



Universidade de Brasília

**AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOESTRUTURAS DE ÓXIDO DE COBRE
UTILIZANDO EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA COMO BIOCENSORES**

Programa de Pós Graduação em Química - PPGQ

Laboratório de Pesquisa em Polímeros e Nanomateriais (LABPOLN)

Candidato: Ramon Tiago Albuquerque Andrade

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Giordano Paterno

Coorientador: Dr. Diego Sousa Moura

Março de 2024.

RESUMO

Nanopartículas de óxido de cobre (CuO-np) são, atualmente, nanomateriais de grande interesse tecnológico devido às suas atividades catalítica e bactericida. Nestas aplicações, seu desempenho é dependente do tamanho e formato, bem como dos métodos de preparação. Com a expectativa de uso extensivo, os impactos de CuO-np sobre o meio ambiente e a saúde humana têm sido cada vez mais estudados. Deste modo, essa dissertação de mestrado versa sobre a síntese de CuO-np e caracterização de sua estrutura, morfologia e toxicidade, sendo esta avaliada por meio de testes embriotóxicológicos utilizando embriões de peixe-zebra como organismos modelo. Especificamente, é avaliada a influência do formato e da cobertura das CuO-np sobre a sua toxicidade. Para tanto, foram sintetizadas e caracterizadas quatro CuO-np, nos formatos esférico e bastão, sem e com recobrimento (funcionalização) de citrato. A síntese foi realizada pelo método de precipitação utilizando cloreto de cobre (CuCl_2) ou acetato de cobre ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) como precursor e hidróxido de sódio como agente de hidrólise/precipitação. A caracterização das nanoestruturas foi realizada utilizando diferentes técnicas: difratometria de raios X (DRX), microscopia eletrônica de transmissão (MET); espectroscopia de absorção no ultravioleta visível (UV-Vis); espectroscopia Raman; análise termogravimétrica (TGA); espalhamento dinâmico de luz (DLS). Os ensaios embriotóxicológicos foram realizados utilizando o protocolo da “(OECD, 2013), no qual os organismos foram expostos a diferentes concentrações das nanoestruturas diluídas em água a fim de verificar os efeitos toxicológicos. Medidas de DRX mostraram que as nanopartículas apresentam tamanhos médios de cristalito, variando da ordem de 11 nm a 27 nm para partículas nos formatos de bastão e esfera, respectivamente, com citrato e sem citrato. Tal resultado é corroborado pelos espectros Raman e UV-Vis. A cobertura com citrato foi confirmada por curvas TGA e medidas de potencial zeta, que variavam entre -45 mV e -30 mV. A análise morfológica por MET revelou CuO-np em dois formatos distintos: bastões e esferas, com estrutura nanocristalina bem definida. Os bastões apresentam um comprimento médio de 23 nm e largura de 12 nm, enquanto as esferas

apresentam um diâmetro médio de 12 nm. Estudos embriotóxicológicos mostraram que as nanoestruturas em formato esférico são menos tóxicas que aquelas com formato de bastão. A cobertura de citrato reduz a toxicidade de ambos os formatos de CuO-np em 30% quando comparadas às nanopartículas sem cobertura. Os valores de LC50 foram 9,99 mg/L, 13,27 mg/L, 16,0 mg/L e 24,9 mg/L para as nanoestruturas em formato de bastão sem cobertura, bastão com cobertura, esfera sem cobertura e esfera com cobertura. A atividade de acetilcolinesterase foi diminuída por ambos os formatos apresentando pequenas diferenças quando as estruturas possuem cobertura com citrato.

Palavras-chave: nanopartículas, óxidos metálicos, nanotoxicidade, toxicologia ambiental, in vivo.

ABSTRACT

Copper oxide nanoparticles (CuO-np) currently stand as nanomaterials of significant technological interest due to their catalytic and bactericidal activities. In these applications, their performance is contingent upon size, shape, and preparation methods. With the anticipation of extensive use, the impacts of CuO-np on the environment and human health have been increasingly scrutinized. Thus, this master's dissertation focuses on the synthesis of CuO-np and the characterization of their structure, morphology, and toxicity, the latter evaluated through embryotoxicological tests using zebrafish embryos as model organisms. Specifically, the influence of CuO-np shape and coverage on their toxicity is assessed. To this end, four CuO-np were synthesized and characterized in spherical and rod-like shapes, with and without citrate coating (functionalization). Synthesis was performed via precipitation method using copper chloride (CuCl_2) or copper acetate ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) as precursors and sodium hydroxide as hydrolysis/precipitation agent. Nanostructure characterization employed various techniques: X-ray diffractometry (XRD), transmission electron microscopy (TEM), UV-Visible absorption spectroscopy, Raman spectroscopy, thermogravimetric analysis (TGA), and dynamic light scattering (DLS). Embryotoxicological assays were conducted following OECD protocol (2013), exposing organisms to different concentrations of nanostructures diluted in water to ascertain toxicological effects. XRD measurements revealed crystallite average sizes ranging from approximately 11 nm to 27 nm for rod-like and spherical particles, respectively, with or without citrate. This result was corroborated by Raman and UV-Vis spectra. Citrate coverage was confirmed by TGA curves and zeta potential measurements, ranging between -45 mV and -30 mV. TEM morphological analysis unveiled CuO-np in two distinct shapes: rods and spheres, with well-defined nanocrystalline structure. Rods exhibited an average length of 23 nm and width of 12 nm, while spheres had a mean diameter of 12 nm. Embryotoxicological studies indicated that spherical nanostructures are less toxic than rod-shaped ones. Citrate coating reduced the toxicity of both CuO-

np shapes by 30% compared to uncovered nanoparticles. LC50 values were 9.99 mg/L, 13.27 mg/L, 16.0 mg/L, and 24.9 mg/L for rod-shaped without coating, rod-shaped with coating, spherical without coating, and spherical with coating nanostructures, respectively. Acetylcholinesterase activity was decreased by both shapes, with slight differences observed when structures were coated with citrate.

Keywords: nanoparticles, metal oxides, nanotoxicity, environmental toxicology, in vivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, fonte inesgotável de sabedoria e força, por guiar meus passos ao longo desta jornada de mestrado. Sua graça e amor foram faróis que iluminaram os momentos de desafio, sustentando-me com fé e esperança.

À minha amada esposa Raquel Angélica Oliveira Albuquerque, minha fonte constante de inspiração e apoio incondicional, agradeço por sua paciência, compreensão e amor. Suas palavras de estímulo foram bálsamos nos dias difíceis, e sua presença tornou cada conquista mais significativa.

Às minhas filhas Helena Angélica Oliveira Albuquerque e Luíza Angélica Oliveira Albuquerque, que, mesmo sem entender completamente a dimensão deste empreendimento, sempre me incentivaram com sorrisos, abraços e gestos de carinho. Elas são a luz que ilumina meus dias e a razão pela qual busco constantemente melhorar.

À minha família, em especial a minha cunhada Patrícia e minha sogra, pilares fundamentais em minha trajetória, agradeço pelo suporte inabalável, pelo incentivo e pela compreensão nos momentos em que a dedicação aos estudos exigiu minha ausência. Aos meus irmãos Rômulo e Rodolfo, vocês certamente são a base sólida que sustenta minhas realizações.

À equipe do LABPOLN, que compartilhou comigo desafios e aprendizados, agradeço pela colaboração e sinergia. Cada membro desse grupo contribuiu de maneira única para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Leonardo Giordano Paterno, expressei minha gratidão pela orientação sábia, pelos conselhos valiosos e pela paciência incansável. Sua dedicação foi fundamental para o sucesso deste trabalho.

Aos amigos Ítalo, Marcos, Lucas, Guilherme, Iago, Fernando e Karolyne, agradeço por serem fontes constantes de apoio e motivação. Compartilhar essa jornada com vocês tornou cada

desafio mais leve e cada vitória mais significativa.

À equipe do GTOX, em especial ao Professor César Grisólia e ao meu coorientador Diego Souza Moura, agradeço pela colaboração e pelos insights valiosos e apoio diário que enriqueceram este trabalho.

Gostaria ainda de expressar minha mais profunda gratidão à Dra. Karolyne Vilela pela condução do teste RAMAN, cujos resultados foram cruciais para nosso estudo. Agradecimentos à equipe da UFG, especialmente à Nathany Ribeiro, pela análise meticulosa de MET, que enriqueceu nossa compreensão dos dados. Além disso, sou imensamente grato ao professor Dr. Alex Fabiano da FUP por seu ensino exemplar e apoio inestimável na análise de Potencial Zeta e DLS. Sua orientação e expertise foram fundamentais para o sucesso desta pesquisa. A todos vocês, meu sincero reconhecimento e apreço.

Este percurso não seria possível sem o suporte de cada pessoa mencionada. Cada um de vocês deixou uma marca indelével em minha jornada acadêmica, e por isso, expresso minha sincera gratidão. Este trabalho não é apenas meu, mas também um reflexo do apoio, amor e orientação recebidos ao longo do caminho

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| RESUMO..... | 2 |
| ABSTRACT..... | 4 |
| AGRADECIMENTOS | 6 |
| LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS..... | 9 |
| ÍNDICES DE FIGURAS | 11 |
| ÍNDICE DE TABELAS..... | 13 |
| 1. Introdução..... | 14 |
| 2. Objetivos..... | 16 |
| 2.1 Objetivo geral..... | 16 |
| 2.2 Objetivos Específicos..... | 17 |
| 3 Revisão Bibliográfica..... | 17 |
| 3.1 Nanopartículas de CuO..... | 17 |
| 3.2 Síntese de CuO-np | 21 |
| 3.3. Efeitos toxicológicos e ecotoxicológicos de CuO-np | 24 |
| 3.4. Biomarcadores | 29 |
| 4. Materiais e Métodos..... | 34 |
| 4.1. <i>Materiais</i> | 34 |
| 4.2. <i>Síntese das CuO-np</i> | 35 |
| 4.3. <i>Caracterização estrutural e morfológica das CuO-np</i> | 38 |
| 4.4. <i>Teste de toxicidade em embriões de peixe (FET)</i> | 40 |
| 4.5 <i>Marcadores de stress oxidativo</i> | 41 |
| 5. Resultados e Discussão..... | 42 |
| 5.1. <i>Estrutura e morfologia das CuO-np</i> | 42 |
| 5.2. <i>Ensaio de ecotoxicidade e bioquímica</i> | 70 |
| 6. Conclusão..... | 86 |
| 7. Perspectivas..... | 89 |
| 8. Referências Bibliográficas | 92 |

LISTA DE ABREVIATURAS E ACRÔNIMOS

μm – micrômetro

AChE – acetilcolinesterase

BC – banda de condução

BV – banda de valência

CH_3COOH – ácido acético

$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ – acetato de cobre(II) monohidratado

Cu_2O – óxido de cobre(I)

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – cloreto de cobre(II) dihidratado

CuO – óxido de cobre(II)

CuO-b – nanopartículas de óxido de cobre(II) em formato de bastão

CuO-b-cit – nanopartículas de óxido de cobre(II) em formato de bastão revestidas com citrato

CuO-e – nanopartículas esféricas de óxido de cobre(II)

CuO-e-cit – nanopartículas esféricas de óxido de cobre(II) revestidas com citrato

CuO-np – nanopartículas de óxido de cobre(II) sem revestimento

DMSO – dimetilsulfóxido

DRX – difratometria de raios X

DLS – espalhamento dinâmico de Luz (*dynamic light scattering*)

DTA – análise térmica diferencial (*differential thermal analysis*)

eV – elétron-volt

Fe_2O_3 – óxido de ferro(III)

FET – Teste de embriotoxicidade em peixe-zebra (*fish embryo toxicity*)

$\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – citrato de sódio trisódico dihidratado

IEP – ponto isoelétrico (*isoelectric point*)

IR – infravermelho (*infrared*)

KBr – brometo de potássio

LC₁₀₀ – concentração letal para 100% da população (*lethal concentration for 100% of population*)

LC₅₀ – concentração letal para 50% da população (*lethal concentration for 50% of population*)

MET – microscopia eletrônica de transmissão

MEV – microscopia eletrônica de varredura

mV - milivolt

NaOH – hidróxido de sódio

nm – nanômetro

OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development*)

PDI – índice de polidispersão (*polydispersity index*)

SAED – difração de elétrons de área selecionada (*selected area electron diffraction*)

TGA – análise termogravimétrica

UV – Ultravioleta

UV-vis – Ultravioleta-visível

ζ – potencial zeta

ZnO – óxido de zinco

ÍNDICES DE FIGURAS

Figura 1. “The Royal Gold Cup”.

Figura 2. Representação da estrutura cristalina do CuO.

Figura 3. Imagens MET de CuO-e e CuO-b em formatos de esferas e bastões.

Figura 4. Aglomerado de nanoestruturas em formato oval (a) aglomerado de nanoestruturas em formato esférico (b) Aglomerado de nanoestruturas em formato de folhas (c) e Aglomerado de nanoestruturas em formato de bastão (d).

Figura 5. Nanoestrutura de CuO no interior do *Zebrafish*, causando alteração no organismo.

Figura 6. Embrião de peixe-zebra submetido a ambiente com nanopartículas de CuO, as manchas sobre o Córion indicam a aderência das CuO-np à estrutura.

Figura 7. Modelos biológicos – vantagens e desvantagens.

Figura 8. Fluxogramas das rotas de síntese das nanopartículas de CuO-b (A) e CuO-e (B), nuas e com revestimento de citrato.

Figura 9. Representação do FET por etapas.

Figura 10. Representação do difratograma do CuO - *Bulk*.

Figura 11. Difratogramas das amostras (A) CuO-b e (B) CuO-b-cit e (C) CuO-e e (D) CuO-e-cit.

Figura 12. Difratogramas das nanopartículas em diferentes condições de síntese e do porta amostras do equipamento.

Figura 13. Imagens obtidas por MET CuO-e (A), CuO-b (B), CuO-e-cit (C) e CuO-b-cit (D).

Figura 14. Imagem CuO-e (A), CuO-b (B), CuO-e-cit (C) e CuO-b-cit (D), obtidas por SAED.

Figura 15. Análise de Energia Dispersiva por raios X de CuO-NPs sintetizadas a 95°C.

CuO-b (A), CuO-e (B), CuO-b-cit (C) e CuO-e-cit (D).

Figura 16: Histograma do comprimento nas nanopartículas de CuO-b e CuO-b-cit (A) e (C);

Histograma da largura nas nanopartículas de CuO-b e CuO-b-cit (B) e (D); Histograma do

diametro das nanopartículas de CuO-e e CuO-e-cit (E) e (F).

Figura 17: Nanopartículas de CuO-b e CuO-b-cit.

Figura 18. Espectros Raman das CuO-np em formatos de bastão e esfera, sem cobertura e com cobertura decitrato, conforme indicado.

Figura 19. Curvas TGA – nanopartículas CuO em formatos de esfera e bastão.

Figura 20. Espectros UV-vis das CuO-nps conforme indicado.

Figura 21. Gráficos de potencial zeta em função do pH do meio para diferentes CuO-np: (a) CuO-b, (b) CuO-b-cit, (c) CuO-e e (d) CuO-e-cit.

Figura 22. Fotografias das amostras de CuO-np em diferentes pHs, conforme indicado.

Figura 23. Medida de DLS do tamanho das nanopartículas em pH's variados.

Figura 24. Gráficos do Índice de Polidispersividade em função do pH do meio para diferentes CuO-np, conforme indicado. A linha vertical indica a condição neutra (pH 7).

Figura 25. Fração de embriões de peixe-zebra afetada por diferentes concentrações de CuO-np determinada em diferentes tempos de exposição.

Figura 26. Efeitos tóxicológicos e má formação dos embriões e larvas dos indivíduos expostos as nanopartículas, CuO-e (A) e (C) e CuO-b (B) e (D).

Figura 27. LC₅₀ obtidas a partir dos ensaios com as nanopartículas em diferentes formatos.

Figura 28. LC₅₀ obtidas a partir dos ensaios com as nanopartículas em diferentes formatos e com cobertura.

Figura 29. Fotografias de ovos de peixe-zebra após incubação de 96h com CuO-np a 39,5 mg.L⁻¹: (a) CuO-e, (b) CuO-e-cit, (c) CuO-b e (d) CuO-b-cit. As setas indicam a presença de CuO-nps no córion.

Figura 30. Atividade de AChE após 96h de exposição com diferentes concentrações de CuO-np: (A) CuO-b, (B) CuO-b-cit, (C) CuO-e e (D) CuO-e-cit.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Tamanho médio dos cristalitos a partir dos dados obtidos por DRX.

Tabela 2. Valores dos modos vibracionais RAMAN experimentais e *Bulk* para o CuO.

Tabela 3. Valores de potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e índice de poli dispersão para as amostras de CuO-np em diferentes pHs.

Tabela 4. Valores de LC₅₀ obtidos para as partículas em diferentes formatos.

1. Introdução.

As nanopartículas de óxido de cobre (CuO-np), as quais apresentam dimensões entre 5 e 100 nanômetros, têm se mostrado potencialmente promissoras nas indústrias eletrônica, medicinal e de produção/armazenamento de energia (JADHAV et al., 2011), Isto se deve à sua elevada área superficial elevada, alta reatividade química, comportamento semicondutor e ação bactericida, permitindo seu emprego na produção de baterias de íons de lítio de alta capacidade, liberação controlada de medicamentos, remoção de contaminantes na água, sensores eletroquímicos, entre outras aplicações (JADHAV et al., 2011). Além disso, apresentam atividade antimicrobiana, sendo usadas na fabricação de materiais e revestimentos para prevenir a propagação de patógenos (RAI et al., 2018). Podem ainda ser empregadas como agentes terapêuticos e na administração de medicamentos (DELGADO et al., 2011). No entanto, é importante destacar que as CuO-np também podem ser tóxicas para os seres vivos, com o nível de toxicidade sendo dependente do formato e da funcionalização da superfície (NAZ; GUL; ZIA, 2020).

Atualmente, as CuO-np são sintetizadas em diferentes formatos, incluindo esfera, bastão, placa (folha), flor, entre outros. Em geral, diferentes morfologias são observadas (PAN et al., 2011), Sendo as partículas em formato esférico com estrutura arredondada e simétrica e com diâmetro que varia na faixa de 5 a 50 nm, já os bastonetes têm formato alongado, com diâmetro de cerca de 10 nm e comprimento que varia na faixa de 20 a 100 nm, enquanto nas partículas em forma de folha possuem forma plana e fina, com espessura em torno de 5 nm e área superficial que pode variar entre 50 e 100 nm² e por fim as que possuem forma de flor que apresentam estrutura ramificada ou dendrítica, com ramificações que se estendem em diferentes direções, dando o aspecto de uma flor.

As propriedades físico-químicas das nanopartículas são altamente dependentes da sua forma e tamanho. Por exemplo, CuO-np com formato de bastão geralmente apresentam uma maior relação área superficial/volume, o que as torna mais reativas e propensas à aglomeração, além de apresentarem maiores condutividade elétrica e estabilidade térmica. Em geral, a síntese de CuO-np

é realizada por meio das rotas química e física, que permitem controlar a morfologia e o tamanho das partículas, visando a alguma aplicação específica. No entanto, não há ainda uma clara compreensão acerca dos possíveis efeitos adversos das CuO-np nos organismos e em múltiplos ecossistemas (BONDARENKO et al., 2013).

Devido ao conhecimento sobre a toxicidade de alguns metais em seu estado iônico, os estudos acerca da toxicidade e os efeitos das CuO-np em ambientes aquáticos é essencial, a fim de elucidar os mecanismos de ação dessas nanopartículas sobre os organismos em um ambiente aquático, pois a maioria dos micropoluentes de caráter metálico ou não, têm como destino final, após seu descarte, os ecossistemas aquáticos. Existem algumas divergências no que tange à toxicidade de nanopartículas de óxido de cobre, pois pouco se sabe se esta é causada pela liberação de íons Cu^{2+} ou se o tamanho e as propriedades físico-químicas das partículas são a causa da toxicidade em organismos. Assim, os estudos dos efeitos das nanoestruturas de CuO e as diferenças entre seus mecanismos de ação, considerando os diferentes formatos, com e sem revestimentos, contribuem significativamente para a compreensão dos mecanismos de ação e toxicidade destas partículas (MISRA et al., 2014a).

O peixe-zebra (*Danio rerio*, “*zebrafish*”) como modelo animal tem se mostrado promissor sendo uma espécie amplamente utilizada em diversas áreas, como: embriotoxicidade, farmacologia e genética. Apresenta baixo custo de manutenção e criação, seus embriões são transparentes e possuem uma homologia genética de aproximadamente 70% com o ser humano (SHAO et al., 2011). Os estudos de exposição de organismos não alvos às nanopartículas mostraram que as concentrações que provocam efeitos na reprodução, comportamento e crescimento são tão frequentes quanto às concentrações de efeito letal (mortalidade)(BAUER; MALLY; LIEDTKE, 2021; DUBEY; GHOSH; SINGH, 2022). Em todo o mundo, o uso de diversas nanopartículas para uso medicinal tem aumentado anualmente, sendo que nanopartículas de cobre/óxido de cobre têm sido sintetizadas desde o início de 1990 para esse fim (LISIECKI; PILENI’, 1993). Estas surgiram como uma nova classe de antimicrobianos com potencial contra uma variedade de patógenos

(GAWANDE et al., 2016; RAI et al., 2018), incluindo aqueles que desenvolveram resistência a produtos químicos (CHOWDHURY; BASU; KUNDU, 2014; SINGH; OJHA; SRIVASTAVA, 2009).

Uma extensa revisão da literatura, abrangendo estudos sobre nanopartículas, foi conduzida, valendo-se de dados relativos à toxicidade aguda em peixes. Tais dados, extraídos de fontes como o banco de dados ECETOC Aquatic Toxicity (HUTCHINSON T~); SOLB6; KLOEPPER-SAMS, 1998), e outros delineados por (HOFF, 2022), foram meticulosamente selecionados. Isso garantiu que apenas informações provenientes de fontes confiáveis, incluindo estudos avaliados por pares e dados gerados em conformidade com as normas científicas vigentes, fossem utilizadas como substrato para análises correlacionais subsequentes.

Além disso, ao considerar os estudos ecotoxicológicos realizados com organismos aquáticos, particularmente em relação aos diferentes níveis tróficos, destaca-se a relevância dos vertebrados, notadamente o peixe-zebra, dada sua notável compatibilidade e similaridade com o organismo humano, compartilhando cerca de 70% de características fisiológicas fundamentais.

Nesse contexto, o escopo do presente estudo reside na avaliação da variabilidade da toxicidade das nanopartículas de CuO em função de sua morfologia e presença de revestimento. Com esse propósito, serão sintetizadas nanopartículas de CuO em duas configurações distintas - bastões e esferas - tanto sem revestimento quanto com revestimento de citrato. A avaliação da toxicidade será realizada por meio de testes genotóxicos e bioquímicos, empregando embriões de peixe-zebra como modelo biológico.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

O objetivo do presente trabalho é avaliar a influência do formato e da cobertura de

nanopartículas de óxido de cobre (CuO) sobre a toxicidade em embriões de peixe-zebra.

2.2 Objetivos Específicos

- Síntese de nanopartículas de CuO em formato esférico e bastão, sem cobertura e com cobertura de citrato;
- Caracterização estrutural e morfológica das diferentes nanopartículas produzidas;
- Caracterização das propriedades coloidais das respectivas suspensões;
- Avaliação da embriotoxicidade (genotoxicidade e bioquímica) das nanopartículas de CuO utilizando o peixe-zebra como modelo in vivo.

3 Revisão Bibliográfica

3.1 Nanopartículas de CuO

Não se sabe ao certo desde quando a humanidade passou a fazer uso dos nanomateriais e de seus benefícios. Contudo, evidências históricas do uso destes materiais remontam muitos séculos atrás, como pode ser observado no vidro medieval da Royal Gold Cup, Figura 1, datada por volta dos anos de 1370 e 1380. A superfície da taça apresenta uma coloração rubi e azul, devido à presença de nanopartículas de ouro e cobalto, respectivamente, que interagem com a radiação eletromagnética visível, conferindo ao material tais colorações.



Figura 1. “The Royal Gold Cup” (The British Museum “Collecting the World”, p. 65).

Desde a década de 1980, com as publicações dos primeiros trabalhos sobre nanotecnologia, a produção e as aplicações de nanomateriais têm se estabelecido solidamente, sendo esta uma das áreas mais promissoras dentro das ciências de materiais (CORRIU; NGUYÊN, 2008). De modo geral, qualquer material que contenha partículas com pelo menos uma de suas dimensões em escala inferior a 100 nm é considerado uma nanoestrutura (Handbook of Thin Film Materials SINGH NALWA et al. Vol 1). São ainda definidos como sólidos, com formatos específicos e que podem ser amorfos, cristalinos ou agregados de pequenos cristais. (CORRIU; NGUYÊN, 2008). Por apresentarem uma grande variedade de propriedades e aplicações devido ao seu pequeno tamanho e grande razão entre sua área superficial e seu volume, o desenvolvimento de nanomateriais tornou-se um desafio promissor tanto do ponto de vista científico como tecnológico.

As propriedades das nanopartículas são dependentes do tamanho individual e de seus agregados, formato e química da superfície. As superfícies de nanopartículas, especialmente em materiais

cristalinos, são compostas por átomos com número de coordenação incompleto, levando a uma contribuição distinta para a energia livre do cristal. Como a superfície das nanopartículas exibe um número muito elevado de átomos quando comparado a sua forma natural (*bulk*), há uma série de alterações nas propriedades físico-químicas do material, tais como diminuição na temperatura de fusão, variação na estabilidade de fases, aumento da reatividade e atividade catalítica, entre outras (SIEMONS et al., 2009).

Dentre as nanopartículas investigadas atualmente, as de CuO (CuO-np) têm recebido atenção especial, especialmente por apresentarem comportamento semicondutor e ação antimicrobiana. Por conta disso, as CuO-np estão sendo empregadas na fabricação de transistores e dispositivos óptico-eletrônicos, baterias, armazenamento de energia, catalisadores para produção de hidrogênio, remoção fotocatalítica de poluentes, sensores eletroquímicos, entre outros. (GAMARRA et al., 2007). Na medicina, estão sendo investigadas como potenciais agentes terapêuticos devido às suas propriedades antimicrobianas e antitumorais, que serão discutidas mais adiante.

Em termos estruturais, as CuO-np apresentam algumas diferenças quando comparadas a estruturas de CuO na forma maciça (*bulk*). Contudo, ao avaliar as propriedades físicas, tais diferenças tornam-se insignificantes, podendo citar a densidade, ponto de fusão e constante dielétrica, as quais apresentam valores iguais a 6,31g/cm³, 1200 °C e 18,1, respectivamente, para as estruturas com formato monoclinico, não sendo observadas mudanças ou alterações significativas quando estas estruturas se encontram em escala nanométrica.

Conforme ilustrado na Figura 2, a estrutura cristalina original do CuO, ao contrário da estrutura habitual de outros monóxidos de metais de transição, é monoclinica com simetria C2/c, estruturada sob camadas de íons Cu²⁺ e íons O²⁻ dispostos de forma alternada e quatro unidades de fórmula por célula unitária. Os íons Cu²⁺ apresentam centros de simetria de inversão em um único sítio quádruplo 4c (1/4, 1/4, 0), e os íons oxigênio ocupam o local 4e (0, y, 1/4) com y = 0,416(2) (MEYER et al., 2012; SHEKHAR; CHEN; PAETZOLD, 1991). O parâmetro estrutural (MEYER et al., 2012) é característico da estrutura cristalina da CuO na forma de tenorita. Ademais,

nanopartículas de CuO não apresentam transição de fase em pressões de até 700kbar e temperaturas de até 3000K, ao contrário de outros óxidos metálicos em que há mudança ou transição em sua fase cristalina após processos de recozimento ou resfriamento, como pode ser observado em óxidos de ferro (Fe_2O_3) e óxidos de zinco (ZnO). (BOURNE et al., 1989).

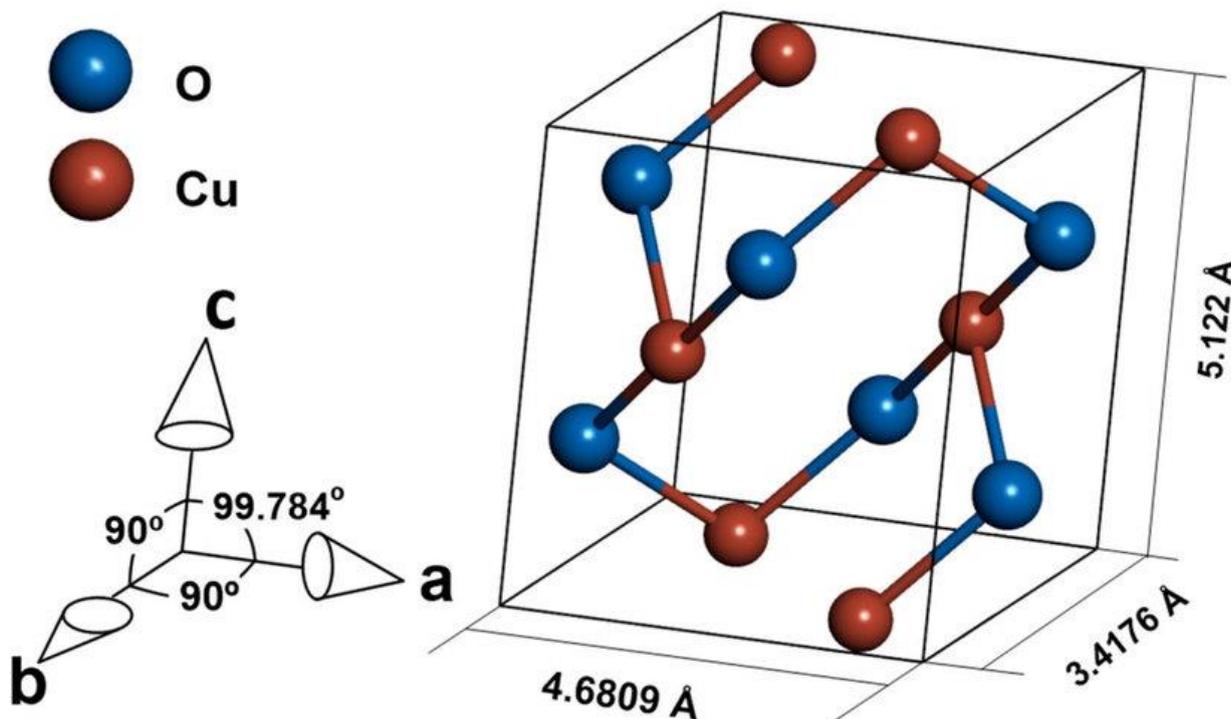


Figura 2. Representação da estrutura cristalina do CuO. (UNGEHEUER et al., 2022)

Também vale destacar que o CuO é um semicondutor do tipo p de banda estreita com uma energia de *bandgap* de 1,2 eV a 2,1 eV, correspondendo à diferença entre os níveis de energia do topo da banda de valência (BV), derivada do orbital Cu 3d, e a parte inferior da banda de condução (BC), derivada do orbital O 2p (OGWU; DARMA; BOUQUEREL, 2007). Devido à estrutura monoclinica, o CuO apresenta um caráter magnético quase unidimensional que consiste em cadeias fracamente acopladas (YABLONSKII, 1990) propriedades magnéticas como rápida expansão de rede e susceptibilidade magnética, além de um fraco caráter antiferromagnético incomensurável, apresentando-se estável entre 213K e 230K (FORSYTH; BROWN; WANKLYND, 1988),

que fora realizado inicialmente em um estudo feito por Yablonskii em 1990, (AMIN, 2012; AVONI; PALEARI; PARRAVICINI, 1359; PUNNOOSE et al., 2001); Além disso, o formato da nanopartícula influencia no comportamento magnético. Os nanobastões, por exemplo, com diâmetro superior a 10 nm, apresentam um comportamento ferromagnético anômalo (OGWU; DARMA; BOUQUEREL, 2007).

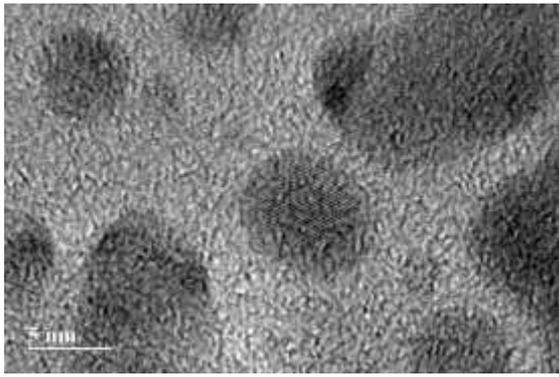
3.2 Síntese de CuO-np

Os métodos de precipitação química baseados em solução se assemelham aos métodos hidrotérmicos, exceto pelo fato de serem conduzidos em um recipiente aberto, a uma temperatura relativamente baixa. Por ser um procedimento simples, a reação química ocorre entre os precursores e produzem estruturas precipitadas que são facilmente isoladas do meio, são muito empregadas atualmente (ZHUANG; PENG; LI, 2011). Sais cúpricos, como o cloreto de cobre e compostos alcalinos, como o hidróxido de sódio, são frequentemente usados na síntese de nanopartículas de CuO. Outras metodologias de precipitação química têm sido investigadas com o intuito de melhorar a separação das nanopartículas seja por meio da aplicação de alguma energia externa, como ultrassom ou em reatores com elevada pressão interna, ou ainda por método sonoquímico (VIJAYA KUMAR; DIAMANT; GEDANKEN, 2000). No entanto, estes métodos requerem aparelhos caros e/ou uso de solventes.

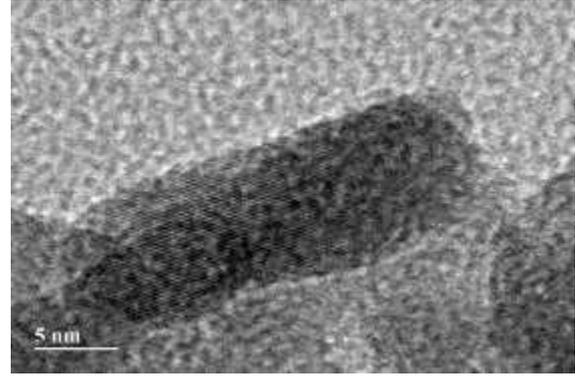
De maneira geral, a síntese de CuO-np consiste em duas etapas: hidrólise do sal precursor, com formação de hidróxido e oxihidróxido de cobre, seguido de desidratação e formação da rede do óxido. O formato das nanopartículas depende das condições do meio, especialmente força da base e pH, pois estas variáveis controlam o empacotamento preferencial em certos planos cristalográficos (WANG et al., 2012). Normalmente, a síntese é conduzida por método hidrotérmico e precipitação, devido ao baixo custo e uso da água como solvente ambientalmente amigável (GAWANDE et al., 2016). As nanoesferas de CuO (CuO-e) são partículas com um diâmetro que varia de alguns

nanômetros. Esse formato pode ser obtido utilizando acetato de cobre hidratado como precursor, ácido acético e hidróxido de sódio, em meio aquoso. Sob pH controlado, variando de 2 a 8, a mistura reacional é submetida a aquecimento, por volta de 95 a 98 °C, quando se formam pequenos núcleos de $\text{Cu}(\text{OH})_2$, seguido de desidratação e crescimento de CuO (TIWARI; TIWARI; KIM, 2012; WANG et al., 2012; XIA et al.) Os nanobastões (CuO -b) apresentam um formato assimétrico, com razão de aspecto (comprimento/largura) geralmente maior ou igual a 3. A síntese de CuO -b envolve o crescimento controlado de cristais de óxido de cobre em uma solução alcalina utilizando diferentes rotas e metodologias, como métodos hidrotérmicos, solvotérmicos ou por precipitação química em solução. Acredita-se que, após a adição de hidróxido, ocorre redução dos íons cobre(II) e consequente formação de núcleos de cobre metálico. Esses servem como ponto de partida para o crescimento unidirecional das partículas de CuO . A razão de aspecto pode ser controlada pela adição de surfactantes ou polímeros, pois auxiliam inibindo o crescimento das nanoestruturas em várias direções e facilitando a formação de bastões.(ZHUANG; PENG; LI, 2011).

Na Figura 3 são apresentadas imagens de microscopia eletrônica de transmissão de amostras de óxidos de cobre em formatos de bastão e óxidos de cobre em formatos de esfera, encontradas na literatura. Existem rotas semelhantes encontradas na literatura, onde é possível obter outros tipos de produtos de CuO com tamanhos e morfologias distintos nanopartículas, nanocintas e nanoplaquetas, porém há entre essas rotas um problema comum, que é a tendência das nanopartículas a aglomerar, conforme pode ser observado na Figura 4.



Nanoesferas



Nanobastões

Figura 3. Imagens MET de CuO-e e CuO-b selecionadas das referências (ATA et al., 2019; DI BUCCHIANICO et al., 2013a) em formatos de esferas e bastões.

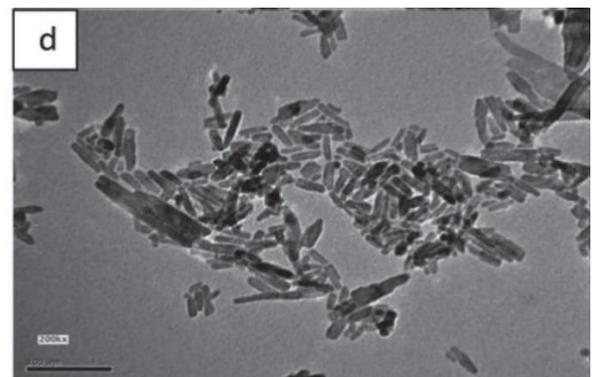
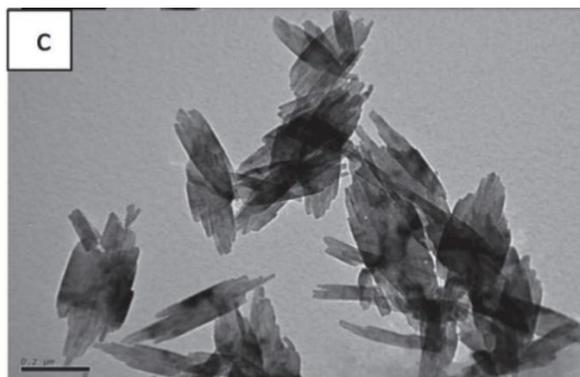
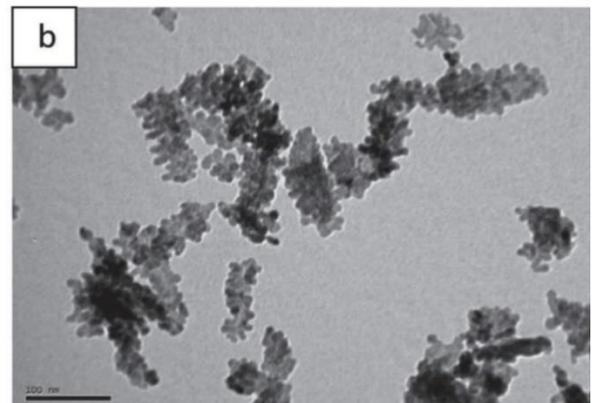
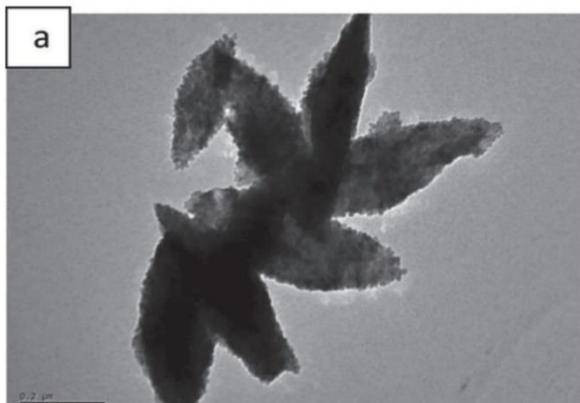


Figura 4. Aglomerado de nanoestruturas em formato oval (a) aglomerado de nanoestruturas em formato esférico (b) Aglomerado de nanoestruturas em formato de folhas (c) e Aglomerado de nanoestruturas em formato de bastão (d).

3.3. Efeitos toxicológicos e ecotoxicológicos de CuO-np

O cobre é um oligoelemento essencial para muitos seres vivos e deve estar presente em baixas concentrações, pois participa de diversos processos metabólicos, porém elevadas concentrações deste metal podem produzir efeito prejudicial, devido a sua alta toxicidade (BOSSUYT; JANSSEN, 2004). As formas de absorção do cobre pelos organismos ocorrem de diferentes maneiras, podendo este ser absorvido desde o contato com utensílios domésticos até por meio de práticas ligadas a agricultura. Tanta variedade de processos que ocorrem com o uso deste metal tem contribuído de maneira significativa para o aumento das concentrações deste elemento em diversos ecossistemas. Além disso, as CuO-np também oferecem risco à saúde humana e ao meio ambiente. Devido ao seu pequeno tamanho, podem penetrar nos tecidos biológicos e exercer efeitos tóxicos. Portanto, é importante tomar as devidas medidas de segurança em seu manuseio e uso, sendo também necessárias pesquisas adicionais para uma melhor compreensão de dos seus efeitos no meio ambiente e na saúde humana (MELEGARI et al., 2013).

Os íons Cu^{2+} auxiliam na manutenção da homeostase de diversos organismos. Contudo, mesmo um pequeno aumento na sua concentração pode desencadear uma grave desregulação homeostática. De fato, os íons Cu^+ e Cu^{2+} livres são capazes de atravessar as membranas em direção ao interior celular, por meio de transporte ativo ou por canais iônicos (ZHANG et al., 2012). A Figura 5 mostra uma representação da capacidade destas nanoestruturas para penetrar no interior do corpo de organismos aquáticos sendo elas na forma de Cu, CuO e Cu_2O , atuando de diferentes formas sobre os organismos devido a fatores como a diferença de dispersão em água, por exemplo.

Tal diferença pode explicar o fato das nanopartículas possuírem diversas formas de ação em organismos, pois quando nanopartículas de diferentes estruturas cristalinas estão presentes em um ambiente aquático, estas alteram a interação dos organismos com o meio, podendo, por exemplo influenciar na absorção ou liberação de íons pelo organismo, devido a facilidade que algumas estruturas irão possuir para interagir com íons ou outros metais (LIU; HURT, 2010; ZHU et al., 2008).

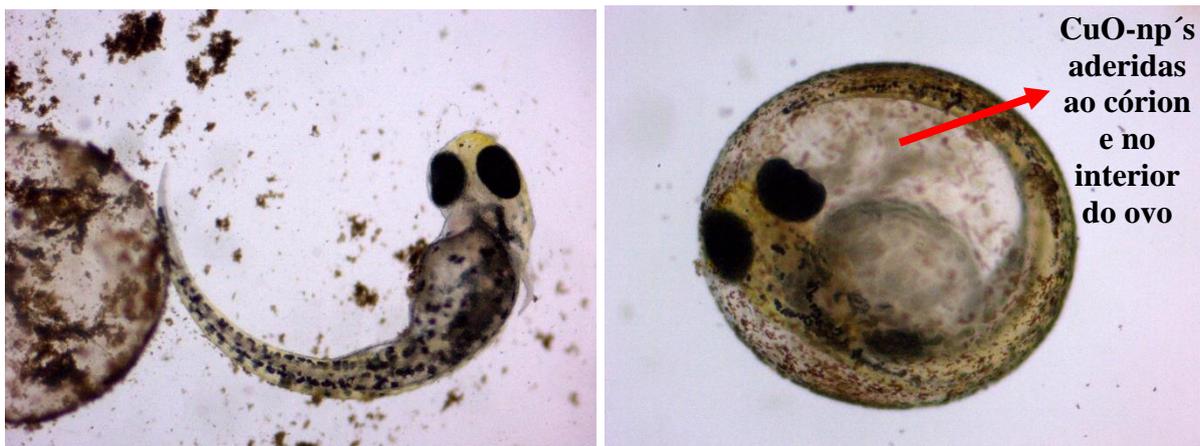


Figura 5. Nanoestrutura de CuO no interior do *Zebrafish*, causando alteração no organismo.

Fonte: autoria própria.

A toxicidade de íons cobre em organismos aquáticos depende da concentração de íons livres ou de ligações com os grupos dos carbonatos, nitratos, sulfatos, cloretos, nitrogênio amoniacal, hidróxidos e materiais orgânicos, como, por exemplo, os ácidos húmicos. O efeito toxicológico dos íons cobre em organismos aquáticos depende também da sensibilidade, estágio de desenvolvimento, idade, tamanho, atividade e ciclo reprodutivo (PELGROM et al., 1994). Nos peixes, o efeito toxicológico do cobre é influenciado por vários fatores, tais como o formato da nanoestrutura dissolvida na água, as condições físico-químicas do meio aquático e a fisiologia do indivíduo (AKSAKAL; CILTAS, 2019). Desse modo, a forma com a qual o cobre será absorvido pelo organismo influenciará no mecanismo de atuação deste metal, podendo aparecer em diversos materiais formando estruturas capazes de reagir de diferentes maneiras nos mais diversos tipos de

organismos.

O CuO (bulk) é um composto inorgânico amplamente utilizado em diversas aplicações industriais, incluindo fabricação de eletrônicos, tintas, revestimentos, cerâmicas e catalisadores. No entanto, sua exposição excessiva pode causar efeitos tóxicos e ecotoxicológicos. Efeitos toxicológicos em humanos podem ocorrer através da exposição ocupacional ou da ingestão acidental podendo este metal apresentar elevada toxicidade em grandes concentrações (STAFFORD et al., 2013). O cobre possui a capacidade de doar e receber elétrons e essa propriedade redox induz a produção de radicais livres tóxicos, que são capazes de reagir com diversas macromoléculas e, assim, causar danos a lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (HODGKINSON; PETRIS, 2012). Também, nas formas iônica e elementar, pode romper a estrutura de proteínas, pois há a probabilidade de ligar-se a aminoácidos, propriedade que prejudica principalmente proteínas que possuem grupamentos de ferro-enxofre (Fe-S), pois o cobre é capaz de realizar ligações com o enxofre, formando tiolatos (HODGKINSON; PETRIS, 2012). A inalação de partículas de CuO pode causar irritação nos pulmões, tosse, falta de ar e até mesmo pneumonia química. A exposição crônica pode levar a problemas respiratórios crônicos e aumentar o risco de câncer de pulmão.

Pelos seus efeitos ecotoxicológicos, as CuO-np podem representar prejuízos para o meio ambiente e para diversos organismos. Quando estão presentes em um ambiente, as CuO-np podem apresentar comportamento tóxico em organismos aquáticos, como peixes e invertebrados. Efeitos toxicológicos relacionados à liberação dos íons são observados com maior intensidade quando comparados aos efeitos de concentração total do metal (LOMBARDI et al., 2007). A liberação íons em solução é geralmente apontada como uma das principais causas dos efeitos toxicológicos e ecotoxicológicos desses nanomateriais em ambientes, sejam aquáticos, sejam terrestres, sendo encontradas em diversos organismos, desde seres unicelulares como bactérias até vertebrados como peixes, com evidências de citotoxicidade, genotoxicidade e estresse oxidativo (BONDARENKO et al., 2013; TAYLOR et al., 2013; ZHANG et al., 2012). Apesar das evidências apontadas, ainda não há uma definição no que tange à toxicidade dessas nanoestruturas ser causada pela liberação dos

íons ou por propriedades ligadas às suas características estruturais (AMORIM; SCOTT-FORDSMAND, 2012; GOMES et al., 2012).

Outro ambiente que pode ser afetado pelos óxidos de cobre é o solo, onde causam efeitos danosos às plantas e microorganismos. A toxicidade do CuO pode variar com as condições ambientais, como temperatura e pH. Além disso, o CuO é um material amplamente utilizado na produção de nanomateriais, o que pode potencializar seus efeitos tóxico ecotoxicológicos, uma vez que as partículas de CuO podem penetrar células e órgãos dos organismos vivos. De fato, conforme mostrado na Figura 6, CuO-e são capazes de adsorver pelo córion dos ovos do peixe-zebra e, por isso, causar danos significativos ao ser vivo. A toxicidade de CuO é influenciada por muitos fatores, incluindo tamanho da partícula, concentração, tempo e via de exposição. Por exemplo, o contato por inalação é mais tóxico do que a ingestão ou contato com a pele. Além disso, o tamanho das partículas pode influenciar a toxicidade, pois partículas menores têm maior probabilidade de colonizar os pulmões e entrar nas células (ASHARANI et al., 2008; NAZ; GUL; ZIA, 2020; NEL et al., 2006; SANTOS et al., 2021).

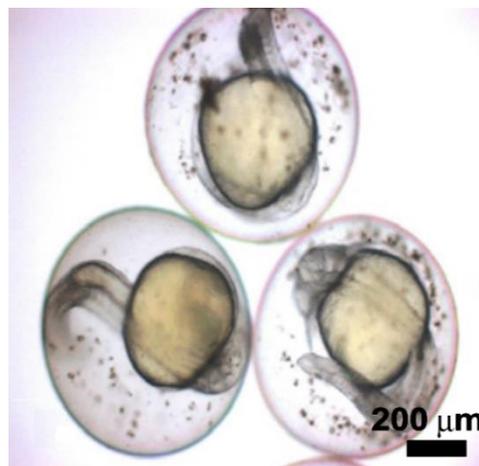


Figura 6. Embrião de peixe-zebra submetido a ambiente com nanopartículas de CuO, as manchas sobre o Córion indicam a aderência das CuO-np à estrutura. Fonte: (ASHARANI et al., 2008)

A toxicidade de CuO-np envolve desde a interação com os organismos vivos que ocorre por meio da absorção até a internalização das partículas pelas células dos organismos que são expostos a tais estruturas. Essas nanopartículas podem induzir estresse oxidativo nas células dos peixes-zebra, levando à produção excessiva de espécies reativas de oxigênio e danos oxidativos às biomoléculas celulares, como lipídios, proteínas e DNA (SUN et al., 2016). Esses danos podem levar a uma variedade de efeitos tóxicos.

Além do formato das nanopartículas, fatores como por exemplo, o tamanho das partículas têm sido identificados como críticos na determinação de sua toxicidade, nanopartículas de CuO menores têm maior capacidade de penetração nas células dos peixes-zebra, levando a efeitos mais pronunciados (HOWE et al., 2013). Além disso, a concentração das nanopartículas também é um fator importante, pois em níveis elevados podem resultar em efeitos mais graves.

Os estudos realizados demonstram que os peixes-zebra são organismos extremamente adequados para a realização de testes e por isso são utilizados em diversos locais e experimentos em todo o mundo, a Figura 7. mostra as vantagens do uso de diversos modelos animais em experimentos de toxicidade e a partir dos dados apresentados é possível enumerar diversas vantagens do uso do peixe-zebra como organismo modelo para os testes realizados, pois trazem uma grande margem de segurança nos testes, sendo possível verificar diferenças entre a toxicidade de diferentes nanopartículas em diversos formatos, bem como avaliar a interação destas com os embriões em ensaios simples e de baixo custo total.

| | Primata (<i>Callithrix penicillata</i>) | Camundongo (<i>Mus musculus</i>) | Peixe (<i>Danio Rerio</i>) | Drosófila (<i>drosophilidae</i>) |
|--|--|---------------------------------------|---------------------------------|---------------------------------------|
| Fecundação | Interna | Interna | Externa | Interna |
| Desenvolvimento Embrionário | Interna | Interno | Externo | Externo |
| Embrião | Não transparente | Não Transparente | Transparente | Não transparente |
| Reprodução | Até 2 filhotes/ 4,5 meses | Até 10 filhotes/ 2 meses | 100 ovos/ dia | 100 ovos/ dia |
| Tempo até a idade reprodutiva | 395 a 425 dias | 85 dias | 60 a 90 dias | 20 dias |
| Manutenção diária por indivíduo | R\$ 60,00 | R\$ 35,00 | R\$ 2,00 | ----- |
| Estrutura Corporal | Vertebrado | Vertebrado | Vertebrado | Invertebrado |

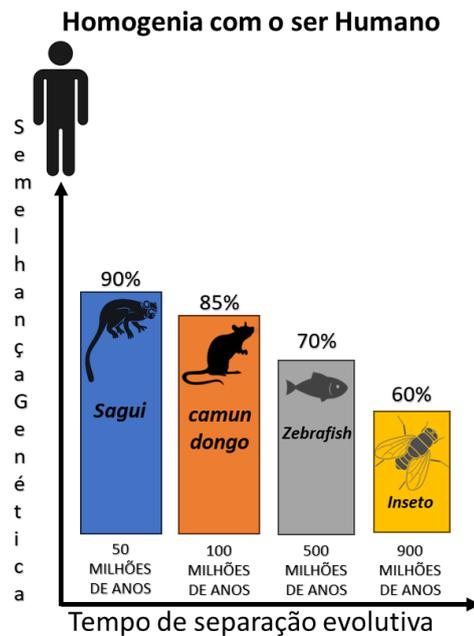


Figura 7. Modelos biológicos – vantagens e desvantagens. Fonte: (MUSSULINI et al., 2013; ZORZETTO; GUIMARÃES, 2013)

3.4. Biomarcadores

Os ensaios bioquímicos realizados permitiram observar que as partículas de óxido de cobre, principalmente sem revestimento, devem provocar alterações nas taxas de acetilcolinesterase dos

zebrafish, essa enzima é essencial em diversas funções do sistema nervoso deste indivíduo, pois desempenha papel importante na regulação da transmissão de impulsos nervosos, e assim catalisa a quebra do neurotransmissor acetilcolina. Interferências na atividade dessa enzima podem representar impactos na fisiologia e comportamento diversos organismos levando a efeitos, incluindo atrasos no desenvolvimento, redução do tamanho corporal, redução da atividade motora, diminuição da expressão de genes importantes para o desenvolvimento neurológico e aumento da mortalidade embrionária.

Além disso, a exposição a inibidores da acetilcolinesterase durante o desenvolvimento embrionário podem levar a alterações no comportamento em *zebrafish* adultos, como hiperatividade e aumento da sensibilidade ao estresse. (GANESAN et al., 2016)

Efeitos das nanopartículas de óxido de cobre sobre a atividade da acetilcolinesterase em *zebrafish* têm sido investigados, tais nanopartículas têm sido muito utilizadas em dispositivos médicos, sistemas de liberação de fármacos em organismos e diagnóstico de doenças. Contudo, as interações destas nanoestruturas em sistemas biológicos mais complexos, ainda não são totalmente compreendidas (AKSAKAL; CILTAS, 2019; BRADFORD, 1976; RODRIGUES et al., 2022).

Os resultados apontados por Aksakal (AKSAKAL; CILTAS, 2019) sugerem que as nanopartículas de óxido de cobre afetam a atividade da acetilcolinesterase dos *zebrafish* que pode inibir a atividade da enzima, e levar a alterações na quebra da acetilcolina, interferindo na comunicação entre as células nervosas, prejudicando a função do sistema nervoso central dos indivíduos. A presença dessas nanopartículas no ambiente aquático leva-as a serem absorvidas por diversos organismos, incluindo os peixes que interagem com estas nanoestruturas por meio das brânquias e do trato digestivo, o que resulta em uma exposição crônica que pode levar a um acúmulo progressivo das nanopartículas nos tecidos, aumentando assim o risco de efeitos adversos. Além disso o estudo evidenciou que as diferentes estruturas cristalinas podem ter efeitos distintos nos *zebrafish*, pois, quando nanopartículas com formato monoclinico de CuO-b estão em contato com os organismos, estas se mostram mais tóxicas do que nanopartículas de CuO-e também

monoclínicas, além de apresentarem diferentes formas de interação com o embrião e com o córion do ovo (CHIBBER; SHANKER, 2017; EL-TRASS et al., 2012; ROMÁN et al., 2017; WANG et al., 2012). Essas diferenças de toxicidade podem ser atribuídas às propriedades específicas de cada estrutura cristalina.

A análise bioquímica da atividade da acetilcolinesterase (AChE) realizada nos embriões de *zebrafish* submetidos à exposição das nanopartículas em formatos de esferas e bastões, realizada após 4 dias de exposição (teste crônico) representa um componente essencial no escopo da avaliação toxicológicas destas nanoestruturas. A AChE, desempenhando papel crítico na neurotransmissão, emerge como um marcador sensível para avaliar os efeitos potenciais das nanopartículas no sistema nervoso dos organismos aquáticos.

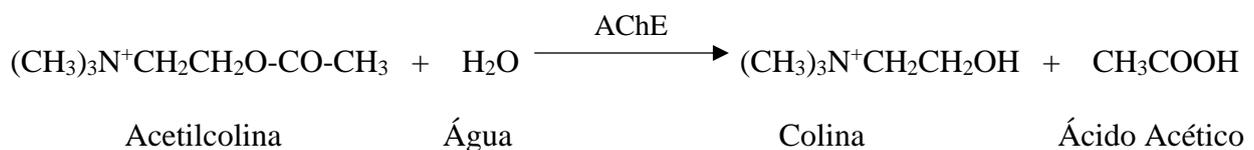
Estudos recentes têm enfatizado a necessidade de uma análise diferenciada das interações nanopartícula-organismo, levando em consideração não apenas a composição química, mas também a morfologia das partículas (DI BUCCHIANICO et al., 2013b; LIU; GUO; CHEN, 2022; MISRA et al., 2014b; WANG et al., 2019). Nesse contexto, elucidar as alterações bioquímicas em embriões de *zebrafish* expostos a nanopartículas de óxido de cobre em formatos distintos, utilizando biomarcadores específicos se faz necessário e de suma importância para a caracterização completa e descrição da interação.

O termo biomarcador tem sido muito utilizado nos últimos anos, abrangendo praticamente qualquer medida capaz de indicar interação entre o sistema de um organismo e um agente ambiental, seja ele químico, físico ou biológico (SANTOS et al., 2021). As respostas biológicas às mudanças induzidas no ambiente, sejam elas de origem humana ou natural, podem ser demonstradas em vários níveis de organização, desde ecossistemas até compartimentos subcelulares, reações bioquímicas celulares ou intracelulares (BERTOLETTI; BERTOLETTI, 2008; ZAGATTO, 2015).

Esterases são um grupo de hidrolases que induzem clivagem e formação de ligações éster (LIU et al., 2004). Sabe-se que enzimas esterase como acetilcolinesterase (AChE) e carboxilesterase (CbE) são fortemente inibidas por metais pesados como cobre, zinco e ferro. Portanto, o teste de

inibição de esterase aquática tem sido amplamente utilizado como indicador de contaminação ambiental por esses compostos (CELISO et al., 2006). Fatores como sensibilidade a diversos contaminantes ambientais, baixo custo de análise e facilidade de testes quantitativos, boa reprodutibilidade e compatibilidade ambiental, fazem com que estudos com inibidores de esterase se tornem mais comuns no grupo de biomarcadores amplamente utilizados em ensaios de ecotoxicidade. (SANCHO et al., 2003).

A AChE tem a função de hidrolisar a acetilcolina, conforme reação 1, expressa abaixo, liberando um éster por meio da fenda sináptica quando os impulsos nervosos são transmitidos entre neurônios. É encontrada nos glóbulos vermelhos, sistema nervoso e na placa motora terminal do músculo esquelético. No instante em que a AChE é bloqueada, a acetilcolina se acumula na fenda sináptica gerando superestimulação dos receptores de acetilcolina, o que impede a contração muscular normal (BERTOLETTI; BERTOLETTI, 2008; VIOQUE-FERNÁNDEZ et al., 2007; ZAGATTO, 2015). A atividade da AChE dos organismos aquáticos ainda precisa ser melhor explorada, pois quando a água entra em contato com os órgãos respiratórios, ocorre a transferência de oxigênio, o que mostra diferença entre os organismos terrestres e pode exercer influência nos resultados obtidos experimentalmente (BARATA; SOLAYAN; PORTE, 2004).



Reação 1.

Estudos realizados sobre a inibição de esterase abordam as atividades dessas enzimas na presença de metais, quando se verifica que os metais podem alterar significativamente a atividade de esterases em animais aquáticos (BARATA; SOLAYAN; PORTE, 2004; VIOQUE-FERNÁNDEZ et al., 2007). Existem ainda estudos que relatam efeitos adversos de certos metais na esterase durante a exposição aguda a vários organismos. A exposição biológica a metais pode

estimular ou diminuir a atividade enzimática, dependendo da duração da exposição e da concentração a qual o organismo é exposto, em estudos realizados em peixes da espécie *Barbus conchoni* foi possível determinar um aumento da atividade da AChE no músculo esquelético e no cérebro com 48 h de exposição a 12,6 mg/L de cádmio (GILL; HEMA; PANDER, 1991), e diminuição em peixe-zebra, exposto a 20 µg/L de chumbo por 24 h (NAJIMI et al., 1997; RICHETTI et al., 2011).

A alteração na atividade esteárica provocada por nanomateriais de metais pesados não apresenta ainda um mecanismo totalmente capaz de explicar a sua toxicidade. Contudo, é possível verificar na literatura inúmeras possibilidades que buscam elaborar modelos que expliquem as alterações promovidas por certos metais sobre a atividade esteárica. Uma possibilidade é que alguns metais podem causar mudanças na estrutura de proteínas e quando se ligam e alteram as interações iônicas entre os aminoácidos nas proteínas, promovendo assim alterações em sua estrutura e em sua capacidade catalítica.(ROMANI et al., 2003).

Outra possibilidade é que o metal pesado se ligue ao receptor de acetilcolina na membrana celular, impedindo que a acetilcolina estabeleça ligação com o receptor. Como resultado, a acetilcolina se acumulará, causando um aumento inicial de expressão de enzimas que destroem neurotransmissores. Com o passar do tempo, após ação prolongada desses metais nos receptores, menos acetilcolina é produzida, causando uma diminuição contínua da enzima degradadora (CELSO et al., 2006).

Uma terceira hipótese seria que os metais pesados poderiam se ligar a determinados resíduos de aminoácidos próximos ao sítio ativo da enzima, impedindo a interação com o substrato catalítico da enzima (CELSO et al., 2006). Um forte candidato seria um resíduo de cisteína, que contém um grupo sulfidril, com certa afinidade metálica. (SHAW; PANIGRAHI, 1990) propuseram a inativação da enzima usando seu sítio ativo com metais pesados ao investigar peixes expostos a uma determinada concentração de mercúrio (RODRIGUES et al., 2022).

A partir da revisão bibliográfica realizada e com base nos resultados obtidos acerca da

caracterização das CuO-np em formatos de bastões e esferas, tanto sem revestimento (naked) quanto revestidas com citrato, fica claro que a toxicidade das nanoestruturas é uma questão que exige uma investigação aprofundada, para que assim seja possível elucidar que os efeitos significativos destas nanoestruturas sobre organismos vivos dependem de fatores como tamanho, estrutura e concentração destas em um ambiente. A utilização do peixe-zebra como biossensor fornece uma abordagem promissora e de relevância para a avaliação toxicológica e ecotoxicológica, uma vez que estes organismos são sensíveis e trazem uma resposta rápida, eficiente e precisa das análises. Caracterizar e compreender os efeitos toxicológicos destas nanoestruturas pode fornecer informações importantes sobre a segurança de seu uso e descarte, apontando assim potenciais riscos ao ambiente e à saúde humana. É também importante, compreender a relação entre as propriedades físico-químicas das nanoestruturas, como tamanho, forma, composição e estrutura cristalina e a toxicidade das nanoestruturas. A seguir serão apresentados os resultados do projeto de mestrado, que servirão de norteadores para estudos futuros sobre a avaliação toxicológica destas nanoestruturas e, assim, permitir uma compreensão mais abrangente sobre o uso e riscos de nanopartículas de CuO.

4. Materiais e Métodos

4.1. *Materiais*

Os reagentes cloreto de cobre(II) dihidratado ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), pureza 99% (CAS N°10125-13-0), acetato de cobre(II) monohidratado ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), pureza 98% (CAS N°6046-93-1) hidróxido de sódio (NaOH), pureza 95% (CAS N° 1310-73-2), ácido acético glacial (CH_3COOH), pureza 99% (CAS N° 64-19-7), citrato trissódico di-hidratado ($\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), pureza de 99% (CAS N° 6132-04-3), fosfato de potássio monobásico (KH_2PO_4), pureza 99,95% (CAS N° 10049-21-5), fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4), pureza 99,95% (CAS N° 7558-79-4), acetiltiocolina ($\text{CH}_3\text{COSCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3\text{I}$),

pureza 98% (CAS N° 1866-15-5), Ácido 5,5'-ditiobis(2-nitrobenzoico) ($[-SC_6H_3(NO_2)CO_2H]_2$) (CAS N° 69-78-3) e γ -globulina bovina, pureza 99% (CAS N° 9007-83-4) foram adquiridos da Sigma Aldrich (EUA) e utilizados assim como recebidos. Para a síntese das nanopartículas e preparo de soluções foi empregada água ultrapura (resistividade: 18 M Ω cm). Para a diálise, foi empregada membrana de celulose regenerada, com corte de massa molar de 12000 g mol⁻¹.

4.2. Síntese das CuO-np

As CuO-np foram produzidas por precipitação em meio aquoso usando um sal precursor de cobre(II) e NaOH, em temperatura de refluxo e com agitação magnética. Esse é composto de uma manta aquecedora com agitação magnética, um balão reacional (125 mL) de fundo redondo e duas bocas e um condensador. As rotas de síntese para a obtenção das CuO-e e CuO-b nuas e com revestimento de citrato são esquematicamente ilustradas nos fluxogramas da Figura 8. Algumas diferenças nas rotas de obtenção dos dois formatos são detalhadas a seguir.

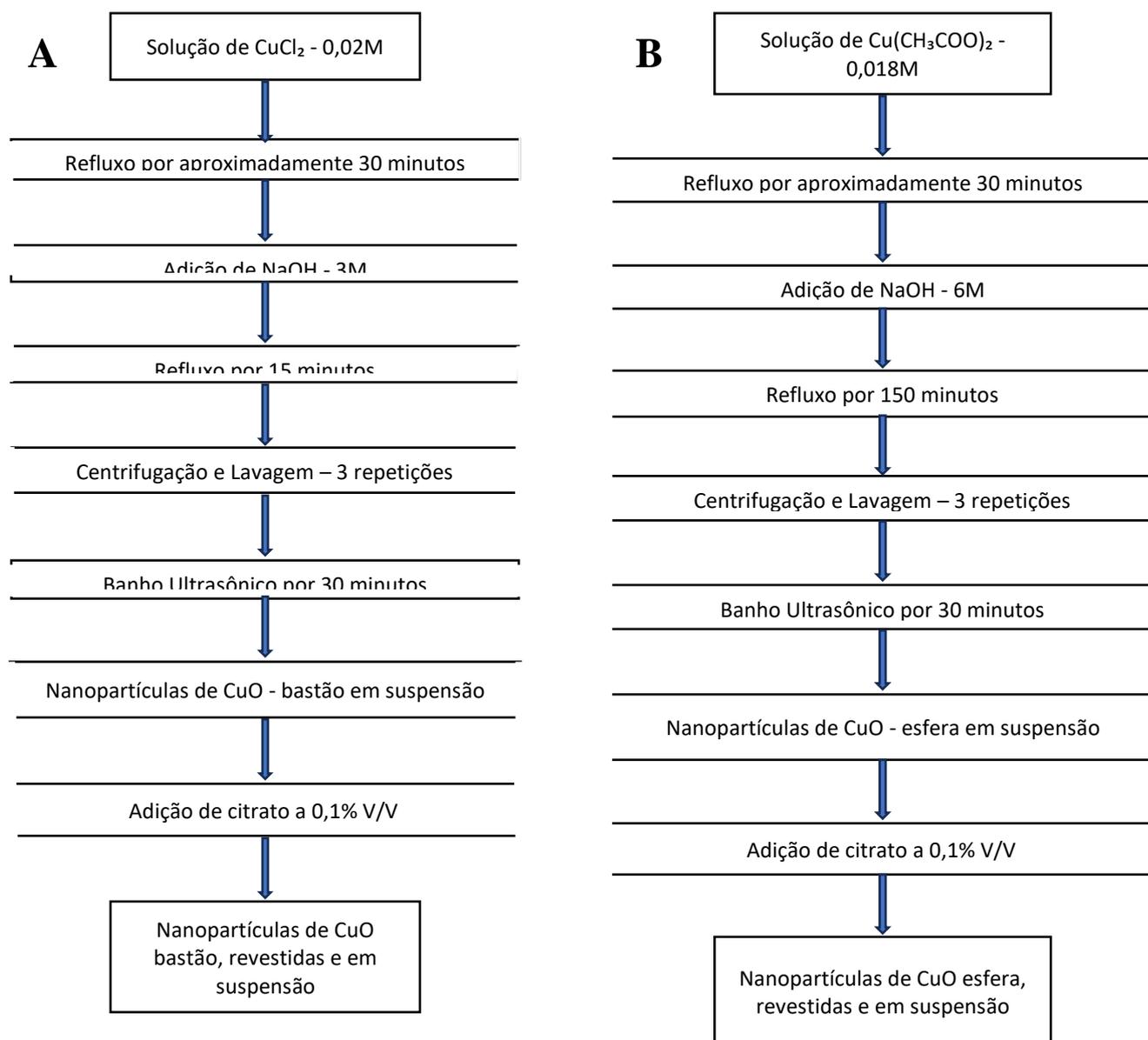


Figura 8. Fluxogramas das rotas de síntese das nanopartículas de CuO-b (A) e CuO-e (B), nuas e com revestimento de citrato.

A síntese de CuO-b seguiu o procedimento experimental descrito por Mishra et al. (MISHRA; ROLDAN; DE LEEUW, 2016) com pequenas modificações. Conforme ilustrado no fluxograma da Figura 8A, 75 mL de solução aquosa de $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0,02 M) foram adicionados ao balão e levados à agitação magnética e aquecimento até atingir a temperatura de refluxo. Nesse momento, foram adicionados de uma única vez 0,4 g de NaOH (0,01 mol), ligeiramente dissolvidos em 3 mL de água. Com a adição da base houve a precipitação imediata de um sólido marrom escuro

de CuO-b. A mistura reacional foi mantida sob agitação e em temperatura de refluxo por mais 15 minutos. Ao término desse período, a mistura foi deixada resfriar em temperatura ambiente e o material precipitado removido após decantação. Posteriormente, o precipitado foi lavado com água para remoção do excesso de NaOH e demais íons e o sobrenadante removido por centrifugação (centrífuga Hermle Z32 HK, 6000 rpm, 15 min.). Esse procedimento foi repetido três vezes. O precipitado obtido foi depois recoberto com citrato e suspenso em água, conforme será descrito mais adiante.

As CuO-e foram preparadas segundo procedimento descrito por Siddiqui et al (SIDDQUI; QURESHI; HAQUE, 2016a, 2016b). Conforme ilustrado no fluxograma da Figura 8B, 75 mL de solução de $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (0,18 M) e 0,25 mL de ácido acético foram adicionados ao balão reacional e a solução resultante foi mantida em agitação magnética com velocidade constante (~ 200 rpm) e aquecida até atingir a temperatura de refluxo. Em seguida, foram adicionados, de uma única vez, 0,9 g de NaOH ligeiramente dissolvidos em 3,75 mL de água, o que levou à precipitação imediata de um sólido marrom escuro de CuO-e. A mistura reacional foi mantida sob agitação e em temperatura de refluxo por mais 2,5 h. Após esse período, a mistura foi deixada resfriar até a temperatura ambiente e depois removido o precipitado de CuO-e por decantação. Em seguida, o precipitado foi lavado com água e o sobrenadante removido por centrifugação (6000 rpm, 15 min.). Esse procedimento foi repetido por três vezes e o sólido isolado para posterior recobrimento com citrato, conforme descrito a seguir.

Uma vez isoladas e purificadas, as CuO-b e CuO-e foram suspensas em água, produzindo suspensões coloidais aquosas, tanto nuas quanto com revestimento de citrato. Para tanto, o material sólido (CuO-b ou CuO-e) foi adicionado a um tubo Falcon (50 mL) contendo 30 mL de uma solução de citrato trissódico a 1% (m/v) e a mistura foi submetida à sonicação a 125W (Branson 450) em modo pulsado (pulsos de 1 s) por 20 min. O procedimento foi realizado em banho de gelo para evitar que a elevação da temperatura prejudicasse a estabilidade do coloide. A suspensão homogênea obtida ao fim desse procedimento foi transferida para um saco de diálise e o conjunto mantido num

béquer com água e agitação lenta, por 24 h. A diálise teve o objetivo de remover o excesso de citrato e demais íons da síntese que não foram removidos na purificação por centrifugação. As amostras com revestimento de citrato, CuO-b-cit e CuO-e-cit, foram então transferidas para tubos Falcon e armazenadas em geladeira até a realização das caracterizações e demais experimentos. Para fins de comparação, amostras sem revestimento (CuO-b e CuO-e) foram produzidas da mesma forma, exceto pela suspensão ser preparada apenas em água. Para fins de caracterização, alíquotas das amostras, sem cobertura e com recobrimento de citrato, também foram secadas em liofilizador (Terroni L SE 3000B). Essas etapas estão ilustradas nos fluxogramas das Figuras 8A e 8B.

4.3. Caracterização estrutural e morfológica das CuO-np

Exceto quando indicado, todas as caracterizações estruturais foram realizadas nos equipamentos disponibilizados pela Central Analítica do IQ-UnB.

As amostras secas foram analisadas num difratômetro D8 Focus (Bruker), com comprimento de onda de raio X de 1,54 Å. Os difratogramas foram registrados entre 10° e 90°; com incremento de 0,05° e velocidade de varredura de 0,5° min⁻¹.

As micrografias das amostras foram obtidas em um microscópio Jeol JEM-2100 (200 keV) localizado no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução da Universidade Federal de Goiás (LabMic-UFG). Para a obtenção das imagens de difração de elétrons, a área selecionada (SAED) foi de 100 μm². A distribuição de tamanhos foi obtida a partir de um histograma construído com os valores de diâmetro para CuO-e e largura e comprimento para CuO-b determinados com o software Image-J. Para esse fim, foram contadas, pelo menos, 300 partículas de cada amostra, a partir de diferentes micrografias. A partir da distribuição e ajuste com uma função log-normal, foram determinados os valores médios de diâmetro, comprimento e largura médios além dos parâmetros de dispersão.

A estrutura eletrônica das nanopartículas foi avaliada por espectroscopia de absorção das suspensões coloidais obtidas, empregando-se um espectrofotômetro UV-Vis-NIR Varian Cary

5000. Os espectros foram adquiridos no intervalo de 200 nm a 800 nm, com velocidade de varredura de $1,00 \text{ nm}\cdot\text{s}^{-1}$ e resolução de 600 nm, em modo duplo feixe e cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm.

Os espectros Raman das amostras liofilizadas foram obtidos à temperatura ambiente em um microscópio Raman confocal In Via (Renishaw), com um detector CCD refrigerado termoeletricamente e uma rede de difração de 1200 linhas/mm. Um microscópio Leica com objetiva de 50× foi utilizado para focalizar o feixe da radiação laser na amostra e coletar a radiação espalhada. A resolução espectral nominal foi de 6 cm^{-1} . O laser de excitação utilizado foi de He-Ne (Renishaw) com emissão em 632,8 nm. O sistema foi calibrado utilizando o sinal Raman do Si em 520 cm^{-1} . A análise foi feita na faixa espectral de 100 a 1800 cm^{-1} . Cada réplica corresponde a 100 espectros obtidos pelo método de mapeamento superficial Raman com tempo de integração de 6 s registrados em intervalos de $2 \mu\text{m}$, perfazendo uma área de amostragem de $20 \times 20 \mu\text{m}$. A potência do laser na amostra foi de 1 mW.

As curvas TG foram obtidas em um analisador simultâneo termogravimétrico e termodiferencial DTG-60H da Shimadzu, utilizando cerca de 5,0 mg de amostra, em cadinho de platina. Os ensaios foram realizados em atmosfera de nitrogênio (30 mL min^{-1}) a uma razão de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$, da temperatura ambiente até $500 \text{ }^\circ\text{C}$.

Os experimentos de espalhamento dinâmico de luz e mobilidade eletroforética foram conduzidos com suspensões aquosas de CuO-np para determinação do diâmetro hidrodinâmico (DH) e potencial zeta (ζ). Esses foram conduzidos no equipamento Zetasizer ZS90c (Malvern) com módulo titulador automático MPT-2, localizado no Laboratório de Nanociência Ambiental e Aplicada da Faculdade da UnB de Planaltina (LNAA-FUP/UnB), gentilmente cedido pelo Prof. Alex F. C. Campos. As curvas de titulação de potencial zeta (ζ) vs pH foram registradas na faixa de pH entre 2 e 12, usando soluções de HCl e NaOH, nas concentrações de 0,1 e $0,01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ para o devido ajuste.

4.4. *Teste de toxicidade em embriões de peixe (FET)*

Os ensaios com embriões foram baseados no protocolo para avaliação de toxicidade da (OECD, 2013), todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Genética Toxicológica do IB-UnB. Atendendo a todos os protocolos e demandas de execução dos testes, segundo o recomendado pela OECD de 2013 e com base nos artigos de referência o número de indivíduos utilizados no teste fornecem margem de confiança para validar os resultados obtidos experimentalmente (BAUER; MALLY; LIEDTKE, 2021; BERTOLETTI; BERTOLETTI, 2008; DUBEY; GHOSH; SINGH, 2022; GEORGE et al., 2018; LIU; DHUNGANA; COBB, 2018; OECD, 2013; ZAGATTO, 2015). Após recolher e selecionar os ovos dos recipientes destinado ao cruzamento, estes foram lavados para retirar qualquer material orgânico que possa interferir no sistema e distribuídos em microplacas contendo soluções em diferentes concentrações de CuO em formatos de esfera e bastão, e também revestidas com citrato, afim de garantir o início da exposição nos estágios iniciais (pré-exposição). Nas horas (h) seguintes, os ovos foram inspecionados individualmente no estereoscópio, sendo descartados os não fertilizados, os que apresentam danos, irregularidades na clivagem, danos estruturais ou más formações no córion. Todos os testes foram feitos em triplicata com um total de 20 organismos por triplicata para cada concentração totalizando 60 indivíduos por concentração, além disso são incluídos no teste o grupo controle sendo este composto por um total de 60 indivíduos sendo 20 embriões em cada réplica da triplicata. As durações dos testes foram de 96 h. A exposição realizada distribuiu os organismos em microplacas de 96 poços com 0,25 mL de cada concentração, sendo submetido apenas um organismo por poço. A Figura 9, traz um esquema que ilustra cada etapa do teste.

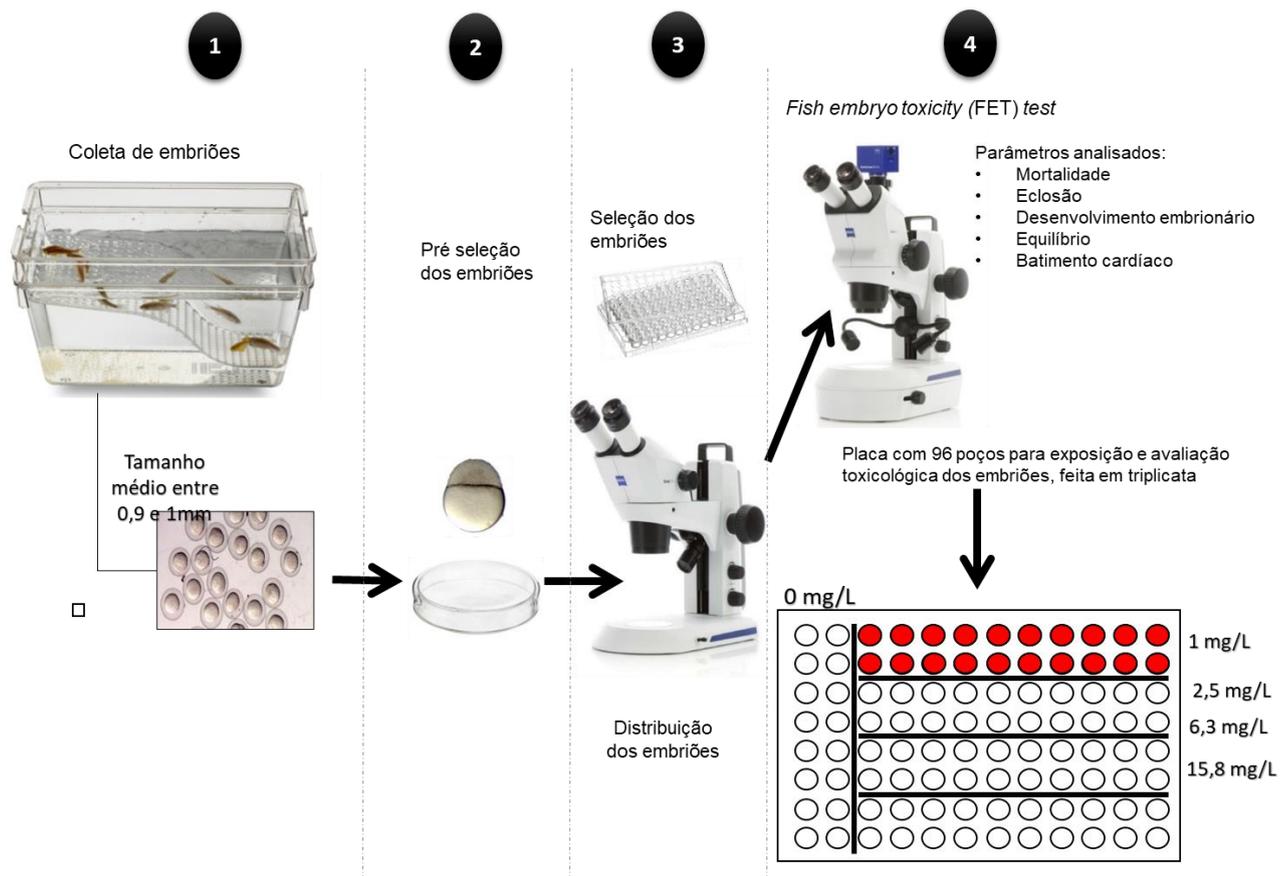


Figura 9. Representação do FET por etapas. (OECD, 2013) P.19.

4.5 Marcadores de stress oxidativo

Os testes foram realizados em aquários de 1 L preenchidos com 300 mL das “soluções teste” que são constituídas por água do sistema de criação dos *zebrafish* e 4 concentrações de cada uma das nanopartículas, a saber 0,01 mg/L, 0,05 mg/L, 0,22 mg/L, 1,00 mg/L; a cada concentração foram adicionados 150 ovos, totalizando 600 ovos, além de adicionar 150 ovos a um aquário contendo apenas água do sistema de criação dos indivíduos, para realizar o teste do grupo de controle. Após 96 hpf, 10 pools, que são 10 eppendorfs de 1,5mL, contendo 15 embriões eclodidos por concentração de CuO-np foram acondicionados com 1,5 mL de tampão fosfato (0.1 M, pH 7.2), congelado em nitrogênio líquido e imediatamente armazenado a -80 °C até o dia da análise. Antes das determinações de atividade enzimática, as amostras foram descongeladas em gelo, homogeneizadas usando um sonicador (Ultrasonic Cleaner 2840D) e centrifugadas (Centrifuge

Hettich e Mikro 220R), 20 min a 10.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante pós-mitocondrial (PMS) foi isolado para conduzir as determinações enzimáticas. As atividades enzimáticas foram determinadas em quadruplicata e expressas como micromoles de substrato hidrolisado por minuto por mg de proteína (UI).

A concentração de proteína das amostras foi determinada por espectrofotometria segundo o método de Bradford (BRADFORD, 1976). As leituras foram registradas em 595 nm com um leitor de microplaca Multisjan FC da Thermo usando g-globulina como padrão. Todos os experimentos foram realizados em quadruplicata.

A atividade da AChE foi determinada usando (ASCh) como substrato, medindo o produto de conjugação entre tiocolina (resultado da degradação de ASCh) e o (DTNB) (aumento de absorvância) a 414 nm, a cada 20 s, durante 5 min, de acordo com o método previamente descrito por Ellman et al. (1961). Para a determinação enzimática, 40 µL de PMS e 250 µL de mistura de reação, foi usado (acetilcolina (75 mM) e DTNB (10 mM)) em tampão fosfato (0.1 M, pH 7.2). As atividades da acetilcolinesterase foram expressas como micromoles de substrato hidrolisado por minuto por mg de proteína (UI).

5. Resultados e Discussão

5.1. Estrutura e morfologia das CuO-np

Nesse capítulo serão apresentados e discutidos os resultados da caracterização estrutural e morfológica das CuO-np, obtidos por um conjunto de técnicas já descritas na parte experimental. Essas caracterizações são fundamentais para comprovar a formação de CuO-np em formatos esférico e bastão, a eficiência da funcionalização com citrato e, por fim, correlacionar tais características com os efeitos toxicológicos que essas nanopartículas exercem sobre os embriões de peixe-zebra. Primeiramente, serão apresentados os resultados das caracterizações realizadas com as

amostras sólidas e, depois, com as amostras em estado coloidal.

Na Figura 11 são apresentados os difratogramas das amostras de CuO-*np* em formato esférico e bastão. Eles são bem similares e indicam a formação da fase CuO (tenorita), de acordo com as informações contidas no cartão JCPDS 48-1548 e demais referências da literatura (SIDDQUI et al., 2018; ZHANG et al., 2014b, 2014^a) Conforme pode ser observado na Figura 10 que apresenta o difratograma do CuO *bulk*.

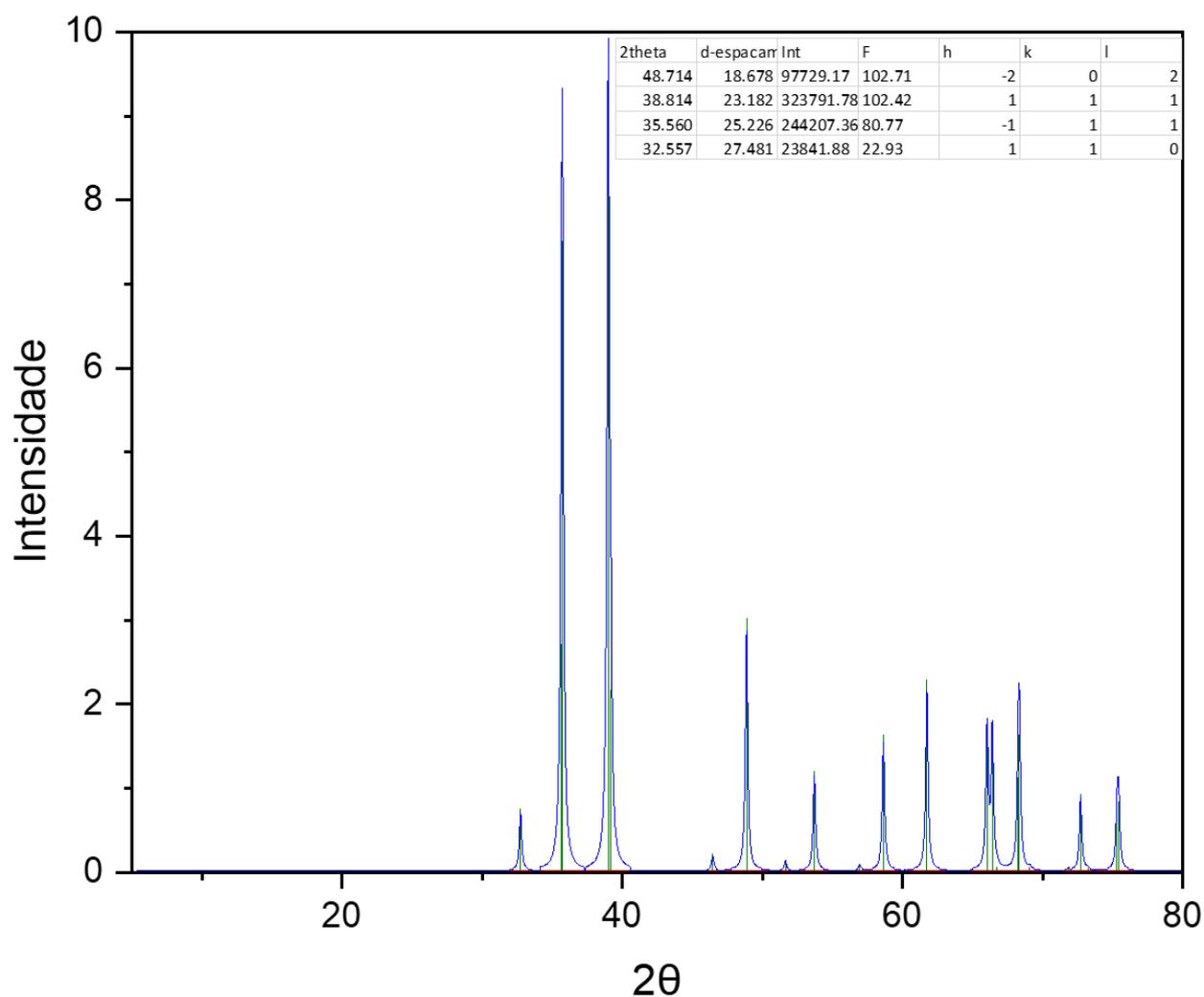


Figura 10. Representação do difratograma do CuO - *Bulk*. Fonte: **Crystallography Open Database.**

Os planos de difração são indicados nos difratogramas. Adicionalmente, observam-se picos de difração em baixo ângulo para ambas as amostras, notadamente em 19,5°, que indicam a presença de uma fase amorfa no material. A fase amorfa é caracterizada por uma desordem parcial, com regiões onde a estrutura não é possível observar perfeitamente os padrões cristalinos devido aos aglomerados de estruturas.

Para estimar o tamanho médio de cristalito das amostras, utilizou-se a equação de Scherrer (equação 1), em que D é o diâmetro médio dos cristalitos, 0,9 é a constante de Scherrer para um cristalito esférico, β é a largura a meia altura (FWHM) do pico de difração mais intenso (111) em radianos), determinada por um ajuste Gaussiano com o software Origin 2019 e θ é o ângulo de difração. Cabe destacar que o valor da constante de Scherrer 0,9 foi empregado para ambos os formatos de nanopartículas pois não foi possível encontrar esse valor para partículas de outros formatos.

$$D_{hkl} = \frac{K\lambda}{\beta \cos(\theta)} \quad (1)$$

Os dados obtidos experimentalmente, após tratados, são apresentados na Tabela 1 e revelam diferenças significativas no tamanho dos cristalitos entre as amostras em bastão e as amostras esféricas. Especificamente, os cristalitos nas amostras em bastão apresentam aproximadamente o dobro do tamanho daqueles estimados nas amostras esféricas. Esse achado está em consonância com estudos anteriores que demonstraram que a morfologia das partículas pode influenciar o tamanho dos cristalitos, foi observado que nanopartículas de diferentes formas podem ter tamanhos de cristalitos distintos devido às diferentes energias de superfície e taxas de crescimento cristalino (JIANG; OBERDÖRSTER; BISWAS, 2009).

Além disso, o aumento no tamanho do cristalito após a funcionalização com citrato para ambas as amostras sugere um efeito significativo dessa etapa de funcionalização. Esse aumento, superior a 10%, não pode ser atribuído apenas à resolução da técnica utilizada na síntese, conforme observado

na difratometria . Uma possível explicação para esse fenômeno é a remoção de camadas superficiais mais amorfas das nanopartículas devido à adsorção do citrato (COOK; LABIENTO; CHAUHAN, 2021; JIANG; OBERDÖRSTER; BISWAS, 2009).

Os resultados presentes corroboram com a literatura, fornecendo insights importantes sobre a influência da morfologia das partículas e da funcionalização na estrutura cristalina de nanopartículas. Outra observação experimental a ser apresentada diz respeito a presença de uma fase amorfa na estrutura, e para corroborar com os dados um teste realizado com a mesma rota de síntese utilizada, porém executada com o dobro do tempo, foi realizado, os dados apresentados na Figura 12.

Tabela 1. Tamanho médio dos cristalitos a partir dos dados obtidos por DRX.

| Amostra | θ (111) (graus) | FWMH | Dhkl (nm) | D _{MET} (nm) | |
|-----------|---------------------------|-------|-----------|-----------------------|-----------------|
| | | | | Comprimento (nm) | Largura (nm) |
| CuO-b | 19,21 | 0,236 | 17,4 | 17,4 ± 1,0 | 12,7 ± 0,7 |
| CuO-b-cit | 19,30 | 0,098 | 21,9 | 21,9 ± 1,5 | 12,3 ± 1,0 |
| CuO-e | 19,89 | 0,787 | 10,8 | Diâmetro → 10,8 ± 0,6 | |
| CuO-e-cit | 19,35 | 0,330 | 13,3 | Diâmetro → 13,3 ± 1,3 | |

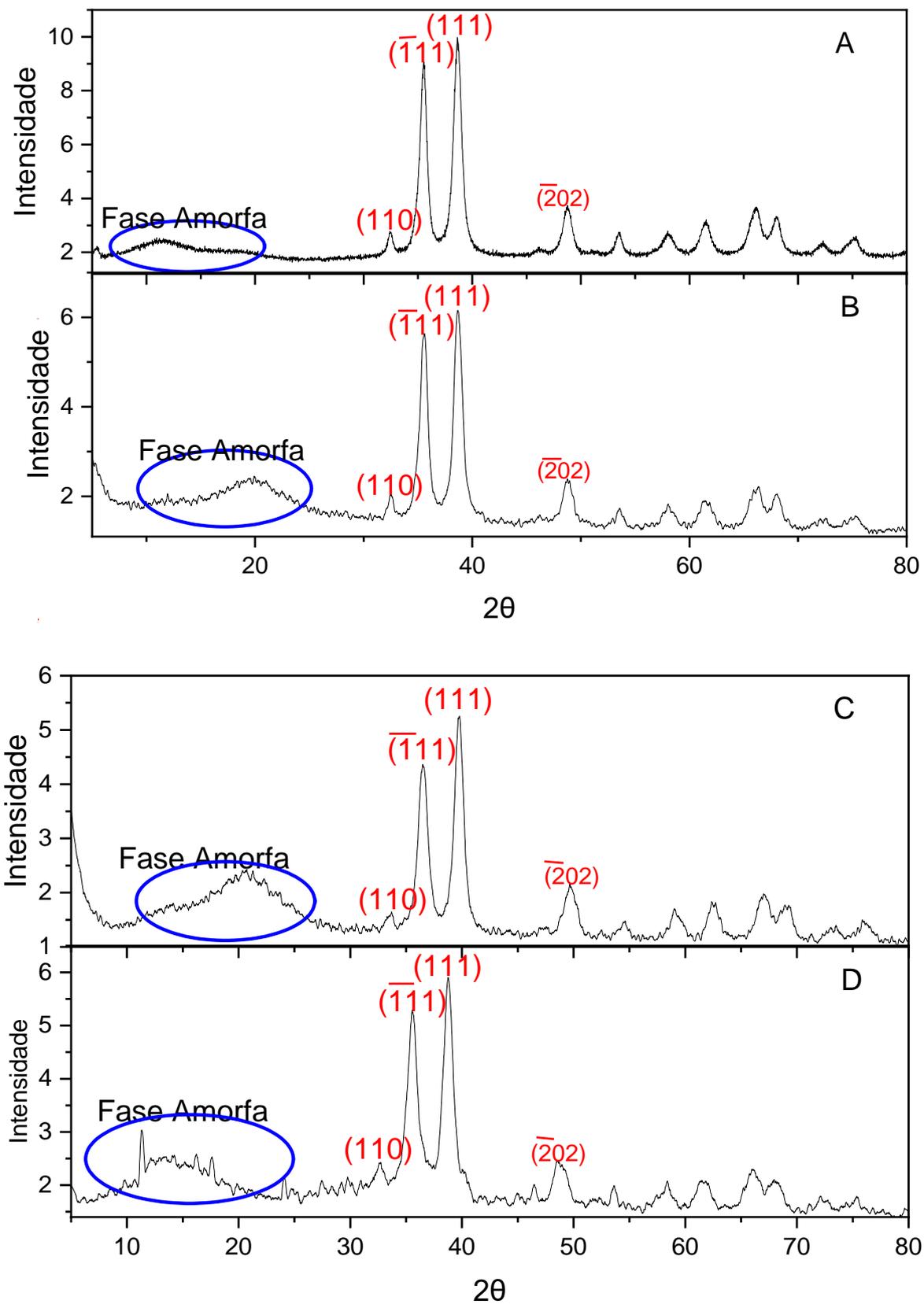


Figura 11. Difratomogramas das amostras (A) CuO-b e (B) CuO-b-cit e (C) CuO-e e (D) CuO-e-cit.

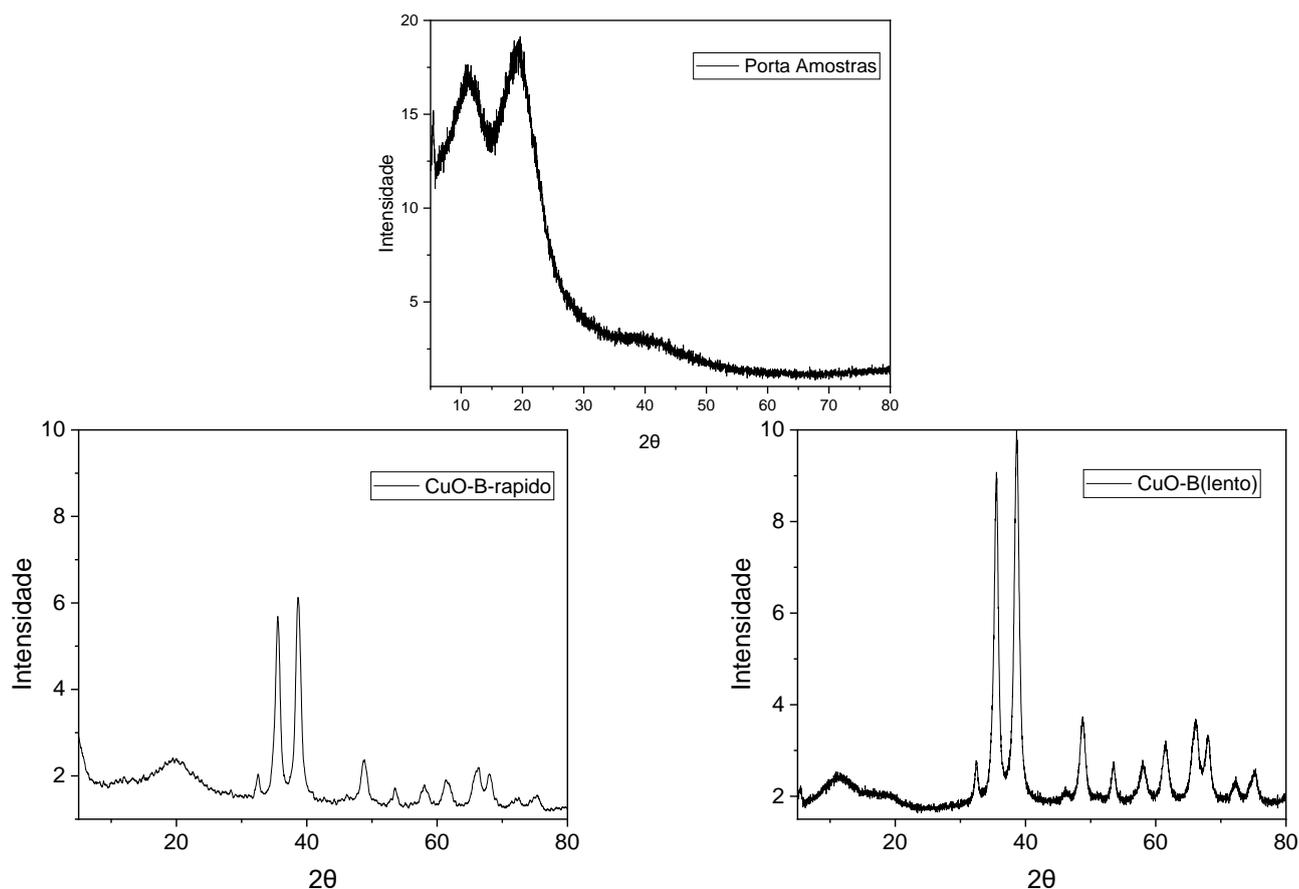


Figura 12. Difratogramas das nanopartículas em diferentes condições de síntese e do porta amostras do equipamento.

A partir da análise dos gráficos apresentados na Figura 11, e comparando com os resultados obtidos na Figura 12, é possível observar que o pico mais acentuado na região entre 10 e 20 Theta, ocorre principalmente pelo porta-amostra utilizado na execução do experimento, porém ainda é possível, com base nos dados, notar a presença de uma fase amorfa na amostra, que pode ser reduzida gerando uma maior dispersão coloidal com a redução da velocidade de agitação durante a síntese e com o aumento do tempo de produção das nanopartículas.

A morfologia, o tamanho médio, a estrutura cristalina e a composição das nanopartículas foram avaliadas por imagens de MET e espectros EDX. Esses resultados são apresentados nas Figuras 13 A, B, C e D e 14 A, B, C e D, para as amostras CuO-e CuO-b, com e sem revestimento de citrato. Os resultados obtidos para as imagens de MET para as partículas sem o revestimento não

mostraram grandes diferenças entre os tamanhos das partículas em função do revestimento, apenas apresentaram-se um pouco menos aglomeradas.

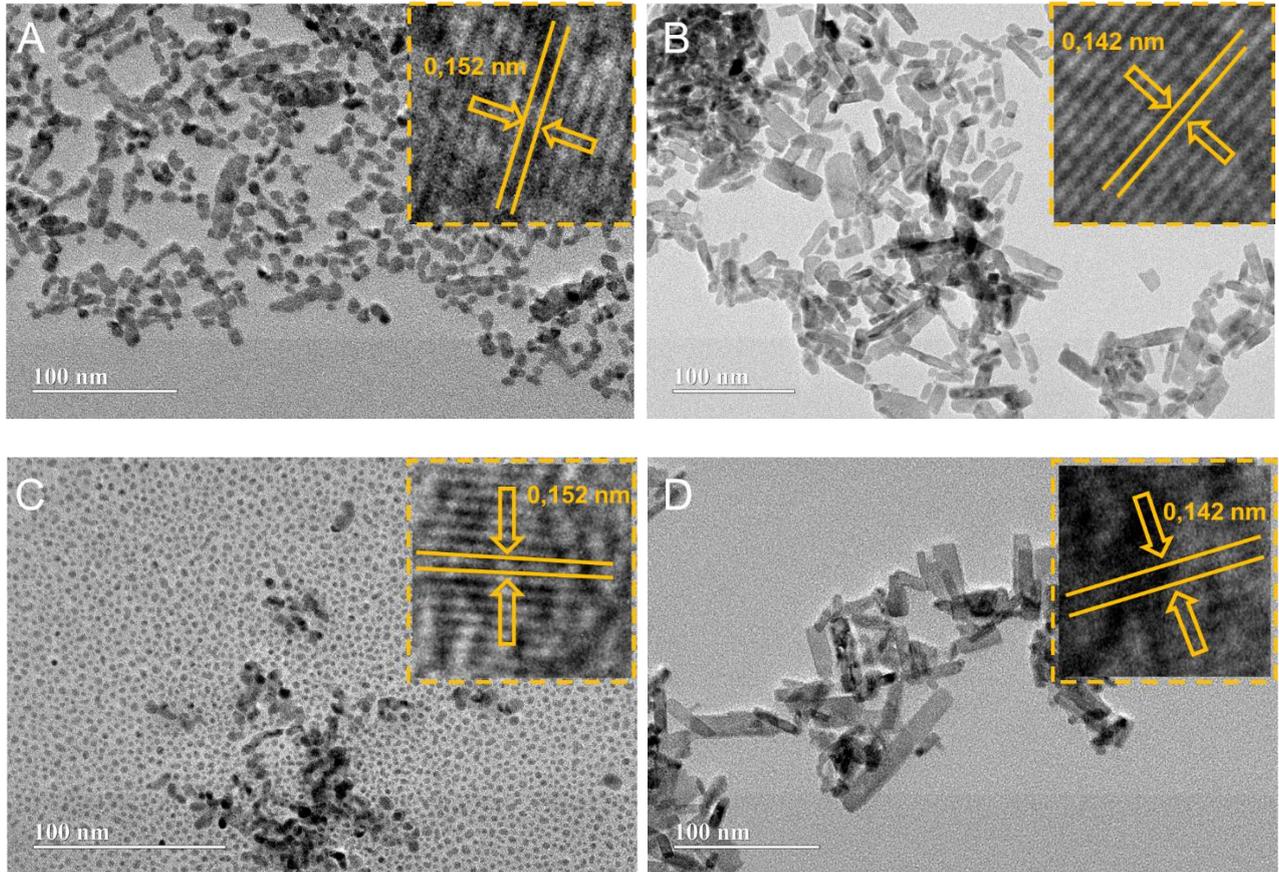


Figura 13. Imagens obtidas por MET CuO-e (A), CuO-b (B), CuO-e-cit (C) e CuO-b-cit (D).

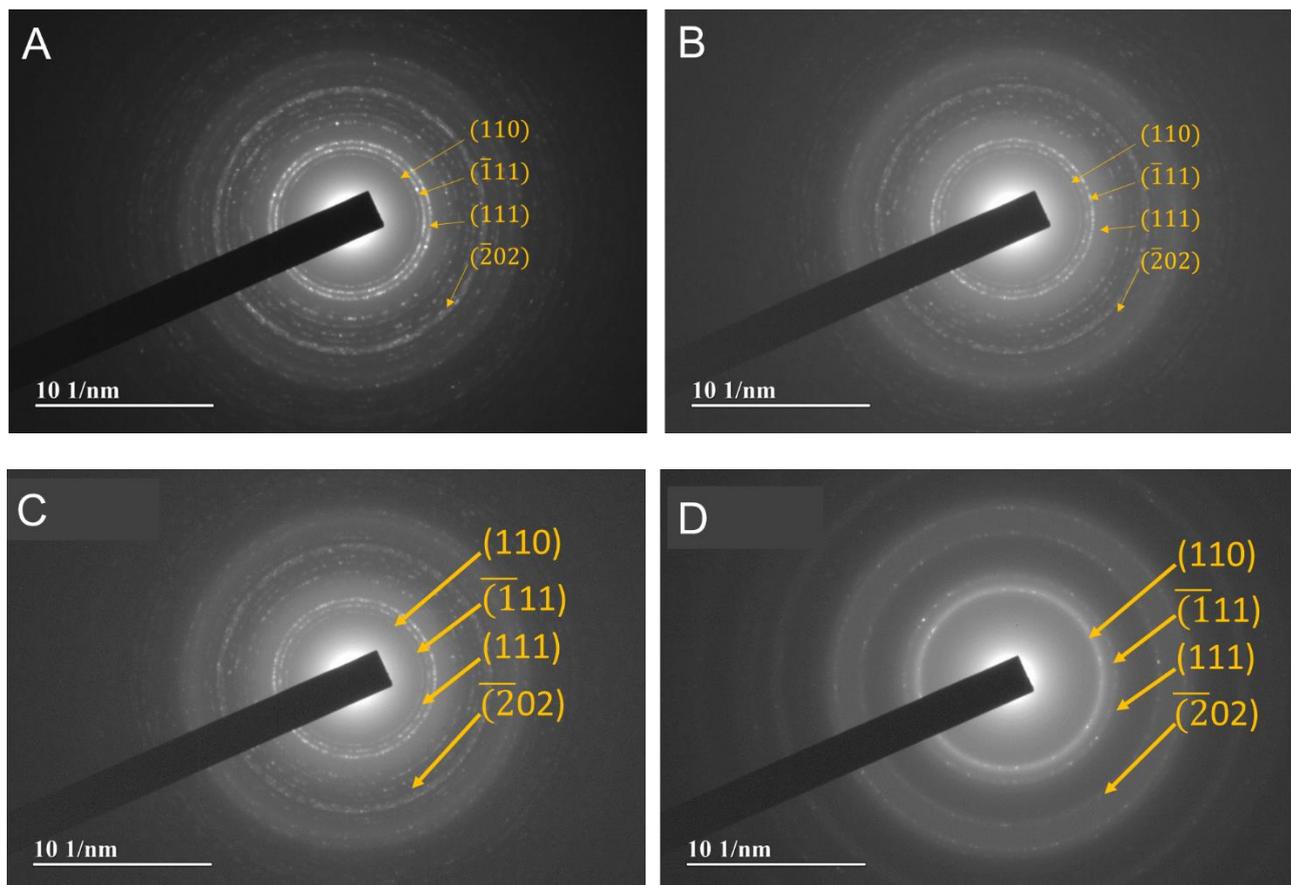


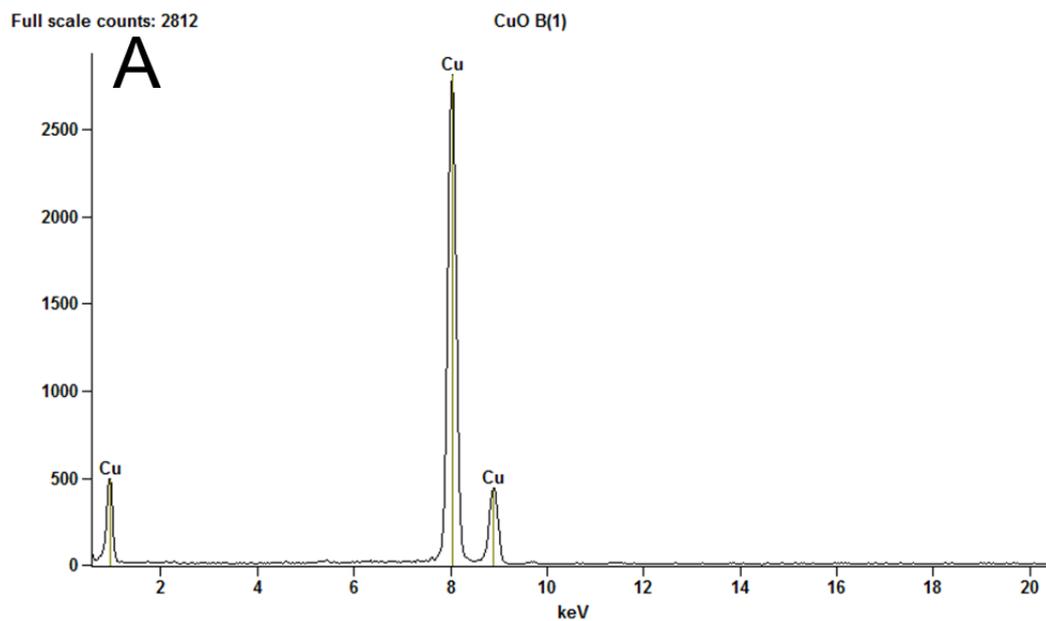
Figura 14. Imagem CuO-e (A) , CuO-b (B), CuO-e-cit (C) e CuO-b-cit (D), obtidas por SAED.

Na Figura 14 são apresentados os padrões de difração de elétrons (SAED) dessas amostras. Em ambos, há a superimposição de pontos brilhantes (padrão de difração) formando anéis quase que contínuos, o que indica um material nanoestruturado e policristalino (WANG, 2003). Contudo, para a amostra CuO-b-cit, há uma descontinuidade nos anéis, sugerindo um aumento relativo da cristalinidade, conforme indicado pelos difratogramas de raio-X.

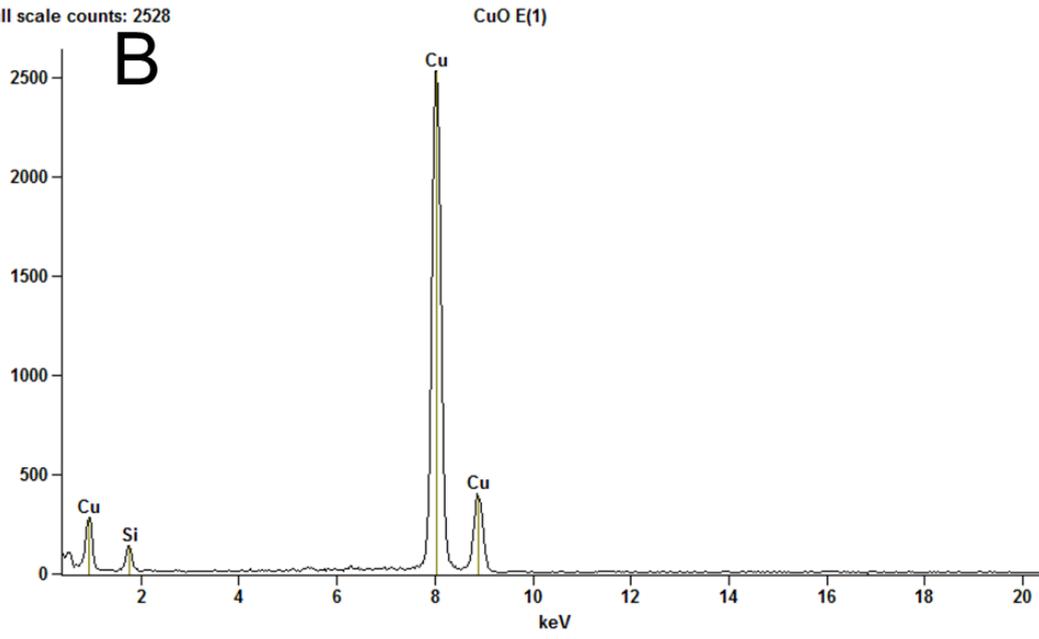
Na Figura 13A e 13C são apresentados os resultados obtidos por MET para as amostras CuO-e. O formato esférico das nanopartículas é constatado em ambas as amostras, independentemente do recobrimento com citrato. Entretanto, nas nanoestruturas sem o recobrimento de citrato, as esferas aglomeram-se em estruturas de cadeias, o que não ocorre quando há o recobrimento, neste as esferas ficam mais individualizadas. Finalmente, na Figura 15, são apresentados os espectros de EDX, em que se observa exclusivamente o pico de cobre, atribuído à

estrutura de CuO. Cabe destacar que o cobre devido à composição do porta amostras não foi subtraído desse sinal.

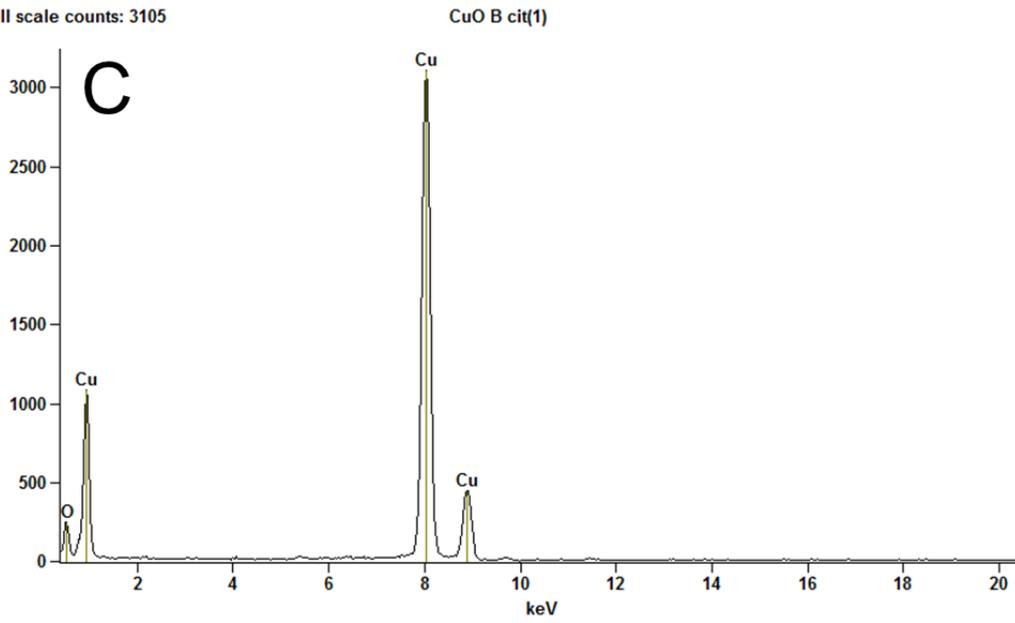
De acordo com os histogramas apresentados nas Figuras 16E e 16F, sugerem os diâmetros médios das esferas são $10,84 \pm 0,66$ nm (CuO-e) e $13,35 \pm 1,39$ nm (CuO-e-cit). Ainda na Figura 13A, as imagens de alta resolução evidenciam os planos cristalográficos e a distância interplanar. Os valores são muito próximos para as amostras CuO-e e CuO-e-cit, indicando que o plano exposto na superfície das nanopartículas é o -202. Os padrões de difração de elétrons apresentados nas Figuras 13C e 13D são muito similares, não permitindo avaliar qualquer efeito do recobrimento. Contudo, ambos confirmam a estrutura de CuO monoclinico. Por fim, os espectros EDX, na Figura 15 indicam claramente a presença quase que exclusiva de cobre, como esperado. Do mesmo modo, não foi realizada a subtração do sinal do porta-amostras.



Full scale counts: 2528



Full scale counts: 3105



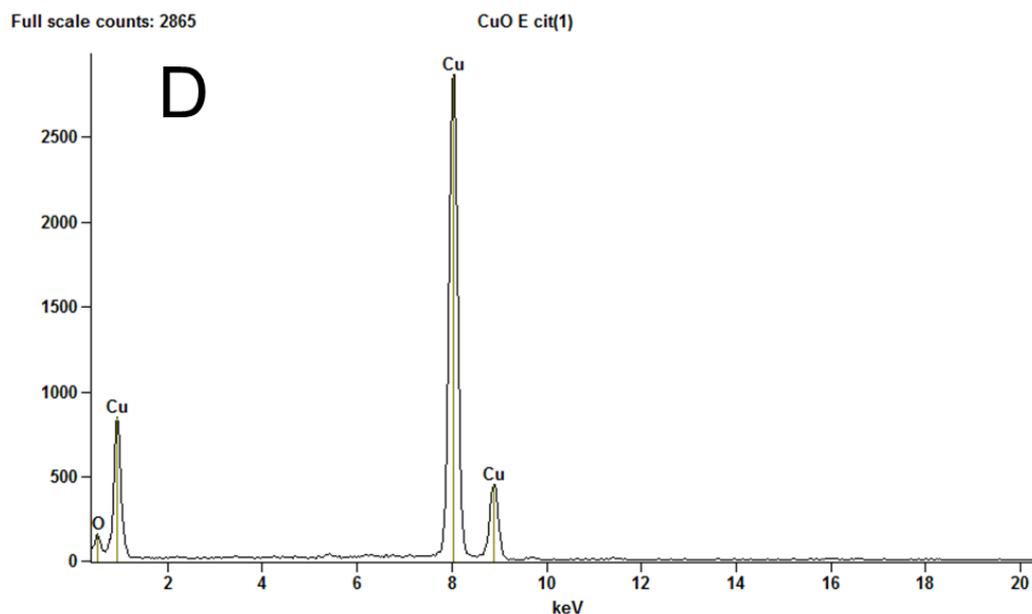


Figura 15. Análise de Energia Dispersiva por raios X de CuO-NPs sintetizadas a 95°C. CuO-b (A), CuO-e (B), CuO-b-cit (C) e CuO-e-cit (D).

Nas amostras em formato de bastão sem revestimento de citrato, a análise revela diretamente a composição intrínseca do material, sem interferências externas. Os picos de intensidade do elemento, cobre (Cu), refletem com precisão a composição da amostra. No entanto, ao adicionar o revestimento de citrato às amostras de bastão, não há diferenças perceptíveis nos espectros, o mesmo nas amostras de CuO em formato de esfera sem revestimento de citrato e com o revestimento.

Em resumo, ao comparar amostras de CuO em diferentes formatos e condições de revestimento, é crucial considerar as possíveis influências na interpretação dos dados da análise por EDX. Pequenas diferenças na geometria da amostra e na presença de revestimento podem impactar a precisão e a confiabilidade dos resultados obtidos por essa técnica analítica.

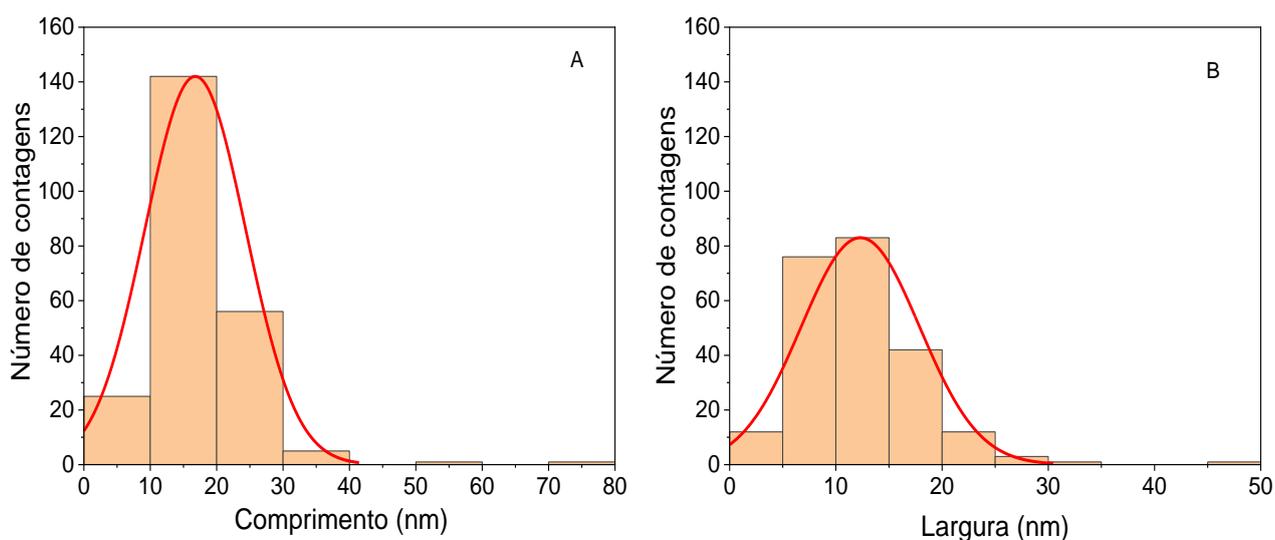
Na Figura 16 são apresentados os histogramas de distribuição de tamanho, construídos a partir da contagem de 300 nanopartículas. Nestes as nanopartículas de CuO com diferentes morfologias tendem a apresentar distribuições de tamanho distintas. As nanopartículas esféricas geralmente exibem uma distribuição mais homogênea de tamanho, com picos mais nítidos e menos dispersão em comparação com as nanopartículas em formato de bastão o que corrobora com os

estudos apresentados por Zhang. (ZHANG et al., 2014a).

Nos histograma das nanopartículas de CuO esféricas, observa-se um pico mais definido centrado em torno do tamanho médio das partículas, com uma dispersão menor que o mesmo formato com o revestimento. Isso sugere que a síntese realizada com um eficiente revestimento, resultam em uma dispersão mais uniforme.

Por outro lado, para as nanopartículas de CuO em formato de bastão, é esperado um histograma com uma distribuição mais ampla e assimétrica (MISRA et al., 2014c; ZHANG et al., 2014a). Isso ocorre devido à maior variabilidade no comprimento e diâmetro das partículas de bastão, resultando em múltiplos picos ou uma cauda longa no histograma. A dispersão aumentada pode ser atribuída a variações na taxa de crescimento dos cristais ao longo de diferentes direções durante a síntese (LIU; DHUNGANA; COBB, 2018; LIU et al., 2004; ZHANG et al., 2014a).

Essas diferenças nos histogramas refletem as distintas características morfológicas das nanopartículas de CuO em esfera e bastão, fornecendo informações valiosas sobre o processo de síntese e as propriedades físicas das partículas.



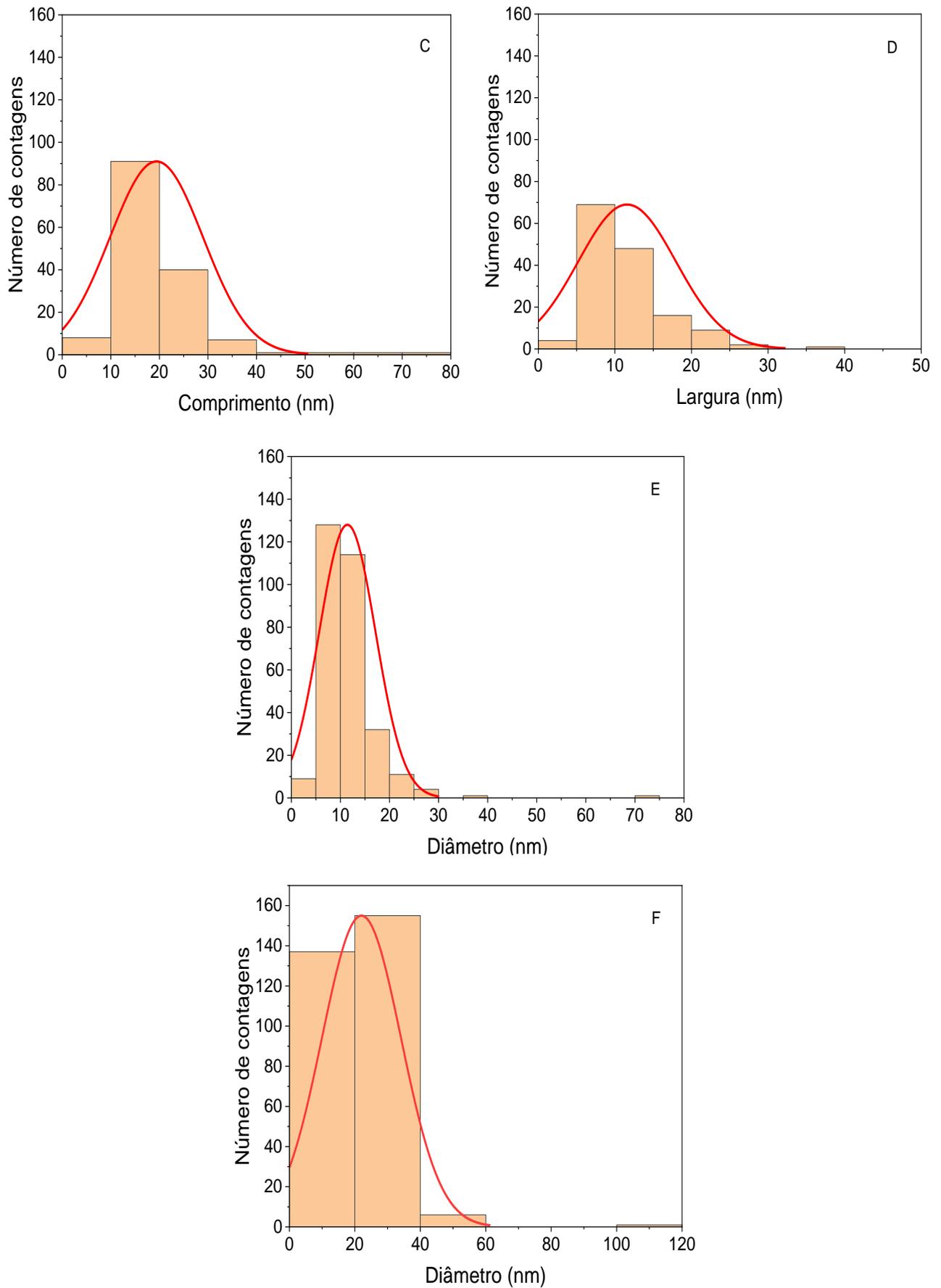


Figura 16: Histograma do comprimento nas nanopartículas de CuO-b e CuO-b-cit (A) e

(C); Histograma da largura nas nanopartículas de CuO-b e CuO-b-cit (B) e (D); Histograma do diâmetro das nanopartículas de CuO-e e CuO-e-cit (E) e (F).

O formato de bastão das amostras CuO-b e CuO-b-cit é confirmado nas imagens apresentadas na Figura 17, independentemente do recobrimento com citrato.

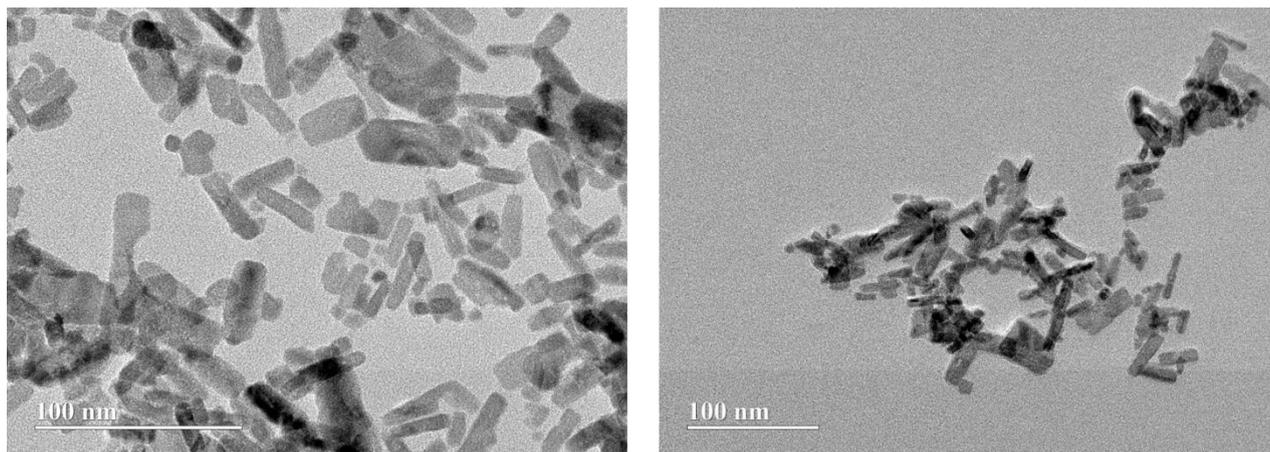


Figura 17: Nanopartículas de CuO-b e CuO-b-cit.

Em ambas as amostras nota-se a formação de aglomerados de nanopartículas. Entretanto, como será discutido mais a frente, as amostras coloidais de nanopartículas sem recobrimento são mais instáveis e tendem a sedimentar com o tempo, o que não foi observado com as amostras recobertas com citrato. De acordo com os histogramas apresentados nas Figuras 16A, 16B, 16C e 16D, os comprimentos médios dos bastões são $17,48 \pm 1,00$ nm (CuO-b) e $21,98 \pm 1,05$ nm (CuO-b-cit), enquanto as larguras médias são $12,75 \pm 0,73$ nm (CuO-b) e $12,38 \pm 1,04$ nm (Cu-b-cit). Isso indica valores de razão de aspecto (comprimento dividido pela largura) da ordem de 1,37 (CuO-b) e 1,77 (CuO-b-cit). Na Figura 13B está incluída a imagem de alta resolução da amostra de CuO-b, onde são observados os planos cristalográficos. A distância interplanar também é indicada para ambas as amostras e os valores são muito similares, indicando que o plano 111 é predominante na superfície das nanopartículas. Esse resultado também indica que o recobrimento com citrato não altera a cristalinidade das nanopartículas. Todavia, como indicado pelos difratogramas, o

recobrimento com citrato aumenta o tamanho dos cristalitos para ambos os formatos de nanopartículas.

A estrutura vibracional das CuO-np foi avaliada por espectroscopia Raman. De acordo com a literatura, são esperados três modos Raman ativos para a estrutura de CuO, ou seja, um modo A_g e outros dois modos B_g (JADHAV et al., 2011; JAN et al., 2015; “RAMAN SPECTRA OF SINGLE CRYSTAL CuO”, 2015; XU et al., 1999). Esses modos se devem ao deslocamento dos átomos de oxigênio nas direções paralela (A_g) e perpendicular (B_g) do eixo b da cela unitária (NESA et al., 2020; RAELIARIJAONA; COHEN, 2022)

Os espectros Raman para as amostras CuO-b, CuO-b-cit, CuO-e e CuO-e-cit são apresentados na Figura 18. De uma forma geral, os espectros são muito semelhantes, especialmente em termos da presença dos três modos Raman esperados e, ainda, muito similares aos espectros encontrados na literatura. (JADHAV et al., 2011; JAN et al., 2015; “RAMAN SPECTRA OF SINGLE CRYSTAL CuO”, 2015; XU et al., 1999) (Debbichi, L.; Marco de Lucas, M. C.; Pierson, J. F.; Krüger, P. Vibrational Properties of CuO and Cu₄O₃ from First-Principles Calculations, and Raman and Infrared Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* 2012, 116 (18), 10232–10237). Em comparação aos resultados obtidos para a amostra bulk, nota-se um alargamento dos picos, que comumente ocorre em nanomateriais de CuO, sintetizados em solução.(JADHAV et al., 2011; JAN et al., 2015; “RAMAN SPECTRA OF SINGLE CRYSTAL CuO”, 2015; XU et al., 1999). Observa-se ainda que, nos espectros das nanopartículas há um deslocamento sistemático da energia dos picos para números de onda menores quando comparados aos valores determinados para o CuO bulk, conforme apontados na Tabela 2. Isso ocorre independentemente da presença do citrato. Esse deslocamento é esperado, uma vez que este é inversamente proporcional à dimensão do corpo espalhador, conforme descrito por Meilakhs e Koniakhin (MEILAKHS; KONIAKHIN, 2017). O estudo também mostrou que as nanopartículas de CuO em formato de bastão apresentaram um deslocamento para frequências mais baixas em relação às partículas esféricas. Esse deslocamento pode ser atribuído às diferentes deformações estruturais causadas pela geometria das partículas

(MOURDIKOUDIS; PALLARES; THANH, 2018).

Tabela 2. Valores dos modos vibracionais RAMAN experimentais e *Bulk* para o CuO.

| PICOS ATRIBUÍDOS AOS MODOS VIBRACIONAIS | | | | |
|--|--------------|------------------|--------------|------------------|
| <i>Bulk</i> | CuO-b | CuO-b-cit | CuO-e | CuO-e-cit |
| 296 – Ag | 276,19 – Ag | 283,44 – Ag | 271,81 – Ag | 284,54 – Ag |
| 344 – Bg | 325,30 – Bg | 335,15 – Bg | 316,68 – Bg | 334,19 – Bg |
| 626 – Bg | 605,88 – Bg | 616,00 – Bg | 605,74 – Bg | 615,59 – Bg |

Além disso, nota-se que a cobertura de citrato resulta num aumento da frequência para todos os modos vibracionais, embora não atinjam os valores determinados para a amostra bulk. Ou seja, há um aumento na energia de vibração da ligação Cu-O. Esse aumento se deve às interações do citrato com a superfície das nanopartículas de CuO (LIZ-MARZÁN; GIERSIG; MULVANEY, 1996). Numa nanopartícula de CuO recoberta com citrato, onde o citrato coordena aos átomos de cobre da superfície, estes últimos são compartilhados entre os átomos de oxigênio da rede da nanopartícula e os átomos de oxigênio do citrato. Essa condição deve elevar a energia da ligação Cu-O e, portanto, aumentar a frequência de espalhamento do fônon, relativo ao deslocamento dos átomos de oxigênio em relação às direções paralela e perpendicular do eixo b da cela unitária a esse modo vibracional. Adicionalmente, pode haver uma contribuição de caráter eletrostático, pela presença de um dipolo partindo dos átomos de cobre (positivo) para os íons de citrato (negativo) espectro (GUHA; PEEBLES; TERENCE WIETING US, 1991; XU et al., 1999).

As diferentes simetrias entre as partículas, resultam em padrões de espectros Raman diferentes e deslocamento de intensidades específicas, pois no caso de nanopartículas em formato esférico, é comum observar modos vibracionais isotrópicos o que as difere do formato de bastão que apresentam modos com simetria axial (JAN et al., 2015).

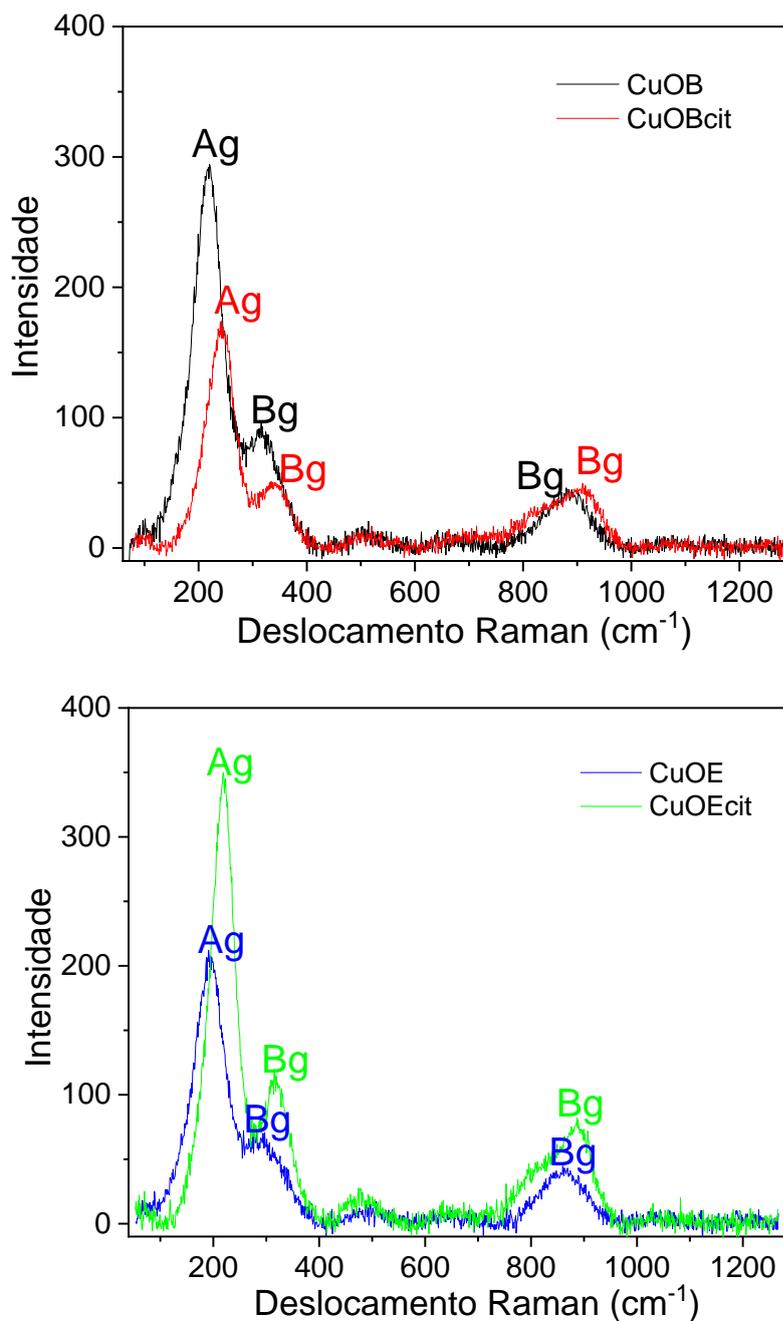


Figura 18. Espectros Raman das CuO-np em formatos de bastão e esfera, sem cobertura e com cobertura decitrato, conforme indicado.

A qualidade dos espectros de FTIR (não apresentados) não foi suficiente para realizar uma análise satisfatória para confirmar o recobrimento de citrato e dos seus modos de adsorção/interação sobre as CuO-np. Todavia, os resultados apresentados até aqui mostram que a presença do citrato altera diferentes características estruturais das amostras, especialmente o tamanho do cristalito e a

energia dos modos vibracionais Raman. Nesse sentido, para completar a caracterização das CuO-np e confirmar a funcionalização com citrato, foram obtidas curvas TG das difentes amostras. As curvas TG apresentadas na Figura 19.

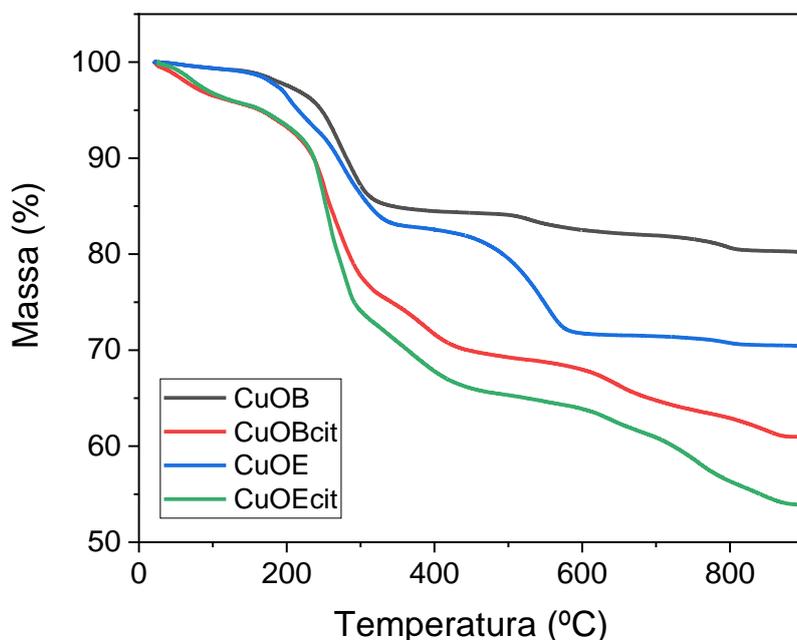


Figura 19. Curvas TGA – nanopartículas CuO em formatos de esfera e bastão.

As curvas mostram que, de maneira geral, as amostras nuas, CuO-b e CuO-e, são termicamente mais estáveis que as amostras recobertas com citrato, perdendo, respectivamente, 14,42% e 15,54% da sua massa inicial. No entanto, nota-se que para CuO-b a perda de massa ocorre quase que totalmente num único evento, que se inicia por volta de 195°C. Já para a amostra de CuO-e, a perda ocorre em dois eventos; o primeiro se inicia por volta de 195°C, resultando na perda de aproximadamente 15,54%, e o segundo se inicia em 437,53°C, com a perda de 12,48%. Enquanto o primeiro evento de decomposição se deve à perda de água de cristalização que ocorre por volta de 100 °C, o segundo evento, observado apenas com CuO-e, deve ser associado à decomposição das estruturas orgânicas como citrato e acetato remanescentes do precursor. Partículas de CuO em tamanho nanométrico são menos estáveis que sua forma *bulk*, pois apresentam uma área superficial

muito maior, assim como um número muito maior de átomos com coordenação incompleta (Wang et al., 2015). Isso também explica o fato das CuO-b serem mais estáveis que as CuO-e, como já observado por outros autores (NUNES et al., 2015). Em contrapartida, as curvas TG para as amostras recobertas com citrato, CuO-b-cit e CuO-e-cit, mostram pelo menos três eventos de perda de massa, que no total perfazem 39,1% e 46,6%, respectivamente. A perda maior se deve à decomposição do citrato, que ocorre em pelo menos dois estágios, entre 95,5 °C e 289,89 °C e entre 425,57 °C e 876 °C. Essas temperaturas são diferentes daquelas observadas com o citrato sozinho, conforme publicado por Gao et al. (GAO; WANG; HAO, 2012), o que pode ser explicado pela interação com a superfície das CuO-np. A partir da diferença entre as perdas de massa das amostras nuas e recobertas, a quantidade de citrato foi estimada em 4,01 mg (CuO-b-cit) e 3,08 mg (CuO-e-cit).

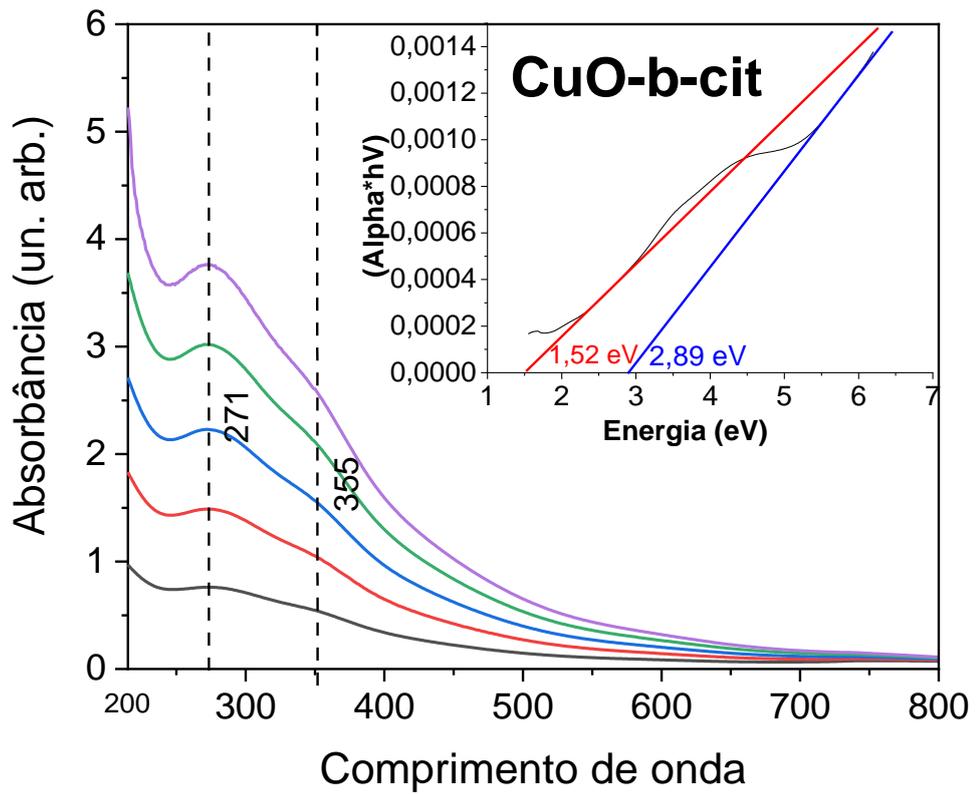
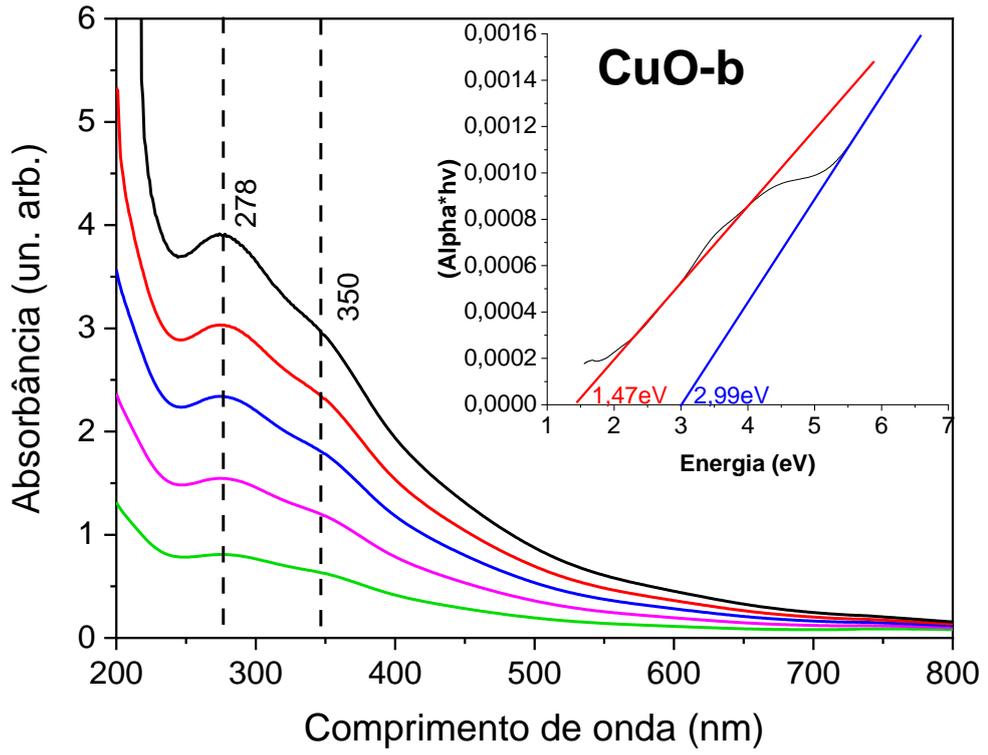
Os eventos de perda de massa e as transformações de fase que ocorrem durante o aquecimento das amostras de nanopartículas de CuO. As análises térmicas então, foram realizadas nas amostras em um cadinho de platina onde cada amostra é aquecida não isotermicamente, para que as análises possam ser realizadas, utilizou-se tanto no ar atmosférico quanto em uma atmosfera úmida de oxigênio.

A caracterização das amostras em estado coloidal foi realizada por espectroscopia de absorção no UV-Vis e medidas de espalhamento de luz. Os resultados são apresentados e discutidos a seguir.

Os espectros de absorção das CuO-np foram obtidos em todos os formatos, com e sem revestimentos nas concentrações de 0,02, 0,04, 0,06, 0,08 e 0,1 mol/L e são apresentados na Figura 20. De uma forma geral, os espectros são similares para as amostras CuO-b e CuO-e. Ambos apresentam uma banda centrada entre 270 e 280 nm, cuja energia depende do formato da nanopartícula, além de uma transição menos intensa, por volta de 300 nm. A banda de maior energia corresponde à transição BV→BC ou, mais especificamente, Cu3d→O2p (DHINESHBABU et al., 2016). Entretanto, a existência de vacâncias de oxigênio e a presença de íons Cu⁺ dão origem a outras

transições, como transferência de carga entre Cu^+ e Cu^{2+} , o que causa um alargamento nas bandas do espectro (OVCHINNIKOV et al., 2007). Outra questão que aponta a diferença entre os espectros obtidos é a energia de *bandgap* do citrato, o qual pode estar gerando uma sobreposição (DAL SANTOS et al., 2012), o que explica a diferença entre os espectros obtidos, já que este efeito é comum em nanoestruturas que possuem revestimento. Além disso, nota-se um efeito do formato das nanopartículas sobre os espectros, especialmente na posição da banda principal, que desloca para comprimentos de onda maiores quando as partículas mudam de bastão para esfera. Isso pode ser explicado pelo efeito de confinamento quântico, que parece ser mais exacerbado nos bastões. Também, observa-se que o recobrimento com citrato aumenta a energia da transição $\text{BC} \rightarrow \text{BV}$. Por ora, não encontramos explicação para esse efeito.

Os dados obtidos foram tratados utilizando o método de Tauc, que é uma representação gráfica da absorção de energia em função do comprimento de onda da luz incidente (TAUC, 1967). Esse método é amplamente utilizado para se obter o valor do *bandgap* com maior precisão. Na Figura 20, são apresentados os gráficos de Tauc, $(\alpha h\nu)^2$ versus $h\nu$, onde α é o coeficiente de absorção, h é a constante de Planck e ν é a frequência da luz absorvida. No geral, observa-se um valor para as energias de *bandgap* entre 2,34 eV e 2,99 eV, a depender do formato e da cobertura com citrato. Esses valores são maiores que o determinado para o CuO *bulk* que é de 2,1 eV (DHINESHBABU et al., 2016). Essa diferença pode ser explicada pela redução do tamanho do material, que incorre numa discretização dos estados e consequente aumento da energia de *bandgap*.



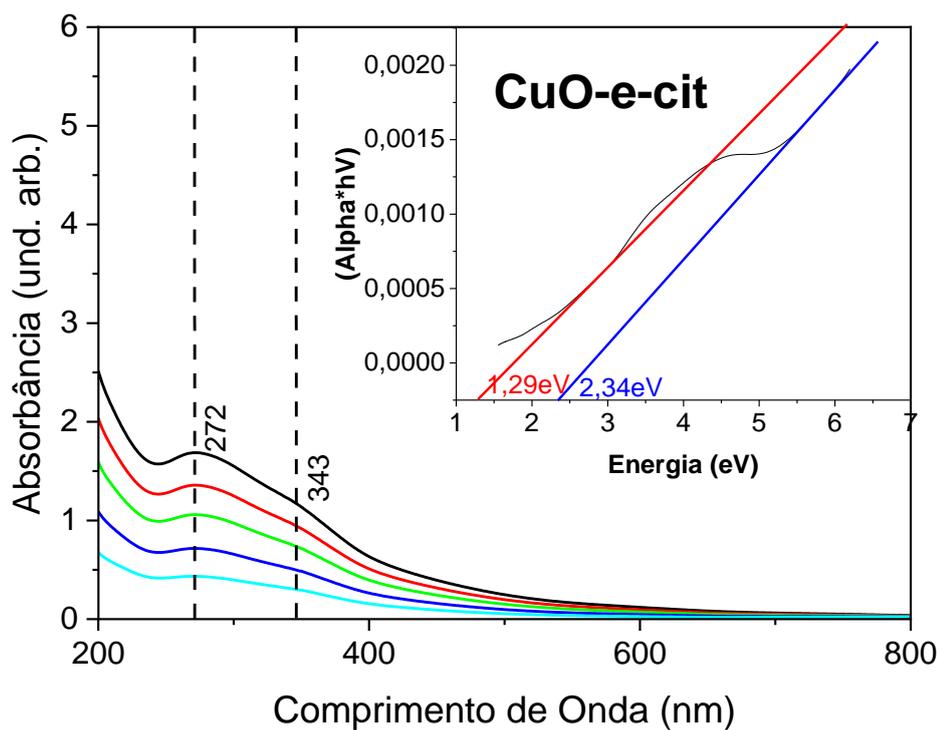
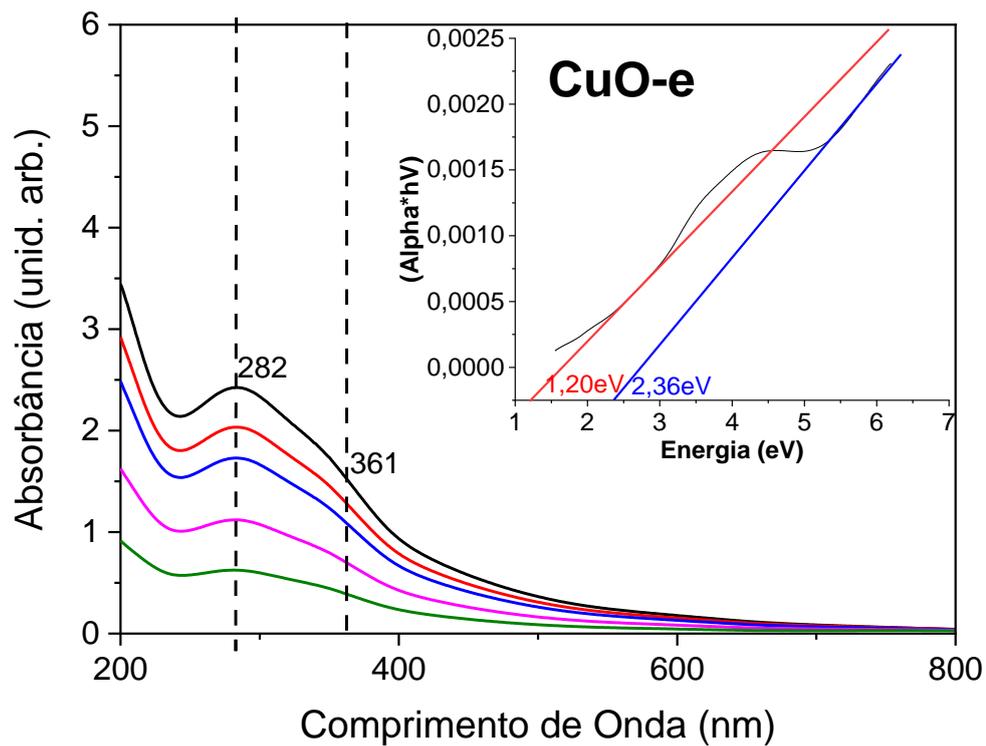


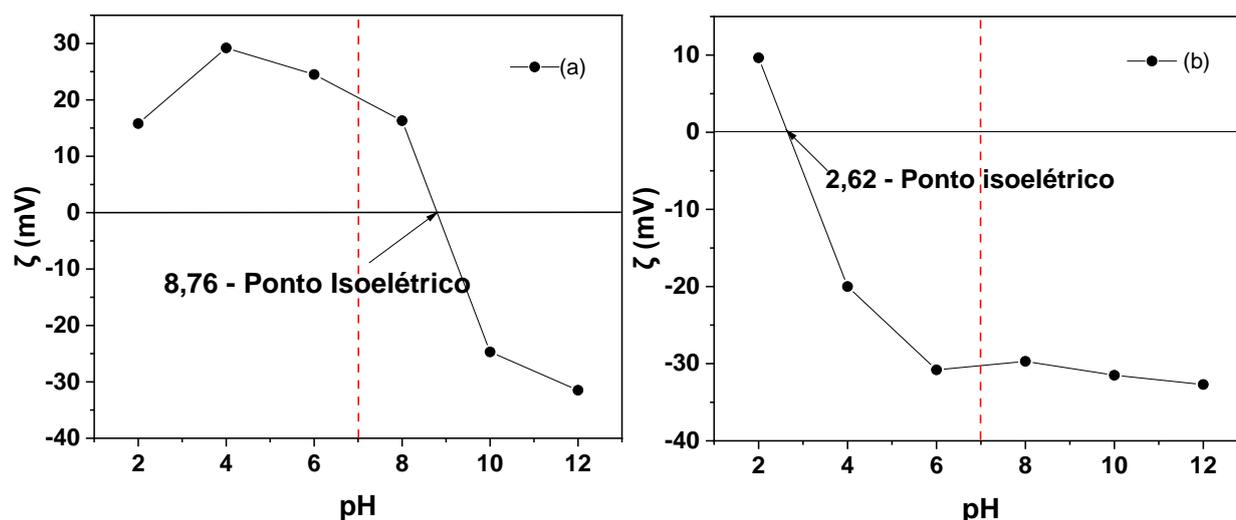
Figura 20. Espectros UV-vis das CuO-nps conforme indicado.

A caracterização das CuO-np foi completada com medidas de espalhamento de luz, para a determinação do potencial zeta e do diâmetro hidrodinâmico. O potencial zeta é uma medida do

potencial elétrico no plano de cisalhamento compreendido entre a partícula e a primeira camada de líquido (HUNTER, 2003). Indiretamente, seu valor exprime a carga elétrica superficial das partículas em uma solução dispersa, que por sua vez é capaz de fornecer informações sobre a estabilidade e a interação das partículas em suspensão. Numa suspensão de nanopartículas, o potencial zeta depende de vários fatores, incluindo o tamanho, o formato, a composição da superfície e o nível de agregação entre elas.

Com base nos dados obtidos por MET, as CuO-b têm área superficial ($\sim 830 \text{ nm}^2$) maior que das CuO-e ($\sim 380 \text{ nm}^2$) e, portanto, estão sujeitas à maior interação e tendência à agregação, o que implica em diferenças nos valores de potencial zeta obtidos. Outro fator importante a ser considerado é o pH do meio, uma vez que o CuO é um óxido anfotérico, com ponto isoelétrico de 9,5. Além disso, o citrato também tem o grau de ionização dependente do pH, com três valores de pKa: 3,13; 4,76 e 6,40. Portanto, o potencial zeta das CuO-np, tanto nuas quanto recobertas com citrato, deve variar com o pH do meio.

A Figura 21 apresenta os resultados da titulação das diferentes amostras de CuO-np e o valor do potencial zeta correspondente, para a faixa de pH compreendida entre 2 e 12.



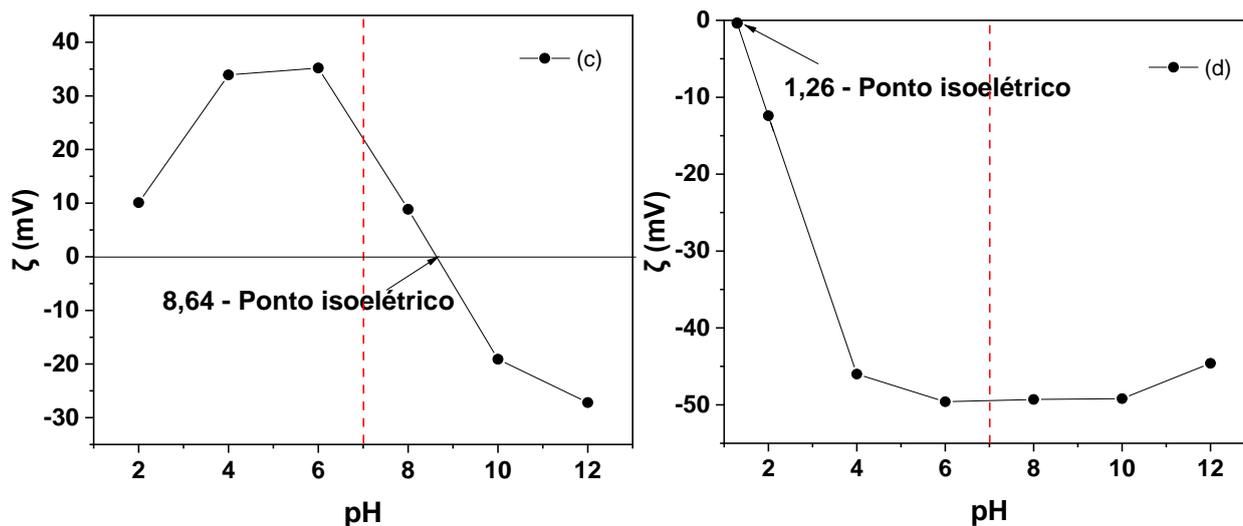


Figura 21. Gráficos de potencial zeta em função do pH do meio para diferentes CuO-np:

(a) CuO-b, (b) CuO-b-cit, (c) CuO-e e (d) CuO-e-cit.

O valor de pH no qual o potencial zeta é zero, chamado de ponto isoeletrico (PI), e a região em torno desse valor corresponde à região menos estável em suspensões do ponto de vista eletrostático. Essa informação é importante porque a carga elétrica da superfície de uma nanoestrutura pode influenciar suas propriedades, como sua capacidade de adsorver ou repelir moléculas, interagir com outras partículas ou simplesmente influenciar a estabilidade coloidal.

Os gráficos mostram que o ponto isoeletrico (PI) é praticamente o mesmo para amostras nuas e de ambos os formatos e é muito próximo daqueles encontrados na literatura para CuO-np nuas (KHAN et al., 2019). Com o recobrimento de citrato, o comportamento muda drasticamente. As CuO-np tornam-se negativamente carregadas devido à dissociação dos grupos ácido carboxílico das moléculas de citrato adsorvidas à superfície das nanopartículas. A carga negativa aparece mesmo em pH inferior àquele do menor pKa do citrato (3,13). Comparativamente, há uma pequena diferença no valor de PI entre CuO-b-cit e CuO-e-cit, 2,62 e 1,26, respectivamente. Por ora, não há uma explicação para essa diferença, embora seja esta, provavelmente, devida ao tamanho e formato da nanopartícula.

A Figura 22 mostra fotografias das amostras coloidais de CuO-np nos pHs em que o

potencial Zeta e o diâmetro hidrodinâmico foram determinados. Notadamente, as partículas recobertas com citrato são estáveis numa faixa mais ampla de pHs, o que corrobora os dados apresentados nos gráficos da Figura 23. Isso pois, no geral, para um coloide de estabilização eletrostática, quanto maior é o potencial Zeta, maior é a estabilidade. Para as partículas recobertas com citrato, a faixa de pH em que há carga superficial é muito mais ampla, o que se reflete nas fotografias apresentadas na Figura 22. Além disso, a Tabela 3 mostra os índices de poli dispersão (PDI) dos valores de potencial Zeta (e de diâmetro hidrodinâmico também) em cada um dos pHs estudados. Com exceção dos dados obtidos em pH 2, o PDI é muito alto (acima de 0,25) para as amostras nuas, independentemente do formato, mas diminui sistematicamente após o recobrimento com citrato, tal comportamento pode ser observado na Figura 24, logo a seguir. Isso mostra que as amostras nuas são polidispersas, certamente um resultado de aglomeração facilitada pela ausência de cobertura. Se o PDI for maior que 0,25, a amostra pode conter uma variação muito grande de tamanhos de partículas, e os efeitos de partículas de diferentes tamanhos podem se sobrepor, tornando a análise do potencial Zeta menos confiável.

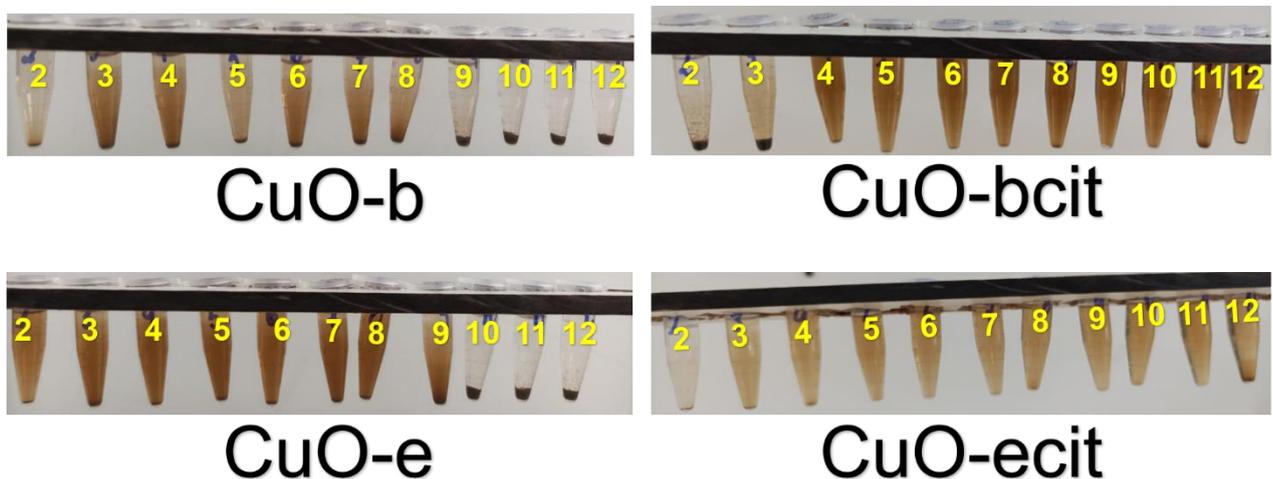


Figura 22. Fotografias das amostras de CuO-np em diferentes pHs, conforme indicado.

Tabela 3. Valores de potencial Zeta, diâmetro hidrodinâmico e índice de poli dispersão para as amostras de CuO-np em diferentes pHs.

| Partícula | Potencial Zeta (mV) | Z – Average (d. nm) | pH | PdI |
|------------------|--------------------------------|--------------------------------|-----------|------------|
| CuO-b | 15,8 | 333,9 | 2 | 0,74 |
| | 29,2 | 1183 | 4 | 0,67 |
| | 24,5 | 147,1 | 6 | 0,2 |
| | 16,3 | 200,7 | 8 | 0,2 |
| | -24,7 | 270,2 | 10 | 0,32 |
| | -31,5 | 473,9 | 12 | 0,43 |
| CuO-b-cit | 9,64 | 339,1 | 2 | 0,46 |
| | -20 | 126,2 | 4 | 0,17 |
| | -30,8 | 125,2 | 6 | 0,17 |
| | -29,7 | 125,3 | 8 | 0,18 |
| | -31,5 | 123,5 | 10 | 0,16 |
| | -32,7 | 133,1 | 12 | 0,17 |
| CuO-e | 10,1 | 613,2 | 2 | 0,78 |
| | 33,9 | 75,4 | 4 | 0,29 |
| | 35,2 | 96,3 | 6 | 0,36 |
| | 8,84 | 918,7 | 8 | 0,52 |
| | -19,1 | 198,7 | 10 | 0,46 |
| | -27,2 | 353,5 | 12 | 0,59 |
| CuO-e-cit | -12,4 | 1943 | 2 | 0,63 |
| | -46 | 142,3 | 4 | 0,18 |
| | -49,6 | 155,2 | 6 | 0,13 |
| | -49,3 | 160,7 | 8 | 0,17 |
| | -49,2 | 197,3 | 10 | 0,16 |
| | -44,6 | 320,4 | 12 | 0,19 |

Na Figura 23 são apresentados os gráficos de distribuição de tamanho hidrodinâmico das CuO-np em diferentes pHs. Primeiramente, nota-se que o tamanho hidrodinâmico médio das nanopartículas é da ordem de 100 nm, o que é consideravelmente maior que aqueles determinados por MET. Isso, pois o tamanho hidrodinâmico mede não somente as nanopartículas mas a cobertura e a camada de solvatação. No entanto, esses elementos não têm tamanho suficiente para multiplicar o tamanho medido em quase cinco vezes aquele determinado por MET. Portanto, há uma contribuição de agregados de nanopartículas para o tamanho hidrodinâmico observado. Nota-se também uma diminuição no tamanho hidrodinâmico após o recobrimento com citrato para ambos os formatos, numa ampla faixa de pHs (Tabela 3). Esse resultado era esperado, pois a cobertura de citrato exerce uma repulsão eletrostática entre as nanopartículas, o que inibe a sua aglomeração. Em particular, observa-se que as CuO-e-cit são muito mais sensíveis ao pH; o tamanho hidrodinâmico delas aumenta gradualmente com o aumento do pH, chegando a valores próximos de 1000 nm. Por outro lado, as CuO-b-cit são muito mais estáveis e o pH do meio pouco afeta o seu tamanho hidrodinâmico, que se mantém próximo de 100 nm. É possível inferir que, pela área superficial maior das CuO-b, há uma quantidade maior de citrato na cobertura (vide curvas TG) e, portanto, maior é sua estabilidade coloidal. Essa hipótese é confirmada pelo maior potencial zeta (em módulo) dessas CuO-np. De todo o modo, cabe destacar que todas as nanoestruturas se mostraram mais estáveis (alto valor de potencial zeta e tamanho hidrodinâmico comparável aos dados de MET) quando o pH do meio dispersor se encontra entre 4 e 7. Essa é uma faixa de pH comum do ambientes aquáticos.

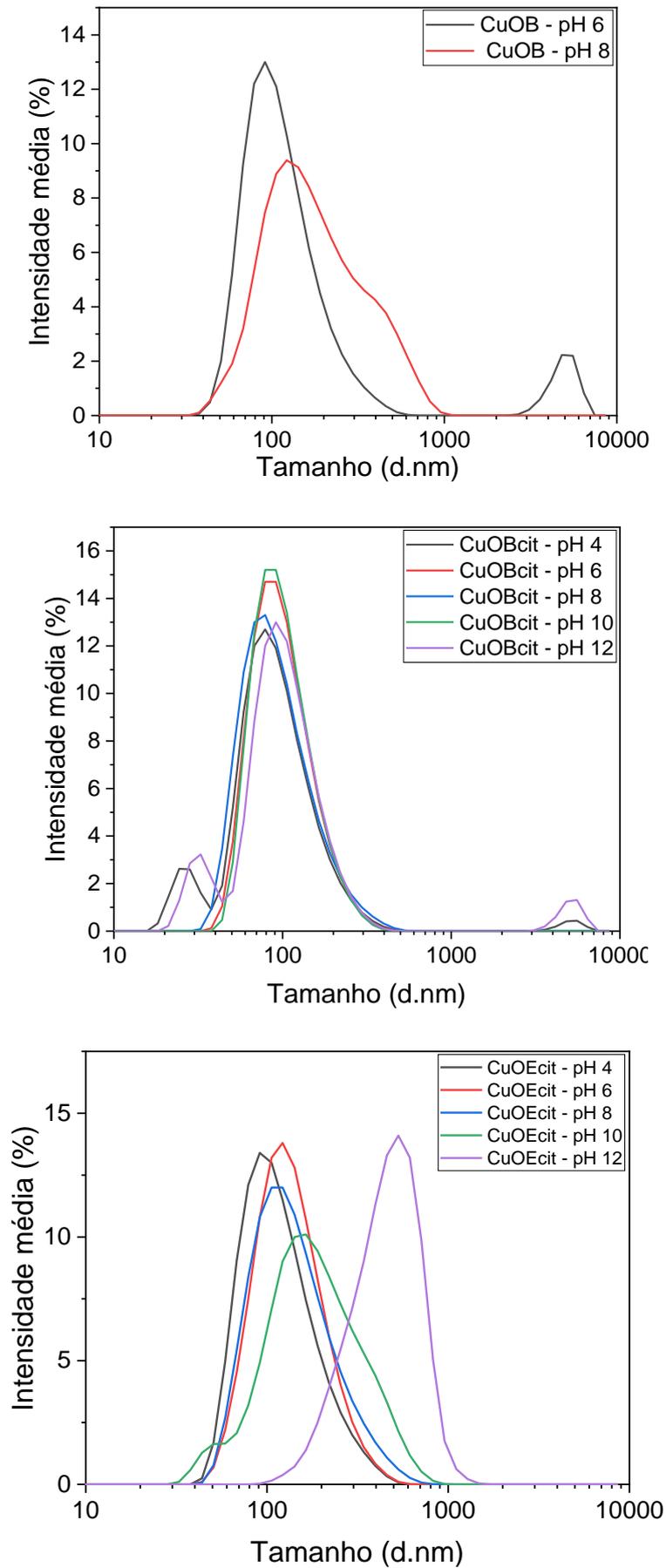


Figura 23. Medida de DLS do tamanho das nanopartículas em pH's variados.

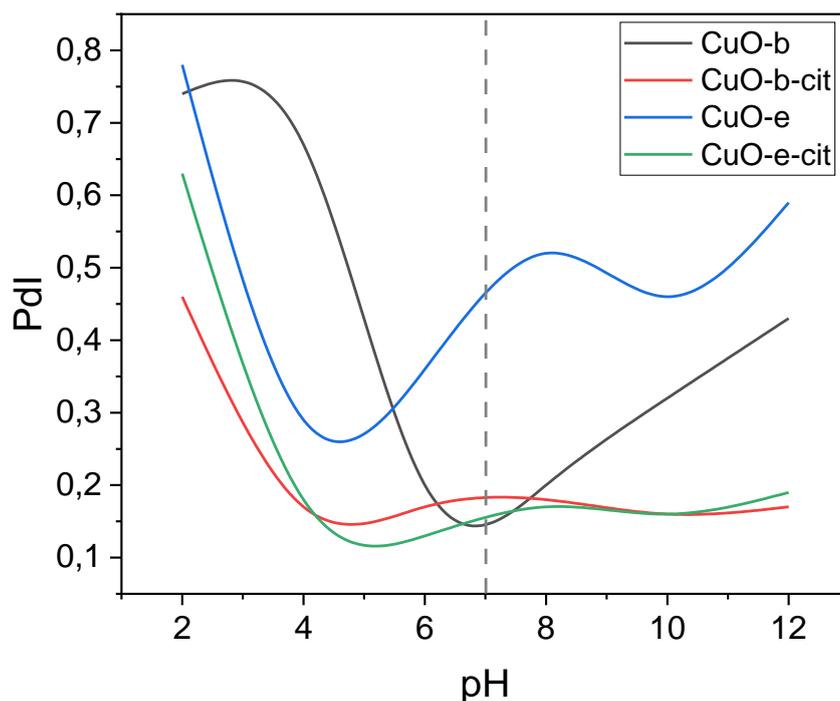


Figura 24. Gráficos do Índice de Polidispersividade em função do pH do meio para diferentes CuO-np, conforme indicado. A linha vertical indica a condição neutra (pH 7).

Além disso, quando as nanopartículas de CuO são cobertas com citrato, este se liga à superfície das partículas, aumentando a estabilidade estrutural e reduzindo a interação entre as nanopartículas, devido a mudança da carga superficial, o que aumenta a dispersão das nanopartículas de óxidos metálicos em solventes polares, como a água. Essa camada pode ter um efeito significativo no potencial zeta das partículas, pois o citrato é um ânion e, quando adsorvido na superfície das partículas de CuO, o citrato pode fornecer uma carga negativa adicional, resultando em um potencial zeta negativo.

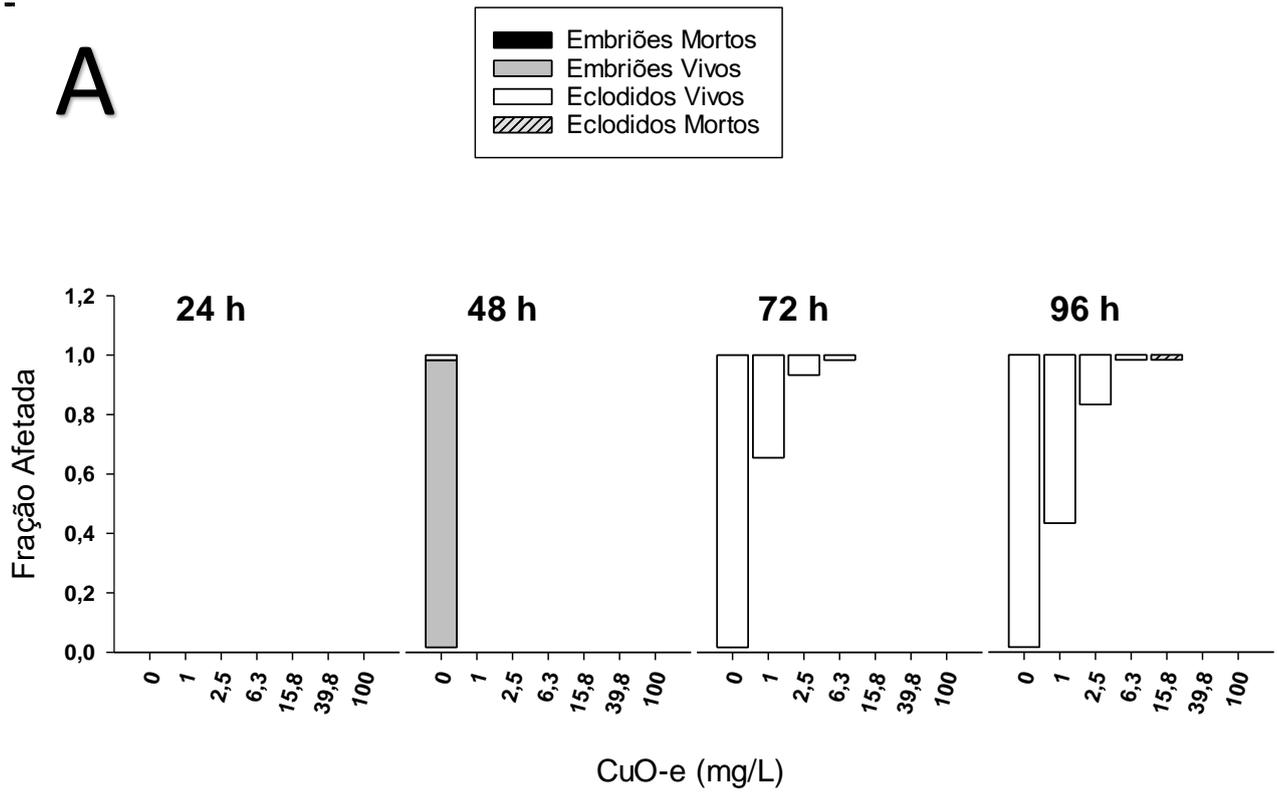
5.2. *Ensaios de ecotoxicidade e bioquímica*

Para realizar os ensaios, foram selecionados embriões de peixe zebra com idades entre 4 e 12 horas. Após a seleção, eles foram expostos a diferentes concentrações de cada uma das CuO-np. Os experimentos foram conduzidos em condições controladas de temperatura, pH e luminosidade, a fim de minimizar as interferências externas. Os embriões foram colocados individualmente em

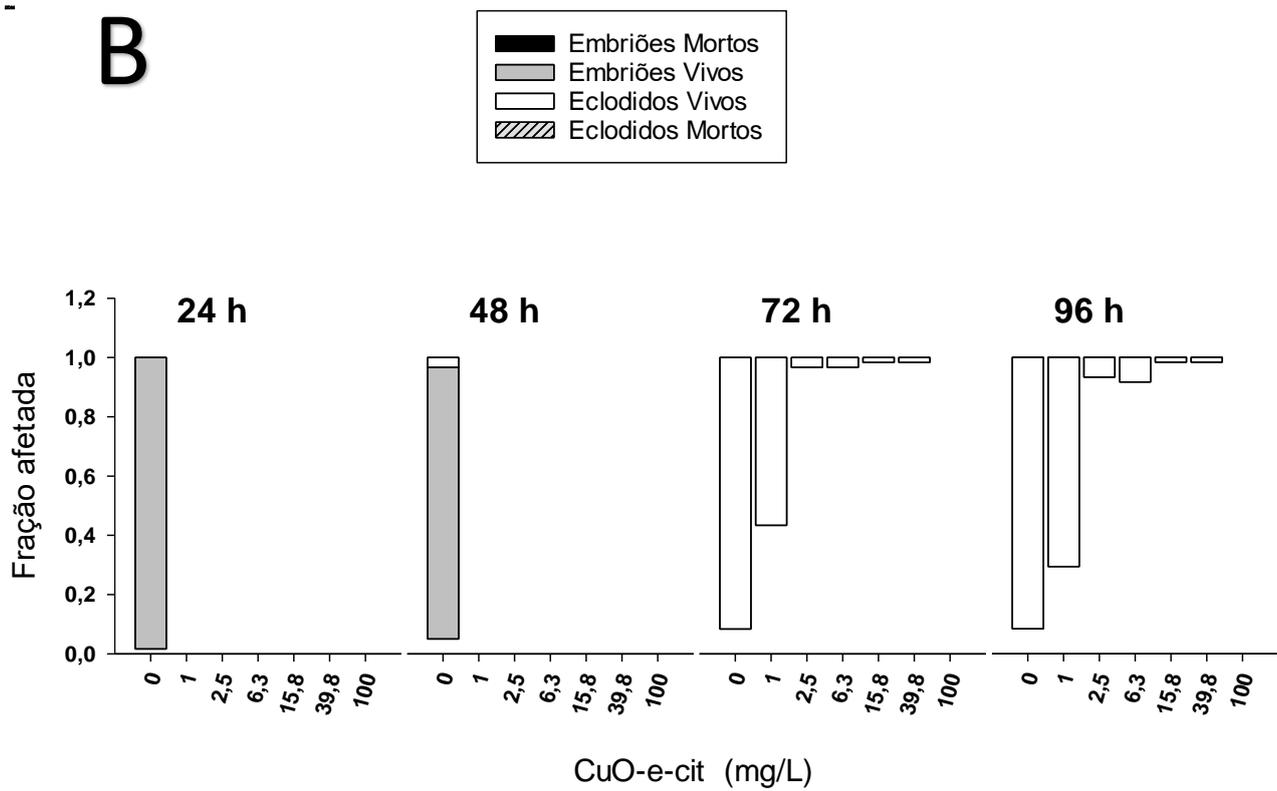
placas de cultura contendo 96 poços, e em cada uma foram adicionados 250 µL das suspensões aquosas das partículas em estudo.

A Figura 25 apresenta a fração de embriões de peixe-zebra afetada por diferentes concentrações de CuO-np e em diferentes tempos de exposição. No geral, os resultados mostram que nas primeiras 24 horas de exposição ocorre uma taxa elevada de mortalidade, principalmente em concentrações mais elevadas de nanopartículas ($\geq 2,5$ mg/L). Também, é possível observar que nanopartículas diferentes têm taxas de toxicidade diferentes. Notavelmente, as CuO-e, independentemente do revestimento com citrato, são as menos tóxicas (Figuras 25A e 25B). O efeito benéfico do revestimento com citrato nesse formato de nanopartícula é muito mais expressivo, como pode ser notado na Figura 25B. Isso ocorre pois a fração morta de embriões diminui drasticamente e numa faixa que se estende até 6,3 mg/L de nanopartícula (Figura 25B, 96h de exposição). No entanto, essas nanopartículas interferem no ciclo evolutivo, atrasando a eclosão dos ovos. Em contrapartida, as CuO-b e CuO-b-cit são muito mais tóxicas (Figuras 25C e 25D), causando a morte dos embriões com uma dose muito menor (2,5 mg/L). Aparentemente, o revestimento de citrato tem pouca influência sobre esse comportamento. No entanto, isso só poderá ser confirmado pelo valor de LC50, como será apresentado mais adiante. Quando comparadas as nanoestruturas com diferentes formatos, sem revestimento e com revestimento, sendo as nanopartículas em formato esférico menos nocivas aos organismos quando revestidas, este resultado também é esperado para as nanopartículas em formato de bastão.

A



B



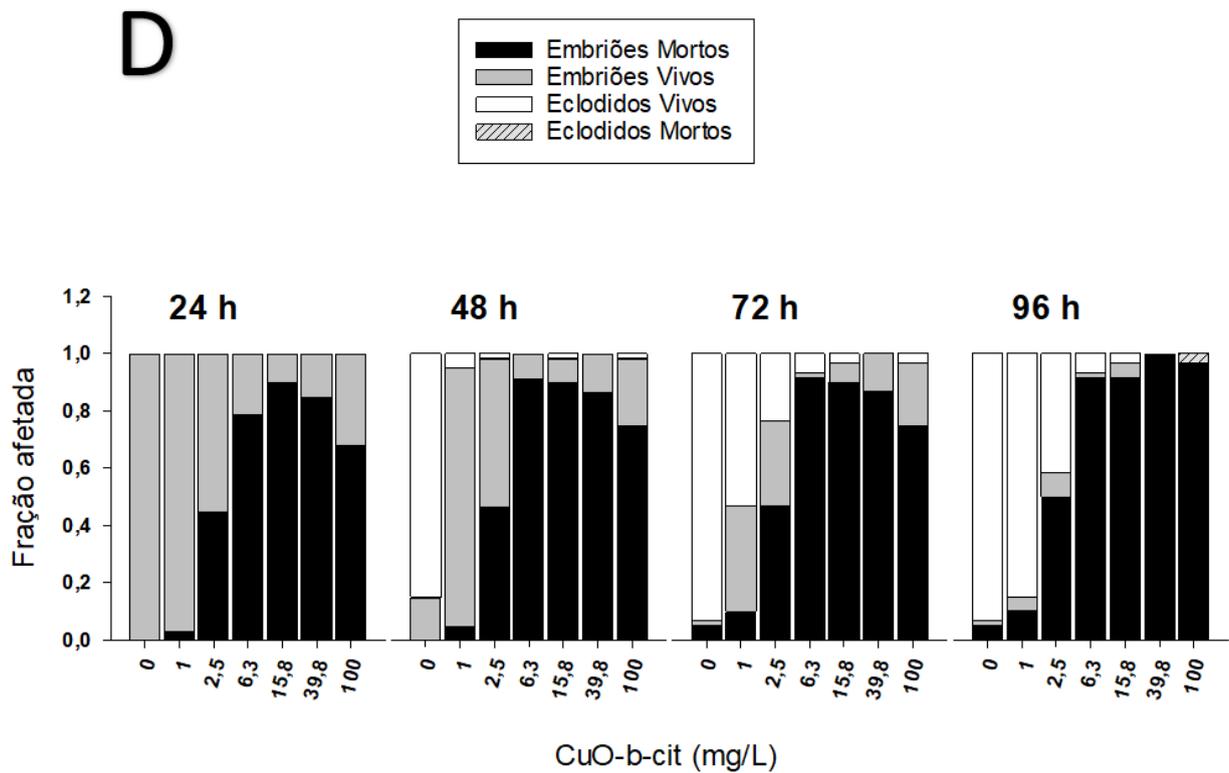
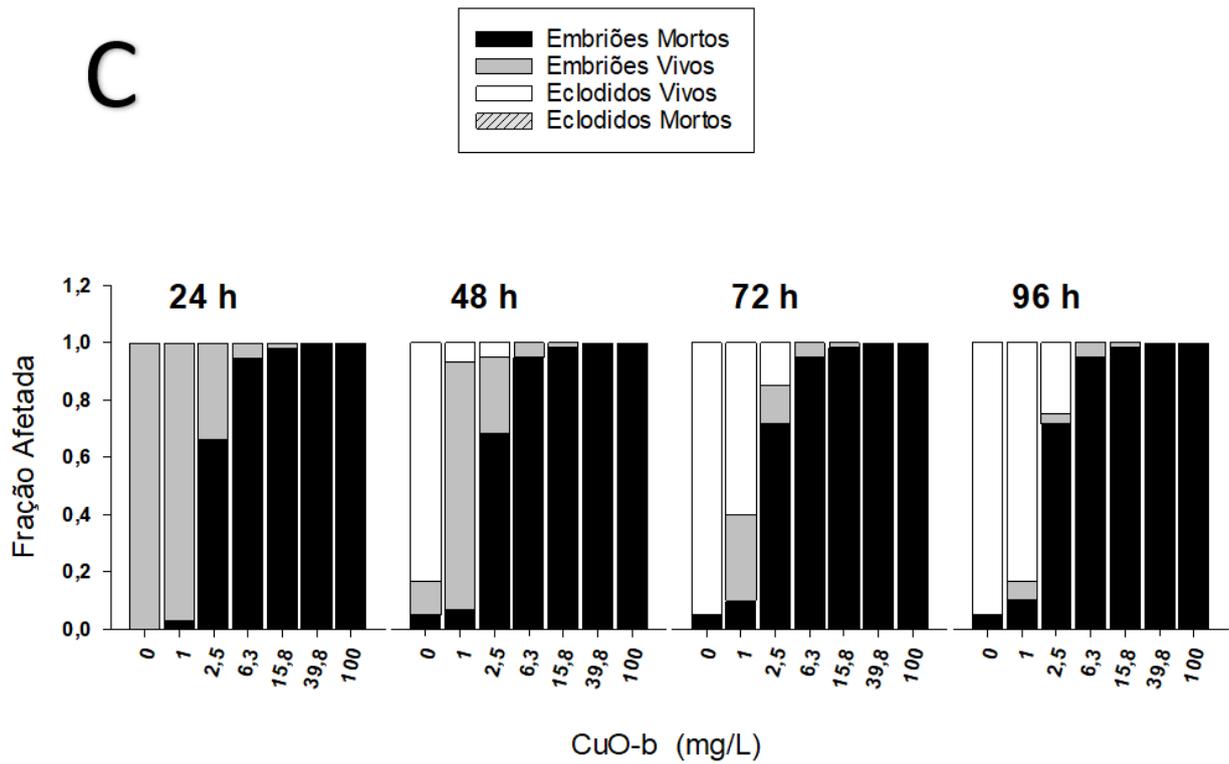


Figura 25. Fração de embriões de peixe-zebra afetada por diferentes concentrações de CuO-np determinada em diferentes tempos de exposição.

No teste, foram avaliados diferentes parâmetros para determinar os efeitos do CuO-np sobre os embriões. Os parâmetros avaliados foram: taxa de mortalidade, desenvolvimento morfológico, tempo para a eclosão dos ovos, formação de órgãos internos, batimento cardíaco e atividade locomotora.

As análises evidenciaram que as CuO-np em ambos os formatos apresentaram diferentes níveis e características de toxicidade para os embriões, em diferentes estágios de seu desenvolvimento, as alterações observadas vão desde morfológicas até bioquímicas, tanto em embriões como nas larvas após a eclosão, sendo que as partículas sem revestimento de citrato e, independentemente do formato testado, se mostram mais tóxicas para os indivíduos, o revestimento com citrato nos testes biológicos se mostra eficiente, promovendo redução na mortalidade dos indivíduos e redução das alterações estruturais quando estes são submetidos a ambientes contendo as nanopartículas revestidas, como pode ser observado na Figura 26, estas apresentam um efeito toxicológico maior do que as partículas revestidas. Esse resultado pode ser explicado pela instabilidade das partículas sem revestimento no ambiente aquático, facilitando a liberação de íons Cu^{2+} (GOMES et al., 2012; LOMBARDI et al., 2007; MANI et al., 2019; NAZ; GUL; ZIA, 2020), que podem ser prejudiciais para os organismos.

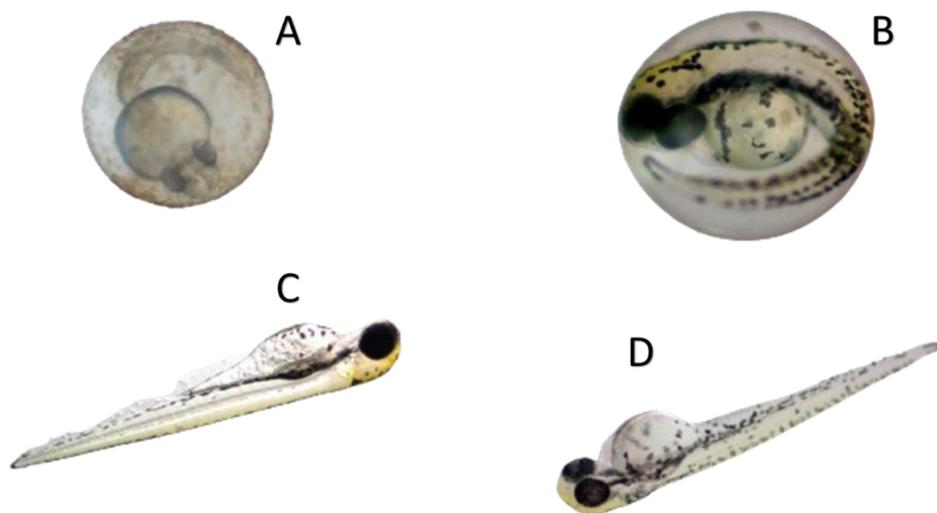


Figura 26. Efeitos toxicológicos e má formação dos embriões e larvas dos indivíduos expostos as nanopartículas, CuO-e (A) e (C) e CuO-b (B) e (D). Fonte: Própria

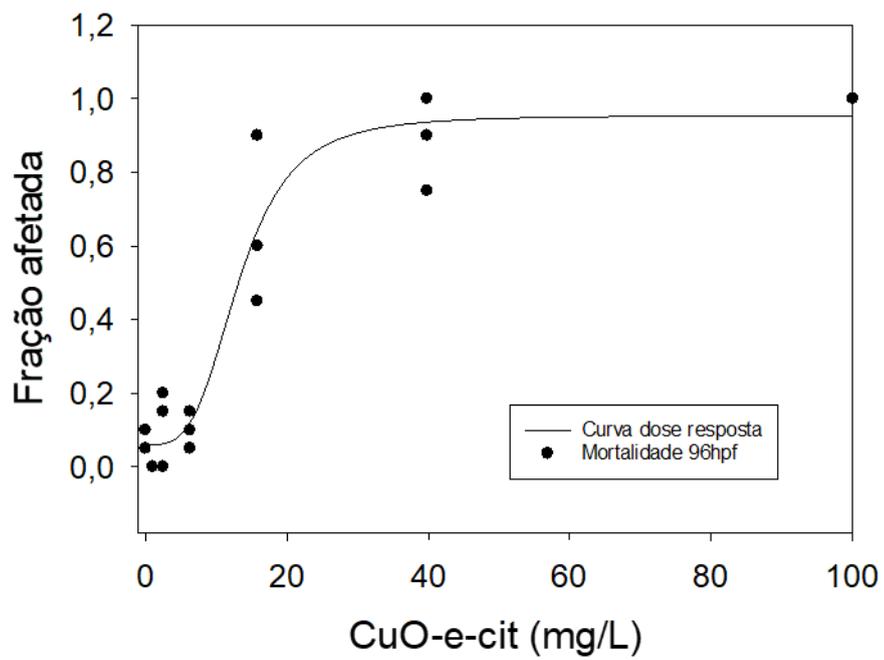
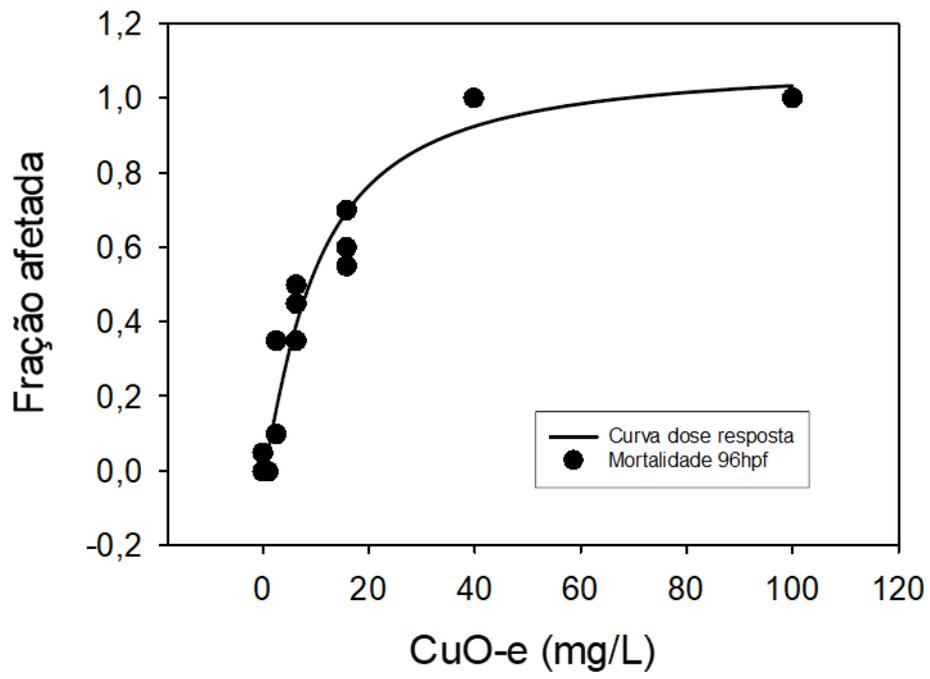
Os ensaios ecotoxicológicos evidenciaram que variações de concentração no meio influenciam na toxicidade do meio, sendo que concentrações mais elevadas das partículas em ambos os formatos resultam em aumento proporcional da toxicidade. Os embriões de *zebrafish* expostos a concentrações mais elevadas apresentaram uma redução elevada na sobrevivência, além de atrasos no desenvolvimento e maior índice de anormalidades morfológicas.

A Figura 27 apresenta as curvas de fração afetada (morte) após 96 h de exposição *versus* concentração de CuO-nps. Os valores de LC₅₀ foram obtidos a partir de um ajuste dos dados experimentais com uma função dose-resposta foram plotados no SigmaPlot utilizando as equações Sigmoidal; Logística, 4 Parâmetros apresentada na Equação 2. e Sigmoidal; Weibull, 4 Parâmetros, apresentada na Equação 3.

$$(2) \quad f = \begin{cases} \text{if}(x \leq 0; \text{if}(b < 0; y_0; y_0 + a); \\ \text{if}(b > 0; y_0 + a / (1 + \text{abs}(x/x_0)^b); \\ y_0 + a * \text{abs}((x/x_0))^{(\text{abs}(b))} / (1 + (\text{abs}(x/x_0))^{\text{abs}(b)})) \end{cases}$$

$$(3) \quad f = \begin{cases} \text{if}(x \leq x_0 - b * \ln(2)^{1/c}; 0; \\ a * (1 - \exp(-(\text{abs}(x - x_0 + b * \ln(2)^{1/c}) / b)^c)) \end{cases}$$

Os resultados obtidos são apresentados na Tabela 4. e mostram a diferença de toxicidade entre as nanopartículas analisadas quando estas interagem com o organismo dos *zebrafish*.



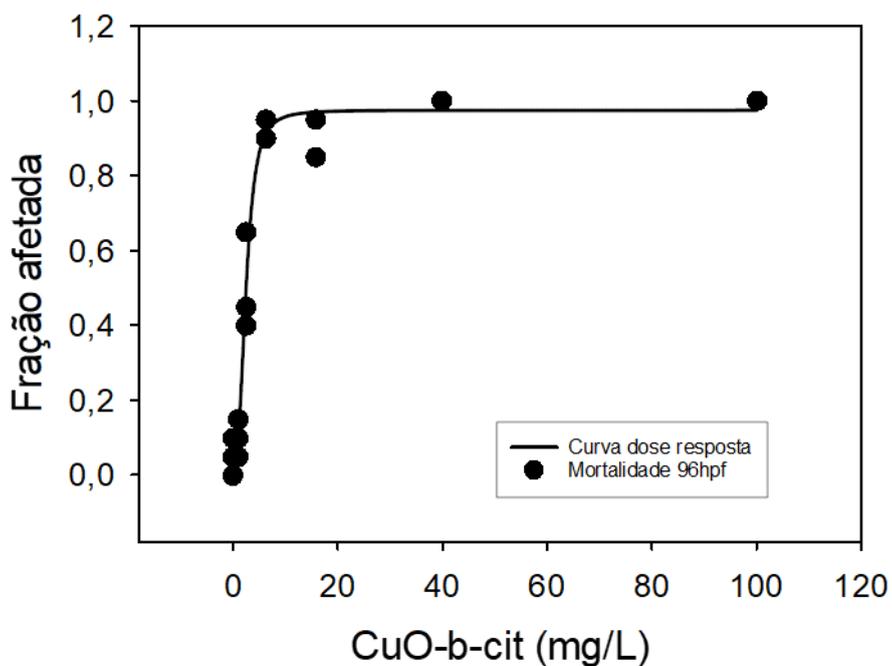
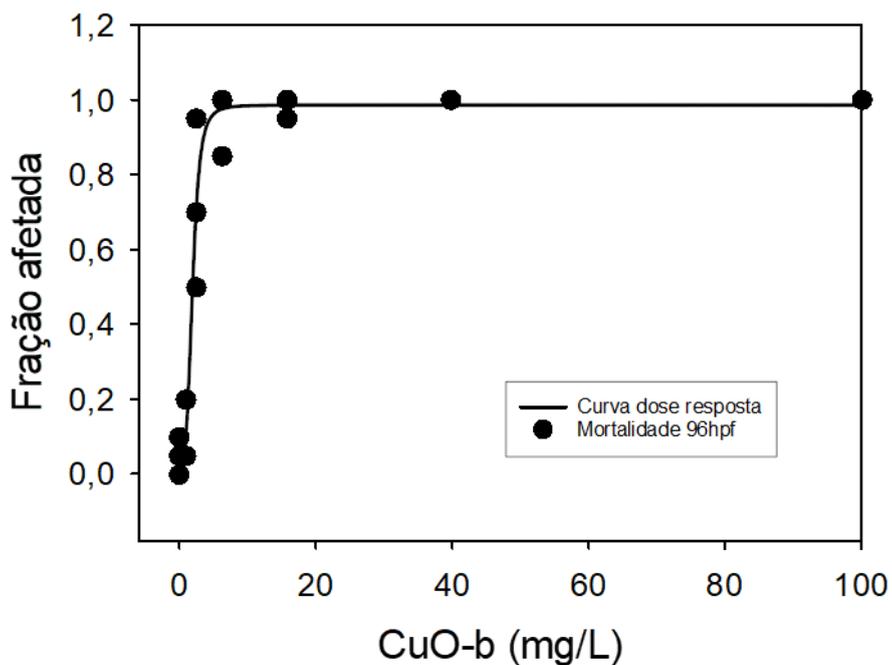


Figura 27. LC₅₀ obtidas a partir dos ensaios com as nanopartículas em diferentes formatos.

Observa-se que as CuO-b e CuO-b-cit são mais letais, uma vez que os valores de LC₅₀ para essas nanopartículas é maior. Os valores são da ordem de dezenas de miligramas por litro, o que pode ser considerado muito menos tóxico. Além disso, evidencia-se a redução da toxicidade com o revestimento de citrato. Para as amostras CuO-b, a redução é da ordem de 24,17%, enquanto que

para as CuO-e a redução é de 35,74%.

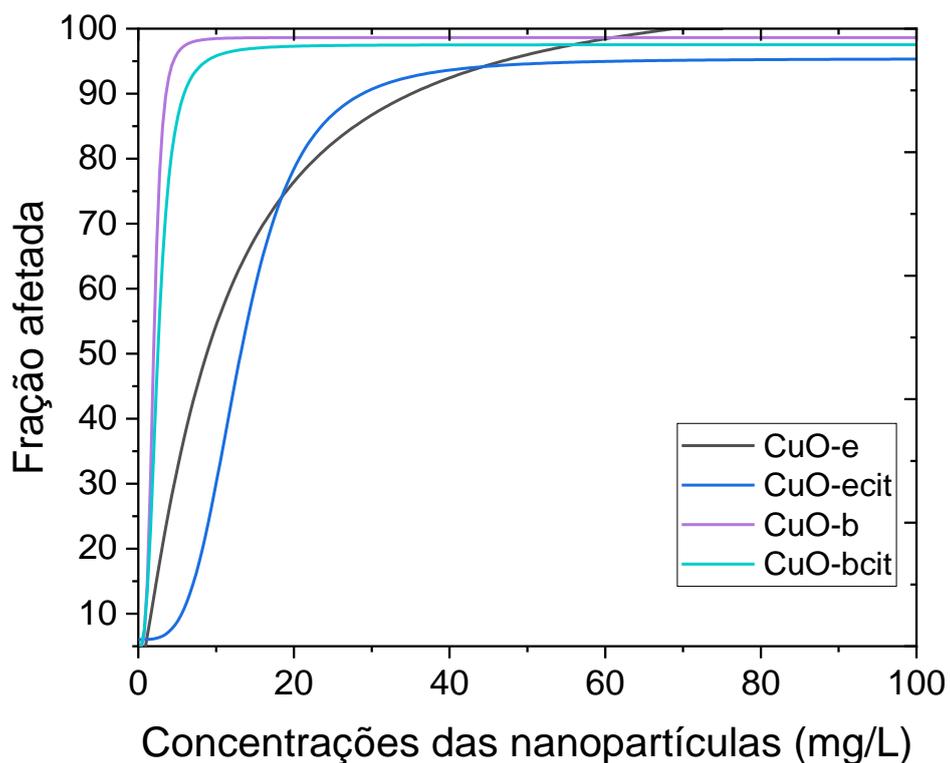


Figura 28. LC₅₀ obtidas a partir dos ensaios com as nanopartículas em diferentes formatos e com cobertura.

Tabela 4. Valores de LC₅₀ obtidos para as partículas em diferentes formatos.

| CuO B | CuO Bcit | CuO E | CuO Ecit |
|------------------------------------|-------------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| LC _{50 (96h)} = 9,99 mg/L | LC _{50 (96h)} = 13,27 mg/L | LC _{50 (96h)} = 16,0 mg/L | LC _{50 (96h)} = 24,9 mg/L |
| R ² = 0,96 | R ² = 0,94 | R ² = 0,95 | R ² = 0,97 |
| Modelo: Logística 4 | Modelo: Logística 4 | Modelo: Sigmóide 4 | Modelo: Sigmóide 4 |
| Parametros | parametros | parametros | parametros |
| P < 0,0001 | P < 0,0001 | P < 0,0001 | P < 0,0001 |

Na Figura 29 são apresentadas fotografias digitais de alguns embriões após 96 h de exposição às CuO-np. Nota-se que a aderência ao córion ocorre de maneira diferente para cada nano partícula, o que certamente afeta os embriões de diferentes maneiras, todas as nanopartículas, devido ao seu tamanho que de acordo com os testes de caracterização realizados apresentaram tamanhos entre 10,5 e 22 nm, sendo muito menor que os poros presentes no córion, que apresentam em média 1µm de diâmetro, dessa forma, todas as nanopartículas podem passar pelo córion e interagir diretamente com o embrião. Observa-se ainda que as CuO-b e CuO-b-cit apresentam-se mais aglomeradas e por isso tendem a cobrir a parte externa do córion com maior facilidade que as CuO-e e CuO-e-cit, que se apresentam mais dispersas, afetando os indivíduos, nessa fase de maneira diferente, pois ao bloquear a parte externa, a troca de nutrientes, água, e a interação com o meio é prejudicada, o que pode justificar o fato de as nanopartículas em formato de bastão serem mais nocivas para os indivíduos, ainda corroborando com este fato, os testes indicam que o revestimento com citrato faz com que as partículas tornem-se mais dispersas cobrindo menos a estrutura externa dos ovos e causando menor letalidade dos indivíduos.

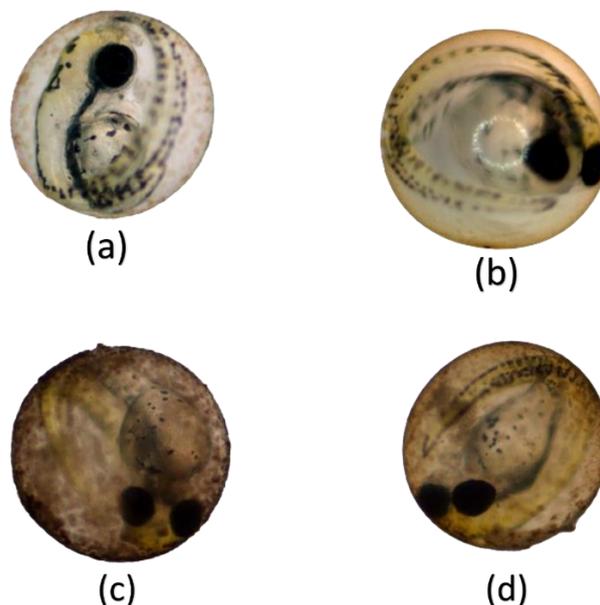


Figura 29. Fotografias de ovos de peixe-zebra após incubação de 96h com CuO-np a 39,5 mg.L⁻¹: (a) CuO-e, (b) CuO-e-cit, (c) CuO-b e (d) CuO-b-cit. As setas indicam a presença de CuO-nps no córion.

Alguns dos receptores táteis na pele dos zebrafish, como os corpúsculos de Meissner, são sensíveis a estímulos de toque leve e podem desencadear respostas comportamentais quando estimulados. (DUBEY; GHOSH; SINGH, 2022; LIN; CHIANG; TSAI, 2016; SNEDDON, 2011), tal interação sugere que as CuO-e e CuO-e-cit, em comparação com as partículas de formato de bastão, podem interagir mais efetivamente com esses receptores, potencialmente desencadeando respostas comportamentais devido a diferença na superfície de contato das nanoestruturas.

Além disso, os *zebrafish* possuem receptores de dor semelhantes aos nociceptores encontrados em outros vertebrados, que detectam estímulos dolorosos. (BAUER; MALLY; LIEDTKE, 2021; LIN; CHIANG; TSAI, 2016). As CuO-nps, especialmente aquelas com formas esféricas, podem interagir com esses receptores de dor, pois graças ao seu formato a interação entre as nanopartículas e os receptores é mais provável, desencadeando respostas nociceptivas se forem percebidas como irritantes ou nocivas. Sabe-se que o formato das nanopartículas pode afetar sua capacidade de interagir com os receptores sensoriais da pele dos *zebrafish*, sugerindo que nanopartículas em formato de bastão podem ter uma maior capacidade de penetrar na pele dos peixes devido à sua forma e tamanho, o que pode desencadear uma resposta biológica mais direta, como uma resposta inflamatória localizada. (GEORGE et al., 2018).

As propriedades estruturais das nanopartículas na sua interação com organismos aquáticos (LI et al., 2014), particularmente o arranjo dos átomos de nanopartículas que apresentam diferentes planos cristalográficos expostos podem influenciar a maneira como as nanopartículas interagem com os sistemas biológicos. As CuO-nps em formato esférico, cujo plano cristalográfico exposto inclui a face $\{-202\}$, tende a ter uma grande área superficial, assim como as CuO-nps em formato de bastão, que expõem principalmente a face $\{111\}$ (GEORGE et al., 2018). Essa diferença na exposição de planos cristalográficos pode afetar a interação das nanopartículas com os receptores sensoriais da pele dos peixes. Enquanto as CuO-nps esféricas, podem interagir mais efetivamente com os receptores táteis e de dor na pele dos peixes, as nanopartículas em formato de bastão, com

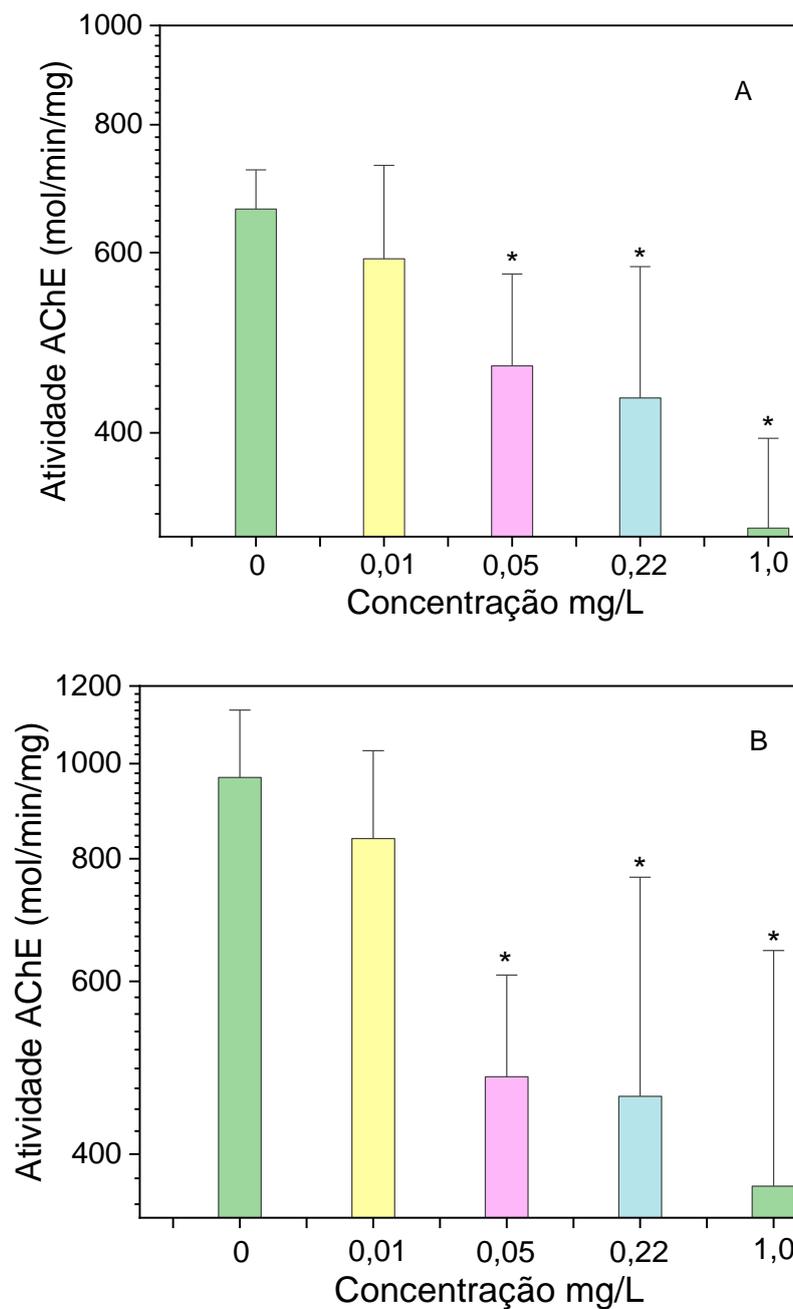
uma maior capacidade de penetrar na pele, podem desencadear uma resposta inflamatória localizada mais pronunciada (GEORGE et al., 2018). No entanto, mais pesquisas são necessárias para entender completamente os mecanismos subjacentes a essas interações e seus impactos na saúde e no comportamento dos peixes.

A partir dos dados obtidos experimentalmente, é possível verificar que há diferenças de interação entre as nanopartículas e os *zebrafish* quando ocorre variação no formato destas, pois a cobertura feita por citrato não proporciona diferenças significativas na inibição da AChE, sendo pouco expressiva nos testes toxicológicos, o que sugere que a cobertura influencia na interação destas nanopartículas e os receptores presentes na derme dos embriões, porém sem produzir diferenças significativas nos resultados obtidos, como pôde ser observado ao comparar os gráficos da Figura 30A e 30B e os gráficos 30C e 30D.

Os dados apresentam diferenças nas LC50 obtidas, tais parâmetros corroboram para mostrar o quanto tais estruturas podem ser tóxicas e como a diferença de formato pode alterar a toxicidade, a presença de cobre nas nanoestruturas as quais os indivíduos foram expostos, mostram que nanopartículas metálicas apresentam alta toxicidade (ASHARANI et al., 2008), porém outro fator que irá diferenciar a toxicidade destas CuO-np é o tamanho, pois as partículas apresentam diferentes tamanhos e sabe-se que quanto maior a área de contato destas nanoestruturas, maior será sua toxicidade no organismo, já que a relação área superficial-volume, facilita a interação com células e tecidos no organismo (MOREIRA et al., 2021; NEL et al., 2006) outro fator relevante é o formato destas CuO-np já que partículas com diferentes formatos podem interagir de formas diferentes e com estruturas diversas em um organismo (CHO et al., 2013) Além disso, o revestimento aplicado a estas nanoestruturas irá modificar a forma de interação das CuO-np com os órgãos dos *zebrafish*, proporcionando aos embriões efeitos toxicológicos variados, vale ressaltar que o revestimento com citrato, altera a carga superficial da nanoestrutura, o que certamente reflete no comportamento desta em uma solução e altera a resposta produzida pelo organismo exposto a nanopartícula (PETERSEN

et al., 2014).

A análise da atividade da enzima acetilcolinesterase (AChE) realizada nos embriões de *zebrafish* expostos a CuO-np em formatos de bastão e esfera revelou resultados significativos sobre a inibição da AChE, como evidenciado na Figura 30. A faixa de concentração testada variou de 0,01 mg L⁻¹ a 1,00 mg L⁻¹. Os gráficos demonstraram uma inibição significativa da atividade da AChE em todos os grupos expostos às nanopartículas de CuO, quando comparados ao grupo controle.



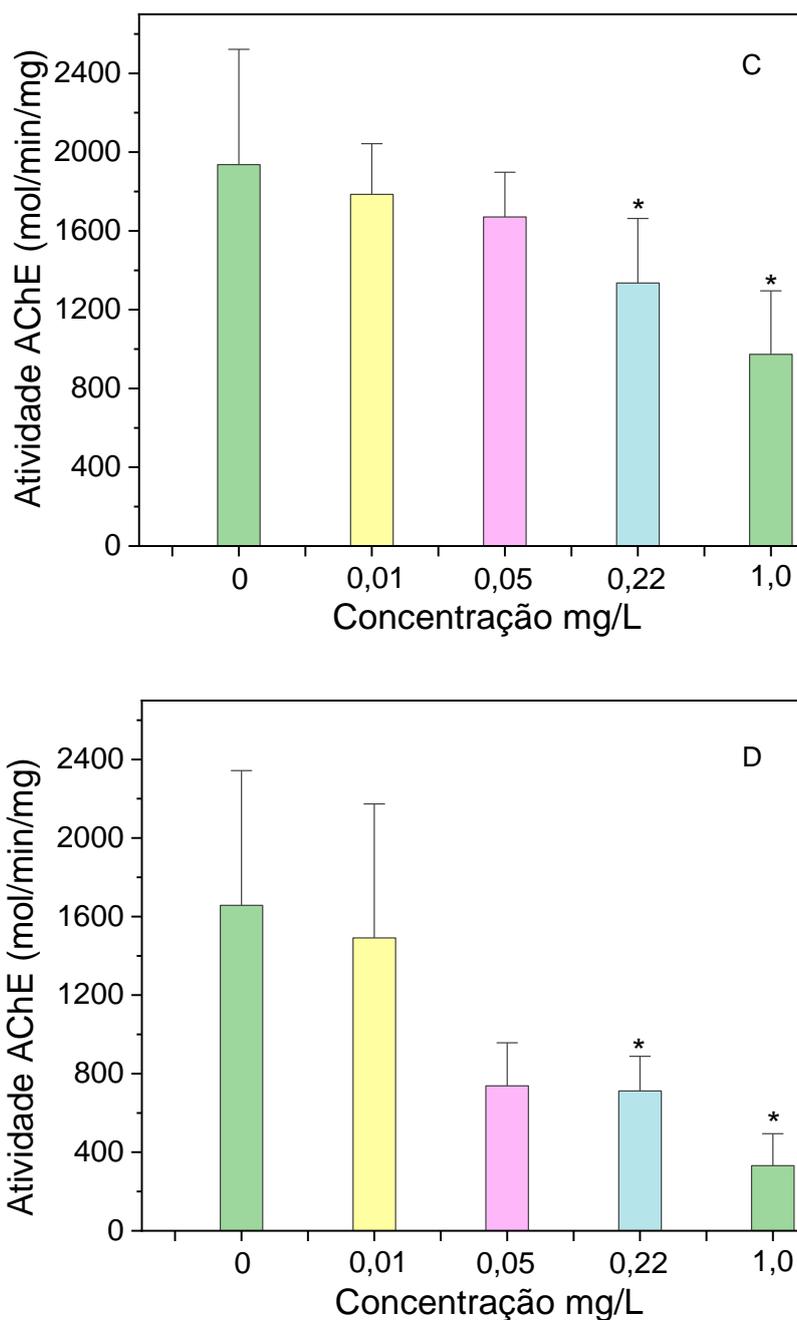


Figura 30. Atividade de AChE após 96h de exposição com diferentes concentrações de CuO-np: (A) CuO-b, (B) CuO-b-cit, (C) CuO-e e (D) CuO-e-cit.

A análise experimental permitiu observar diferença entre os dois formatos de nanopartícula, sendo que as nanopartículas em formato de bastão demonstraram uma capacidade de inibição maior em comparação com as de formato esférico, independentemente da cobertura de citrato. Ademais, não foram observadas diferenças significativas entre as nanopartículas em formato de bastão, com

e sem cobertura, porém os dados corroboram com os resultados prévios que sugeriam uma menor nocividade das partículas com cobertura em comparação com aquelas sem revestimento.

Analisando os dados, observou-se uma inibição significativa da atividade da AChE nos embriões de *zebrafish* expostos às concentrações de 0,22 mg .L⁻¹ e 1,00 mg .L⁻¹ de nanopartículas de CuO em ambos os formatos, quando comparadas ao grupo controle.

Estes resultados endossam observações anteriores de que o tamanho e o formato das nanopartículas desempenham papéis cruciais na determinação de sua toxicidade. Embora todas as nanopartículas tenham demonstrado inibição da atividade da AChE, as diferenças entre os formatos de bastão e esfera indicam uma influência significativa da morfologia na magnitude da resposta biológica. Portanto, é essencial considerar não apenas a concentração, mas também a morfologia das nanopartículas ao avaliar os riscos ambientais associados a esses materiais, destacando a necessidade de uma abordagem abrangente na avaliação de sua segurança ambiental e potenciais efeitos adversos sobre organismos aquáticos.

A partir da análise realizada foi possível notar diferenças de toxicidade e efeitos toxicológicos, as nanopartículas em formato de bastão apresentam uma elevada área de superfície de contato, o que proporciona uma maior absorção pelos embriões (LIU; GUO; CHEN, 2022), levando a uma maior bioacumulação de cobre nos tecidos dos peixes. Isso resultou em alterações bioquímicas mais pronunciadas, incluindo um aumento nos níveis de estresse oxidativo, conforme pode ser observado na Figura 30. Isso permite avaliar modificações na atividade da AChE, indicando potenciais distúrbios na neurotransmissão e no desenvolvimento neural dos *zebrafish*. Paralelamente, as nanopartículas em formato de esferas apresentam uma geometria que pode influenciar as interações com as células, afetando a biodisponibilidade e os efeitos na atividade da AChE (WANG et al., 2019). Sabe-se que ambas as nanopartículas podem interagir com os embriões, visto o seu pequeno tamanho e o grande tamanho dos poros do córion dos ovos dos embriões, porém a interação com os indivíduos se dá de diferentes maneiras sendo necessário avaliar o formato, e os

planos cristalográficos expostos, pois a depender do plano exposto a interação da nanoestrutura com o indivíduo pode variar e trazer diferenças nos resultados obtidos em ensaios toxicológicos, como abordado anteriormente.

6. Conclusão

Este trabalho buscou avaliar os efeitos do formato e cobertura de nanopartículas de óxido de cobre sobre a sua ecotoxicidade, usando embriões de peixe zebra como biosensores.

Por meio de uma revisão detalhada da literatura, foi possível verificar a importância e os desafios relacionados a sua síntese e ao uso de nanopartículas aplicadas a áreas de pesquisa, incluindo a nanotecnologia e a toxicologia ambiental. A escolha do óxido de cobre como material de estudo se mostrou pertinente devido às suas propriedades únicas e sua vasta gama de aplicações em diferentes campos.

Através de técnicas de síntese química de precipitação, foram obtidas nanopartículas de óxido de cobre nos formatos de bastão e esfera, e sobre estas estruturas foi inserido o revestimento de citrato. As diferentes rotas de síntese permitiram a obtenção de partículas com tamanhos e morfologias controladas, o que se mostrou fundamental para as análises subsequentes. A caracterização detalhada dessas nanopartículas foi realizada por meio de diferentes técnicas, como microscopia eletrônica de transmissão (MET), espectroscopias de absorção na região do ultravioleta-visível (UV-Vis) e Raman e difratometria de raios-X (DRX). Tais caracterizações revelaram que as nanopartículas de óxido de cobre exibiam tamanhos e formas bem definidos, além de uma estrutura cristalina adequada e de acordo com a literatura. Além disso, o revestimento dessas nanopartículas, feito com citrato de sódio, mostrou-se estável e eficiente, conferindo maior estabilidade e dispersibilidade das nanoestruturas em diferentes pH's.

Em seguida, foram realizados os ensaios embriotóxicológicos (FET), comparando-se as amostras de nanopartículas de formato bastão e esférico, sem cobertura e com cobertura de citrato. Os ensaios realizados em diferentes concentrações de nanopartículas permitiram a avaliação de vários parâmetros, como sobrevivência e crescimento. Os resultados obtidos indicam que as nanopartículas de óxido de cobre não apresentam efeitos significativos na sobrevivência dos

zebrafish em concentrações baixas pois as alterações que promovem quantidades significativas de mortes e alterações toxicológicas nos indivíduos só são observadas em concentrações a partir de 6,3mg/L. No entanto, em concentrações mais elevadas, entre 8,0 e 15,6 mg/L, já demonstram alterações significativas, foram observados efeitos adversos, como diminuição na taxa de crescimento e mortalidade, além de efeitos toxicológicos. Além disso, as nanopartículas de óxido de cobre foram capazes de atravessar o córion dos ovos contendo os embriões, mostrando assim uma capacidade dessas partículas para atravessar barreiras biológicas e se acumular nos órgãos internos.

Os resultados obtidos destacam a complexidade das interações entre nanopartículas de CuO e os *zebrafish*, ressaltando a importância não apenas de avaliar as concentrações destas estruturas em diversos meios, mas também da morfologia das nanopartículas na determinação de sua toxicidade e potenciais efeitos adversos. Essas descobertas sublinham a necessidade de uma abordagem integrada e abrangente na avaliação do impacto ambiental desses materiais, enfatizando a importância de considerar não apenas os parâmetros tradicionais de toxicidade, mas também os aspectos físico-químicos das nanopartículas. A compreensão desses mecanismos é essencial para o desenvolvimento de estratégias eficazes de gestão de riscos e proteção ambiental frente ao crescente uso e dispersão de nanomateriais.

É importante destacar que compreender os efeitos das nanopartículas de óxido de cobre nos organismos aquáticos é fundamental para avaliar riscos ambientais associados ao uso e descarte destas nanoestruturas, pois óxidos metálicos como o óxido de cobre são descartados em processos diversos e chegam ao ambiente aquático, contaminando-o. Ademais, os resultados forneceram informações importantes que podem ser utilizadas no desenvolvimento de diretrizes de segurança e regulamentações no que diz respeito ao uso de nanopartículas de óxido de cobre e para a compreensão do comportamento das nanopartículas no ambiente aquático, bem como para a otimização dos métodos de síntese e obtenção de nanopartículas com diferentes formatos, a fim de

obter estruturas de menor toxicidade.

Além disso, as nanopartículas revestidas mostraram-se mais estáveis em ambos os formatos, considerando que as nanoestruturas em formatos de bastão são naturalmente mais estáveis que as nanoestruturas em formato de esferas, as nanopartículas revestidas apresentaram menor toxicidade em comparação com as não revestidas. Isso sugere que o revestimento de citrato pode desempenhar um papel crucial na redução de vários efeitos tóxicos das nanopartículas e, com isso, produzir melhorias a respeito de suas aplicabilidades em diferentes áreas, como a ecotoxicologia e medicina.

Esse trabalho contribui significativamente para o conhecimento sobre as propriedades, caracterização e aplicações das nanopartículas de óxido de cobre, mostrando resultados relevantes para pesquisas a fim de explorar aplicações e técnicas de produção dessas partículas em diversas áreas.

Ademais, faz-se importante ressaltar que ainda existem desafios a serem superados no uso de nanopartículas em aplicações práticas, pois é necessário realizar estudos mais detalhados acerca das aplicações, sobre os mecanismos de toxicidade e os efeitos a longo prazo das nanopartículas nos organismos vivos, sendo assim torna-se fundamental a investigação de métodos de encapsulamento e controle de liberação das nanopartículas em ambientes e em organismos vivos para que assim, seja possível minimizar seus impactos negativos e maximizar seus benefícios em aplicações específicas.

Em resumo, a análise, caracterização e aplicação de nanopartículas de óxido de cobre em formatos de bastão e esferas, com e sem revestimento feito por citrato, demonstraram seu potencial em diversas áreas, embora a toxicidade e os efeitos adversos exijam uma investigação aprofundada. O avanço nesse campo requer uma abordagem cuidadosa e responsável, visando à maximização dos benefícios das nanopartículas, enquanto se minimizam seus impactos negativos sobre a saúde humana em relação ao seu descarte no meio ambiente.

7. Perspectivas

A avaliação toxicológica de nanoestruturas de CuO empregando embriões de zebrafish como biossensores emerge como um campo promissor, suscitando novas reflexões e desafios pertinentes à compreensão dos impactos ambientais e à salvaguarda da segurança em relação aos nanomateriais. Os resultados obtidos até o presente momento estabelecem uma fundação robusta, propiciando um terreno fértil para indagações posteriores e aplicações pragmáticas. Este capítulo almeja delinear perspectivas críticas que possam direcionar investigações futuras, proporcionando contribuições substantivas ao campo em análise.

7.1.Exploração Aprofundada dos Mecanismos de Toxicidade

A despeito dos avanços alcançados na caracterização dos efeitos adversos das nanoestruturas de CuO nos embriões de peixe-zebra, a necessidade de uma incursão mais aprofundada nos mecanismos subjacentes torna-se imperativa. A investigação meticulosa dos caminhos bioquímicos e moleculares imbricados nas respostas adversas se revela como uma via propícia à obtenção de insights significativos acerca dos processos intrínsecos de toxicidade. A aplicação de metodologias avançadas, como a transcriptômica e proteômica, desponta como essencial para a identificação precisa de alterações em escala molecular, facultando uma apreciação mais abrangente dos eventos celulares desencadeados pelas nanoestruturas.

7.2.Considerações sobre os Impactos a Longo Prazo

O predomínio de estudos toxicológicos e ecotoxicológicos com enfoque em avaliações de curto prazo constitui um parâmetro digno de atenção. Entretanto, a compreensão holística dos impactos a longo prazo das CuO-np sobre o desenvolvimento e comportamento dos organismos figura como uma imperiosidade para avaliações de risco. A análise das implicações a longo prazo

engloba o monitoramento contínuo de parâmetros como crescimento, reprodução e comportamento dos *zebrafish* expostos, proporcionando uma perspectiva mais abrangente dos efeitos desses nanomateriais ao longo de todo o ciclo de vida.

7.3.Estratégias de Mitigação e Remediação.

À medida que a disseminação de CuO-np se intensifica em diversas esferas industriais, a concretização de estratégias eficazes de mitigação e remediação se torna premente sobre os impactos ambientais. A pesquisa direcionada à identificação de métodos de remoção ou inativação de nanoestruturas tóxicas após sua liberação no ambiente emerge como uma trilha promissora de investigação. Ademais, a proposição e desenvolvimento de materiais alternativos, pautados na segurança ambiental e sustentabilidade, figura como uma abordagem proativa, visando reduzir a dependência de nanoestruturas com potencial impacto adverso.

7.4.Integração Sinérgica de Abordagens Multidisciplinares

A avaliação toxicológica de CuO-np em embriões de peixe-zebra constitui um campo intrincado, cuja resolução se beneficia sobremaneira da sinergia entre disciplinas distintas. A fusão de conhecimentos oriundos da química, toxicologia, nanotecnologia e biologia molecular é uma prerrogativa indispensável para a obtenção de uma compreensão abrangente dos riscos associados. A promoção da interdisciplinaridade, nesse sentido, não apenas acelera o desenvolvimento de metodologias mais eficazes, mas também viabiliza uma interpretação de resultados mais contextualizada.

7.5.Potencialidades na Aplicação em Monitoramento Ambiental

Além das implicações inerentes à avaliação toxicológica, a utilização de embriões de peixe-zebra como biossensores oferece perspectivas fascinantes para aplicações práticas no âmbito do

monitoramento ambiental. A implementação de sistemas automatizados de detecção, fundamentados em biossensores, desponta como uma ferramenta inestimável para alertar sobre a presença de nanoestruturas tóxicas em tempo real. Tal abordagem se erige como um recurso estratégico, facultando respostas ágeis e eficazes para minimizar os danos ambientais decorrentes da presença desses nanomateriais.

Em síntese, a presente dissertação figura como uma contribuição para a compreensão dos efeitos toxicológicos das CuO-np em embriões de peixe-zebra. As perspectivas delineadas no presente capítulo aspiram orientar investigações subsequentes, realçando a importância de uma abordagem holística e multidisciplinar no enfrentamento dos desafios emergentes. O compromisso continuado com a pesquisa e inovação representa uma premissa crucial para o avanço de nosso entendimento e assegura a promoção do desenvolvimento sustentável de nanomateriais na contemporaneidade.

8. Referências Bibliográficas

- AKSAKAL, F. I.; CILTAS, A. Impact of copper oxide nanoparticles (CuO NPs) exposure on embryo development and expression of genes related to the innate immune system of zebrafish (*Danio rerio*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 223, p. 78–87, 1 set. 2019.
- AMIN, GUL. **ZnO and CuO Nanostructures**. [s.l.] Linkopings Universitet, 2012.
- AMORIM, M. J. B.; SCOTT-FORDSMAND, J. J. Toxicity of copper nanoparticles and CuCl₂ salt to *Enchytraeus albidus* worms: Survival, reproduction and avoidance responses. **Environmental Pollution**, v. 164, p. 164–168, maio 2012.
- ASHARANI, P. V. et al. Toxicity of silver nanoparticles in zebrafish models. **Nanotechnology**, v. 19, n. 25, 25 jun. 2008.
- ATA, S. et al. **Lead remediation using smart materials. A review**. **Zeitschrift fur Physikalische Chemie** De Gruyter Open Ltd, , 2019.
- AVONI, C. B.; PALEARI, A.; PARRAVICINI, G. B. **On the low-temperature magnetic properties of CuO single crystals**. **J. Phys.: Condens. Matter**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://iopscience.iop.org/0953-8984/4/5/015>>.
- BARATA, C.; SOLAYAN, A.; PORTE, C. Role of B-esterases in assessing toxicity of organophosphorus (chlorpyrifos, malathion) and carbamate (carbofuran) pesticides to *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**, v. 66, n. 2, p. 125–139, 10 fev. 2004.
- BAUER, B.; MALLY, A.; LIEDTKE, D. **Zebrafish embryos and larvae as alternative animal models for toxicity testing**. **International Journal of Molecular Sciences** MDPI, , 1 dez. 2021.
- BERTOLETTI, E.; BERTOLETTI, E. **Ecotoxicologia Acuática: Princípios e Aplicações**. [s.l.: s.n.].
- BONDARENKO, O. et al. **Toxicity of Ag, CuO and ZnO nanoparticles to selected environmentally relevant test organisms and mammalian cells in vitro: A critical review**. **Archives of Toxicology**, jul. 2013.
- BOSSUYT, B. T. A.; JANSSEN, C. R. Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: Changes in tolerance and physiology. **Aquatic Toxicology**, v. 68, n. 1, p. 61–74, 28 maio 2004.
- BOURNE, L. C. et al. High-pressure electrical conductivity measurements in the copper oxides. **Physical Review B**, v. 40, n. 16, p. 10973–10976, 1989.
- BRADFORD, M. M. **A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding**. **ANALYTICAL BIOCHEMISTRY**. [s.l.: s.n.].
- CELSO, A. et al. **In vivo effects of metals on the acetylcholinesterase activity of the Perna perna mussel's digestive gland**. **Revista Biotemas**. [s.l.: s.n.].
- CHIBBER, S.; SHANKER, R. **Can CuO nanoparticles lead to epigenetic regulation of antioxidant enzyme system?** **Journal of Applied Toxicology** John Wiley and Sons Ltd, , 1 jan. 2017.
- CHO, W. S. et al. Predictive value of in vitro assays depends on the mechanism of toxicity of metal oxide nanoparticles. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 10, n. 1, 25 out. 2013.
- CHOWDHURY, S.; BASU, A.; KUNDU, S. Green synthesis of protein capped silver nanoparticles from phytopathogenic fungus *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid with antimicrobial properties against multidrug-resistant bacteria. **Nanoscale Research Letters**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2014.
- Collecting the World**. . [s.l.: s.n.].
- COOK, E.; LABIENTO, G.; CHAUHAN, B. P. S. **Fundamental methods for the phase transfer of nanoparticles**. **Molecules** MDPI, , 1 out. 2021.
- CORRIU, ROBERT.; NGUYÊN, T. A. **Chimie moléculaire, sol-gel et nanomatériaux**. [s.l.] Éditions de l'École polytechnique, 2008.
- DAL SANTOS, M. A. et al. Filmes finos nanoestruturados de dióxido de estanho obtidos pelo método dos precursores poliméricos. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 32, n. 2, p. 243–254, 2 dez. 2012.
- DELGADO, K. et al. Polypropylene with embedded copper metal or copper oxide nanoparticles as a novel plastic antimicrobial agent. **Letters in Applied Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 50–54, 2011.
- DHINESHBABU, N. R. et al. Study of structural and optical properties of cupric oxide nanoparticles. **Applied Nanoscience (Switzerland)**, v. 6, n. 6, p. 933–939, 1 ago. 2016.

DI BUCCHIANICO, S. et al. Multiple cytotoxic and genotoxic effects induced in vitro by differently shaped copper oxide nanomaterials. **Mutagenesis**, v. 28, n. 3, p. 287–299, maio 2013a.

DI BUCCHIANICO, S. et al. Multiple cytotoxic and genotoxic effects induced in vitro by differently shaped copper oxide nanomaterials. **Mutagenesis**, v. 28, n. 3, p. 287–299, maio 2013b.

DUBEY, A.; GHOSH, N. S.; SINGH, R. Zebrafish as An Emerging Model: An Important Testing Platform for Biomedical Science. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v. 13, n. 3, p. 1–7, 2022.

EL-TRASS, A. et al. CuO nanoparticles: Synthesis, characterization, optical properties and interaction with amino acids. **Applied Surface Science**, v. 258, n. 7, p. 2997–3001, 15 jan. 2012.

FORSYTH, J. B.; BROWN, P. J.; WANKLYND, B. M. **Magnetism in cupric oxide**. **J. Phys. C: Solid State Phys.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://iopscience.iop.org/0022-3719/21/15/023>>.

GAMARRA, D. et al. Structure-activity relationship in nanostructured copper-ceria-based preferential CO oxidation catalysts. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 111, n. 29, p. 11026–11038, 26 jul. 2007.

GANESAN, S. et al. Acute and sub-lethal exposure to copper oxide nanoparticles causes oxidative stress and teratogenicity in zebrafish embryos. **Journal of Applied Toxicology**, v. 36, n. 4, p. 554–567, 1 abr. 2016.

GAO, J.; WANG, Y.; HAO, H. Investigations on dehydration processes of trisodium citrate hydrates. **Frontiers of Chemical Science and Engineering**, v. 6, n. 3, p. 276–281, set. 2012.

GAWANDE, M. B. et al. **Cu and Cu-Based Nanoparticles: Synthesis and Applications in Catalysis**. **Chemical Reviews** American Chemical Society, , 23 mar. 2016.

GEORGE, S. et al. **Use of Zebrafish Models for the Analysis of Human Disease**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://www.gene-tools.com/>>.

GILL, T. S.; HEMA, ?; PANDER, J. **IN VIVO AND IN VITRO EFFECTS OF CADMIUM ON SELECTED ENZYMES IN DIFFERENT ORGANS OF THE FISH BARBUS CONCHONIUS HAM. (ROSY BARB)**. **Camp. Biochem. Physiol.** [s.l: s.n.].

GOMES, T. et al. Accumulation and toxicity of copper oxide nanoparticles in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis*. **Aquatic Toxicology**, v. 118–119, p. 72–79, 15 ago. 2012.

GUHA, S.; PEEBLES, D.; TERENCE WIETING US, J. **Raman and infrared studies of cupric oxide**. **Bull. Mater. Sci.** [s.l: s.n.].

HODGKINSON, V.; PETRIS, M. J. **Copper homeostasis at the host-pathogen interface**. **Journal of Biological Chemistry**, 20 abr. 2012.

HOFF, D. **The ECOTOXICology Knowledgebase Literature Search and Review Processes for Identifying and Curating Toxicity Data for Ecological Risk Assessments**. [s.l: s.n.].

HOWE, K. et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 498–503, 25 abr. 2013.

HUNTER, R. J. **Introduction to Modern Colloid Science**. [s.l: s.n.].

HUTCHINSON T~, T. H.; SOLBERG, J.; KLOPPER-SAMS, P. J. **ANALYSIS OF THE ECETOC AQUATIC TOXICITY (EAT) DATABASE III-COMPARATIVE TOXICITY OF CHEMICAL SUBSTANCES TO DIFFERENT LIFE STAGES OF AQUATIC ORGANISMS**. **Chemosphere**. [s.l: s.n.].

JADHAV, S. et al. Copper Oxide Nanoparticles: Synthesis, Characterization and Their Antibacterial Activity. **Journal of Cluster Science**, v. 22, n. 2, p. 121–129, jun. 2011.

JAN, T. et al. Structural, Raman and optical characteristics of Sn doped CuO nanostructures: A novel anticancer agent. **Ceramics International**, v. 41, n. 10, p. 13074–13079, 1 dez. 2015.

JIANG, J.; OBERDÖRSTER, G.; BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 11, n. 1, p. 77–89, jan. 2009.

KHAN, R. et al. The removal of CuO nanoparticles from water by conventional treatment C/F/S: The effect of pH and natural organic matter. **Molecules**, v. 24, n. 5, 2019.

LI, X. et al. Functional gold nanoparticles as potent antimicrobial agents against multi-drug-resistant bacteria. **ACS Nano**, v. 8, n. 10, p. 10682–10686, 28 out. 2014.

LIN, C. Y.; CHIANG, C. Y.; TSAI, H. J. **Zebrafish and Medaka: New model organisms for modern biomedical research**. **Journal of Biomedical Science** BioMed Central Ltd., , 28 jan. 2016.

LISIECKI, I.; PILENI, M. P. **Synthesis of Copper Metallic Clusters Using Reverse Micelles as Microreactors**. **J. Am. Chem. Soc.** [s.l: s.n.].

LIU, J.; DHUNGANA, B.; COBB, G. P. **Environmental behavior, potential phytotoxicity, and**

accumulation of copper oxide nanoparticles and arsenic in rice plants. Environmental Toxicology and ChemistryWiley Blackwell, , 1 jan. 2018.

LIU, J.; GUO, M.; CHEN, C. **Nano-bio interactions: A major principle in the dynamic biological processes of nano-assemblies. Advanced Drug Delivery Reviews**Elsevier B.V., , 1 jul. 2022.

LIU, J.; HURT, R. H. Ion release kinetics and particle persistence in aqueous nano-silver colloids.

Environmental Science and Technology, v. 44, n. 6, p. 2169–2175, 15 mar. 2010.

LIU, S. Q. et al. Characterisation of esterases of *Streptococcus thermophilus* ST1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B1079 as alcohol acyltransferases. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 10, p. 865–870, out. 2004.

LIZ-MARZÁ, L. M.; GIERSIG, M.; MULVANEY, P. **Synthesis of Nanosized Gold-Silica Core-Shell Particles.** [s.l: s.n.].

LOMBARDI, A. T. et al. Toxicity of ionic copper to the freshwater microalga *Scenedesmus acuminatus* (Chlorophyceae, Chlorococcales). **Phycologia**, v. 46, n. 1, p. 74–78, jan. 2007.

MEILAKHS, A. P.; KONIAKHIN, S. V. New explanation of Raman peak redshift in nanoparticles.

Superlattices and Microstructures, v. 110, p. 319–323, 1 out. 2017.

MELEGARI, S. P. et al. Evaluation of toxicity and oxidative stress induced by copper oxide nanoparticles in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Aquatic Toxicology**, v. 142–143, p. 431–440, 15 out. 2013.

MEYER, B. K. et al. Binary copper oxide semiconductors: From materials towards devices. **Physica Status Solidi (B) Basic Research**, v. 249, n. 8, p. 1487–1509, 2012.

MISHRA, A. K.; ROLDAN, A.; DE LEEUW, N. H. CuO Surfaces and CO₂ Activation: A Dispersion-Corrected DFT+U Study. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 120, n. 4, p. 2198–2214, 4 fev. 2016.

MISRA, S. K. et al. Comparative study using spheres, rods and spindle-shaped nanoplatelets on dispersion stability, dissolution and toxicity of CuO nanomaterials. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 4, p. 422–432, jun. 2014a.

MISRA, S. K. et al. Comparative study using spheres, rods and spindle-shaped nanoplatelets on dispersion stability, dissolution and toxicity of CuO nanomaterials. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 4, p. 422–432, jun. 2014b.

MISRA, S. K. et al. Comparative study using spheres, rods and spindle-shaped nanoplatelets on dispersion stability, dissolution and toxicity of CuO nanomaterials. **Nanotoxicology**, v. 8, n. 4, p. 422–432, jun. 2014c.

MOREIRA, C. C. C. et al. Oxidation degree or sheet size: What really matters for the photothermal effect and ecotoxicity of graphene oxide? **FlatChem**, v. 26, 1 mar. 2021.

MOURDIKOU DIS, S.; PALLARES, R. M.; THANH, N. T. K. **Characterization techniques for nanoparticles: Comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties.**

NanoscaleRoyal Society of Chemistry, , 21 jul. 2018.

MUSSULINI, B. H. M. et al. Seizures Induced by Pentylentetrazole in the Adult Zebrafish: A Detailed Behavioral Characterization. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 21 jan. 2013.

NAJIMI, S. et al. Use of acetylcholinesterase in *Perna perna* and *Mytilus galloprovincialis* as a biomarker of pollution in Agadir Marine Bay (South of Morocco). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 58, n. 6, p. 901–908, jun. 1997.

NAZ, S.; GUL, A.; ZIA, M. **Toxicity of copper oxide nanoparticles: A review study. IET Nanobiotechnology**Institution of Engineering and Technology, , 1 fev. 2020.

NEL, A. et al. **Toxic potential of materials at the nanolevel. Science**, 3 fev. 2006.

NESA, M. et al. Structural, optical and electronic properties of CuO and Zn doped CuO: DFT based First-principles calculations. **Chemical Physics**, v. 528, 1 jan. 2020.

NUNES, D. et al. Room Temperature Synthesis of Cu₂O Nanospheres: Optical Properties and Thermal Behavior. **Microscopy and Microanalysis**, v. 21, n. 1, p. 108–119, 20 jun. 2015.

OECD. **OECD/OCDE 2.** [s.l: s.n.].

OGWU, A. A.; DARMA, T. H.; BOUQUEREL, E. **Electrical resistivity of copper oxide thin films prepared by reactive magnetron sputtering.** [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.journalamme.org>.

OVCHINNIKOV, S. G. et al. Specific features of the electronic structure and optical spectra of nanoparticles with strong electron correlations. **Physics of the Solid State**, v. 49, n. 6, p. 1116–1120, jun. 2007.

PAN, K. et al. Different copper oxide nanostructures: Synthesis, characterization, and application for C-N cross-coupling catalysis. **Crystal Research and Technology**, v. 46, n. 11, p. 1167–1174, nov. 2011.

PELGROM, S. M. G. J. et al. **AQUATIC TOXICITY Interactions between copper and cadmium during single and combined exposure in juvenile tilapia *Oreochromis mossambicus*: Influence of feeding condition on whole body metal accumulation and the effect of the metals on tissue water and ion content** *Aquatic Toxicology*. [s.l: s.n.].

PETERSEN, E. J. et al. **Identification and avoidance of potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements.** *Environmental Science and Technology* American Chemical Society, , 15 abr. 2014.

PUNNOOSE, A. et al. Bulk to nanoscale magnetism and exchange bias in CuO nanoparticles. **Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics**, v. 64, n. 17, 2001.

RAELIARIJAONA, A.; COHEN, R. E. First-principles calculations of Raman and infrared spectroscopy for phase identification and strain calibration of hafnia. **Applied Physics Letters**, v. 120, n. 24, 13 jun. 2022.

RAI, M. et al. **Copper and copper nanoparticles: Role in management of insect-pests and pathogenic microbes.** *Nanotechnology Reviews* De Gruyter, , 28 ago. 2018.

RAMAN SPECTRA OF SINGLE CRYSTAL CuO. [s.d.].

RICHETTI, S. K. et al. Acetylcholinesterase activity and antioxidant capacity of zebrafish brain is altered by heavy metal exposure. **NeuroToxicology**, v. 32, n. 1, p. 116–122, jan. 2011.

RODRIGUES, A. C. M. et al. Ecophysiological effects of mercury bioaccumulation and biochemical stress in the deep-water mesopredator *Etmopterus spinax* (Elasmobranchii; Etmopteridae). **Journal of Hazardous Materials**, v. 423, 5 fev. 2022.

ROMÁN, L. E. et al. Nanopartículas de CuO e sua propriedade antimicrobiana frente a cepas intrahospitalares. **Revista Colombiana de Química**, v. 46, n. 3, p. 28–36, 1 set. 2017.

ROMANI, R. et al. Increased acetylcholinesterase activities in specimens of *Sparus auratus* exposed to sublethal copper concentrations. **Chemico-Biological Interactions**, v. 145, n. 3, p. 321–329, 15 jun. 2003.

SANCHO, E. et al. Eel ATPase activity as biomarker of thiobencarb exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 56, n. 3, p. 434–441, 2003.

SANTOS, D. et al. Single and combined acute and subchronic toxic effects of microplastics and copper in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages. **Chemosphere**, v. 277, 1 ago. 2021.

SHAO, J. et al. Tissue regeneration after injury in adult zebrafish: The regenerative potential of the caudal fin. **Developmental Dynamics**, v. 240, n. 5, p. 1271–1277, maio 2011.

SHAW, B. P.; PANIGRAHI, A. K. **BRAIN AChE ACTIVITY STUDIES IN SOME FISH SPECIES COLLECTED FROM A MERCURY CONTAMINATED ESTUARY.** [s.l: s.n.].

SHEKHAR, A.; CHEN, J.; PAETZOLD, J. C. **Journal of Physics: Condensed Matter To cite this article: J B Forsyth and S Hull. J. Phys.: Condens. Matter.** [s.l: s.n.].

SIDDIQUI, H. et al. Studies of structural, optical, and electrical properties associated with defects in sodium-doped copper oxide (CuO/Na) nanostructures. **Journal of Materials Science**, v. 53, n. 12, p. 8826–8843, 1 jun. 2018.

SIDDIQUI, H.; QURESHI, M. S.; HAQUE, F. Z. Surfactant assisted wet chemical synthesis of copper oxide (CuO) nanostructures and their spectroscopic analysis. **Optik**, v. 127, n. 5, p. 2740–2747, 1 mar. 2016a.

SIDDIQUI, H.; QURESHI, M. S.; HAQUE, F. Z. Effect of copper precursor salts: Facile and sustainable synthesis of controlled shaped copper oxide nanoparticles. **Optik**, v. 127, n. 11, p. 4726–4730, 1 jun. 2016b.

SIEMONS, W. et al. Tetragonal CuO: End member of the 3d transition metal monoxides. **Physical Review B - Condensed Matter and Materials Physics**, v. 79, n. 19, 1 maio 2009.

SINGH, D. P.; OJHA, A. K.; SRIVASTAVA, O. N. Synthesis of different Cu(OH)₂ and CuO (nanowires, rectangles, seed-, belt-, and sheetlike) nanostructures by simple wet chemical route. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 113, n. 9, p. 3409–3418, 5 mar. 2009.

SINGH NALWA, H. et al. **Handbook of Thin Film Materials Deposition and Processing of Thin Films Edited by ACADEMIC PRESS Contents.** [s.l: s.n.].

SNEDDON, L. U. **Pain Perception in Fish: Evidence and Implications for the Use of Fish** *Journal of Consciousness Studies*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.wellbeingintlstudiesrepository.org/acwp_vsm>.

STAFFORD, S. L. et al. **Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: Emerging roles for zinc and copper.** *Bioscience Reports* Portland Press Ltd, , 2013.

SUN, Y. et al. Effects of copper oxide nanoparticles on developing zebrafish embryos and larvae. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 905–918, 7 mar. 2016.

TAUC, J. **OPTICAL PROPERTIES AND ELECTRONIC STRUCTURE OF AMORPHOUS** **Mat. Res. Bull.** [s.l: s.n.].

TAYLOR, R. et al. **Small particles, big impacts: A review of the diverse applications of nanofluids.** **Journal of Applied Physics**, 7 jan. 2013.

TIWARI, J. N.; TIWARI, R. N.; KIM, K. S. **Zero-dimensional, one-dimensional, two-dimensional and three-dimensional nanostructured materials for advanced electrochemical energy devices.** **Progress in Materials Science**, maio 2012.

UNGEHEUER, K. et al. Influence of Cr Ion Implantation on Physical Properties of CuO Thin Films. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 9, 1 maio 2022.

VIJAYA KUMAR, R.; DIAMANT, Y.; GEDANKEN, A. Sonochemical synthesis and characterization of nanometer-size transition metal oxides from metal acetates. **Chemistry of Materials**, v. 12, n. 8, p. 2301–2305, 2000.

VIOQUE-FERNÁNDEZ, A. et al. Doñana National Park survey using crayfish (*Procambarus clarkii*) as bioindicator: Esterase inhibition and pollutant levels. **Toxicology Letters**, v. 168, n. 3, p. 260–268, 5 fev. 2007.

WANG, W. et al. The impact of nanoparticle shape on cellular internalisation and transport: What do the different analysis methods tell us? **Materials Horizons**, v. 6, n. 8, p. 1538–1547, 1 out. 2019.

WANG, X. et al. Revealing the conversion mechanism of CuO nanowires during lithiation–delithiation by in situ transmission electron microscopy. **Chemical Communications**, v. 48, n. 40, p. 4812–4814, 23 abr. 2012.

WANG, Z. L. Introduction to Conventional Transmission Electron Microscopy. **Materials Research Bulletin**, v. 38, n. 13, p. 1781–1782, out. 2003.

XIA, Y. et al. **One-Dimensional Nanostructures: Synthesis, Characterization, and Applications**.** [s.l: s.n.].

XU, J. F. et al. **Raman Spectra of CuO Nanocrystals.** [s.l: s.n.].

YABLONSKII, D. A. **Mean-field theory of magnetic order in cupric oxide** **Physica C.** [s.l: s.n.].

ZAGATTO, P. A. **ECOTOXICOLOGIA AQUÁTICA: PRINCÍPIOS E APLICAÇÕES.** [s.l: s.n.].

ZHANG, C. et al. Alkali-metal-promoted Pt/TiO₂ opens a more efficient pathway to formaldehyde oxidation at ambient temperatures. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 51, n. 38, p. 9628–9632, 17 set. 2012.

ZHANG, Q. et al. **CuO nanostructures: Synthesis, characterization, growth mechanisms, fundamental properties, and applications.** **Progress in Materials Science** Elsevier Ltd, , 2014a.

ZHANG, Q. et al. **CuO nanostructures: Synthesis, characterization, growth mechanisms, fundamental properties, and applications.** **Progress in Materials Science** Elsevier Ltd, , 2014b.

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

ZHUANG, Z.; PENG, Q.; LI, Y. Controlled synthesis of semiconductor nanostructures in the liquid phase. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 11, p. 5492–5513, 17 out. 2011.

ZORZETTO, R.; GUIMARÃES, M. **Mais prático e barato que os roedores, o paulistinha começa a ser usado em pesquisas de neurociências e testes de medicamentos no Brasil Um peixe modelo capa.** São Paulo: [s.n.].

**DECLARAÇÃO DE ORIGINALIDADE DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OU TESE DE
DOUTORADO**

Declaro que a presente dissertação/tese é original, elaborada especialmente para este fim, não tendo sido apresentada para obtenção de qualquer título e que identifico e cito devidamente todas as autoras e todos os autores que contribuíram para o trabalho, bem como as contribuições oriundas de outras publicações de minha autoria.

Declaro estar ciente de que a cópia ou o plágio podem gerar responsabilidade civil, criminal e disciplinar, consistindo em grave violação à ética acadêmica.

Brasília, (dia) de (mês) de (ano).

Assinatura do/a discente:  _____

Programa: PPGQ - Programa de Pós Graduação em Química

Nome completo: Ramon Tiago Albuquerque Andrade

Título do Trabalho: _____

AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOESTRUTURAS DE ÓXIDO DE COBRE
UTILIZANDO EMBRIÕES DE PEIXE-ZEBRA COMO BIOSSENSORES

Nível: Mestrado Doutorado

Orientador/a: _____