar relacionado com uma menor concentração de agentes

tensioactivos no detergente. Portanto a influência da concentração de tensioactivos na suspensão deverá ser um factor a investigar em próximos estudos.

Tabela 5 – Modelo matemático das transmitâncias directas das amostras D ao longo do tempo ($\lambda=800\text{nm}$), sendo T_{REF} a transmitância apresentada pela referência e respectivos valores de tempo para a sedimentação total.

Amostra	Tendência	R^2	T_{REF} (%)	Tempo de Sedimentação Teórico (Horas)
D1	$Y = 59,986x^{0,14}$	0,9846	89,06	18
D2	$Y = 26,3 x + 10 ^{0,20}$	0,992	88,88	431
D3	$Y = 57,4x^{0,14}$	0,994	88,73	22
D4	$Y = 47,62x^{0,13}$	1	88,82	119

Estudo do Sedimento

Após a total sedimentação da suspensão, retirou-se o sedimento com auxílio de uma seringa. O conteúdo da seringa foi então vertido sobre uma lamela de vidro, que se manteve no escuro e em repouso até todo o líquido se evaporar. Visualmente, o sedimento de D1 formou uma espécie de película, não sendo distinguíveis aglomerados isolados. A amostra D2 originou um sedimento algo complexo, com zonas similares a uma película com pequenos aglomerados, e regiões mais concentradas. A amostra D3 apresentou um sedimento composto também por aglomerados. A amostra D4 formou uma película no centro da lamela e a agregação de algumas partículas formando como que cristais no rebordo. Estas variações na morfologia do sedimento podem estar relacionadas com a forma como o solvente evapora e também com a tensão superficial das nanopartículas/solvente.

A Figura 15 mostra as fotografias dos sedimentos obtidos nas amostras referidas anteriormente.

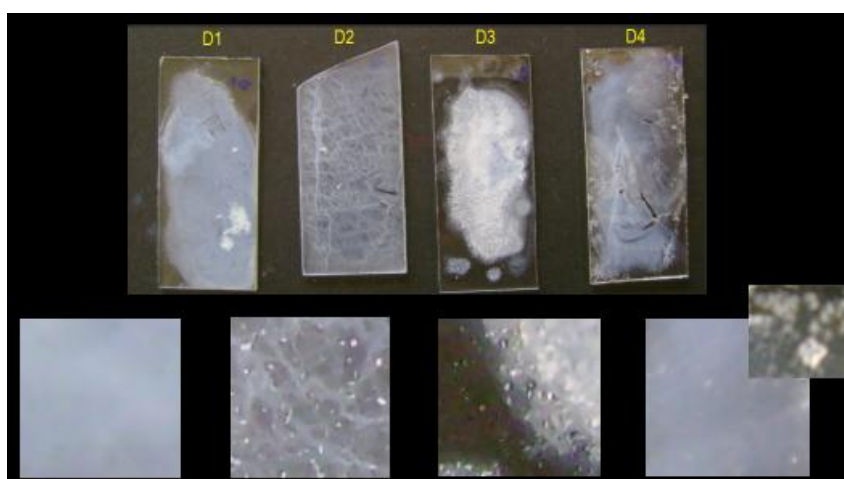


Figura 15 - Aspecto dos sedimentos das amostras D.

DIFRACÇÃO DE RAIOS-X

Nos difractogramas das amostras D foram identificados picos de TiO_2 na forma de Anatase e Rutilo e ainda picos de Cloreto de Sódio na estrutura de Halite. (Figura 16)

A fraca resolução dos picos apresentados nestes espectros pode dever-se a vários

factores, porém uma das maiores contribuições vem das condições de preparação das amostras. É também sabido que os difractogramas de nanopartículas são sempre acompanhados de maior ruído e menor contagens que o mesmo material com um volume maior.

No difractograma da amostra D2 identificam-se apenas os planos cristalográficos (001) da Anatase. Sendo esta amostra a que se mostrou mais dispersa, é possível que a fraca nitidez do espectro seja consequência dos aglomerados serem menores, isto é, as nanopartículas estarem envolvidas por resíduos orgânicos, ou outro tipo de impurezas.

Como esperado, tendo em conta a composição dos agentes tensoactivos, foi encontrado cloreto de sódio na amostra D4. O Cloreto de sódio, na estrutura de Halite, tem uma presença muito acentuada no espectro, mascarando assim os possíveis picos de TiO_2 . Mesmo assim é possível identificar, um pequeno pico aos 25° referente à fase Anatase do TiO_2 . Existe também neste espectro um pico cuja correspondência não foi identificada por volta dos 66° que muito possivelmente se deva a contaminação do agente tensoactivo usado. Para as amostras D1 e D4 foram facilmente identificadas as refrações das famílias de planos da Anatase e Rutilo. Nos espectros destas duas amostras não se observaram refrações anormais, nem interferência de estruturas causadas pelos agentes tensoactivos utilizados.

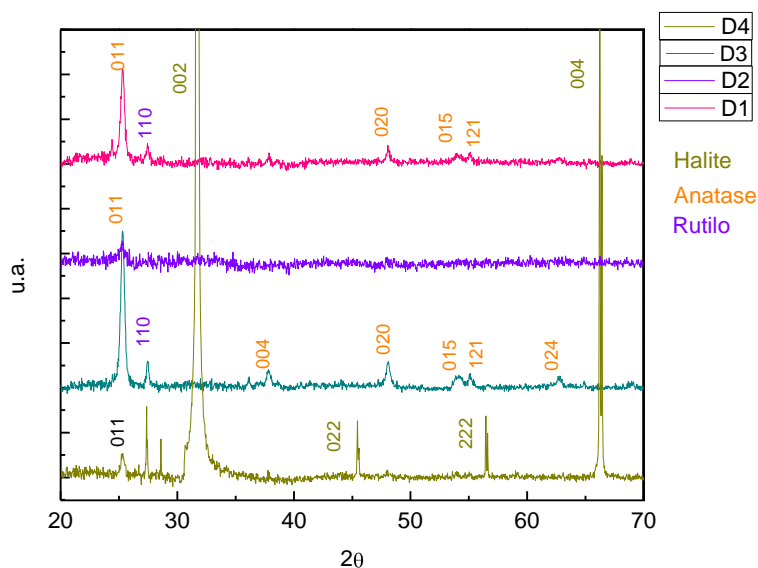


Figura 16 - Difractogramas obtidos para as amostras com diferentes tensoactivos.

Devido à falta de definição do difractograma da amostra D2 não foi possível proceder ao cálculo das dimensões das suas cristalites. A sobreposição de picos alheios ao TiO_2 na região entre os 2θ 26° e 28° no difractograma de D4 impediu uma clara identificação do pico da família de planos cristalográficos (110) do Rutilo.

As dimensões das cristalites de Anatase calculadas para D1, D3 e D4, apresentam todas dimensões entre os 41 e 43nm. Já as dimensões das cristalites de Rutilo calculadas para D1 e D3 apresentam valores entre 73 e 76nm. (Tabela 6) Estes valores estão próximos dos obtidos no

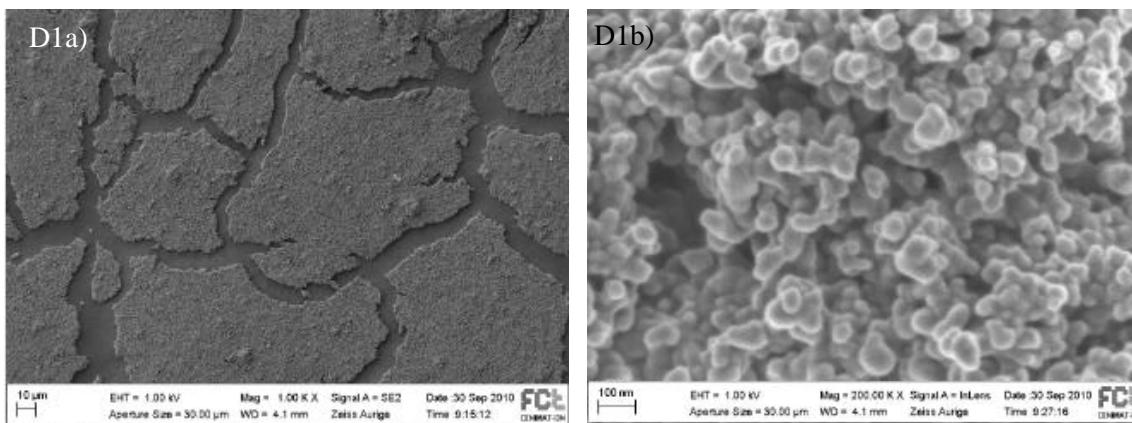
estudo do pó, em que se obteve 42 nm para as cristalites de Anatase e 73nm para as de Rutilo. Contudo continuam a apresentar valores superiores aos da partícula como se pode concluir na análise das imagens obtidas por SEM.

Tabela 6 – Cálculo das dimensões das cristalites.

Amostra	Anatase			Rutilo		
	FWHM	Cristalite (nm)	2 Θ (°)	FWHM	Cristalite (nm)	2 Θ (°)
D1	0,38	42,95	25,31	0,22	73,01	27,46
D2	-	-	-	-	-	-
D3	0,39	41,35	25,32	0,21	76,40	27,46
D4	0,38	43,28	25,32	-	-	-

Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

Foram obtidas várias imagens a diferentes ampliações com SEM para cada amostra. (Figura 17). Pelas imagens de menor ampliação conclui-se que as amostras D2 e D3 apresentam um sedimento mais disperso. Curiosamente, D4, que apresentava um diâmetro hidrodinâmico tão baixo, é a que apresenta um sedimento de aspecto mais compacto. Nas imagens de maior ampliação (200kx) observa-se que as partículas se encontram envoltas no que parece ser uma matriz orgânica. Mesmo as amostras mais dispersas não apresentam partículas individuais mas sim aglomerados mais pequenos. Na amostra D3 são visíveis alguns resíduos, provavelmente resultantes do agente tensioactivo e formados durante o processo de secagem da amostra. Fora dessas zonas as nanopartículas estão agregadas como na amostra D2. A amostra D4 apresenta um sedimento bastante diferente da amostra D1 aparentando existir aglomeração de nanopartículas dentro dos agregados formados.



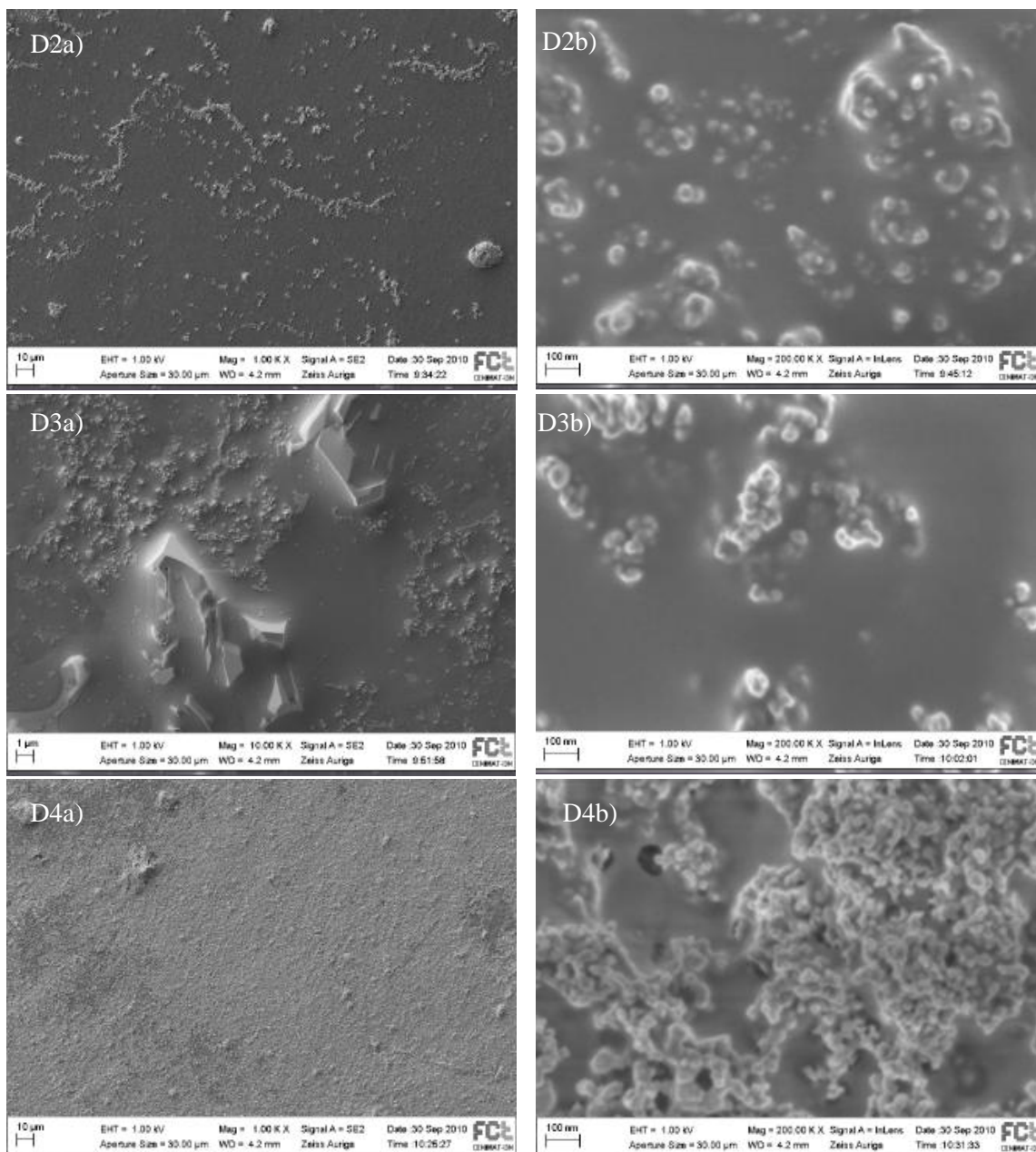


Figura 17 – Imagens de SEM da amostra D3 amplificada a)10000x e b)200000x; Amostra D4 amplificada a)1000x e b) 200000x

Por recurso a um software de análise de imagem [44] obteve-se a área média, perímetro médio e diâmetro de Feret médio para as partículas de cada amostra. Tendo em conta o aspecto circular das partículas calculou-se o diâmetro a partir da área média e do perímetro médio e compilaram-se os resultados que se indicam na Tabela 7.

As partículas apresentam, diâmetros médios entre os 23 e os 38nm e áreas médias entre os 420 e os 855 nm². Estes valores, são ligeiramente superiores às dimensões dadas pelo fornecedor (21nm e 346nm²) mas esta disparidade é facilmente explicada pelos factores de erro associados a esta técnica de análise de imagem. Os valores são próximos o suficiente para que não se registem alterações significativas nas dimensões das partículas primárias por adição de

tensioactivos.

Tabela 7 – Tratamento estatístico das imagens obtidas por SEM.

	D1	D2	D3	D4
Área (nm²)	854,8 ± 245,5	692,6 ± 293,4	699,0 ± 220,3	466,2 ± 205,1
d(A) (nm)	32,7 ± 4,7	29,2 ± 5,6	29,5 ± 4,6	23,9 ± 4,6
d(P) (nm)	34,6 ± 5,1	30,6 ± 6,1	31,5 ± 5,4	25,6 ± 5,0
Feret (nm)	37,6 ± 5,7	33,2 ± 6,3	35,2 ± 6,7	29,1 ± 5,6

2.2.2 INFLUÊNCIA DO PH

Variações de pH são por vezes utilizadas como método de dispersão de partículas em matrizes aquosas, mesmo em ensaios toxicológicos. É por isso importante determinar um padrão de comportamento das nanopartículas nestas condições.

Para o estudo da influência do pH na aglomeração das partículas, foram utilizadas diferentes soluções tampão da Roth. Na Tabela 8 encontra-se resumida a constituição de cada solução-padrão utilizada.

Tabela 8 – Tabela-Resumo dos componentes das soluções-padrão utilizadas

Amostra	pH	Constituição
P4	4	Cloreto de sódio, soda cáustica, ácido cítrico
P6	6	Ácido cítrico, soda cáustica
P7	7	Á base de fosfatos
P8	8	Á base de fosfatos
P10	10	Ácido bórico, soda cáustica, cloreto de potássio

Análise por Dispersão Dinâmica da Luz

Foram medidos os diâmetros hidrodinâmicos das cinco suspensões. Ao analisar as três medidas tiradas para cada suspensão verifica-se uma tendência crescente que pode ser explicada por as amostras estarem a aglomerar. Os diâmetros hidrodinâmicos apresentaram valores superiores para pH mais extremos, nomeadamente o pH4 e pH10.(Tabela 9)

Tabela 9 - Dados obtidos por DLS para as amostras D .

Amostra	Solução-tampão	Z1 (nm)	Z2 (nm)	Z3 (nm)	Diâmetro médio(nm)
P4	pH4	923,9	1014	1108	1015,3
P6	pH6	667,8	704,6	687,5	686,6
P7	pH7	610,7	622,1	728,0	653,6
P8	pH8	760,2	853,9	863,7	825,9
P10	pH10	1017	1054	1134	1068,3

Construiu-se um gráfico com as medidas do Diâmetro Hidrodinâmico vs pH para melhor se observar a evolução comportamental das partículas (Figura 18). Estas apresentam um d(H) mínimo para valores de pH entre 6 e 7 (653 nm). Apesar deste facto os valores são bastante próximos distando apenas de cerca de 400 nm entre si.

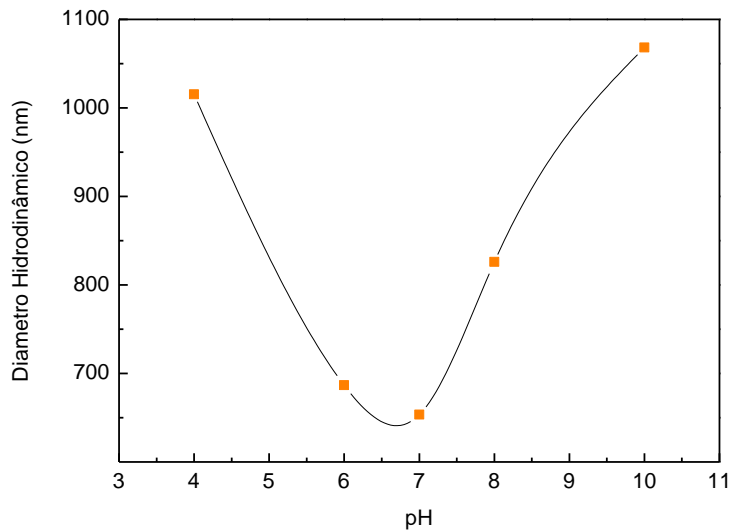


Figura 18 – Evolução do Diâmetro Hidrodinâmico com diferentes pH.

Estudo da Sedimentação

Espectroscopia do Visível/UV

Na Figura 19 mostra-se a evolução do espectro de transmitância da suspensão de pH7 com o comprimento de onda para diferentes tempos. No espectro está também indicado a transmitância da amostra de referência (sem adição de nanopartículas).

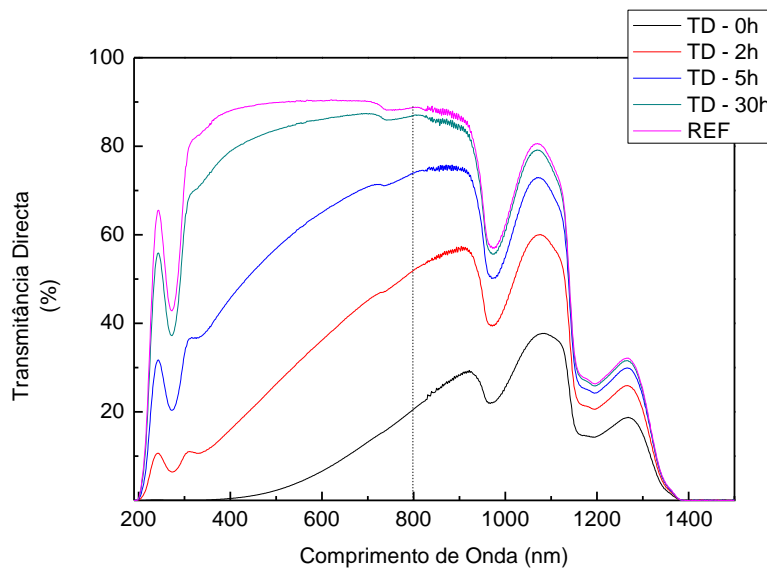


Figura 19 – Transmitância directa vs comprimento de onda para diferentes tempos da amostra D2

A variação da transmitância directa (a 800nm) com o tempo para as suspensões do grupo P estão representadas na Figura 20.

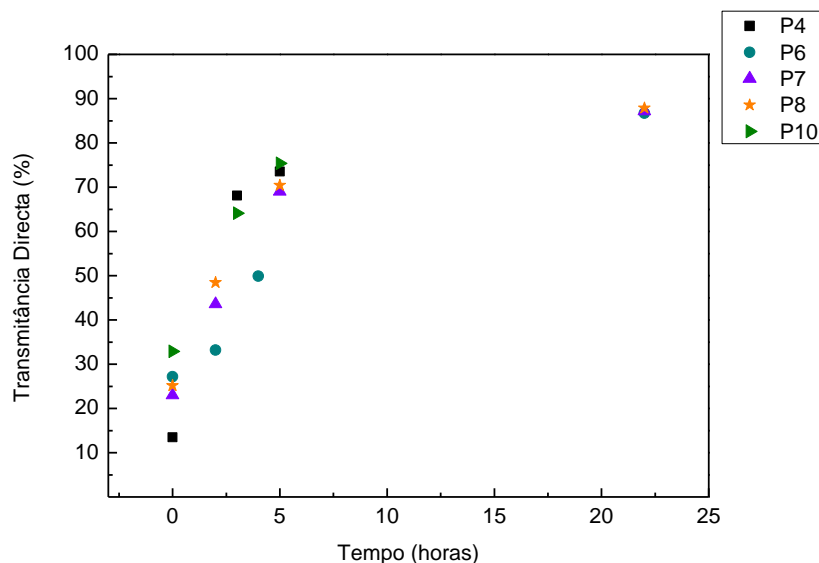


Figura 20 – Transmissão Total ao longo do tempo para o conjunto das amostras P para o comprimento de onda de 800nm.

Atendendo aos diâmetros hidrodinâmicos e supondo mais uma vez que os aglomerados maiores sedimentam mais rapidamente, seria expectável que as amostras P4 e P10 sedimentassem mais depressa e P7 mais lentamente.

Na prática esta previsão não se confirmou. P4 e P10 realmente sedimentaram mais rapidamente porém, P7 e P8 apresentaram evoluções praticamente coincidentes e P6 teve a sedimentação mais lenta.

As equações que melhor representam as variações de transmissão vs tempo estão indicadas na Tabela 10. Os tempos calculados para a sedimentação total são bastante semelhantes para as amostras com pH 6, 7 e 8, entre 22 e 24 horas, e para pH 10 o tempo calculado é de apenas 8 horas.

Tabela 10 – Equações que representam a variação dos pontos experimentais de T ($\lambda=800\text{nm}$) vs t e tempo necessário para a sedimentação total das nanopartículas em suspensão

Amostra	Tendência	R ²	T _{REF} (%)	Tempo de Sedimentação Teórico (horas)
P4	$Y = 57,75x^{0,15}$	1	89,13	18
P6	$Y = 31,86x^{0,32}$	1	89,27	24
P7	$Y = 41,77 x - 0,09 ^{0,25}$,	0,89269	88,78	22
P8	$Y = 45,57 x - 0,07 ^{0,22}$	0,92734	88,87	22
P10	$Y = 45,16x^{0,32}$	1	88,50	8

Foi possível confirmar estes resultados pela análise visual das suspensões. As fotografias destas após 5 horas podem observar-se na Figura 21. É possível ver uma gradação de opacidade, isto é, as amostras nos extremos parecem estar mais translúcidas e as do centro mais

opacas.

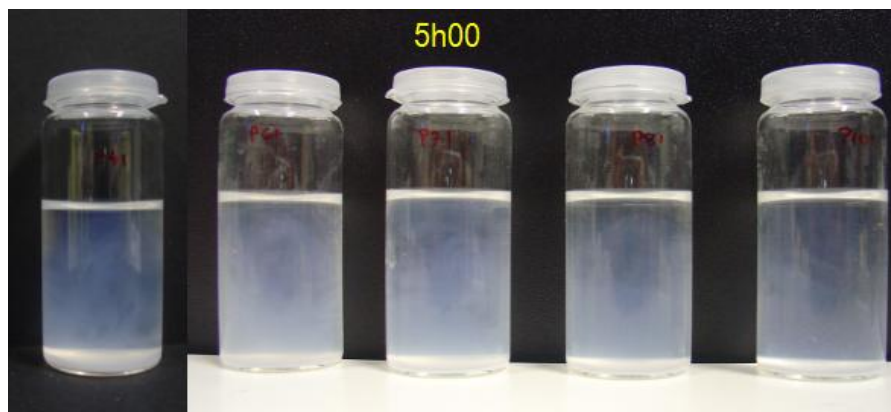


Figura 21 – Imagem das suspensões P passadas 5 horas após sonicação.

Estudo do Sedimento

As amostras de sedimento foram obtidas pelo método descrito anteriormente.

As amostras P4, P6 e P7 apresentaram um sedimento compacto com viscosidade elevada que tende a aglomerar-se ao centro da amostra durante o processo de secagem. Este problema, embora presente, não teve tanta influência nas amostras P8 e P10.

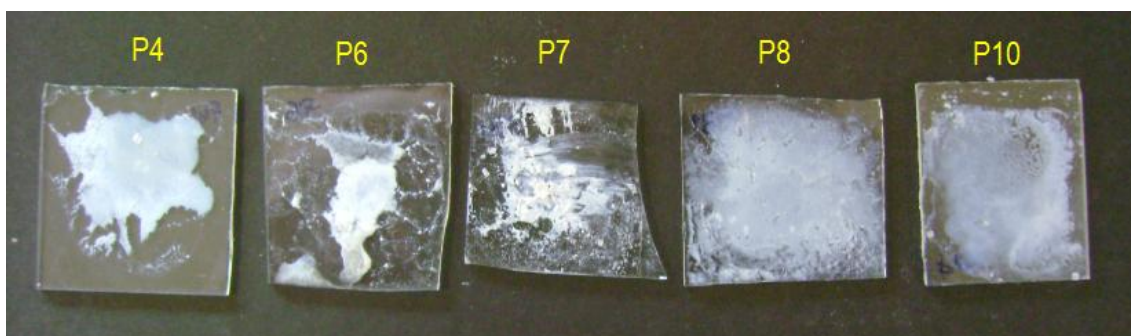


Figura 22 – Aspecto do sedimento das amostras P.

Difracção de raios-X

Observando os espectros obtidos para cada amostra P (Figura 23) e comparando com o espectro obtido para o nanopó, é possível identificar os picos da Anatase e do Rutilo nas amostras 4,6 e 7. Na amostra P4 existe um pico muito intenso correspondente á Halite do NaCl. Tal é expectável pois este composto encontra-se presente na constituição da solução-padrão utilizada. A amostra P6 apresenta 3 picos que não estão presentes em mais nenhuma amostra. Infelizmente não foi possível encontrar uma correspondência válida para os mesmos.

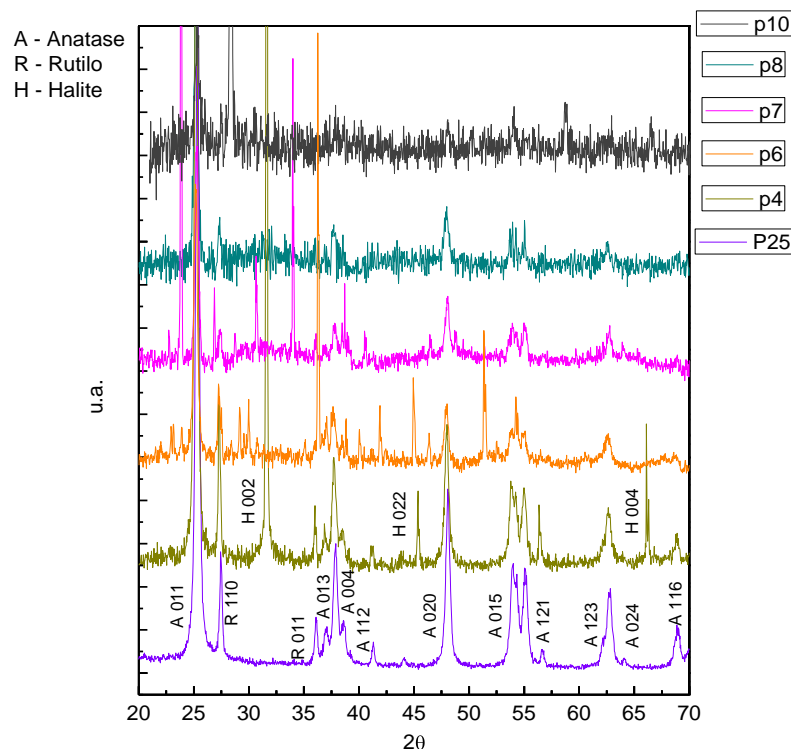


Figura 23 - Espectros de DRX obtidos para as amostras P e o espectro das nanopartículas em pó.

Devido à sobreposição de reflexões de elementos que não o TiO_2 , não foi possível calcular as dimensões das cristalites de Rutilo para as amostras P6, P7 e P10.

O difractograma da amostra P8 apresenta muito ruído, o que contribui para que a linha de base seja menos definida e consequentemente a determinação do tamanho de cristalite seja afectada por um erro maior. Nas outras amostras o tamanho de cristalite da Anatase, obtido para cada amostra situa-se entre os 41nm e os 44nm, o que se encontra bastante próximo das dimensões obtidas para o pó (42nm). Para a amostra P4 obteve-se 72nm para a cristalite de Rutilo que também não se encontra longe do valor obtido para o pó (73nm). (Tabela 11)

Tabela 11 – Cálculo das cristalites para as amostras P.

Amostra	Anatase			Rutilo		
	FWHM	Cristalite (nm)	2θ (°)	FWHM	Cristalite (nm)	2θ (°)
P4	0,38	42,35	25,21	0,23	71,79	27,31
P6	0,39	41,24	25,17	-	-	-
P7	0,37	44,49	25,27	-	-	-
P8	0,39	42,25	25,19	0,29	56,11	27,32
P10	0,38	42,99	25,28	-	-	-

Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

As imagens de SEM (Figura 24) mostraram elevada contaminação do sedimento por estruturas resultantes da secagem dos compostos existentes nas soluções-padrão. A Figura 24b é um claro exemplo desta ocorrência, as estruturas com formas alongadas observadas têm na sua constituição fosfatos, o que é consistente com a composição da solução-padrão P7. Para além de fósforo foram ainda identificados Cloro, Sódio e Potássio. Estes elementos juntamente com o Enxofre também foram identificados na amostra P10.

Curiosamente o sedimento da amostra P4 (Figura 24) está mais disperso que os restantes. As partículas das amostras P7 e P8 parecem envoltas numa espécie de matriz. (Figura 24)

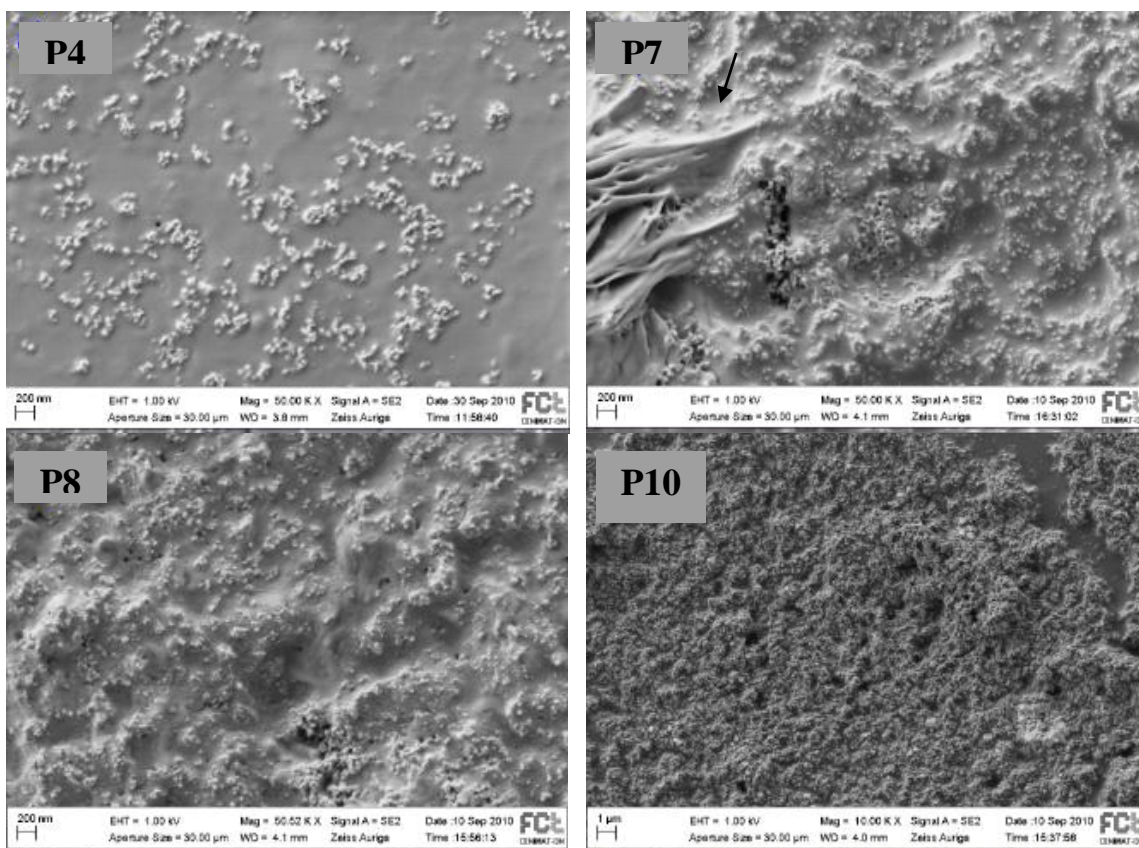


Figura 24 – a) amostra P4 b) amostra P7 c) Amostra P8 (50x) d) Amostra P10 (10x)

Por recurso a um software de análise de imagem obteve-se a área média, perímetro médio e diâmetro de Feret médio para as partículas das amostras P4,P7 e P8. Não foi possível obter uma imagem da amostra P10 com ampliação suficiente para se aplicar estes métodos de análise. As amostras P7 e P8 apresentaram muito efeito de carga, tinham muitos planos de focagem e estavam envoltas numa matriz com vários elementos. Todos estes factores dificultaram a identificação correcta dos limites das nanopartículas e contribuíram para um aumento do erro associado a este tipo de análise. Este efeito pode ser claramente observado nos resultados obtidos para P8 em que a área média e o diâmetro de Feret são muito elevados.

No caso da amostra P4 as partículas foram facilmente identificadas, porém o facto do

sedimento se mostrar muito disperso limitou significativamente a amostragem.

A discrepância entre os diâmetros de Feret médio e os calculados a partir da área e perímetro médios (cerca de 20 nm), tem a ver com a aproximação das partículas a esferas, o que na realidade não se verifica.

De um modo geral os diâmetros das partículas são, nos casos mais extremos superiores em 30 nm ao valor atribuído pelo fornecedor, o que, tendo em conta todos estes factores de variação, não parece ser significativamente elevado para se afirmar, ter havido mudanças estruturais nas partículas.

Tabela 12 – Dados obtidos por tratamento estatístico das amostras P

	P4	P7	P8	P10
Área (nm²)	348,6±65,1	341,0±100,8	1058,9±163,6	-
d(A) (nm)	24,8±5,0	25,2±6,4	24,4±6,5	-
d(P) (nm)	26,0±5,8	26,5±6,9	25,6±6,0	-
Feret (nm)	43,3±4,3	38,2±7,8	54,1±7,1	-

2.2.3 INFLUÊNCIA DA EXPOSIÇÃO À RADIAÇÃO ULTRA-VIOLETA

Para o estudo da influência da radiação UV foram preparadas 3 suspensões idênticas mas expostas a diferentes condições. As amostras U2 foram expostas a UV de comprimento entre 185 e 254 nm, também denominados de UVC (com acção germicida). Quanto às amostras U3 foram expostas à radiação solar em dias diferentes mas em que o índice de UVs era semelhante (Irradiância 0,2 W/m²).

Tabela 13 – Tabela-resumo das amostras U efectuadas

Amostra	Condições
U1	No escuro
U2	Exposição de 2horas a radiação UV artificial
U3	Exposição ao sol das 12h às 14h

Estudo da Sedimentação

Espectroscopia do Visível/UV

Na Figura 25 mostra-se a evolução do espectro de transmitância directa da suspensão exposta a UV a variar com o comprimento de onda para diferentes tempos. No espectro está também indicado a transmitância da amostra de referência (sem adição de nanopartículas).

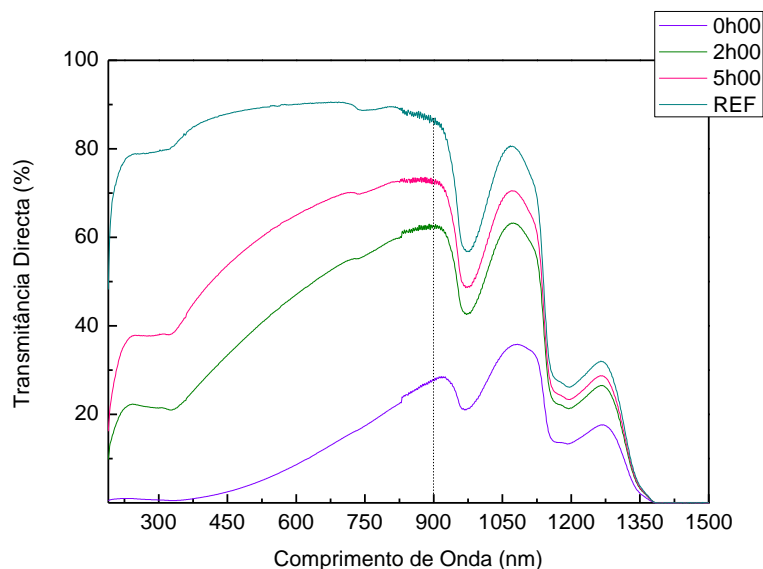


Figura 25 - Transmitância vs comprimento de onda para diferentes tempos da amostra U2

Os valores da Transmitância Directa foram retirados para o comprimento de onda de 900nm. A evolução da sedimentação é quase coincidente para as amostra que foram expostas á radiação ultravioleta. Apesar de semelhante, nota-se um ligeiro atraso na evolução da

sedimentação da amostra que não foi exposta a radiação (U1).

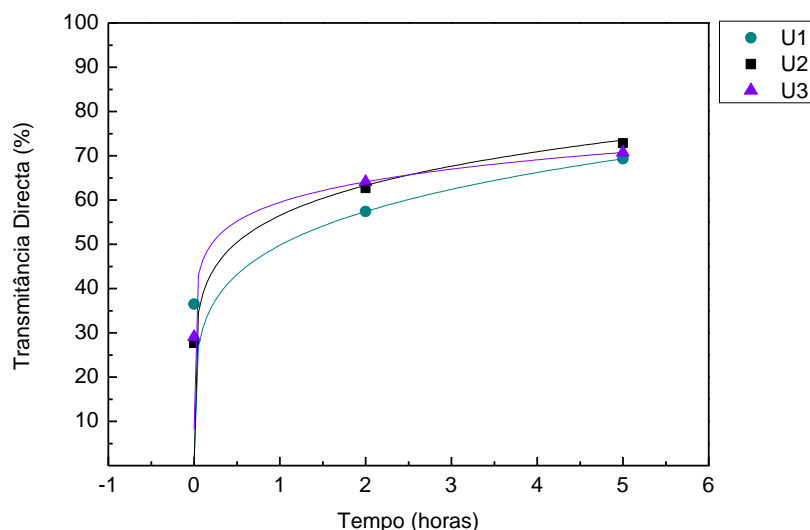


Figura 26 - Transmissão Total ao longo do tempo para o conjunto das amostras U para o comprimento de onda de 900nm.

A variação da transmissão directa ao longo do tempo é bastante semelhante para as três amostras. O factor Ultravioleta aparenta não causar perturbações no processo de sedimentação das nanopartículas. Atendendo ao cálculo do tempo máximo teórico de sedimentação, este é muito próximo para U2 e U3 (respectivamente 14 e 13 horas) e um pouco mais elevado para U1 (17 horas). Embora não tenha sido um factor estudado neste trabalho, uma possível causa para esta variação pode ser o aquecimento sofrido pelas amostras U2 e U3 por estarem expostas à radiação. Por outro lado, à que ter em conta que estes resultados são afectados de uma grande variância pelo que, seria necessário um maior número de réplicas para poder considerar esta diferença significativa. Para além disso em futuros estudos deverá ser considerada também a influência da intensidade da luz UV utilizada. A Transmissão apresentada pela água pura para o comprimento de onda de 900 nm é de 85,97%.

Tabela 14 – Modelação matemática das Transmissões Directas das amostras U ao longo do tempo ($\lambda=900\text{nm}$)

Amostra	Tendência	R ²	Tempo de Sedimentação Teórico (horas)
U1	$Y = 59,48x^{0,13}$	1	17
U2	$Y = 56,50x^{0,16}$	1	14
U3	$Y = 49,78x^{0,21}$	1	13

Estudo do Sedimento

Difracção de raios-X

O difractograma obtido para as amostras U (Figura 27) apresentou um elevado nível de ruído que dificultou a identificação das reflexões dos planos cristalográficos. Mesmo assim, no caso da fase Anatase, a reflexão dos planos cristalográficos (011) foi identificada para todas as amostras, a fase Rutilo relativa aos planos (110) apenas foi identificada na amostra U1 e U3. Não se observam picos de outros elementos que não o TiO₂.

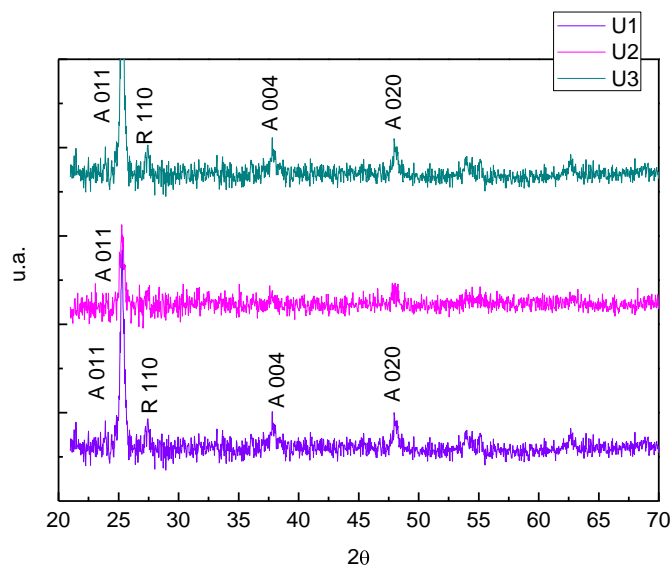


Figura 27 – Difractograma obtido para as amostras U.

Apesar do nível de ruído exibido pelo difractograma foram calculadas as dimensões das cristalites da Anatase. A amostra U1 e U3 apresentam cristalites de 44 nm enquanto a amostra U2, cujo difractograma apresenta mais ruído, apenas 38 nm. Estes valores continuam a estar muito próximos do calculado para o pó.

Tabela 15 – Cálculo das cristalites das amostras U.

Amostra	FWHM	Anatase	
		Cristalite (nm)	2θ (°)
U1	0.37	43.65	25.31
U2	0.43	38.18	25.29
U3	0.37	44.35	25.30

Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

As imagens do sedimento obtidas por SEM são muito semelhantes para as três amostras.(Figura 29) A exposição à radiação UV parece não afectar morfologicamente as partículas. As amostras apresentaram-se muito estáveis durante o ensaio o que permitiu atingir ampliações muito elevadas (1 milhão de vezes).

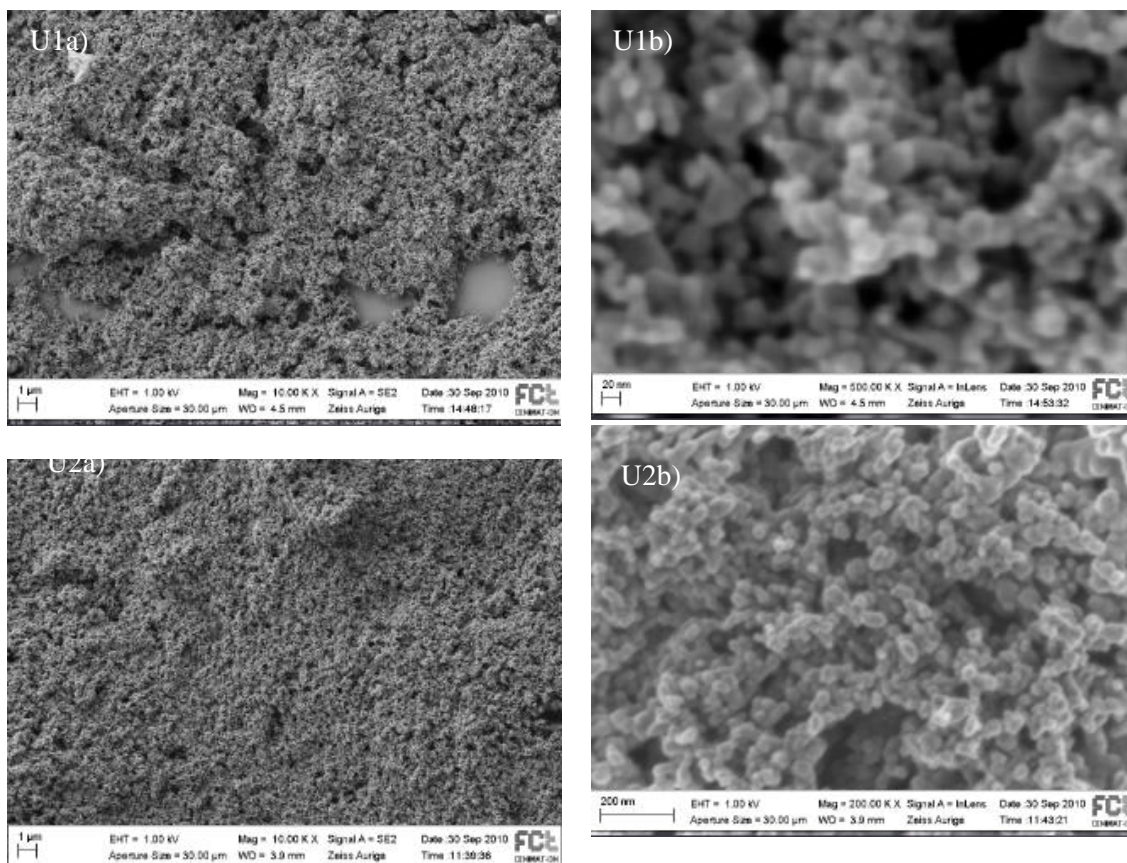


Figura 28 – Imagens obtidas por SEM da amostra U1 com ampliação a)10000x b) 500000x e da U2 com ampliação a) 10000x b) 200000x

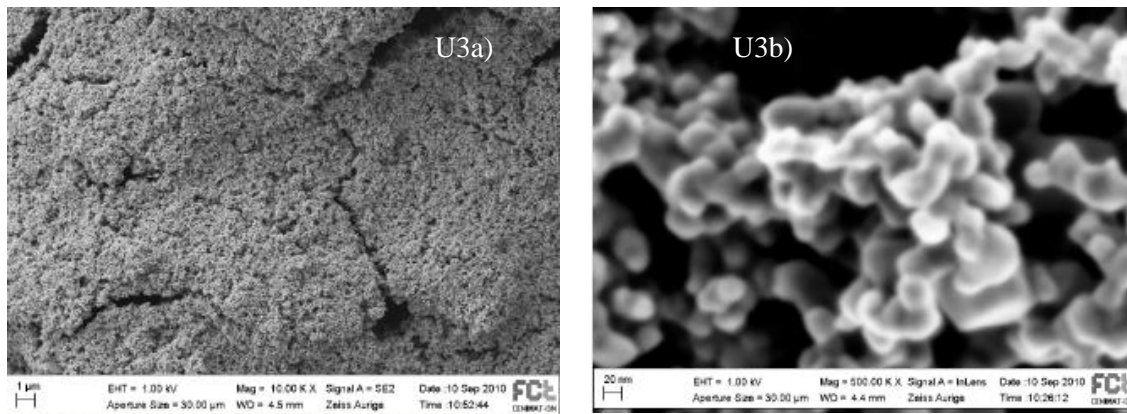


Figura 29 – Imagens obtidas por SEM da amostra U3 com ampliação a)10000x b) 500000x

As imagens com ampliações superiores a 200 000x não se mostraram ideais para tratamentos estatísticos. Factores como a focagem, diferentes planos de profundidade e efeito de carga tornam-se mais significativos a ampliações superiores. Tem-se também uma amostragem menor. Mesmos assim obtiveram-se diâmetros entre os 33 e os 65 nm, o que se encontra próximo das dimensões esperadas. A maior variação ocorre para a área média de cada partícula, que varia entre os 575nm e os 2315nm.

Tabela 16 - Dados obtidos por tratamento estatístico das amostras U

	U1	U2	U3
Área (nm ²)	575±126,3	913,4±236,7	2314,6±575,7
d(A) (nm)	33,2±5,1	33,8±4,5	53,9±6,8
d(P) (nm)	35,0±5,7	36,4±5,7	58,4±8,4
Feret (nm)	48,5±8,3	41,7±7,8	64,5±11,6

2.2.4 ESTUDO DAS MATRIZES AQUOSAS

Para este estudo foram elaboradas seis suspensões com diferentes tipos de água.

W1 – A água ultrapura consiste em água destilada duas vezes à qual foram retirados iões por processos de osmose inversa.

W2 – A água do mar cuja salinidade varia consoante as condições em que se encontram de um modo geral admite-se que se situa entre os 3,1 e os 3,8% e o seu pH varia entre 7,5 e 8,4. É comum encontrar na sua composição para além do oxigénio, hidrogénio, cloro e sódio, também magnésio, enxofre, cálcio, potássio, bromo e carbono.

W3 – A água do rio Tejo, recolhida em Porto Brandão, revelou-se uma fraca representante de um curso de água doce, pois a sua proximidade da foz confere-lhe um nível elevado de salinidade.

W4 – As Daphnias são seres vivos aquáticos da família dos crustáceos. Estes seres são bastante utilizados em estudos toxicológicos. O meio de cultura onde as Daphnias são mantidas utilizado neste trabalho, foi elaborado segundo as directivas da OECD (meio M7), e é composto por sais e vitaminas.

W5 – O meio de teste em que são levados a cabo os estudos toxicológicos em Daphnias é bastante mais simples que o meio de cultura onde estas são mantidas. Este meio é elaborado segundo as directivas da ISO6341 e é composto por cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, bicarbonato de sódio e cloreto de potássio em partes iguais.

W6 – A água da torneira utilizada neste trabalho é da responsabilidade das Águas do Sado e, no mês de Agosto, encontrava-se em conformidade com as normas de qualidade estabelecidas na legislação em vigor (Decreto-Lei 206/2007). Esta informação provém do PCQA e foi facultada pela ERSAR.

Tabela 17 – Tabela-Resumo das suspensões elaboradas para o estudo das matrizes aquosas.

Amostra	Tipo de água
W1	Água ultra-pura
W2	Água do mar (praia de Carcavelos – 10 de Agosto de 2010)
W3	Água do rio (Porto Brandão – 13 de Setembro de 2010)
W4	Água do meio de cultura das Daphnias
W5	Água do ensaio de teste (Daphnias)
W6	Água da torneira (Almada – 13 de Agosto de 2010)

Estudo da Sedimentação

Espectroscopia do Visível/Ultravioleta

A variação do espectro de transmitância ao longo do tempo da suspensão preparada com a água do meio de cultura das Daphnias está representado na Figura 30.

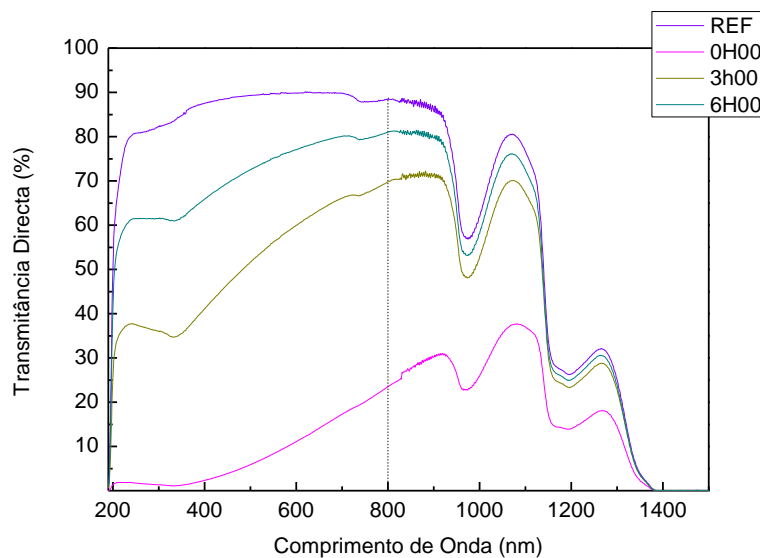


Figura 30 - Transmitância vs comprimento de onda para diferentes tempos da amostra W4

Os valores de T para $\lambda=800\text{nm}$ em função do tempo para todas as suspensões estudadas encontram-se representados na Figura 31. Na Tabela 18 estão indicadas as equações que melhor se adaptam à variação experimental obtida.

A evolução da sedimentação aparenta ser muito semelhante para todas as amostras. Tal já era esperado para algumas suspensões com a W2 e W3 por ambas terem elevado teor de sais, ou até mesmo W4 e W6 pela semelhança das suas composições. Porém tamanha semelhança leva a crer que as diferenças nas matrizes aquosas não induzem alterações significativas no processo de sedimentação.

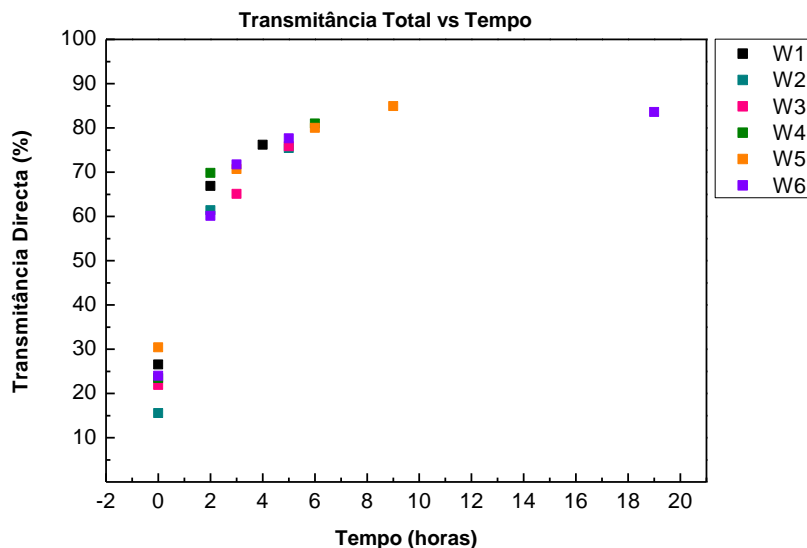


Figura 31 – Transmissão Directa ao longo do tempo para o conjunto das amostras W para o comprimento de onda de 800nm.

Uma análise dos modelos matemáticos obtidos e do tempo máximo de sedimentação teórico (Tabela 18) apoiam a afirmação anterior uma vez que as suspensões sedimentam num intervalo entre 8 e 27 horas. As amostras com um maior teor de sais, em especial, elevados níveis de NaCl apresentam um processo de sedimentação mais rápido que os restantes (apenas 6/9 horas). Este facto é indicativo de que os sais contidos na solução podem levar a uma aglomeração mais intensa das nanopartículas e consequentemente uma sedimentação mais rápida.

Um resultado algo inesperado consiste no facto da água da torneira (amostra W6) ter um processo de sedimentação razoavelmente mais lento (cerca de 15 horas) que o meio de cultura das Daphnias (W4), uma vez que têm composições semelhantes. No entanto a diferença em termos de concentração de iões também pode explicar esse facto. Neste aspecto seria interessante realizar um estudo onde é variada a concentração de iões (Cl, Na, etc.)

Tabela 18 – Equações de ajuste dos pontos experimentais de T vs t e valores calculados para o tempo de sedimentação total das nanopartículas

Amostra	Linha de Tendência	R ²	T _{REF} (%)	Tempo de Sedimentação Teórico (horas)
W1	$Y = 59x^{0,13}$	1	89,49	24
W2	$Y = 53x^{0,23}$	1	85,67	8
W3	$Y = 52x^{0,23}$	1	85,58	9
W4	$Y = 64x^{0,13}$	1	88,37	12
W5	$Y = 58 x + 0,01 ^{0,17}$	0,99955	89,22	13
W6	$Y = 60x^{0,12}$	0,94405	89,20	27

Sedimento

Nas fotografias dos sedimentos da Figura 32 é notória a diferença da morfologia dos sedimentos nas diferentes amostras. Os sedimentos das amostras W2 e W3, revelam um grande número de cristais distribuídos aleatoriamente no sedimento. As amostras W4, W5 e W6 apresentam sedimentos morfologicamente uniformes formando como que um filme na superfície do vidro. Ao contrário das outras amostras que apresentavam uma camada homogênea de sedimento no fundo do recipiente, o sedimento da amostra W6 tinha uma forma semelhante a algodão doce.

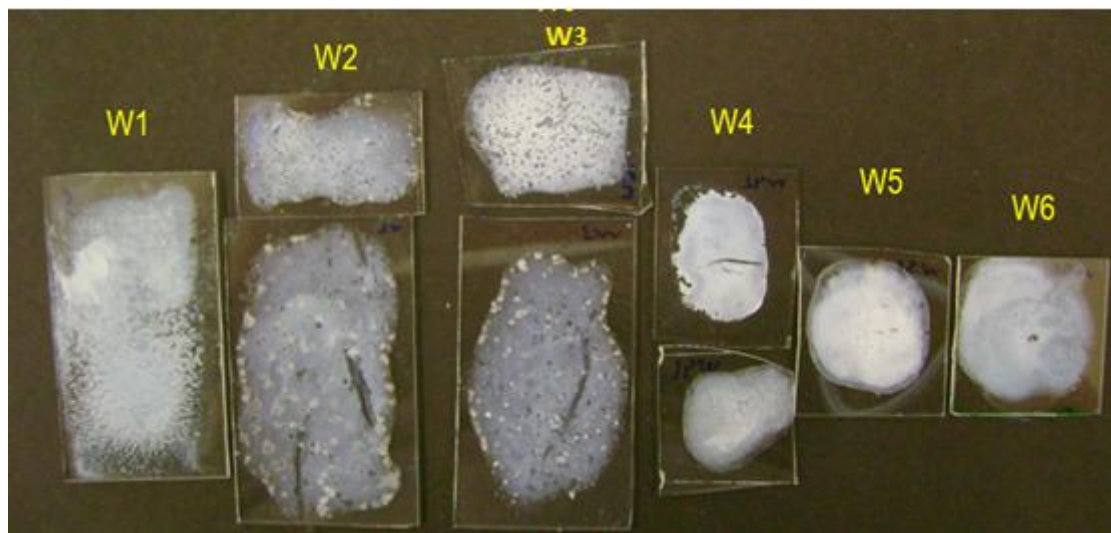


Figura 32 – Aspecto do sedimento apresentado pelas amostras W.

Difracção de raios-X

Os espectros de DRX das amostras W1, W4, W5 e W6 estão representados na Figura 33, foram identificados os picos referentes à fase de Anatase e Rutilo do TiO_2 . Ao comparar com o espectro do pó, no gráfico representado como referencia, pode-se concluir que não foram registados picos de contaminação de outros elementos.

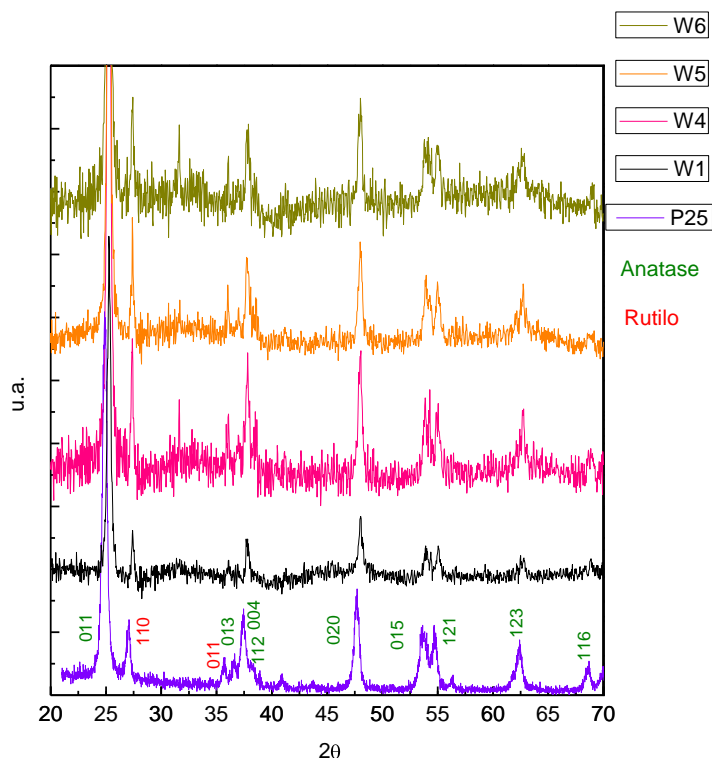


Figura 33 – Difractograma obtido por DRX para as amostras W4, W5, W6 e P25 da Degussa.

Durante a etapa de secagem do sedimento formaram-se cristais visíveis a olho nu, nas amostras de W2 e W3. (Figura 32) Estes cristais, que posteriormente se confirmou serem de NaCl na forma de Halite, são tão predominantes nos espectros obtidos, que não foi possível identificar os picos de TiO_2 .(Figura 34) A ocorrência destes cristais é maior na amostra W2 que na W3, o que seria de esperar uma vez que a primeira consiste em água do mar e a outra em água do rio (Tejo, Porto Brandão). Apesar de não serem espectáveis níveis tão elevados de salinidade na água do rio, há que ter em conta que a água foi recolhida muito próximo da foz do rio Tejo.

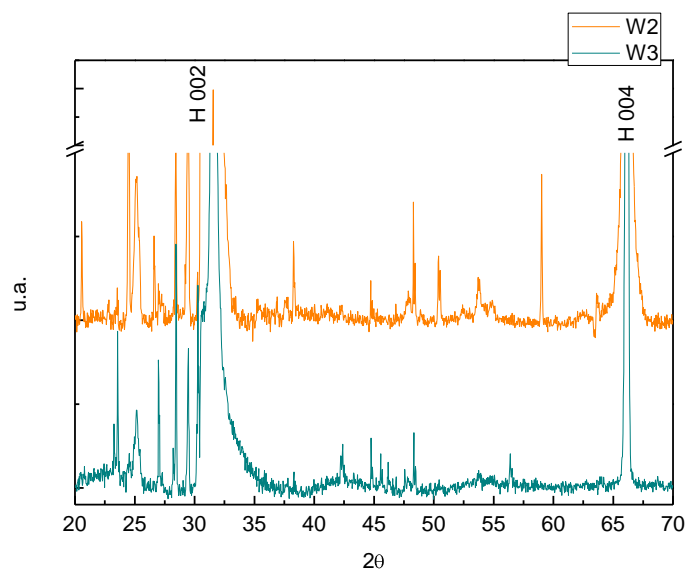


Figura 34 – Diffractograma obtido por DRX para as amostras W2 e W3.

Apesar dos diffractogramas das amostras W2 e W3 terem uma predominância forte da fase da halite (H002 e H004), e como consequência os picos da Anatase e Rutilo ficarem com pouca definição, tentou-se calcular o tamanho de cristalite. Este foi só calculado para a fase da Anatase utilizando a reflexão correspondente ao plano cristalográfico (011). A largura do pico a meia altura é superior ao das restantes amostras, o que contribui para a determinação de um tamanho de cristalite inferior ao esperado. Não é possível concluir se tal se deve às condições do diffractograma ou se a salinidade causou alterações. Seria necessário proceder a um novo estudo que incluísse este novo factor.

As restantes amostras revelaram cristalites de dimensões consistentes com as obtidas nos estudos apresentados anteriormente, isto é, W1, W4, W6 e W5 apresentam uma cristalite de aproximadamente 42nm para a Anatase, e entre os 63 e os 75 nm para o Rutilo. Estes valores, apesar de superiores às dimensões calculadas para as partículas, continuam próximos dos calculados para as cristalites do pó.

Tabela 19 – Cálculo das cristalites para as amostras W

Amostra	Anatase			Rutilo		
	FWHM	Cristalite (nm)	2θ (°)	FWHM	Cristalite (nm)	2θ (°)
W1	0,38	42,94	25,28	0,26	63,12	27,41
W2	0,46	35,32	25,15	-	-	-
W3	0,45	35,80	25,15	-	-	-
W4	0,39	42,00	25,25	0,22	72,74	27,37
W5	0,38	43,02	25,26	0,24	67,26	27,39
W6	0,38	43,02	25,26	0,22	75,11	27,39

Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

As imagens de SEM obtidas para as amostras W estão representadas na Figura 37.

Comparando a amostra W2 (água do mar) com a amostra W1 (água ultrapura), a amostra W2 aparenta ter as nanopartículas envoltas numa espécie de matriz. Esta matriz mostrou ser reactiva com o feixe o que levou à formação de bolhas na estrutura e à impossibilidade de obter boas imagens a ampliações superiores. Pelo que se supões ser um composto orgânico. (Figura 35)

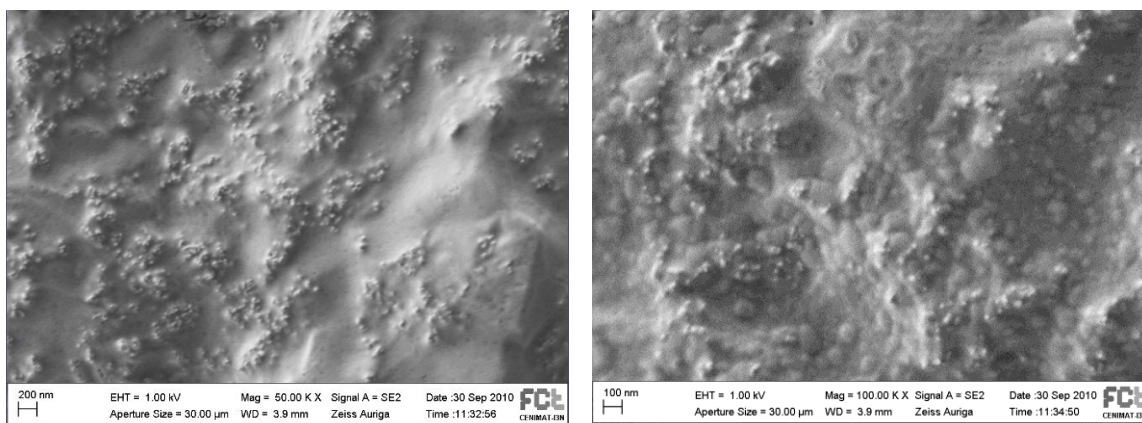


Figura 35 – Formação de bolhas na amostra W2 ampliada 50kx e 100kx respectivamente.

A amostra W6 também apresentou resultados peculiares, as nanopartículas estão envoltas numa matriz de estruturas alongadas. As estruturas observadas são semelhantes a bactérias existentes na água da torneira em termos de forma e dimensões. Para além da forma, outro aspecto que levou à confirmação da origem das regiões alongadas na amostra W6, foi estas terem desaparecido após iluminação com luz ultravioleta. Como mostra a Figura 36 antes da amostra ser iluminada há uma grande densidade de "formas cilíndricas" (Figura 36a) que deixam de se existir após irradiação do sedimento com UV. Numa visualização mais detalhada pode observar-se alguns vazios que aparentam ter diâmetros semelhantes aos dos bastonetes observados na Figura 36a). Portanto a explicação mais plausível é de facto tratarem-se de bactérias que são eliminadas com radiação UVs.

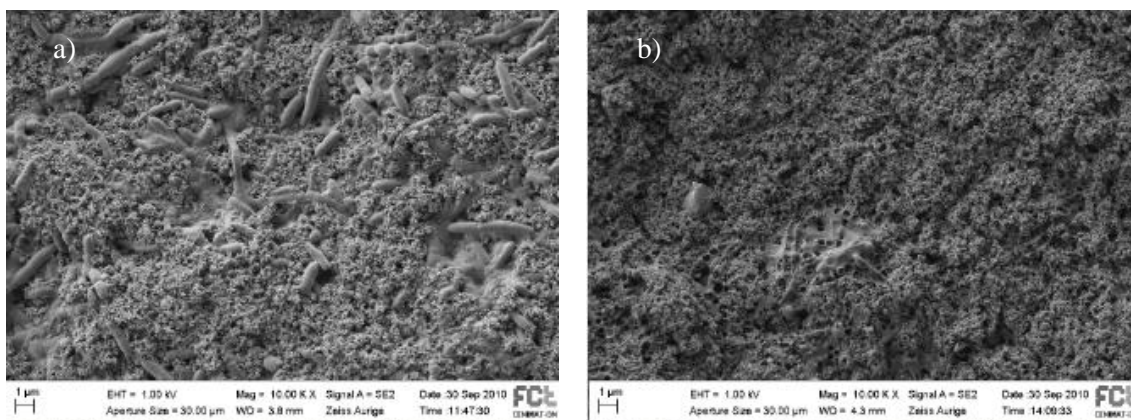


Figura 36 – Imagem obtida por SEM da amostra W6 a) antes de exposta a UV e b) depois de exposta aos UV

Comparando W2 com W3 (água do rio) a matriz presente em W2 não é visível em W3

embora se observe que existem algo a ligar as nanopartículas. Os sedimentos das amostras W1, W4 e W5 são muito semelhantes entre si. (Figura 37)

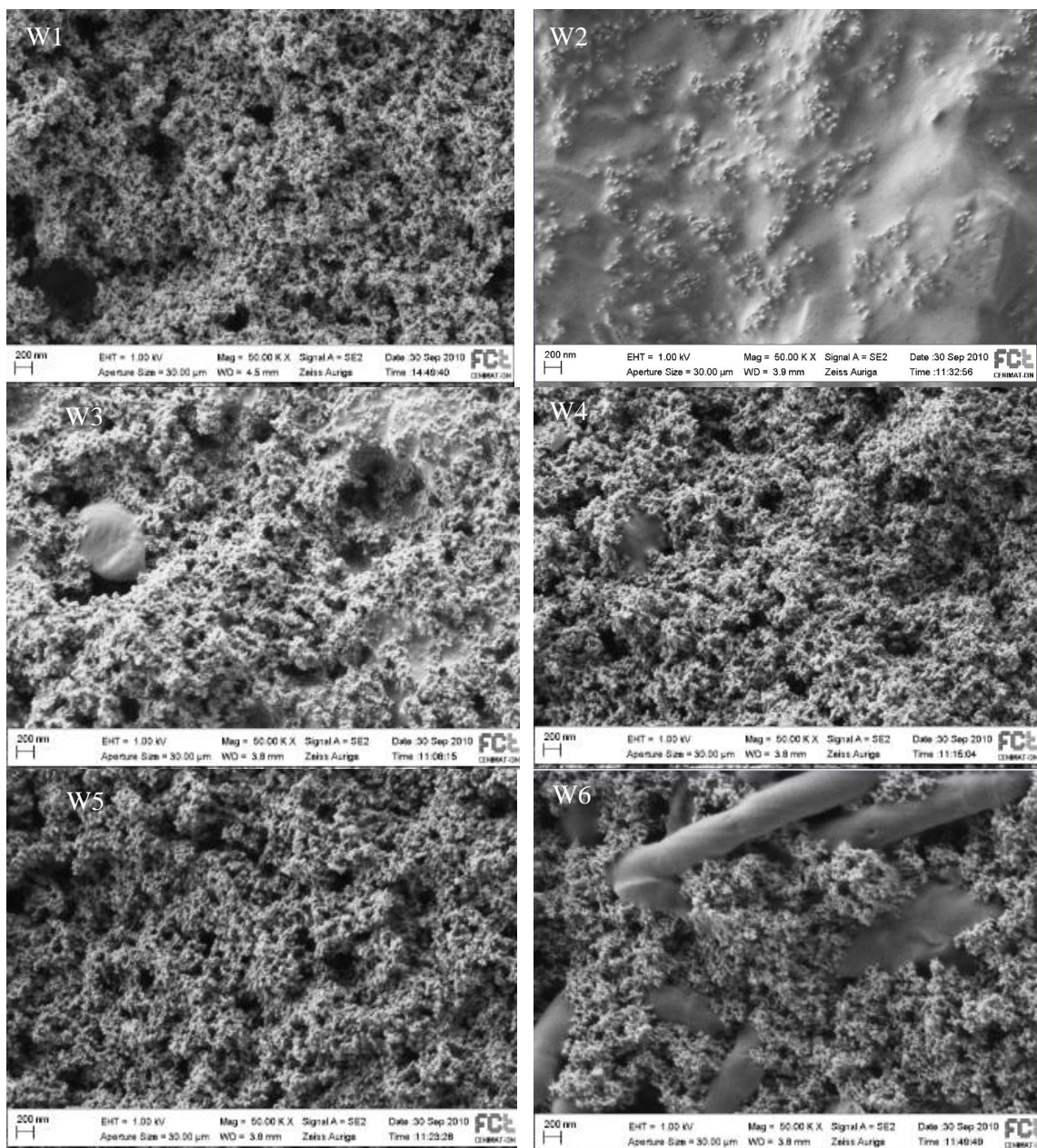


Figura 37 – Imagem de SEM das amostras W ampliadas 50000x.

Nas amostras W1, W3 e W5 foi possível obter imagens com ampliações mais elevadas de modos a viabilizar uma análise estatística do tamanho de partícula (Tabela 20) mas não para W6 pois a estrutura degradava-se. A amostra W3 apresentou uma área média mais elevada que as restantes mas a sua dispersão também é 200 vezes maior que as de W1 e W5. Apesar desta variação os diâmetros obtidos pela área e pelo perímetro são bastante próximos entre si, variando entre os 24 e os 26nm. O diâmetro de Feret está bastante próximo destes valores, sendo apenas superior em 10nm, no caso de W1 e 20nm nos restantes.

Tabela 20 - Dimensões médias obtidas a partir do tratamento estatístico das imagens obtidas por SEM das amostras W

	W1	W2	W3	W4	W5	W6
Área	308,7±108,6	-	844,0±343,5	-	513,5±126,7	-
d(A)	23,9±5,4	-	24,8±5,6	-	24,8±5,6	-
d(P)	25,0±5,9	-	26,0±6,1	-	26,0±6,1	-
Feret	36,1±7,3	-	46,0±15,8	-	39,5±8,4	-

2.2.5 ESTUDO DA INFLUÊNCIA DO SOLVENTE

Para este estudo foram elaboradas 6 suspensões diferentes mas todas com a mesma quantidade de pó - 2mg de TiO₂ (Tabela 21). Os reagentes utilizados neste estudo foram Acetona da Fluka (>99.5%) e Etanol Absoluto da Merk .

Tabela 21 - Compilação das amostras elaboradas para o estudo do Solvente

Amostra	Solvente
M1	Água ultrapura (20ml)
M2	Acetona (20ml)
M3	Etanol (20ml)
M4	Água Ultrapura (10ml) + Acetona (10ml)
M5	Água Ultrapura (10ml) + Etanol (10ml)
M6	Acetona(10ml) + Etanol(10ml)

ANÁLISE POR DISPERSÃO DINÂMICA DA LUZ

Não foi possível medir as amostras que contêm acetona por estas reagirem com as cuvets. A amostra M3, em que foi utilizado o solvente etanol, apresentou diâmetros hidrodinâmico menores (318nm), porém, ao misturar-se o álcool com água, as dimensões mostraram-se muito superiores (1676nm), superiores mesmo à da água ultrapura (759nm), e com tendência para aglomerar rapidamente.

Tabela 22 - -- Dados obtidos por DLS para as amostras M

Amostra	Matriz Aquosa	Z1 (nm)	Z2 (nm)	Z3 (nm)	\bar{Z}
M1	Água ultrapure	742,9	761,1	771,9	758,6
M2	Acetona	-	-	-	-
M3	Etanol	310,4	321,6	323,6	318,5
M4	Acetona diluida	-	-	-	-
M5	Etanol diluido	1704	1602	1722	1676,0
M6	Acetona + Etanol	-	-	-	-

Estudo da Sedimentação

Espectroscopia do Visível/Ultravioleta

A variação do espectro de transmitância vs comprimento de onda ao longo do tempo da suspensão preparada com a acetona está representado na Figura 38.

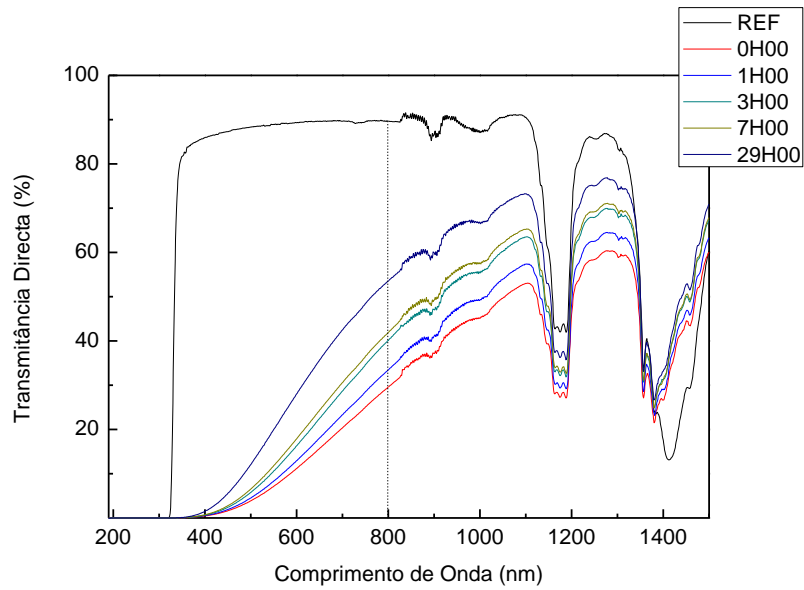


Figura 38 - Transmitância vs comprimento de onda para diferentes tempos da amostra W4

As amostras que contêm acetona (M2, M4 e M6) apresentam um processo de sedimentação mais lento. A amostra M6, que possui Acetona e Etanol em iguais proporções, tem uma sedimentação muito semelhante à amostra M2 o que mostra uma clara dominância da acetona, neste processo. (Figura 39)

As amostras M3 e M5, contendo etanol e etanol diluído respectivamente, apresentam uma sedimentação praticamente coincidente, o que não seria esperado tendo em conta as suas diferenças em diâmetros hidrodinâmicos.

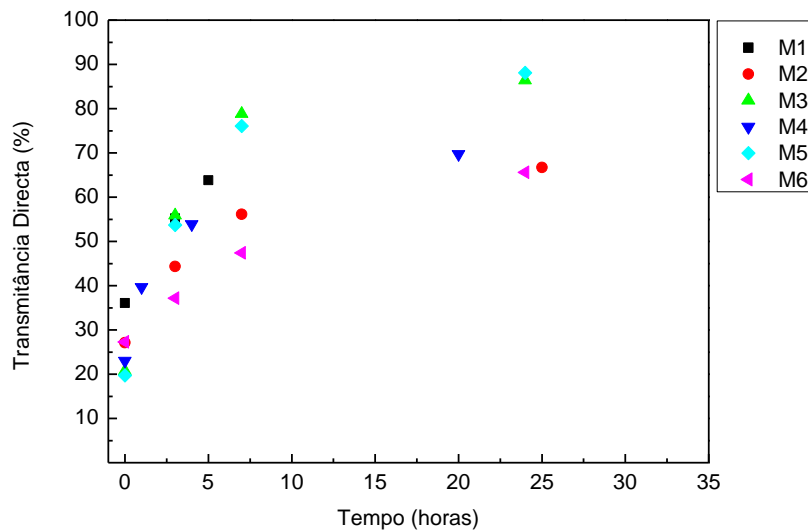


Figura 39 - Transmitância Total ao longo do tempo para o conjunto das amostras M para o comprimento de onda de 800nm.

Calculando o tempo de sedimentação teórico que cada amostra, obtiveram-se valores entre as 23/24h para a água ultrapura, etanol e etanol diluído. Para a acetona pura, obtiveram-se 268 horas (aproximadamente 11dias), 77h (3dias) para a acetona diluída e 120h (5dias) para a acetona com etanol (Tabela 23).

Tabela 23 - Equação que melhor se ajusta aos valores experimentais de T vs t para as amostras M ($\lambda=800\text{nm}$) e calculo do tempo necessário para que as nanopartículas sedimentem completamente

Amostra	Tendência	R ²	T _{REF} (%)	Tempo de Sedimentação Teórico (horas)
M1	$Y = 59,48x^{0,13}$	1	89,49	23
M2	$Y = 40,95 x - 0,05 ^{0,14}$	0,95762	89,66	268
M3	$Y = 50,20x^{0,18}$	0,894	89,58	24
M4	$46,23 x + 0,017 ^{0,21}$	0,92568	89,69	77
M5	$Y = 40,47 x + 0,05 ^{0,18}$	0,978	88,56	23
M6	$Y = 30,10 x - 0,67 ^{0,25}$	0,99997	90,28	120

Estudo do Sedimento

M1 apresentou um sedimento homogêneo com alguns aglomerados. As amostras com Acetona e Etanol sofreram uma evaporação muito rápida, e as suas correntes de convecção podem ter estado na origem dos aglomerados observados no seu sedimento (Figura 40).

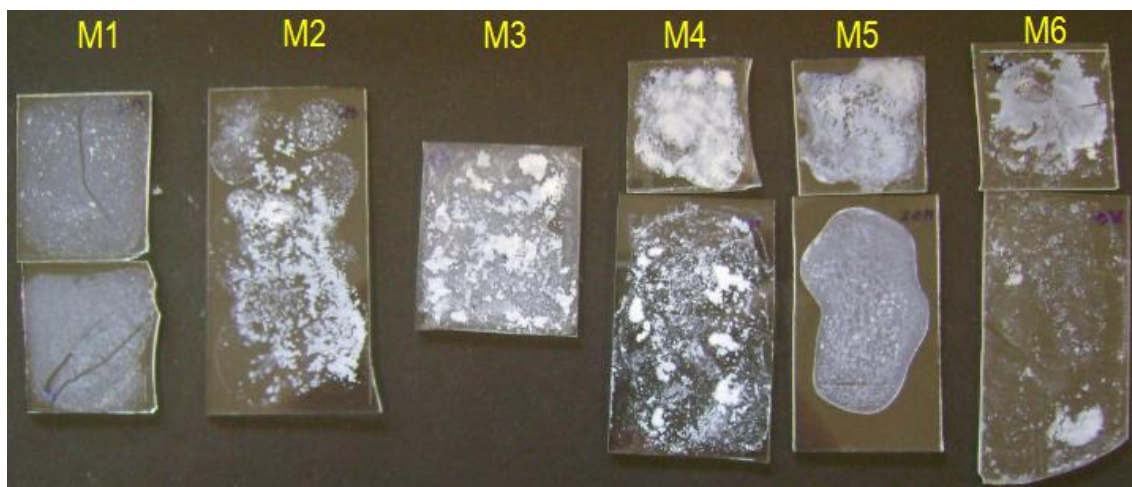


Figura 40 – Aspecto do sedimento das amostras M

Difracção de raios-X (DRX)

Foram identificados apenas reflexões coerentes com as fases típicas do TiO₂, Anatase e Rutilo. As amostras não mostraram picos reflexões de nenhum outro elemento. (Figura 41)

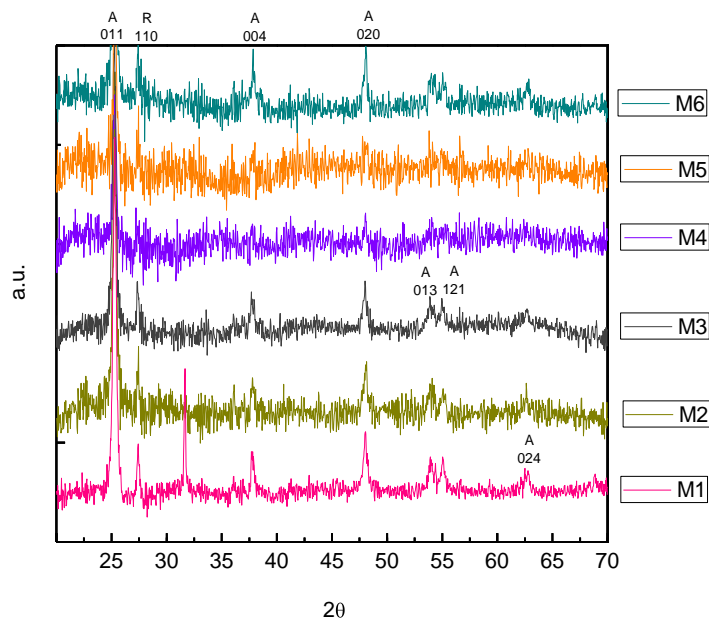


Figura 41 – Difractogramas obtidos para as amostras M.

A técnica de DRX mostrou-se eficaz na identificação de picos, tendo sido possível calcular as dimensões das cristalites da Anatase, cujos valores se situaram dentro do intervalo 44 ± 3 nm. No caso do Rutilo não foi possível obter uma resolução suficiente que possibilitasse o cálculo das cristalites das amostras M4 e M5, sendo que as restantes apresentaram valores entre os 59 e os 79 nm. Estes valores encontram-se próximos dos obtidos para o pó.

Tabela 24 - Cálculo das dimensões das cristalites.

Amostra	Anatase			Rutilo		
	FWHM	Cristalite (nm)	2θ (°)	FWHM	Cristalite (nm)	2θ (°)
M1	0,36	45,44	25,28	0,28	59,21	27,42
M2	0,37	44,45	25,29	0,22	73,74	27,42
M3	0,38	42,78	25,24	0,21	78,99	27,37
M4	0,38	43,14	25,27	-	-	-
M5	0,35	46,64	25,30	-	-	-
M6	0,39	42,17	25,29	0,23	70,88	27,40

Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM)

A morfologia do sedimento é semelhante em todas as amostras, com excepção das amostras M3 e M5 que reagiram com o feixe de electrões do SEM, coalescendo. O sedimento mostrou-se muito compacto e com grande densidade de aglomerados. (Figura 42)

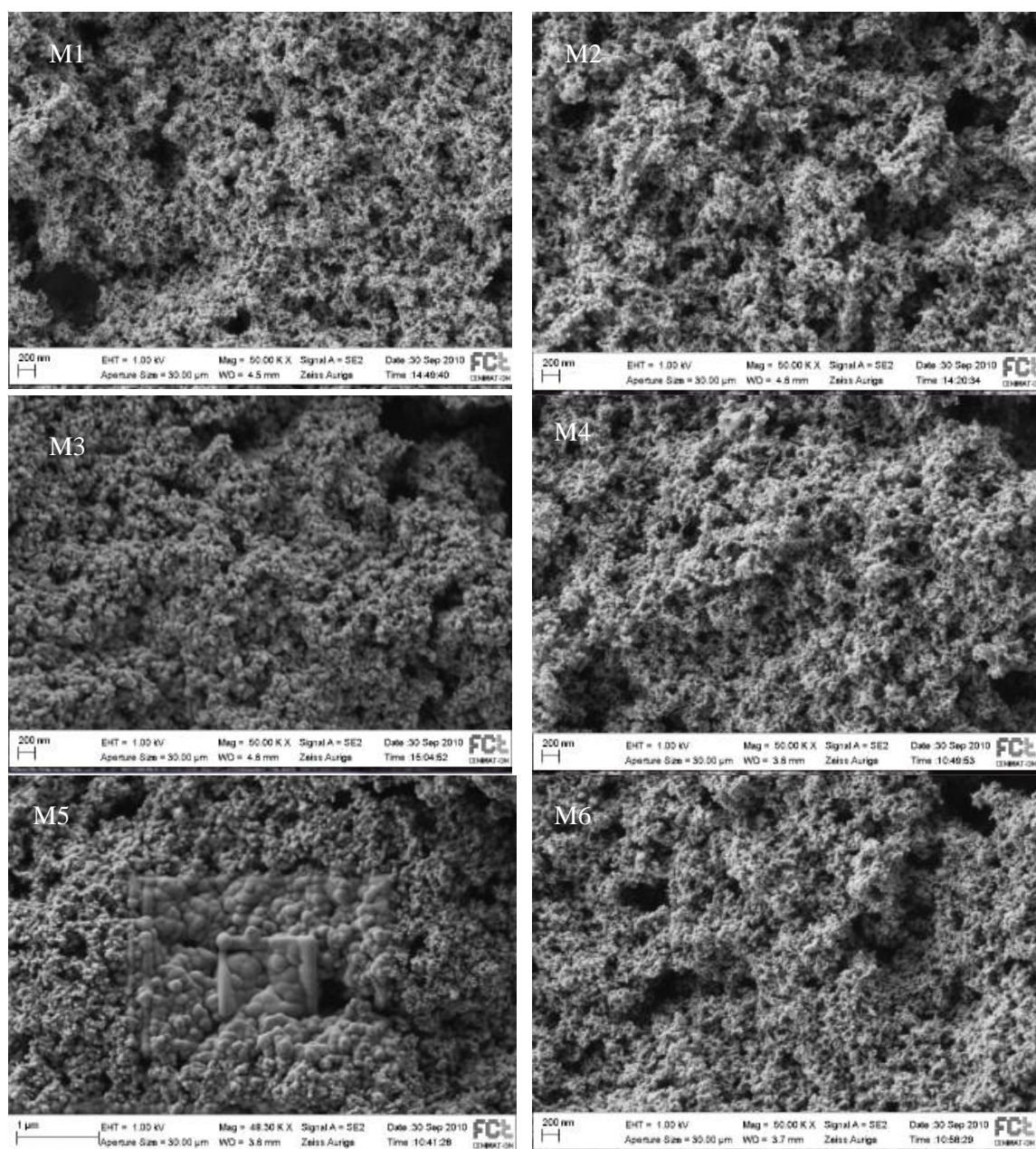


Figura 42 – Imagens obtidas por SEM das amostras M todas com ampliação de 50000x excepto a M3 (48000x).

A Figura 43 mostra as imagens de SEM das amostras M1, M3 e M5 com uma maior ampliação. Enquanto no sedimento da amostra M1 os grãos são muito pequenos e dispersos, no sedimento das amostras M3 e M5 parece existir uma coalescência/agregação dos pequenos grãos formando aglomerados com dimensões maiores.

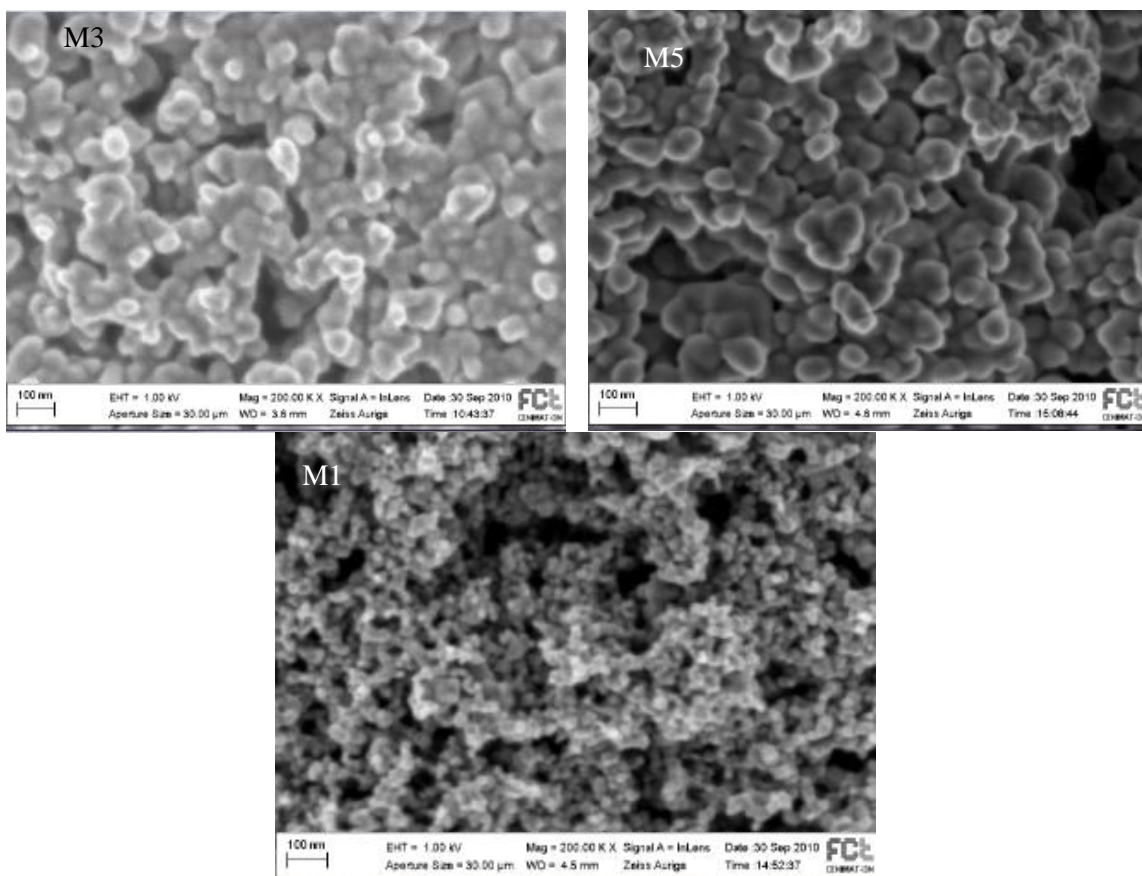


Figura 43 – Imagens de M3 e M5 coalescidas e M1 não coalescida ampliadas 200000x

A análise estatística do tamanho de grão das amostras obtidas através das imagens de SEM está indicada na Tabela 25.

Os resultados obtidos revelaram-se pouco coerentes entre si, apresentando um desvio padrão muito elevado para todas as amostras e valores muito díspares obtidos para os diâmetros. Com a exceção da amostra M4 para a qual se observou uma área média de 481nm (mas com um erro elevado), todas as outras amostras apresentaram áreas entre os 900 e 1900nm. Como seria de esperar, a análise estatística mostrou diâmetros e áreas mais elevados para as amostras M3 e M5.

Tabela 25 - Dimensões médias obtidas a partir do tratamento estatístico das imagens obtidas por SEM das amostras M.

	M1	M2	M3	M4	M5	M6
Área (nm ²)	896±322	1267±445	1597±1357	481±222	1898±422	939±242
d(A) (nm)	33,2±6,1	39,6±6,8	42,0±15,8	24,2±5,3	48,9±5,2	24,8±5,6
d(P) (nm)	34,9±6,7	54,5±13,9	71,1±94,5	25,4±5,8	71,0±12,7	26,0±6,1
Feret (nm)	39,7±7,8	58,7±14,9	81,4±129,7	28,3±6,6	74,7±13,3	55,4±8,1

2.3 ANÁLISE COMPARATIVA DAS AMOSTRAS CONTROLO

Para o estudo da influência dos solventes (M), das matrizes aquosas (W) e da radiação ultravioleta (U) foram utilizadas amostras-controlo compostas por 20ml de água ultrapura com 2mg de TiO₂. No estudo M foi considerada uma amostra controlo, para o W e U duas cada. A única variante na sua preparação o dia de execução de cada uma, e com isto todos os factores que daí advêm (temperatura, humidade, etc..).

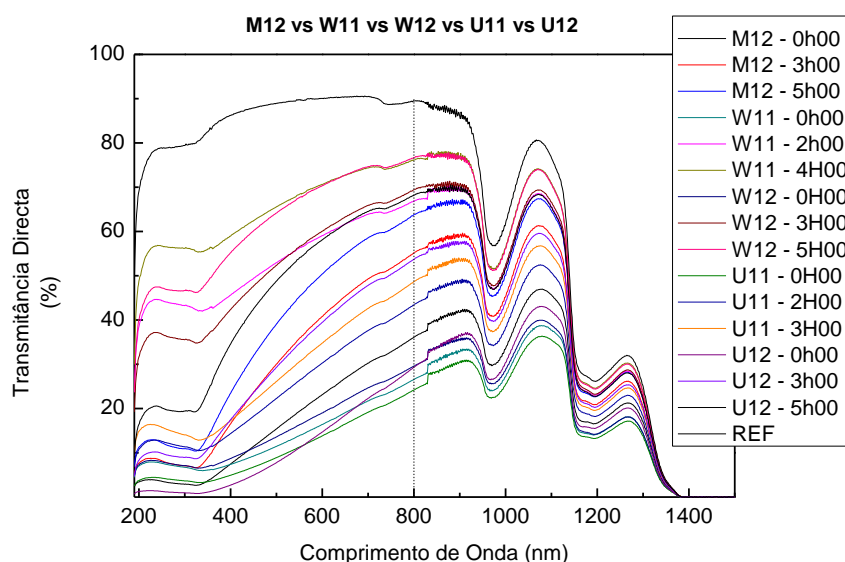


Figura 44 - Espectro da Transmissão directa das amostras M12, W11,W12, U11 e U12

Analisando os resultados obtidos no momento inicial (Figura 45) e ao fim de 5h para todas as suspensões excepto W11 que foi medida ao fim de 4h (Figura 46), verifica-se uma variação de transmitância de cerca de 30%. Esta variação é consistente para os dois tempos escolhidos e é facilmente explicada pelo facto do t_0 ter alguma variação de amostra para amostra, isto é, o intervalo de tempo desde a sonicação da amostra até a sua primeira transmitância ser medida não é exactamente o mesmo. Estes dados são indicativo de uma boa reprodutibilidade das suspensões estudadas.

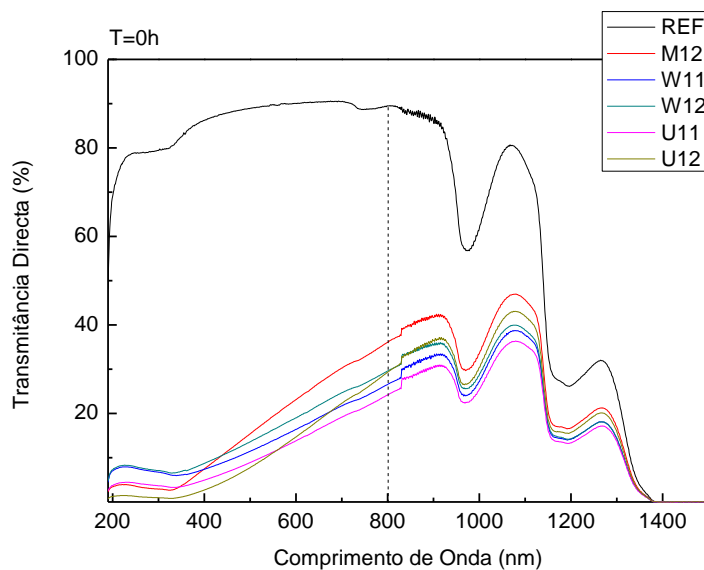


Figura 45 – Transmittância Directa vs Comprimento de Onda no momento inicial

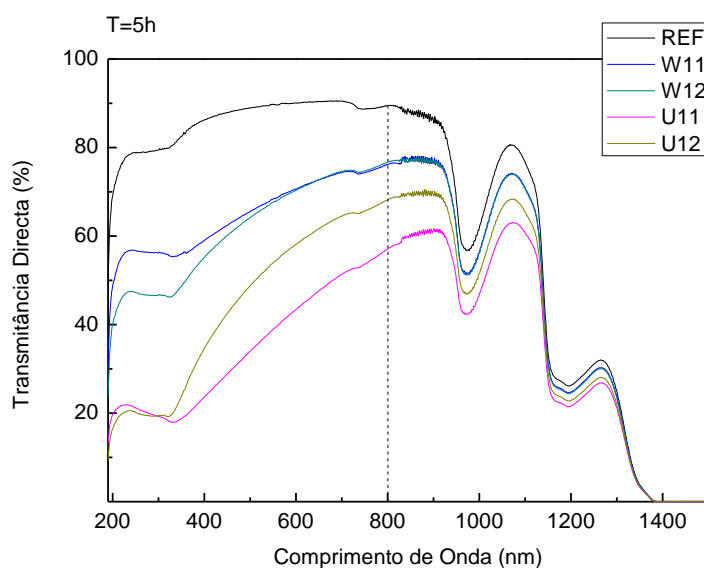


Figura 46 – T vs CDO ao fim de 5h para todas as suspensões menos W11 (4h).

2.4 INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DO SONICADOR

A sonicação foi realizada em todas as suspensões preparadas para os estudos referidos anteriormente. A duração da sonicação foi de 3 minutos com ciclo contínuo e 60% da amplitude total permitida para o equipamento.

Genericamente a sonicação baseia-se no efeito piezoelétrico invertido, isto é, ao aplicar uma diferença de potencial ao material piezoelétrico obtém-se uma resposta mecânica. No caso deste equipamento a acção mecânica consiste numa vibração longitudinal. Esta vibração pode atingir frequências máximas de 24kHz. Contudo o output do equipamento pode ser ajustado entre 20% a 100% deste valor. As vibrações geradas pelo piezoelétrico são amplificadas pela sonda numa ordem de $\lambda/2$. Factores como as dimensões e formato da sonda influenciam grandemente o output. Quanto menor for a área da extremidade da sonda menor será a potência acústica induzida. Por outro lado, a amplitude (s) e a densidade de potência (N) aumentam à medida que a área da extremidade diminui ($s, N \sim 1/A$).

Outro factor regulável consiste nos ciclos, isto é, é possível programar o equipamento para que sonifique a intervalos idênticos de tempo. Sendo 1 para agitação continua e 0,6 para sonificar durante 0,6 segundos e fazer uma pausa de 0,4.

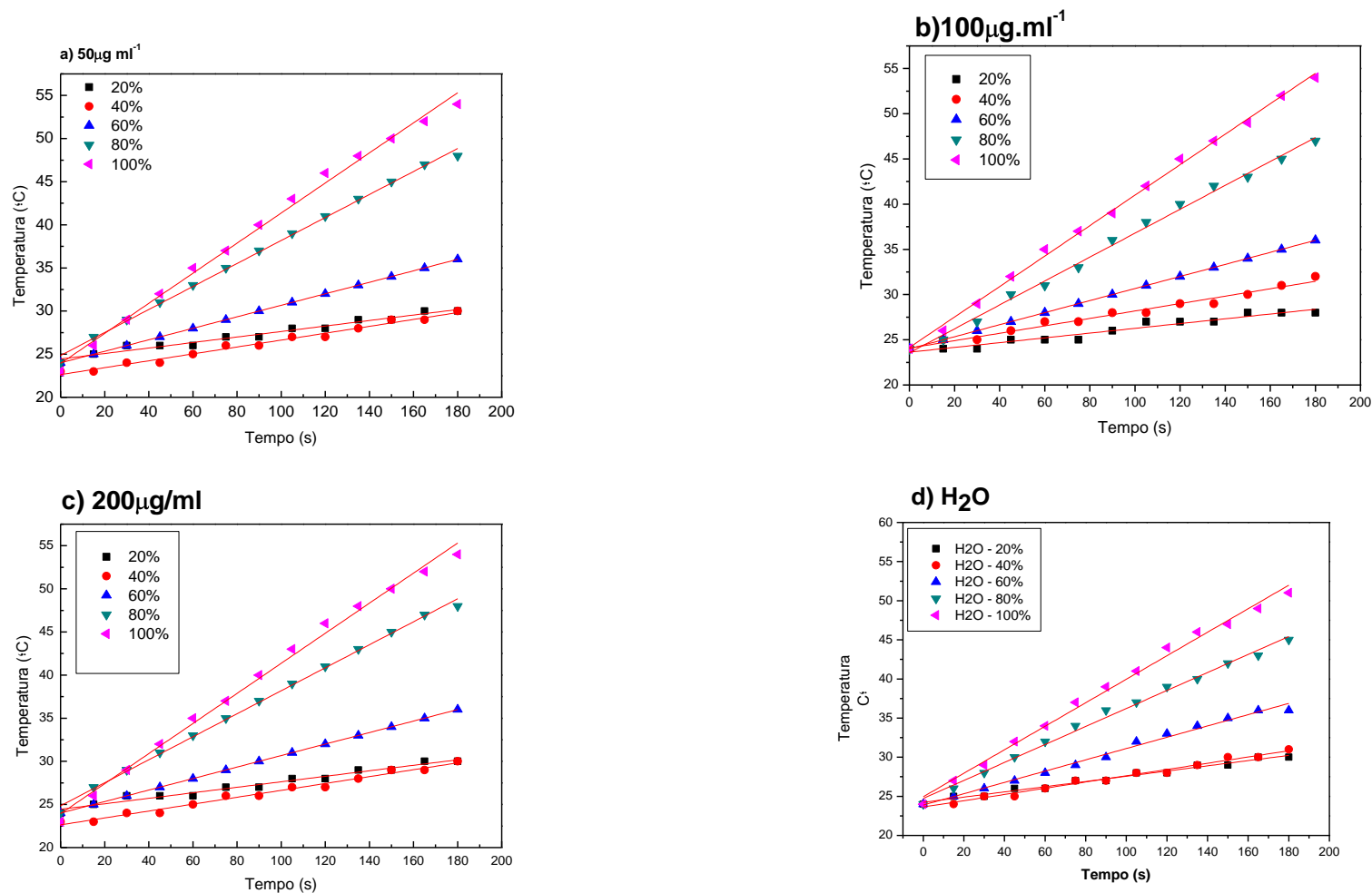
Dado todas estas possíveis variáveis no sonicador importa verificar qual o efeito destas na sonicação das suspensões. Para tal foram testados vários parâmetros e três suspensões: 50, 100 e 200 $\mu\text{g/ml}$.

Cada concentração foi agitada no modo contínuo a 5 amplitudes diferentes, respectivamente 20,40,60,80 e 100%. A temperatura de cada suspensão foi medida de 15 em 15 segundos durante a agitação com um pirómetro óptico.

Há um claro aumento da temperatura com o tempo de sonicação. Esta variação está patente nas Figura 47 e Figura 49.

A influência do aumento do tempo de sonicação na temperatura é visível em todos os gráficos da Figura 47 e da Figura 49, para amplitudes de vibração do sonicador entre 20 e 100% numa suspensão com uma concentração de 50 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 47a), 100 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 47b) e 200 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 47c). Observa-se o mesmo tipo de variação nos gráficos de referência contendo apenas água ultrapura (Figura 47d).

Figura 47 – Sonicação a 20,40,60,80 e 100% de amplitude total de suspensões com concentração de : a) 50µg/l b) 100 µg/l c) 200µg/l d) 0µg/l (referência)



Pela análise dos gráficos da Figura 48 constata-se que a concentração da suspensão não influencia a temperatura da suspensão uma vez que a temperatura aumenta de modo similar para todas as concentrações, até mesmo para a referência. Pelo que se conclui que o aquecimento é sobretudo devido à transferência de energia mecânica do sonicador para o meio tendo como consequência o aquecimento desta.

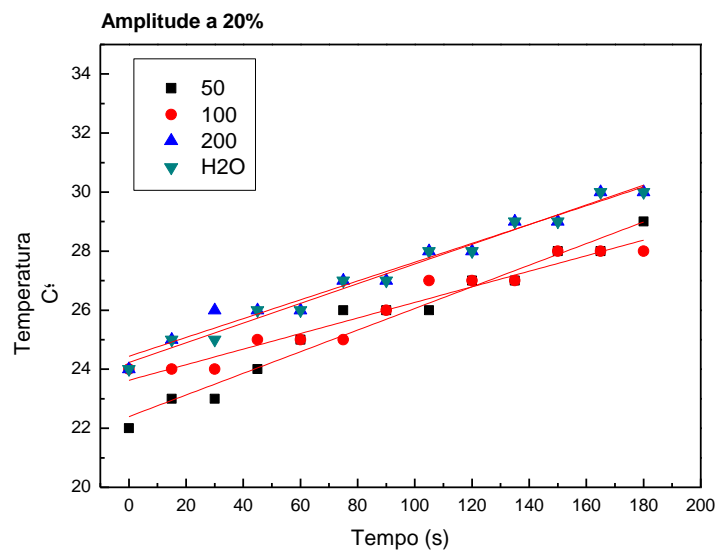
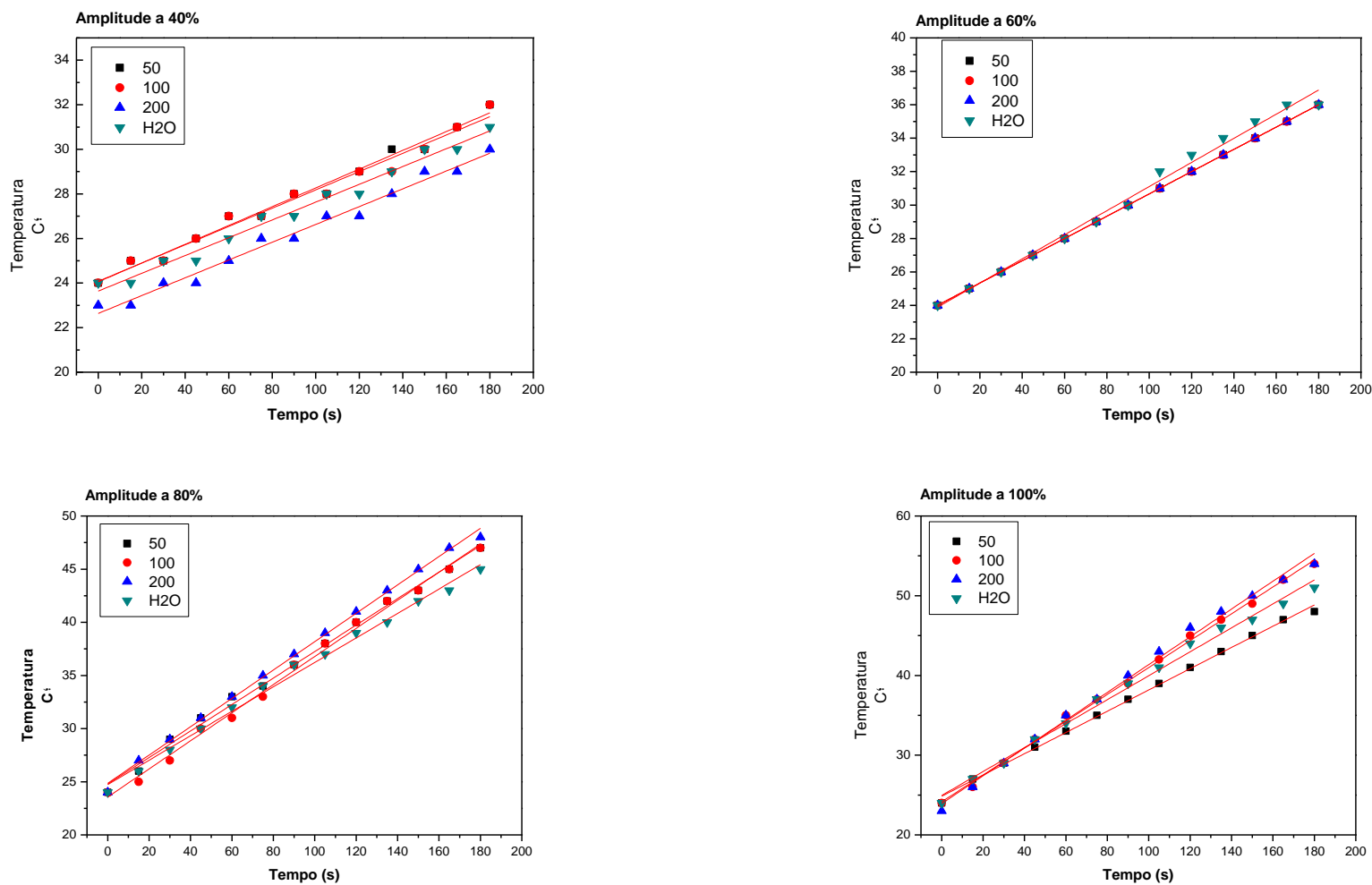


Figura 48 - -- Dados recolhidos da sonicacão de suspensões com concentrações de 0,5,100,200 µg/ml a 20% da amplitude total.

Porém, já não se pode dizer o mesmo da variação da amplitude. Analisando os gráficos da Figura 49 juntamente com os da Figura 48 nota-se um claro aumento da temperatura com o aumento da amplitude de sonicacão. Enquanto para uma amplitude de 20% a suspensão atinge cerca de 30^o C ao fim de 3 minutos, a 100% atinge o dobro.

Figura 49 – Dados recolhidos da sonicação de suspensões com concentrações de 0,50,100,200 µg/ml a diferentes amplitudes.



3. CONCLUSÃO

Do estudo realizado conclui-se que as nanopartículas de dióxido de titânio em suspensão têm tendência a sedimentar qualquer que seja o meio usado. No entanto o tempo de sedimentação é bastante variável tomando valores entre 8 e 431h.

Dos dispersantes utilizados (sabão líquido, detergente da loiça, ácido oxálico e Triton X-100) o que se mostrou mais eficaz a manter as partículas em suspensão foi o ácido oxálico. Com este dispersante as partículas demoraram a sedimentar totalmente cerca de 431h (18 dias). Com o detergente comercial Romar também se obteve uma boa dispersão tendo se obtido um tempo de 119h (≈5dias) para a sedimentação total. Este efeito foi também confirmado através das medidas dos diâmetros hidrodinâmicos obtidos (142 e 154 nm respectivamente). Com os outros detergentes obteve-se um tempo de sedimentação à volta de 20h, portanto muito menos eficazes que os anteriores.

A análise do sedimento destas amostras revelou que não existe agregação das nanopartículas embora fiquem envoltas em compostos orgânicos no caso das suspensões contendo ácido oxálico e TritonX-100. Nas outras o sedimento após a secagem apresentam nanopartículas mais dispersas.

Dos estudos do efeito do pH é notória uma menor aglomeração das partículas em suspensão realizadas com soluções-padrão de pH 6, 7 e 8. Neste caso obteve-se um mínimo no diâmetro hidrodinâmico para pH7. No entanto em termos de velocidade de sedimentação os valores são muito semelhantes entre 22 e 24h.

Para a suspensão com pH 10 obteve-se uma sedimentação mais rápida (8h). Tal levou a concluir que em meios básicos as nanopartículas tendem a aglomerar mais rapidamente. Porém o que se verifica no sedimento após a secagem é o oposto. Nos sedimentos das suspensões com pH mais baixo verifica-se que as nanopartículas estão envolvidas numa matriz orgânica enquanto para pH superiores estas encontram-se dispersas não aparentando existir nenhum ligante.

Os resultados obtidos não são coerentes com o estudo de Jingkun et al. (2009)[31] o que leva a crer que estão outras forças envolvidas. Esta discrepância pode ser explicada com as condições em que as amostras foram preparadas, isto é, no caso deste estudo em particular foram utilizadas soluções padrão enquanto no outro estudo foram apenas utilizadas titulações de NaOH, HCl e NaCl para contrabalançar a força iónica. Este estudo não teve em conta a condutividade iónica das suspensões.

Conclusão

O estudo da influência do tipo de água utilizada na preparação das suspensões levou a concluir-se que em termos de sedimentação as que contêm NaCl têm uma velocidade de sedimentação maior, e muito similar aos obtidos para pH10.

As suspensões preparadas com água ultrapura e da torneira são semelhantes no que diz respeito à velocidade de sedimentação das nanopartículas. As suspensões realizadas com água contendo NaCl apresentam um sedimento em que as nanopartículas estão aparentemente envoltas numa matriz orgânica. Tal não se observa nos sedimentos das restantes suspensões. Nestas as nanopartículas estão dispersas e desaglomeradas.

Das suspensões realizadas com diferentes solventes: água pura, acetona, etanol e misturas destas; a acetona e a mistura de acetona com álcool são as que mantêm as nanopartículas em suspensão durante mais tempo. No caso da acetona obteve-se um tempo de sedimentação máximo de 268h (11 dias) e para a acetona com etanol cerca de 5 dias. O etanol, etanol diluído e água pura têm tempos de sedimentação de um dia aproximadamente. A suspensão com 100% etanol foi a que apresentou o diâmetro hidrodinâmico menor (319nm).

Os sedimentos obtidos destas suspensões têm todos uma morfologia muito semelhante. No entanto no caso dos sedimentos das suspensões com etanol observa-se alguma agregação das nanopartículas, nas imagens de SEM, que pode eventualmente ser devida à interação com o feixe de electrões.

Avaliando todos os estudos, o controlo da aglomeração das nanopartículas de TiO_2 é mais eficaz com a adição de ácido oxálico, detergente Romar, utilização de solventes como Acetona ou utilizando uma solução-padrão de pH4. Porém estes apresentam limitações na aplicação em testes toxicológicos pois também contribuem para a toxicidade do meio, influenciando deste modo os resultados obtidos.

Avaliando o desempenho dos equipamentos/técnicas utilizados, a ultra-sonicação também não se mostrou totalmente eficaz na dispersão prolongada das suspensões, pois mostrou-se que as partículas têm tendência a aglomerar.

A técnica de DLS, embora no caso do TiO_2 não forneça o tamanho da partícula, é um bom método para estudar os seus aglomerados em suspensão. Através dela é possível ter uma medida quantitativa do diâmetro hidrodinâmico da sua evolução desde durante o processo de sedimentação (quando efectuadas medidas ao longo do tempo).

A partir da espectroscopia do visível/UV conseguiu-se determinar um padrão de sedimentação. Apesar de válido, é necessário executar um maior número de réplicas para aumentar o grau de confiança nos resultados obtidos. Outras formas de controlar a variação

Conclusão

passa pelo melhor controlo das condições ambientais, tais como a humidade, temperatura, pH e resistividade do líquido. O controlo da humidade do pó antes de realizar a suspensão, colocando-o numa mufla durante um determinado tempo e a uma temperatura definida, deve ser também uma variável a eliminar no comportamento das suspensões.

O sedimento foi facilmente observado pela técnica de SEM. A preparação da amostra mais eficaz consistiu em colocar uma gota do sedimento directamente na cola de carbono ou numa bolacha de silício (no caso dos solventes). Não foi possível identificar os elementos das amostras que aparentavam ter uma matriz orgânica, caso da água do mar e da torneira. O tratamento estatístico das imagens de SEM obtidas permitiu determinar o tamanho médio de partícula. Os sedimentos apresentaram valores relativamente semelhantes (entre os 20 e os 70nm). No entanto deve-se ter em conta que esta técnica é dependente da focagem, contraste entre outros factores que podem afectar os resultados obtidos. Verificou-se ainda que nalgumas amostras o feixe reagia com o sedimento, especialmente nas amostras com solventes e água do mar.

Para melhorar os espectros obtidos por DRX é preciso otimizar a preparação da amostra de modo a obter uma camada mais homogénea e concentrada. É necessário investigar outros substratos que não o vidro de maneira a diminuir o ruído. Tentar obter resultados em modo rasante pode ser uma opção viável. De modo a confirmar os resultados obtidos com a fórmula de Sherrer, pode utilizar-se o TEM. O TEM dá informação precisa para pequenos volumes de amostra permite discriminar as formas e dimensões das cristalites.

Embora individualmente seja arriscado tirar conclusões, foi possível validar a caracterização das suspensões por cruzamento de dados dos métodos utilizados, isto é os métodos de DLS, Espectroscopia, DRX e SEM apresentaram resultados consistentes entre si. Por exemplo, no caso da amostra D2, o DLS confirmou tratarem-se de aglomerados pequenos (142nm), a Espectroscopia registou um processo de sedimentação muito mais lento (consistente com as dimensões), a imagem do sedimento obtida por SEM mostrou os aglomerados muito dispersos e por fim o espectro de DRX não apresentou quase nenhum pico (o que pode ser devido ao maior grau de desordem das nanopartículas).

Como conclusão geral, com este trabalho que se baseou na análise da transmitância de suspensões contendo a mesma concentração de nanopartículas, mas em que se utilizou suspensões com diferentes pH; tipos de água; álcool, acetona e misturas destes; tipos de tensioactivos; foi possível fazer uma análise representativa da influência destes parâmetros na velocidade de sedimentação das nanopartículas de TiO₂. Através das análise de DRX e SEM aos

Conclusão

sedimentos obtidos para cada uma das suspensões foi também possível verificar que excepto no caso do solvente ser um álcool ou álcool diluído não existe agregação das nanopartículas obtendo-se no sedimento partículas com dimensões semelhantes às introduzidas na suspensão, embora nalguns casos fique envolta em resíduos orgânicos.

Este trabalho não pretendeu ser um estudo acabado, pelo contrário ambiciona dar um contributo para que futuras linhas de investigação possam ser seguidas

PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados obtidos neste trabalho apontam para a necessidade de estudar outros factores, como a condutividade iónica, temperatura e concentração.

O estudo da variação da aglomeração por alteração do pH mostrou que a condutividade iónica pode estar mesmo a sobrepor-se ao efeito do pH do meio. Outro estudo que sugeriu a importância da força iónica, foi o das matrizes aquosas, em que as amostras com um índice de salinidade mais elevado, sedimentaram mais rapidamente.

A possibilidade de utilizar a técnica de AFM directamente nas suspensões, evitando assim a etapa de secagem, afigura-se promissora, tanto para o estudo do sedimento como do sobrenadante.

Outra vertente a explorar está relacionada com a técnica de DLS para estudar a evolução dos aglomerados ao longo do tempo, ou mesmo para o processo de sedimentação em si. Este pode ser um método de validação dos resultados obtidos por Espectroscopia do Visível/Ultravioletas.

Em resumo futuras investigações das suspensões devem incluir também:

- a) a caracterização do potencial zeta;
- b) o controlo do pH de todas as suspensões e ao longo do tempo;
- c) o DLS ou outra técnica que permita analisar a dinâmica dos aglomerados;
- d) estudar a influência da concentração de nanopartículas em suspensão;
- e) a influência da concentração dos tensoactivos na suspensão;
- g) o efeito da temperatura da suspensão, nomeadamente através da sonicação.

Conclusão

O estudo do impacto das nanopartículas de dióxido de titânio no ecossistema de carpas juvenis (*Carassius auratus*), em desenvolvimento pelo professor Mário Diniz e a sua equipa, é um perfeito exemplo da aplicabilidade dos métodos de preparação e caracterização descritos neste trabalho.

Neste estudo sujeitou-se uma suspensão de água destilada com nanopartículas Aeroxide TiO₂ P25 (Aeroxil®, USA) da Degussa, a uma etapa de sonicação com o equipamento UP200 na sua amplitude total, durante 5 minutos. Esta suspensão foi posteriormente diluída em concentrações entre 800 e 0,1mg/L que posteriormente foram adicionadas a 10L de água da torneira. Ao fim de dois dias as partículas encontravam-se todas depositadas no fundo dos tanques, embora a renovação das condições, a oxigenação e o movimento dos peixes tenha contribuído para voltar a suspender as partículas. Neste estudo preliminar, embora não tenha ocorrido mortalidade demonstrou-se que estas nanopartículas se acumulam em diferentes órgãos tais como o fígado e guelras.

Como forma de confirmar e observar as partículas de TiO₂ nestas estruturas, foi utilizada a microscopia electrónica de varrimento.

ANEXOS

ANEXO 1 – ESTUDOS ECOTOXICOLÓGICOS

Tabela 26 – Resumo de alguns estudos toxicológicos do TiO₂. legenda p.p. – dimensões da partícula primária; a – dimensões dos aglomerados.

Referências [30,34,45-56]

Estudo/Autor	Data	Propriedades	Aditivos	Dose (mg/l)	Tempo de exposição	Espécie	Toxicidade
Zhu et al.	2010	P25(anatase/rutilo) p.p:21nm a(12h):580,5nm a(24h):3528,6nm (3 réplicas)	Meio de teste OECD	0,1; 0,5; 1; 5; 10; 50 e 100	72h	Daphnia Magna	Imobilidade significativa e 13% de mortalidade (para todas as concentrações) NOEC: <0,1mg/l; EC50 1,62mg/l; LC50 2.02mg/l
Zhu et al.	2010	P25(anatase/rutilo) p.p:21nm a.s:50m ² /g (10 réplicas)	Meio de teste OECD	0,1; 0,5; 1 e 5	21 dias	Daphnia Magna	0,1mg/l – diminuição no número de nascimentos 0,5mg/l – inibição de crescimento e nascimentos 1 e 5 mg/l – mortalidade(8dias)
Ki Tae Kim et al.	2010	40nm (anatase/rutilo)	Meio de teste EPA US	0, 1, 2, 5, 10	48h e 21 dias	Daphnia Magna	Não foi possível determinar LC50. A capacidade reprodutiva não foi afectada. Indícios de stress oxidativo.
Hao et al	2009	Rutilo p.p: 50nm a.s: 30±10 m ² /g 3 Replicas	Sonicada 30min	5, 10, 25, 50, 100, 200e 400	6 dias	Cyprinus carpio (Carpas Juvenis)	Não ocorreu mortalidade mas foram registados efeitos adversos, alterações fisiológicas e comportamentais. Foi causado stress oxidativo que levou à produção de enzimas anti-oxidantes.
Margit Heinlaan et al	2008	25/70nm	(no escuro) Sonicada 30 min	20000		Daphnia Magna Vibrio fischeri Thamnocephalus platyurus	60% de mortalidade em Daphnia Magna(crustáceo) Não é tóxico para Thamnocephalus Platyrus (crustáceo) nem para Vibrio fischeri (bactéria)
Federici et al	2007	p.p.:24nm	Sonicada	1	14 dias	Oncorhynchus mykiss	Stress oxidativo – alterações em tecidos TBARS e na glutadiona total; Patologias nas guelras e órgãos internos;

								(truta arco-iris)
Lovern Klaper	and	2006	p.p.:10-20nm Filtrada-a:30 nm	Dispersa em THF	0,2-10	48h	Daphnia Magna	100% mortalidade
Lovern Klaper	and	2006	p.p.:10-20 nm Não filtrada a: 100-500nm	Dispersa em THF	50-500	48h	Daphnia Magna	Mortalidade não significativa

Nos estudos de Lovern & Klaper é de salientar o uso de Tetrahydrofurano (THF) como dispersante, uma vez que este é também ele tóxico para as Daphnias.[2]

ANEXO 2 – LIMITAÇÕES E VANTAGENS

Method	Approximate size range (nm)	Limit of detection ^a	Single particle or particle population methods	Level of sample perturbation
AFM	0.5 to >1000	ppb–ppm	sp	Medium
BET	1 to >1000	Dry powder	pp	High
Centrifugation	10 to >1000	Detection dependant	pp	Low
Dialysis	0.5–100	Detection dependant	pp	Low
DLS	3 to >1000	ppm	pp	Minimum
Electrophoresis	3 to >1000	ppm	pp	Minimum
EM-EELS/-EDX	Analysis spot size: ~ 1 nm	ppm in single particle	sp	High
ESEM	40 to >1000	ppb–ppm	sp	Medium
ES-MS	<3	ppb	pp	Medium
FFF	Flow FFF: 1–1000 Sed FFF: 50–1000	Detection dependant; UV: ppm, Fluo&ICP-MS: ppb	pp	Low
HDC	5–1200	Detection dependant	pp	Low
ICP-MS	Depends on fractionation	ppt–ppb	pp	
LIBD	5 to >1000	ppt	sp	Minimum
Microfiltration	100 to >1000	Detection dependant	pp	Low-medium
SEC	0.5–10	Detection dependant	pp	Medium
SEM	10 to >1000	ppb–ppm	sp	High
SLS	50 to >1000		pp	Minimum
TEM/HR-TEM	1 to >1000	ppb–ppm	sp	High
TEM-SAED	Analysis spot size: 1 nm		sp	High
Spectrometry		ppb–ppm	pp	Minimum
Turbidimetry/nephelometry	50 to >1000	ppb–ppm	pp	Minimum
Ultrafiltration	1–30	Detection dependant	pp	Medium
WetSEM	50 to >1000	ppm	sp	Low
WetSTEM		ppm	sp	Low
XRD	0.5 to >1000	Dry powder	pp	High

^a For comparison mass concentration limit of detection for 100 nm particles are estimated

Figura 50 – Limitações de técnicas utilizadas na caracterização de nanomateriais retirado de [36]

ANEXO 3 – ANÁLISE DA DISPERSÃO DINÂMICA DA LUZ

Esta técnica baseia-se na análise da variação da variação de intensidade medida a um ângulo fixo durante um determinado intervalo de tempo. A variação deste ângulo leva a diferenças em algumas ordens de grandeza a concentração máxima que o equipamento é capaz de medir. Nos equipamentos mais antigos, o ângulo era de apenas 90° o que obrigava a diluições extensas das amostras em estudo. O equipamento da Malvern NS mede esta difracção a um ângulo de 173° e pode medir concentrações até 5% da massa tendo em conta uma densidade de 1g/cm^3 para partículas entre os 10 e os 100 nm.

As flutuações originadas pelo movimento Browniano das partículas vizinhas podem causar interferências construtivas ou destrutivas na difracção da luz numa dada direcção. Neste equipamento a intensidade da luz é medida durante pequenos intervalos de tempo (da ordem dos micro/milisegundos). Esta intensidade é posteriormente relacionada entre si através da seguinte função de correlação.

$$g(\tau) = |G(\tau) - \langle I \rangle^2 / \gamma|^{1/2} = Ae^{-2\Gamma\tau}$$

Com $G(\tau)$ – Função de autocorrelação

$\langle I \rangle^2$ – A linha de base

γ – Factor de coerência

A – constante

Γ – taxa de decaimento

τ – intervalo de tempo

Para partículas muito pequenas (nanométricas) a sua capacidade de difusão no meio é muito grande pelo que o gráfico da sua correlação é muito mais irregular.

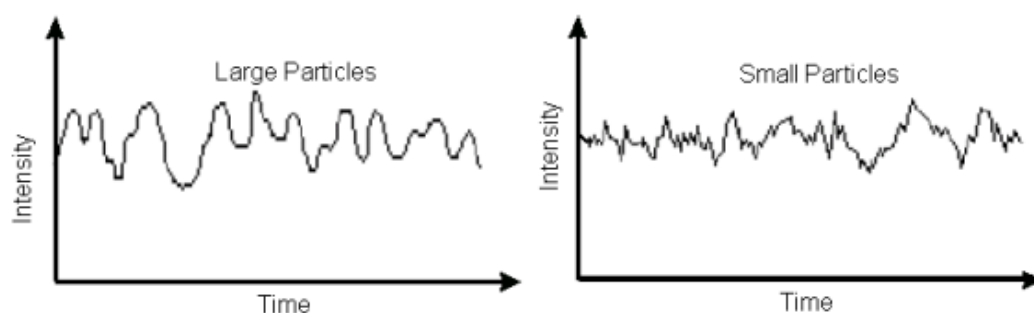


Figura 51 - Intensidade típica para pequenas e grandes partículas, adaptado de [38].

Fazendo um gráfico da taxa de decaimento ao longo do tempo também é possível retirar informação acerca das dimensões das partículas. Quanto menor o tempo de decaimento menor as dimensões das mesmas.

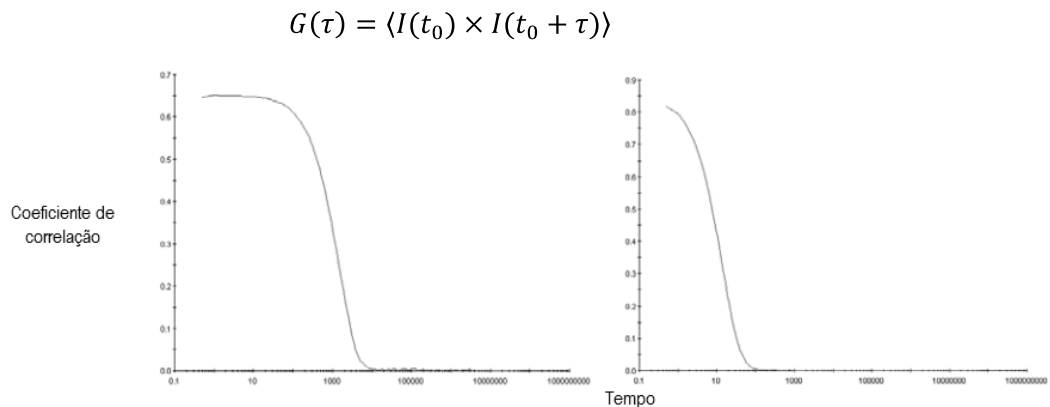


Figura 52 – Coeficiente de Correlação vs Tempo para partículas grande e para partículas pequenas Adaptado de [38]

Porém a taxa de decaimento pode ser convertida em Dq^2 sendo D o coeficiente de difusão e q um vector de onda; $q = \frac{\pi}{\lambda} \eta \text{sen}(\pi/4)$ com η o índice de refração e λ o comprimento de onda da radiação incidente.

Sabendo o Coeficiente de Difusão é então possível calcular o diâmetro hidrodinâmico:

$$d(H) = \frac{kT}{6\pi\eta D}$$

Com k a constante de Boltzman e T a temperatura absoluta.

Este diâmetro hidrodinâmico é então convertido num coeficiente de intensidade (z-average).

Porém este princípio tem uma limitação. Considerando o parâmetro de dispersão d, quando a dimensão da partícula é superior que o comprimento de onda incidente então a intensidade da luz dispersa depende apenas do ângulo difractado. Porém, para partículas de dimensões menores, por exemplo $d < \frac{\lambda}{20}$ há que considerar outros parâmetros como o ângulo de espalhamento, propriedades da solução etc. Usa-se por isso a aproximação de Rayleigh em que: a intensidade $I \propto d^6$. No caso das partículas terem dimensões entre $\frac{\lambda}{20} < d < \lambda$ já não ocorre este problema e a aproximação usada é a de Mie em que: $d \propto I^2$ [2].

REFERÊNCIAS

- [1] T. Masciangioli and W.-X. Zhang, “Environmental technologies at the nanoscale.,” *Environmental science & technology*, vol. 37, Mar. 2003, p. 102A-108A.
- [2] M. Crane, R.D. Handy, J. Garrod, and R. Owen, “Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles.,” *Ecotoxicology (London, England)*, vol. 17, Jul. 2008, pp. 421-437.
- [3] R. Feynman, “There is plenty of room at the bottom - <http://www.zyvex.com/nanotech/feynman.html> (29 Outubro 2010),” *Caltech*, 1959.
- [4] D. Fanfair, S. Desai, and C. Kelty, “The Early History of Nanotechnology” , The Connexions Project, 2005.
- [5] “A Short History of Nanotechnology - <http://www.foresight.org/nano/history.html> (29 Outubro 2010),”
- [6] E. Drexler, *Engines of Creation 2.0 - The Coming Era of Nanotechnology*, Anchor Books, 2006.
- [7] R. Kaegi, a Ulrich, B. Sinnet, R. Vonbank, a Wichser, S. Zuleeg, H. Simmler, S. Brunner, H. Vonmont, M. Burkhardt, and M. Boller, “Synthetic TiO₂ nanoparticle emission from exterior facades into the aquatic environment.,” *Environmental pollution (Barking, Essex : 1987)*, vol. 156, Nov. 2008, pp. 233-9.
- [8] M.I. Institute, “<http://www.mii.org/Minerals/phototitan.html> (30 de Outubro de 2010).”
- [9] “ICIS - <http://www.icis.com/v2/chemicals/9076546/titanium-dioxide/uses.html> (27 Outubro 2010).”
- [10] “<http://webmineral.com> (20 Outubro 2010).”
- [11] A. Kuempel, Eileen; Ruder, *Titanium Dioxide (TiO₂)*, <http://monographs.iarc.fr/ENG/Publications/techrep42/TR42-4.pdf> (20 Outubro 2010).
- [12] C.O. Robichaud, A.L.I.E. Uyar, M.R. Darby, L.G. Zucker, and M.R. Wiesner, “Policy Analysis Estimates of Upper Bounds and Trends in Nano-TiO₂ Production a Basis for Exposure Assessment,” *Environmental Science & Technology*, vol. 43, 2009, pp. 4227-4233.
- [13] K.J. Wetter, “100 Years after The Pure Food & Drug Act: FDA’s Current Regulatory Framework Inadequate to Address New Nano-Scale Technologies,” *U.S. Department of Health&Human Services*

<http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/Nanotechnology/NanotechnologyTaskForce/ucm118910.htm> (30 Outubro 2010), 2006.

- [14] A. Fujishima, "Discovery and applications of photocatalysis - Creating a comfortable future by making use of light energy-," *Japan Nanonet Bulletin*, 44th Issue, 2005.
- [15] A. Fujishima, "Titanium dioxide photocatalysis," *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, vol. 1, Jun. 2000, pp. 1-21.
- [16] M. Anpo, "Utilization of TiO₂ photocatalysts in green chemistry," *Pure and Applied Chemistry*, vol. 72, 2000, pp. 1265-1270.
- [17] S. Guo, Z. Wu, and W. Zhao, "TiO₂-based building materials: Above and beyond traditional applications," *Chinese Science Bulletin*, vol. 54, Apr. 2009, pp. 1137-1142.
- [18] K. Fujishima, Akira; Honda, "Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode," *Nature*, vol. 238, 1972, pp. 37-38.
- [19] J.-wook Seo, H. Chung, M.-yun Kim, J. Lee, I.-hong Choi, and J. Cheon, "Development of Water-Soluble Single-Crystalline TiO₂ Nanoparticles for Photocatalytic Cancer-Cell Treatment," *Small*, vol. 3, 2007, pp. 850-853.
- [20] S. Swetha, S.M. Santhosh, and R. Geetha Balakrishna, "Synthesis and comparative study of nano-TiO₂ over Degussa P-25 in disinfection of water.," *Photochemistry and photobiology*, vol. 86, 2010, pp. 628-32.
- [21] M. Higarashi, "Remediation of pesticide contaminated soil using TiO₂ mediated by solar light," *Catalysis Today*, vol. 76, Nov. 2002, pp. 201-207.
- [22] R.D. Handy, F. von der Kammer, J.R. Lead, M. Hassellöv, R. Owen, and M. Crane, "The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles.," *Ecotoxicology (London, England)*, vol. 17, May. 2008, pp. 287-314.
- [23] C. Buzea, I.I. Pacheco, and K. Robbie, "Nanomaterials and nanoparticles: Sources and toxicity," *Biointerphases*, vol. 2, 2007, p. MR55-MR56.
- [24] J. Wu, W. Liu, C. Xue, S. Zhou, F. Lan, L. Bi, H. Xu, X. Yang, and F.-D. Zeng, "Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure.," *Toxicology letters*, vol. 191, Dec. 2009, pp. 1-8.
- [25] R.F. Hamilton, N. Wu, D. Porter, M. Buford, M. Wolfarth, and A. Holian, "Particle length-dependent titanium dioxide nanomaterials toxicity and bioactivity.," *Particle and fibre toxicology*, vol. 6, Jan. 2009, p. 35.
- [26] S. Lanone, F. Rogerieux, J. Geys, A. Dupont, E. Maillot-Marechal, J. Boczkowski, G. Lacroix, and P. Hoet, "Comparative toxicity of 24 manufactured

nanoparticles in human alveolar epithelial and macrophage cell lines.,” *Particle and fibre toxicology*, vol. 6, Jan. 2009, p. 14.

- [27] A. Baun, N.B. Hartmann, K.D. Grieger, and S.F. Hansen, “Setting the limits for engineered nanoparticles in European surface waters - are current approaches appropriate?,” *Journal of environmental monitoring : JEM*, vol. 11, Oct. 2009, pp. 1774-81.
- [28] K.D. Grieger, A. Baun, and R. Owen, “Redefining risk research priorities for nanomaterials,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 12, Dec. 2009, pp. 383-392.
- [29] OECD, *Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials #6*, France: 2008.
- [30] A. Kahru and H.-C. Dubourguier, “From Ecotoxicology to Nanoecotoxicology,” *Toxicology*, vol. 269, Mar. 2010, pp. 105-119.
- [31] J. Jiang, G. Oberdörster, and P. Biswas, “Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies,” *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 11, Jun. 2008, pp. 77-89.
- [32] G. Oberdörster, V. Stone, and K. Donaldson, “Toxicology of nanoparticles: A historical perspective,” *Nanotoxicology*, vol. 1, Jan. 2007, pp. 2-25.
- [33] R.F. Domingos, N. Tufenkji, and K.J. Wilkinson, “Aggregation of Titanium Dioxide Nanoparticles: Role of a Fulvic Acid,” *Environmental Science & Technology*, vol. 43, Mar. 2009, pp. 1282-1286.
- [34] X. Zhu, Y. Chang, and Y. Chen, “Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*.,” *Chemosphere*, vol. 78, Jan. 2010, pp. 209-15.
- [35] J. Tanguchi, H. Murata, and Y. Okamura, “Analysis of aggregation and dispersion states of small particles in concentrated suspension by using diffused photon density wave spectroscopy.,” *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*, vol. 76, Mar. 2010, pp. 137-44.
- [36] M. Hassellöv, J.W. Readman, J.F. Ranville, and K. Tiede, “Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles.,” *Ecotoxicology (London, England)*, vol. 17, Jul. 2008, pp. 344-61.
- [37] R.F. Domingos, M. a Baalousha, Y. Ju-Nam, M.M. Reid, N. Tufenkji, J.R. Lead, G.G. Leppard, and K.J. Wilkinson, “Characterizing manufactured nanoparticles in the environment: multimethod determination of particle sizes.,” *Environmental science & technology*, vol. 43, Oct. 2009, pp. 7277-84.

- [38] M. Instruments, "Dynamic Light Scattering : An Introduction in 30 Minutes," [http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000792/\\$file/MRK656-01_An_Introduction_to_DLS.pdf](http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB000792/$file/MRK656-01_An_Introduction_to_DLS.pdf) (10 Outubro 2010), pp. 1-8.
- [39] "Skoog, et al. Principles of Instrumental Analysis. 6th ed. Thomson Brooks/Cole. 2007, 169-173."
- [40] L. Ribeiro, "Introdução à Técnica de Espectrometria de Fluorescência de Raios-X," *Shimadzu*.
- [41] D. Williams and B. Carter, *Transmission Electron Microscopy - A Textbook for Material Science*, Springer, 2008.
- [42] M.E. Lauer, O. Grassmann, M. Siam, J. Tardio, L. Jacob, S. Page, J.H. Kindt, A. Engel, and J. Alsenz, "Atomic Force Microscopy : A guide to Understanding and Using AFM," Nov. 2004.
- [43] "http://www.malvern.com/LabEng/technology/zeta_potential/zeta_potential_LD E.htm (10 Outubro 2010)."
- [44] S.J. Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., Ram, "'Image Processing with ImageJ'," *Biophotonics International*, vol. 11, 2004, pp. 36-42.
- [45] X. Zhu, J. Wang, X. Zhang, Y. Chang, and Y. Chen, "Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from Daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain.," *Chemosphere*, vol. 79, May. 2010, pp. 928-33.
- [46] M. Heinlaan, A. Ivask, I. Blinova, H.-C. Dubourguier, and A. Kahru, "Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*," *Chemosphere*, vol. 71, Apr. 2008, pp. 1308-16.
- [47] X. Zhu, Y. Chang, and Y. Chen, "Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*," *Chemosphere*, vol. 78, Jan. 2010, pp. 209-15.
- [48] X. Zhu, Y. Chang, and Y. Chen, "Chemosphere Toxicity and bioaccumulation of TiO₂ nanoparticle aggregates in *Daphnia magna*," *Chemosphere*, vol. 78, 2010, pp. 209-215.
- [49] K.T. Kim, S.J. Klaine, J. Cho, S.-H. Kim, and S.D. Kim, "Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction.," *The Science of the total environment*, vol. 408, Apr. 2010, pp. 2268-72.
- [50] K. Knauer, S. Mohr, and U. Feiler, "Comparing growth development of *Myriophyllum* spp. in laboratory and field experiments for ecotoxicological

testing.” *Environmental science and pollution research international*, vol. 15, Jun. 2008, pp. 322-31.

- [51] S.B. Lovern, J.R. Strickler, and R. Klaper, “Behavioral and physiological changes in *Daphnia magna* when exposed to nanoparticle suspensions (titanium dioxide, nano-C60, and C60HxC70Hx).,” *Environmental science & technology*, vol. 41, Jun. 2007, pp. 4465-70.
- [52] K. Hund-Rinke and M. Simon, “Ecotoxic effect of photocatalytic active nanoparticles (TiO₂) on algae and daphnids.” *Environmental science and pollution research international*, vol. 13, Jul. 2006, pp. 225-32.
- [53] L. Hao, Z. Wang, and B. Xing, “Effect of sub-acute exposure to TiO₂ nanoparticles on oxidative stress and histopathological changes in Juvenile Carp (*Cyprinus carpio*),” *Journal of Environmental Sciences*, vol. 21, 2009, pp. 1459-1466.
- [54] S.B. Lovern and R. Klaper, “*Daphnia magna* mortality when exposed to titanium dioxide and fullerene (C60) nanoparticles.” *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, vol. 25, Apr. 2006, pp. 1132-7.
- [55] K.T. Kim, S.J. Klaine, J. Cho, S.-H. Kim, and S.D. Kim, “Oxidative stress responses of *Daphnia magna* exposed to TiO₂ nanoparticles according to size fraction.” *The Science of the total environment*, vol. 408, Apr. 2010, pp. 2268-72.
- [56] N.B. Hartmann, F. Von der Kammer, T. Hofmann, M. Baalousha, S. Ottofuelling, and a Baun, “Algal testing of titanium dioxide nanoparticles-- testing considerations, inhibitory effects and modification of cadmium bioavailability.” *Toxicology*, vol. 269, Mar. 2010, pp. 190-7.