

NANOSEGURANÇA NA PRÁTICA

NANOSSEGURANÇA NA PRÁTICA

Um guia para análise da segurança de empresas,
laboratórios e consumidores que utilizam a
nanotecnologia.

André Luiz Meira de Oliveira
Leandro Antunes Berti
Carlos Roberto De Rolt

NANOSSEGURANÇA NA PRÁTICA

Um guia para análise da segurança de empresas, laboratórios e consumidores que utilizam a nanotecnologia



GUIA PARA ANÁLISE DE SEGURANÇA DE
EMPRESAS, LABORATÓRIOS E CONSUMIDORES
QUE UTILIZAM A NANOTECNOLOGIA



LabGES



Apoio:



LabGES



André Luiz Meira de Oliveira
Leandro Antunes Berti
Carlos Roberto De Rolt

**André Luiz Meira de Oliveira
Leandro Berti Nunes
Carlos Roberto de Rolt**

Nanossegurança na Prática

**Um guia para análise da segurança
de empresas, laboratórios e consumidores
que utilizam a nanotecnologia.**

Editora Fundação CERTI
2017

Todos os direitos reservados.

ARTE DA CAPA

Bruno Quint Berretta

Greice Keli da Silva

REVISÃO

Luciana Santaella Malaguti

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Manuella Souza Ouriques (CRB-14/1533)

Daniel Vieira

O48n OLIVEIRA, André Luiz Meira de,

Nanosseguurança na Prática: um guia para análise da segurança de empresas, laboratórios e consumidores que utilizam a nanotecnologia. / André Luiz Meira de Oliveira; Leandro Antunes Berti; Carlos Roberto de Rolt. Florianópolis: Fundação Certi, 2017

186 p. : il

ISBN - 978-85-87079-12-1

1. Nanosseguurança. 2. Guia. 3. Nanotecnologia I. André Luiz Meira de Oliveira. II Leandro Antunes Berti. III. Carlos Roberto de Rolt. IV. Título

CDU 620.5

Agradecimentos

À FAPESC – Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina, à UDESC – Universidade do Estado de Santa Catarina, ao LABGES – Laboratório de Tecnologias de Gestão e à Fundação CERTI – Centros de Referência em Tecnologias Inovadoras, por apoiarem financeira e operacionalmente a redação e a edição desse livro.

Sumário

1	A estrutura da normalização de nanosseurança	6
1.1	Os atores da Nanotecnologia.....	8
1.2	Iniciativas internacionais em nanosseurança.....	11
1.3	Normalização para nanosseurança	19
2	Ensaio e Caracterização de Nanomateriais e Nanoprodutos.....	25
2.1	Preparação de Amostras e Dosimetria.....	29
2.1.1	Dispersão x Solubilidade	30
2.1.2	Problemas comuns com a Preparação e a Dosimetria	37
2.2	Protocolos Gerais de Dispersão.....	50
2.2.1	Preparação do Meio de Dispersão Aquoso	54
2.2.2	Qualidade do Meio de Teste	55
2.2.3	Caracterizações Físico-Químicas	55
2.2.4	Preparação do Meio de Dispersão Não-aquoso.....	57
2.2.5	Qualidade do Meio de Teste	58
2.2.6	Caracterizações Físico-Químicas	58
2.2.7	Degradação, Transformação e Acumulação	59
2.2.8	Degradação e Transformação	61
2.2.9	Estudos em meio aquoso	66
2.2.10	Estudos em solo, terra e sedimento	69
2.2.11	Estudos na cadeia alimentar	70
2.3	Detecção e Caracterização de Nanomateriais no Meio de Teste e na Biota.....	71
2.3.1	Detecção de Liberação de Íons	71
2.3.2	Detecção em matrizes sólidas / meio poroso	72
2.3.3	Detecção na biota	73
3	Avaliação de Risco e Conformidade da Produção	75
3.1	A avaliação de risco e a segurança ocupacional	76
3.1.1	Nivelamento do Perigo	77
3.1.2	Nivelamento da Exposição	79
3.1.3	Nivelamento por Faixas de Controle.....	81
3.2	Conformidade da Produção.....	82

3.2.1	Fatores de controle para produção	83
3.2.2	Qualidade dos ensaios laboratoriais.....	85
4	Avaliação dos Modos de Exposição (MoE)	86
4.1	Efeitos na Saúde	88
4.2	Caracterização da dispersão de teste.....	89
4.2.1	Considerações especiais para toxicologia animal	97
4.2.2	Rotas de entregas e comportamento de nanomateriais em toxicologia animal	100
4.3	Exposição pelo trato respiratório	101
4.4	Exposição oral.....	107
4.5	Exposição dérmica/cutânea	108
4.6	Exposição por injeção.....	111
4.7	Guias de Testes (Teste Guidelines - TG)	112
4.7.1	Parâmetros de Toxicologia e Destino Ambiental.....	112
4.7.2	Parâmetros de Toxicologia em Mamíferos	124
5	Estudo de caso – Normalização de nanosseguurança para nanocosméticos	146
5.1	Restrições de uso da norma	146
5.2	Documentos complementares.....	147
5.3	Descrição da metodologia.....	148
5.4	Avaliação da conformidade do fornecedor do nanomaterial	149
5.5	Avaliação da conformidade do nanoproduto.....	155
6	O Futuro da Nanosseguurança.....	160
7	Referências.....	164

1 A estrutura da normalização de nanosseguurança

A nanotecnologia vem, indiscutivelmente, ganhando espaço nos dias de hoje. As novas propriedades dos materiais conquistadas a partir do entendimento e da utilização da nanotecnologia revolucionam não somente os produtos, mas também os bens de capital – as máquinas para produção – e a prestação de serviços, com inovações até pouco tempo inimagináveis.

Produtos hidrofóbicos ou com capacidade de trazer maior resistência aos materiais, carregadores de químicas encapsuladas ou materiais autoreparáveis têm criado expectativas de grande avanço tecnológico para as empresas e consumidores.

Porém, nem tudo está resolvido. Em conjunto com os benefícios que podem ser trazidos, há um risco associado ainda não plenamente entendido. A toxicologia associada aos nanomateriais vem sendo tema de discussão em diversos fóruns em nível mundial e, pelo andamento das pesquisas, ainda longe de um consenso. Partículas manipuladas, ou seja, criadas pelo ser humano, e que podem atravessar a epiderme dos animais ou causar efeitos ainda desconhecidos no meio ambiente, podendo alterar totalmente uma cadeia e um ecossistema devido à sua extensa área superficial, têm trazido governos, pesquisadores, empresas e organizações internacionais (a exemplo da ISO, ASTM e OECD) à mesa de debate, na busca de caminhos para a normalização no que tange à nanosseguurança para o homem e para o meio ambiente. Podem ser encontrados casos de projetos de lei no Brasil com propostas de proibição da nanotecnologia como, por exemplo, o projeto de lei 6741/2013, de autoria do então Deputado Sarney Filho, que traz os princípios da precaução e da prevenção para propor uma série de regras, incluindo rotulagem, inspeção, monitoramento e aprovação prévia de nanoprodutos por parte do Estado, além de propor proibições como para a “pesquisa, a utilização, a

comercialização, o registro, o patenteamento e o licenciamento de nanotecnologias de restrição de uso” [Art. 18]¹.

As propostas realmente aparentam coerência quando, paralelamente ao aumento do uso da nanotecnologia, aparecem problemas aparentemente relacionados aos nanomateriais, a exemplo do acidente relatado na China em 2009, bastante divulgado pela mídia na ocasião, em que trabalhadoras inalaram nanopartículas por meses sem a devida proteção, levando a óbito duas delas. Surgem, então, novos casos suspeitos, como a intoxicação causada no Japão por spray selante em lavatórios em 2013, ou pesquisadores indicando possibilidade de as nanopartículas de dióxido de titânio (muito utilizadas em protetores solares) comprometer a fauna marinha.

Assim, conforme o próprio Sarney Filho debate em seu projeto de lei:

É inaceitável, do ponto de vista ético, colocar produtos no mercado sem identificar antes seus efeitos. A população, sob uma política de abertura irrestrita do mercado nanotecnológico, torna-se cobaia do setor.

Por outro lado, a redução de contaminação em indústrias e hospitais com novos revestimentos hidrofóbicos ou bactericidas, ou as possibilidades de prevenção de acidentes de trabalho com novas tintas de revestimentos térmicos e acústicos para máquinas, trazem o lado benéfico do uso da nanotecnologia. A eficiência de carregadores químicos, cosméticos ou suplementos alimentares, permitindo que sejam reduzidos os princípios

¹ No mesmo projeto de lei, o autor estabelece: “Para os efeitos desta Lei, entende-se por nanotecnologia de restrição de uso qualquer processo de intervenção humana para geração ou multiplicação de animais, fungos ou plantas modificados pela nanotecnologia para produzir estruturas reprodutivas estéreis, bem como qualquer forma de manipulação nanotecnológica que vise à ativação ou desativação de genes relacionados à fertilidade das plantas, fungos ou animais, por indutores químicos ou nanotecnológicos externos.”

ativos e obtendo-se um mesmo impacto, a possibilidade de redução de uso de materiais em infraestruturas da construção civil com um mesmo desempenho, alterando o nível de exploração mineral da natureza, são exemplos claros de que proibir o uso não é o caminho correto, mas sim trabalhar em prol da nanossecurança.

O caminho apresentado nesse livro utiliza as mais recentes pesquisas para propor um modelo de avaliação da nanossecurança que atuará na cadeia produtiva e do consumo de nanoprodutos e nanomateriais. Devido à falta de estudos relacionados aos impactos dos nanomateriais no meio ambiente, este tema será somente parcialmente abordado, porém infere-se que uma proteção ao ser humano leva a um relacionado aumento de proteção ao meio ambiente, considerando as medidas de contenção e mitigação de riscos.

Por fim, é certo considerar que as sugestões aqui apresentadas não são definitivas, pois o tema é ainda recente e muito terá a evoluir. Porém, na opinião dos autores, o início do trato da nanossecurança, buscando acompanhar o estado da arte, levará à tranquilidade e à sustentabilidade desse setor, em um breve espaço de tempo.

1.1 Os atores da Nanotecnologia

Existem três forças principais no mercado que suportam o desenvolvimento de normas e regulamentos.

A primeira delas é levar o consumidor a um estágio de compreensão que o torne consciente o suficiente para aumentar sua exigência acerca da padronização dos produtos e segurança no uso dos mesmos. Para ativar essa força, campanhas de conscientização e capacitação em massa devem ser executadas.

A segunda força é o governo fiscalizador. A partir dos estudos de institutos próprios ou contratados, além dos acordos e exigências internacionais — as barreiras técnicas —, o governo pode impor regulamentos ou propor normas que prezem pela qualidade e segurança dos produtos e sistemas, cobrando a efetiva implantação por parte das empresas produtoras e comercializadoras.

Por fim, a terceira força da normalização é a organizacional, quando empresas e instituições impõem critérios de segurança e de qualidade nas negociações comerciais, a partir de normas que elas mesmas desenvolvem, buscando melhorar seus produtos ou mesmo garantir a qualidade e se proteger de problemas futuros (ocupacionais ou com seus consumidores).

Dentro dessas três forças, a primeira (do consumidor) é a mais efetiva — pois “puxa” as demais correntes — porém mais cara e lenta para ser implantada. Mesmo as empresas, que prioritariamente têm como foco o resultado financeiro de suas operações, necessitam cuidado com as pessoas (viés social) e com o meio ambiente (viés ambiental) para uma sustentabilidade plena².

Neste ambiente, podem ser destacados os atores que influenciam na nanosseguurança e nos debates do presente livro, conceituados para esse fim como sendo:

- Fornecedor de nanomaterial – serão assim denominadas todas aquelas empresas ou organizações que produzem e comercializam nanomateriais que integrarão um nanoproduto.
- Fabricante de nanoproduto – toda a empresa que utiliza nanomateriais em seus produtos finais, colocando-os à venda no mercado.

² Com base nos trabalhos de John Elkington acerca da sustentabilidade corporativa.

- Laboratório de ensaios e medições em nanotecnologia – composto por infraestrutura e técnicos especialistas, realizam medições de propriedades dos nanomateriais.
- Laboratórios de ensaios em toxicologia – são aqueles que possuem competência suficiente para execução de análises de impacto toxicológico em animais ou no meio ambiente, seguindo procedimentos internacionais.
- Trabalhadores da nanotecnologia – indivíduos que trabalham diretamente com nanomateriais, aumentando consideravelmente o nível e tempo de exposição e, conseqüentemente, os riscos toxicológicos.
- Usuário final – clientes dos fabricantes de nanoprodutos, ou aqueles que utilizam os nanoprodutos periodicamente.
- Regulamentadores, normalizadores e fiscalizadores – agências e associações nacionais e internacionais que têm o poder de legislar ou propor padrões nacionais ou internacionais, como a ANVISA e o INMETRO no Brasil, ou a ISO e a OECD internacionalmente.

Uma empresa fabricante de nanoproduto deve estar atenta aos seus consumidores e fiscalizadores. Suas normas internas devem garantir a segurança ocupacional de seus trabalhadores e de seus consumidores, sendo também apropriadas as regras para seus fornecedores de nanomateriais e laboratórios de ensaios e medições subcontratadores. O investimento nessa normalização traz benefícios a toda a cadeia de valor, assim como, demonstra aos fiscalizadores sua intenção de bom uso da tecnologia e preocupação em “fazer o certo”, que não deve ser somente voltada ao produto final, mas aos métodos de manipulação de nanomateriais, aos recursos de mitigação de riscos e, é certo, à conformidade de seus processos, garantindo produtos semelhantes saindo da linha de produção.

A entrada dos critérios de nanosseguurança no sistema da qualidade da empresa implica em necessidade de atenção constante e melhoria contínua, criando um processo retroalimentado por seus fornecedores e beneficiando a cadeia inteira. Enquanto isso, os fiscalizadores e

laboratórios correm em paralelo com pesquisas e investimentos em cooperações internacionais, com foco na descoberta de novos riscos e suas formas de mitigação. Integrados desta forma, a redução do risco é consequência.

1.2 Iniciativas internacionais em nanosseguurança

Voltando ao tema da nanosseguurança, ainda não existe um consenso mundial acerca da avaliação da conformidade de nanomateriais e produtos com nanotecnologia. Essencialmente, existem divergências metrológicas não explicadas ainda com metodologias e ferramentas diferenciadas, cada qual com seus defensores.

Pode ser exemplificado o caso da nanopartícula de prata, que elimina bactérias por meio da liberação de íons. Algumas pesquisas demonstram e comprovam sua genotoxicidade, enquanto outras demonstram ter efeito benéfico sem afetar a saúde do usuário. Na realidade, os testes de toxicidade existentes são projetados para avaliar a relação dosagem com a massa ingerida/adsorvida/inspirada. Estes testes extrapolam as dosagens nocivas, avaliando somente uma parcela das características de nanomateriais.

Por esse motivo, necessitam-se técnicas mais apuradas que avaliem todas as propriedades e não somente extrapolem resultados de medições. O órgão norte-americano *Food Drug and Adminsitration* (FDA) recentemente publicou recomendações a respeito de nanomateriais, considerando que cosméticos, alimentos para humanos ou para animais e fármacos com propriedades nano sejam todos avaliados com os mesmos critérios de nanosseguurança. No entanto, o maior progresso vem da União Europeia (UE) que, ao longo dos últimos anos, promove e financia programas e projetos entre múltiplos países, incluindo os EUA e o Brasil, para definição de regulações, normas e unificação de metodologias e entendimentos.

Como exemplo, a Dinamarca possui uma das regulamentações mais recentes, em que a Agência de Dinamarquesa de Proteção Ambiental (Miljøstyrelsen) criou uma base de dados para registrar todos os produtos com nanotecnologia produzidos no país. Apesar de utilizar a definição de nanomateriais da União Europeia, algumas atividades e tipos de produtos foram excluídos do registro. Na Tabela 1 estão listados produtos específicos, que usam nanomateriais, excluídos do registro obrigatório:

Tabela 1: Produtos excluídos da obrigatoriedade de registro na Dinamarca.

Produtos de substâncias nanométricas em REACH Anexo V:

- Produtos em que o material não é conscientemente produzido em tamanho nano;
- Produtos em que o nanomaterial está em uma matriz fixa;
- Produtos em que o nanomaterial é usado como tinta de impressão diretamente no produto ou nos rótulos sobre o produto;
- Têxteis em que o nanomaterial é usado como tinta de impressão ou a coloração do têxtil;
- Tintas e produtos de proteção de madeira contendo dióxido de titânio, em que o único propósito para o dióxido de titânio é colorir o produto;
- Produtos de borracha e de borracha que contêm o dióxido de silício ou negro de carbono nanomateriais;
- Produtos importados para uso privado;
- Produtos utilizados para pesquisa e desenvolvimento.

Apesar dos debates terem sido abertos, ainda não existem leis específicas de regulamentação no Brasil ou mesmo no mundo. Existem, sim, propostas de definição de marcos regulatórios, porém ainda em debate. A única exceção, ao longo dos anos, é o Decreto de Lei da Prefeitura da Cidade de Berkeley, na Califórnia, que exige o registro e a quantidade de material produzido, devido à quantidade de empresas de Nanotecnologia no estado que, segundo o site *California in the Nanoeconomy*, chega a 382 empresas. Órgãos internacionais como a Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) mantêm um grupo de trabalho permanente para Materiais Manufaturados, denominado (WPMN – *Working Party on Manufactured Nanomaterials*) e os principais órgãos

regulamentadores e publicadores de normas internacionais (ISO, ASTM, ANSI) possuem trabalhos convergentes em relação à nomenclatura, definições, medições e caracterização, segurança e saúde, além de aspectos ambientais (ISO TC 229, ASTM E56 e ANSI NSP). A Figura 1 demonstra a estrutura básica da ISO TC 229.

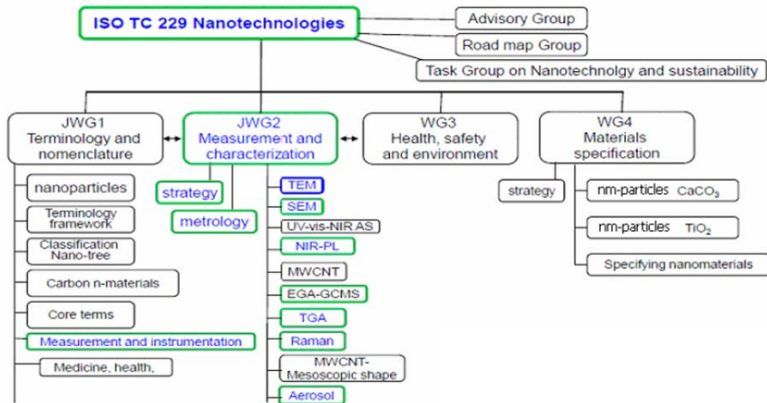


Figura 1 - Estrutura básica da ISO TC 229 Nanotechnologies [Fonte: website ISO]

Nos Estados Unidos, existem vários grupos e programas alinhados à Iniciativa Nacional de Nanotecnologia (NNI), dentre eles se encontra a Força Tarefa Nano (NTF – *Nano Task Force*) criada pelo *Food Drug and Administration* (FDA) como grupo de trabalho responsável pelas definições, testes, avaliações e segurança de nanomateriais e produtos com Nanotecnologia nas áreas de cosméticos, fármacos e alimentos. O NTF publicou recentemente, em junho de 2014, o *Guidance for Industry: Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products* que tem o objetivo de educar a indústria de cosméticos sobre como lidar com nanomateriais. A Universidade de Rice sedia o Conselho Internacional de Nanotecnologia (ICON - *International Council on Nanotechnology*), um importante portal de divulgação de informações estratégicas sobre Nanotecnologia nos EUA e no mundo.

Ainda no hemisfério norte, o Canadá possui poucas, mas efetivas iniciativas, como o NanoQuébec - *Hub for Nanotech development in Quebec*, uma espécie de rede de inovação financiada pelo *Ministère de l'Économie, de l'Innovation et des Exportations* (MEIE), com a missão de fortalecer a inovação em Nanotecnologia com foco na maximização do impacto econômico, na região do Quebec. Além disso, existe uma proposta de um Marco Regulatório para Nanomateriais dentro da Lei de Proteção Ambiental Canadense de 1999 (*Proposed Regulatory Framework for Nanomaterials under the Canadian Environmental Protection Act, 1999*).

A Europa, devido a sua força econômica e organização estrutural, detém os maiores avanços e iniciativas, que incluem os EUA e Canadá. Um dos grandes responsáveis por esses avanços é a Agência Química Europeia (ECHA), que possui um robusto sistema para registro, validação, autorização de químicos, conhecido como (REACH - *European Union Registration, Evaluation, Authorization of Chemicals*) e o CLP (*Classification, Labelling and Packaging*) para classificação, rotulagem, acondicionamento de substâncias e misturas químicas com a normatização via GHS (*Global Harmonised System*), um sistema que normaliza mundialmente a descrição de perigo e exposição com etiquetagem de produtos químicos.

Os programas europeus são financiados pela Comissão Europeia por meio de plataformas de apoio, como o FP7 (*Framework P7*) e mais recentemente, o *Horizon 2020*. Desde 2011, o projeto NanoValid vem sendo executado; conta com uma estrutura de 24 parceiros europeus de 14 países diferentes e 6 parceiros do Brasil, com um orçamento de € 13 milhões. O projeto prossegue tentando desenvolver os métodos de referência para nanomateriais, mas infelizmente ainda não conseguiu chegar a um resultado praticável.

Outro projeto importante é o MARINA (*Managing Risks of Nanoparticles*) que tem por objetivo desenvolver ferramentas e métodos nos quatro temas centrais de análise e gerenciamento de riscos de nanomateriais: Materiais, Exposição, Perigo e Risco. O projeto MARINA é coordenado pelo Instituto de Medicina Ocupacional (IOM - *Institute of Occupational*

países, regularmente negligenciados, onde a regulamentação e até mesmo a certificação está muito avançada, que são Taiwan, Tailândia e Irã.

No continente da Oceania, a Austrália se destaca com a Rede Australiana de Nanotecnologia (ANN – *The Australian Nanotechnology Network*), que tem a missão de ampliar o alcance dos resultados de pesquisadores, realizando colaborações, promoções, encorajando estudantes de pós-graduação, a fim de aumentar a infraestrutura da Nanotecnologia no país.

No Brasil, o INMETRO coordena o projeto NANOTOX, uma rede de laboratórios distribuídos em universidades federais e que possui três objetivos principais:

- Ser referência em medições de área de superfície, dimensão e tamanho.
- Buscar métodos padronizados de caracterização físico-química (DICE).
- Buscar métodos padronizados de caracterização biológica (DIPRO).

Para isto, o Inmetro está utilizando a ISO TC 229 para redigir a norma da Associação Brasileira de Normas Técnicas ABNT/CEE-89, que procura normatizar avaliação da adequabilidade de métodos internacionais à realidade nacional para medição e caracterização de nanomateriais. O Governo Federal lançou, em 2013, a Iniciativa Nacional de Nanotecnologia (IBN) coordenando pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Recentemente, em agosto de 2014, o Conselho Nacional de Nanotecnologia aprovou a adesão do Brasil ao projeto NANOREG. A IBN pretende, com sua participação, ser capaz de construir o marco regulatório da nanotecnologia no Brasil nos próximos anos.

Enquanto isso, alguns países já avançaram a ponto de possuir um sistema próprio de certificação e etiquetagem. No momento da redação desse livro, o principal exemplo de sucesso é o nanoMark, de Taiwan, que foi estabelecido pelo Ministério da Economia do país em 2004, a partir de sua Agência de Desenvolvimento Industrial. Segundo o órgão, nos 10 nos de

existência desse sistema de certificação, 38 empresas e mais de 1.488 produtos passaram pela avaliação. Pesquisas de mercado indicam que a etiqueta nanoMark não só auxilia as empresas certificadas a melhorar sua imagem corporativa, no ganho de confiança do consumidor e na promoção de vendas, mas em alguns casos, suportou aumentos em torno de 20% no preço de venda do nanoproduto, a partir da agregação de valor. O sistema de certificação nanoMark possui 13 laboratórios associados e a certificação é realizada individualmente por produto, com validade de três anos e respeitando os seguintes princípios:

1. Participação dos fabricantes é voluntária.
2. Certificação de produtos é realizada com base em nanoescala e nanofunção.
3. Os requisitos de qualidade geral e da função devem também ser avaliados nos demais sistemas de avaliação nacionais.

O sistema de certificação nanoMark ainda inclui um programa de divulgação (*Nano Living House*) que tem a função de promover todos os produtos aprovados pela certificadora, auxiliando no incremento de vendas e viabilizando parcerias comerciais.



Figura 3 - Website Nano Living House

O processo de certificação é bem estruturado e respeita os padrões internacionais de normas e regulamentos, sendo os métodos de testes e critérios de certificação definidos caso a caso pela Agência de Desenvolvimento Industrial, ou seja, sem envolvimento direto do requisitante. Os fabricantes que desejarem solicitar a certificação, devem obrigatoriamente preencher os seguintes requisitos:

- Ser empresas independentes, parcerias ou empresas que estão registradas legalmente na República da China.
- O fabricante deve ter um registro de terceira parte para a certificação de sistemas de gestão da qualidade.

Por sua vez, em 2011, a Associação de Nanotecnologia da Tailândia criou a etiqueta NanoQ como resposta aos acordos entre fabricantes e organizações nacionais de testes e certificações. O NanoQ foi um importante marco para os setores industrial e comercial pois, com o aumento de nanoproductos no mercado, a certificação tornou-se uma ferramenta de incentivo aos fabricantes envolvidos com a Nanotecnologia. O processo do NanoQ é realizado pelo Centro Nacional de Nanotecnologia (NANOTEC), que verifica e testa os produtos nano. Além disso, o processo de certificação inclui um ano de processo de auditoria. Infelizmente, até o momento não foram encontradas muitas informações disponíveis acerca do processo de certificação do NanoQ, devido aos problemas sócio-políticos da Tailândia.



Figura 4 - Sistemas de certificação NanoQ da Tailândia, com etiqueta NanoQ detalhada.

Também, pode-se considerar o Irã que, a partir do Conselho Iraniano da Iniciativa de Nanotecnologia que iniciou suas atividades em 2001, hoje possui cerca de 50 laboratórios que oferecem serviços através da Rede de Laboratórios Iraniana de Nanotecnologia e ocupa o 1º lugar no *ranking* mundial em relação à prioridade nacional dada à nanotecnologia, em acordo com as estatísticas do website StatNano.com em 2017 (dados de 03/2017, quando o Brasil ocupava o 61º lugar no mesmo ranking). Em 2006, um Comitê para Padronização da Nanotecnologia desse país foi estabelecido e logo se tornou membro da coordenação da ISO/TC 229. Entre suas atividades, foi um dos países pioneiros a discutir o assunto da Nanosseguurança. Apesar de não haver ainda um sistema de certificação, o Iran mantém em seu calendário anual a realização do Congresso de Nanosseguurança, um dos eventos mais respeitados no mundo.

1.3 Normalização para nanosseguurança

Mesmo que esse livro não pretenda se aprofundar nos conceitos de normalização ou de regulamentação, vale a pena contemplar alguns parágrafos sobre o tema, facilitando o entendimento.

De acordo com a ABNT, normalizar é estabelecer, em relação a problemas existentes ou potenciais, prescrições para uso comum, com vistas à obtenção de um nível previsto de qualidade. Com a normalização, espera-se preservar o conhecimento ou a memória tecnológica ou institucional de uma organização ou região, podendo tratar desde aspectos construtivos de um produto, considerações acerca de segurança, saúde e meio ambiente ou mesmo regras sociais para comum acordo.

Fica claro, neste sentido, que a atividade de normalização ganhou destaque a partir da Revolução Industrial, quanto passou a ser necessário que as peças que compunham um produto fossem intercambiáveis, mesmo que providas de outras fábricas ou fornecedores. Pode-se então,

considerar as possibilidades de simplificação ou limitação da variedade de produtos, a segurança para o ser humano e o meio ambiente, a proteção ao consumidor, a superação de barreiras técnicas, a comunicação e a economia direta de capital. Com essa abrangência, a normalização torna-se a base para a garantia da qualidade de uma organização e, a partir dela, a referência para ações de melhoria contínua.

A normalização deve ser considerada em relação às três forças que movem a Avaliação da Conformidade, citada anteriormente. Entre empresas, as normas e termos de referência estabelecem requisitos mínimos para fornecimento de insumos e segurança de manuseio, por exemplo. Entre pessoas, a certificação de um sistema de gestão ou a comprovação de uma terceira parte (confiável) como auditora, pode melhorar a posição da empresa fornecedora. Por último, os governos fiscalizadores somente atuam mediante normas previamente aprovadas e regulamentadas.

As normas, neste sentido, diferenciam-se quanto ao seu objetivo e relevância na competitividade da organização, podendo ser classificadas – em acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas, como:

- Procedimentos, ou a descrição da forma pela qual é executada uma rotina ou serviço especial. Como exemplo de procedimentos, cita-se uma rotina administrativa ou a manutenção preventiva.
- Especificações, considerando o detalhamento de características de um bem ou serviço, como suas propriedades físicas ou químicas, por exemplo.
- Padronizações, para garantir o intercâmbio entre partes e diversos fornecedores complementares. Como exemplos, a padronização de bocais de lâmpadas ou conectores de energia.
- Terminologia, para definir e relacionar termos técnicos entre diferentes idiomas, diferentes setores ou mesmo diferentes empresas do mesmo setor.
- Método de ensaio, relacionando as características com os métodos para confirmá-las.
- Simbologia, para fixação de convenções e símbolos gráficos.

- Classificação, buscando-se a subdivisão de conceitos ou objetos e sua relação com critérios de aceitação.

Dentro de cada um dos tipos, a norma desenvolvida também pode ter diferentes níveis de aplicação, servindo a propósitos igualmente diferenciados. Neste sentido, podem ser internacionais, regionais, nacionais, ou normas de empresas ou organizações, que devem ser – sempre que possível e aplicável – encadeadas, ou seja, uma norma nacional é a norma internacional, acrescida de considerações específicas que aquele país colocará, o mesmo valendo para empresas.

Considerado que uma norma deve, então, trazer os requisitos a serem minimamente executados para a garantia das características desejadas, e retornando ao tema nanosseguurança, são propostos alguns requisitos que devem ser contemplados na norma, e serão posteriormente tratados de forma individual nos próximos capítulos. São eles:

Critério 1 – O nanoproduto deve conter nanomateriais.

Esse critério pode parecer estranho à primeira vista, porém é sabido que um nanomaterial, após passar por ações de manufatura, pode ser descaracterizado ou aglomerado, perdendo suas características de tamanho, ou seja, deixando de ter nanomaterial.

Importante deixar claro também, que a avaliação da nanosseguurança não tratará, neste livro, os requisitos de funcionalidade dos nanomateriais e nanoprodutos, deixando essa responsabilidade aos fabricantes.

Critério 2 - Os fornecedores de nanomateriais e os fabricantes de nanoprodutos devem garantir a conformidade (ou a reprodutibilidade) de suas características, permitindo a avaliação a partir de modelos ou amostras iniciais.

Na impossibilidade atual de realizar avaliações de nanosseguurança em lotes de produção e, ainda mais, individualmente por produto, os sistemas de gestão devem ser avaliados e aprovados. Isso garantirá a reprodutibilidade dos lotes e a manutenção das suas características, sejam elas quais forem, além de uma tendência à melhoria contínua.

Os requisitos para a avaliação dos sistemas de gestão devem contemplar os controles de características que podem influenciar na alteração das propriedades dos nanomateriais, sendo um motivo de análise de especialistas no tema.

Critério 3 - Os fornecedores de nanomateriais e os fabricantes de nanoprodutos devem garantir a segurança ocupacional de seus trabalhadores.

Fica claro que o agrupamento com o maior risco é o dos trabalhadores, tanto dos fornecedores quanto dos fabricantes de nanoprodutos, expostos por tempos muito maiores. Avaliar a segurança para esses agentes é fundamental para a garantia da conformidade do sistema. De nada adiantará um produto seguro se não há saúde ocupacional garantida nas fábricas e laboratórios.

Critério 4 - O nanoproduto vendido ao consumidor final, em sua composição completa, deve ter LC/LD50 > 2.000, ou “praticamente não tóxico”.

A Organização de Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) é um dos grandes precursores e responsáveis pelo esforço global de regulação de nanomateriais. Seguindo os conceitos dessa organização, o produto final (nanoproduto), deve ser avaliado quanto aos seus “modos de exposição”, tendo como resultado final a classificação de praticamente não tóxico, ou seja, ter sua dose letal (LC ou LD50), com resultado maior do que 2.000. Considera-se, nesse ponto, que qualquer material pode levar um indivíduo a óbito, dependendo diretamente da dose e da

exposição à qual ele é submetido. Isto será abordado e detalhado em capítulo próprio.

Tendo como base esses quatro critérios, a estrutura proposta para o desenvolvimento da uma norma, seja ela interna para uma empresa ou mesmo em nível regulatório, deve conter, minimamente, as seguintes seções:

1. Objetivo e escopo – deve justificar a implantação do sistema de avaliação da nanosseguurança, além de seu escopo de aplicação (quais produtos ou famílias estão contemplados nessa norma).
2. Siglas e Definições – as siglas e definições das terminologias utilizadas no documento devem ser listadas nesse tópico. Opcionalmente, pode ser criada uma norma de “Terminologia” para ser referenciada por diversos documentos.
3. Documentos Complementares – normas e regulamentos nacionais ou internacionais que servem de base técnica ou administrativa para a execução da avaliação da nanosseguurança.
4. Condições Gerais – estabelecem aspectos que envolvem a infraestrutura mínima necessária ao grupo que realizará a avaliação da nanosseguurança, incluindo espaços físicos, equipamentos e equipe, relacionando-os ou não com outros terceirizados (ex. laboratórios externos). Além disso, podem estabelecer critérios preliminares para a execução das análises, direcionar formulários de cadastros e rastreabilidade ou custódia das amostras coletadas.
5. Execução da Avaliação da Nanosseguurança – os ensaios e processos devem ser descritos com informações suficientes para a clareza do processo, permitindo, por exemplo, uma possível repetição da avaliação.

Nesta direção, o tópico de execução da avaliação deve conter, dentre outros possíveis dados, o plano de ensaios e as definições de métodos de

amostragem, além de possíveis listas e definições de laboratórios aptos a executar, a partir de características de capacidade. O plano de ensaios pode ser, caso necessário, diferente entre a avaliação inicial e a manutenção da periódica, com foco na máxima segurança com sustentabilidade econômica.

Importante considerar que, nos desenvolvimentos iniciais dos autores acerca da normalização para a avaliação da nanosseguurança, já ficou clara a impossibilidade de um sistema único para todos os tipos de produtos. Trabalhar com “famílias de produtos”, seguindo um mesmo processo operacional, traz diferentes requisitos técnicos de qualidade. Assim, um nanocosmético terá seu próprio regulamento técnico, diferente de um tecido ou uma cerâmica com nanomaterial ou até de uma outra família de nanocosméticos, de acordo com suas características e/ou utilização pretendida (por exemplo, em pó, líquido ou creme). Contemplar todas as possibilidades em um único documento poderá comprometer o controle de revisões do mesmo e dificultar a utilização pelos interessados, pois envolverá muitas exceções ou considerações de métodos versus características.

Então, tendo-se um formato básico de documentação, os critérios que devem ser levados em consideração e os conceitos técnicos de cada critério, os responsáveis pela nanosseguurança poderão criar um arcabouço normativo que contemple a diversidade das possibilidades de avaliação de uma empresa ou nação.

2 Ensaio e Caracterização de Nanomateriais e Nanoprodutos

Em outubro de 2011, a UE publicou sua recomendação inicial sobre nanomateriais (2011/696/EU), mundialmente referenciada como *EC Definition*, com o propósito de fornecer os meios necessários para classificar um material, considerando se é um nanomaterial gerado naturalmente, acidentalmente ou manufaturado. A definição foi o resultado de um processo de mais de dois anos de discussão com comissões de pesquisadores e empresários, agências da UE e consulta pública aberta, mas estava baseada apenas no tamanho das partículas que constituíam o material, sem qualquer ligação com a funcionalidade ou mesmo as propriedades de perigo ou risco.

Atualmente, a Agência Europeia de Produtos Químicos (ECHA) considera “nano” qualquer material que esteja entre 1 a 999 nm e quando ao menos 50% dos componentes que compõem a estrutura tenham dimensões entre 1 e 100 nm. Outra definição interessante foi descrita pela American Society for Testing and Materials (ASTM): “nanotecnologia é um termo que se refere a um conjunto de tecnologias que medem, manipulam e incorporam materiais e/ou características em dimensões aproximadas de pelo menos 1 a 100 nanômetros (nm)” (ASTM, 2007). Esta definição já é aplicada na legislação *Cosmetic Products Regulation* n° 1223/2009, na *Food Information to Consumers Regulation* n° 1169/2011, na mais recente regulamentação *Biocidal Products Regulation* n° 528/2012 e no aditivo *Recast of the Novel Foods Regulation* (adicionado na *Regulation EC* n° 258/97).

A regulamentação *Biocidal Products Regulation* n° 528/2012 adaptou a definição de nanomaterias da ECHA, resultando na definição apresentada na Tabela 2.

Tabela 2: Definição de nanomaterial da Bicial Products Regulation.

Nanomaterial	<p>Uma substância natural ou substância ativa fabricada ou não ativa contendo partículas, num estado desagregado ou na forma de um agregado ou de um aglomerado em que, para 50% ou mais das partículas na distribuição de tamanho, uma ou mais dimensões externas esteja entre 1-100 nm.</p> <p>Os fulerenos, flocos de grafeno e nanotubos de carbono de parede simples com uma ou mais dimensões externas inferiores a 1 nm devem ser considerados nanomateriais.</p>
Partícula	A porção minúscula de matéria com fronteiras físicas definidas.
Aglomerado	Uma coleção de partículas ou agregados fracamente ligadas, em que a área de superfície externa é igual à soma das áreas de superfície dos componentes individuais.
Agregado	Uma partícula compreendendo partículas fortemente ligadas ou fundidas.

O Comitê Europeu para Padronização (CEN - *European Committee for Standardization*) e Comitê Técnico em Nanotecnologias (CEN/TC - *Technical Committee on Nanotechnologies*) não estão desenvolvendo uma terminologia diferente das encontradas nas normas ISO, mas sim, têm acompanhado e utilizado as seguintes normas como base: a ISO/TS 27687:2008 (*Terminology and definitions for nano-objects – Nanoparticle, nanofibre and nanoplate*), a ISO/TS 80004-1:2010 (*Vocabulary – Part 1: Core terms*) e, mais recentemente, a ISO 26824:2013 (*Particle characterization of particulate systems – Vocabulary*), que contém as definições dos termos “partícula”, “agregado”, “aglomerado” e “partícula primária”.

Existem, portanto, vários comitês trabalhando para gerar uma definição e padronização global da Nanotecnologia. Há um recentemente criado Comitê Científico em Riscos à Saúde Emergentes e Recentemente Identificados (*SCENIHR - Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks*), que publicou um relatório intitulado *Scientific Basis for the Definition of the Term 'Nanomaterial'* ou as bases científicas para definição do termo nanomaterial. O relatório identifica as métricas mais importantes na definição de nanomateriais, propondo a definição considerando a distribuição de tamanho de partícula, ao invés da fração de massa para definir quantidade, além de propor que a relação dosagem-resposta deva estar associada diretamente ao potencial de periculosidade em relação ao número de partículas e o total de área de superfície (novamente ao invés da massa do material).

Alguns países europeus usam definições próprias, mas que não conflitam em nada com a definição da EU. Como, por exemplo, a Associação da Indústria Química de Alemanha (VCI), que manifestou sua definição no documento intitulado *"VCI position on the definition of the term nanomaterial for use in regulations laying down provisions on substances"*, como ilustrado na Tabela 3.

Tabela 3: Definição de nanomateriais da VCI.

<p>Nanomateriais</p>	<p>Intencionalmente fabricados, substâncias sólidas, em partículas, ou na forma de pó ou como dispersões ou como aerossóis, que consistem em nano-objetos e seus agregados e aglomerados,</p> <p>(i) que contêm, quando medido por métodos padronizados e reconhecidos, pelo menos 10% de nano-objetos;</p> <p>(ii) ou que têm, quando medido por métodos adequados, uma área de superfície específica com maior volume do que $60 \text{ m}^2 / \text{cm}^3$</p>
-----------------------------	--

Nanoobjetos	Partículas discretas com uma, duas ou três dimensões externas entre cerca de 1 nm e 100 nm.
--------------------	---

Em outro exemplo, o Ministério Francês da Ecologia, Desenvolvimento Sustentável, Transporte e Moradia, publicou em fevereiro de 2012 o decreto 2012-232, sobre a obrigatoriedade de reportar nanomateriais intencionalmente fabricados, rotulados como “substâncias na nanoescala”, conforme Tabela 4.

Tabela 4: Definição de nanomateriais do Ministério Francês da Ecologia, Desenvolvimento Sustentável, Transporte e Moradia

Substâncias na nanoescala	Substância conforme definido no artigo 3º do Regulamento CE nº. 1907/2006, produzida voluntariamente na escala nanométrica, que contém partículas, em estado desagregado, agregado ou aglomerado, por uma proporção mínima de partículas na distribuição de tamanho de partícula, com uma ou mais dimensões externas na faixa de 1 nm - 100 nm.
----------------------------------	---

É certo que dimensões diferentes podem trazer maior ou menor risco para os seres humanos, porém não é desprezível um nanomaterial de 200 nanômetros, ou até de 600 nanômetros, mesmo porque a relação entre o tamanho, a composição química, a forma da partícula, o estado de aglomeração, a concentração e outras características trazem infinitas possibilidades de funcionalização e, conseqüentemente, de nível de risco. Neste sentido, pode-se afirmar que nanomateriais de mesma composição – por exemplo – e mesmo tamanho podem ter níveis de risco diferentes. Enquanto o Brasil não tem sua terminologia definida, o gestor da

organização poderá adotar o trato com nanotecnologia entre 1 e 999 nm, seguindo o Sistema Internacional de Unidades.

Definidos os nanomateriais e nanoprodutos para análise, parte-se para a determinação de suas características, neste capítulo ordenada por:

- Preparação de amostras e dosimetria;
- Protocolos Gerais de Dispersão;
- Degradação e Transformação; e
- Caracterização de Propriedades Nano.

2.1 Preparação de Amostras e Dosimetria

A preparação, dosimetria e dispersão/estabilidade de nanomateriais para testes no meio adequado é uma condição crítica importante, reconhecida internacionalmente por pesquisadores e comitês, pois a detecção de possíveis perigos associados a nanomateriais é influenciada por aspectos como tamanho, formato, área de superfície, entre outras propriedades. Estes parâmetros afetam diretamente o Modo de Ação (MoA), Modo de Exposição (MoE) e o toxicocinética ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). O meio no qual o nanomaterial de teste é inserido é de grande importância, pois, em sua maioria, os nanomateriais são insolúveis ou esparsamente solúveis em água e outros meios de teste utilizados em ecotoxicologia.

Outros fatores importantes, como as propriedades físico-químicas e ecotoxicológicas de nanomateriais devem ser levadas em consideração, pois são altamente influenciadas pelas interações bio-físico-químicas do meio de teste. A melhor forma para atenuar os problemas é a avaliação do nanomaterial de teste em diferentes estágios preparatórios. Podem ser utilizados testes em formato de pó e/ou em dispersões, de acordo com o

parâmetro escolhido e respeitando um processo crítico de preparação que precisa de um controle consistente, relevante, confiável e robusto.

O principal documento guia para preparação e dosimetria de nanomateriais para teste aceito atualmente é o *OECD Document on Sample Preparation*⁸. No entanto, o documento guia somente considera nanomateriais insolúveis, pois, segundo os especialistas, é improvável que nanomateriais solúveis devam ser avaliados diferentemente dos produtos químicos convencionais. Existem, porém, muitos outros esforços além da OECD, que publicaram documentos guias com uma diversidade de protocolos para preparação e dosimetria (*NIST – National Institute for Standards and Technology, Measurement Protocols*⁹, *PROSPECt – Protocol for Nanoparticle Dispersion*¹⁰, *Nanogenotox – Final protocol for producing suitable manufactured*¹¹, *ENPRA – Nanomaterial Dispersion Protocol for Toxicological Studies*¹² e recomendações de Tranta et al. – *Comparison of the effects of different protocols on the particle size distribution of TiO2 dispersions*¹³. Complementarmente a estes esforços, pesquisadores realizaram uma revisão geral dos protocolos de dispersão em meio aquoso, na intenção de harmonizar os procedimentos aplicados em nanomateriais de teste. Um dos resultados obtidos com esses trabalhos foi a conscientização de que a dosimetria clássica utilizada para descrever a dosagem em miligramas de substância/quilograma de animal pode não ser a melhor abordagem, uma vez que a massa de um nanomaterial não é o fator mais importante para se determinar a toxicidade da substância. Outras propriedades possuem igual ou maior importância, como por exemplo, informações sobre a química de superfície, que podem influenciar muito mais a interação bio-físico-química das substâncias com o meio.

2.1.1 Dispersão x Solubilidade

A fim de alinhar as expectativas tanto dos profissionais ecotoxicologistas, como dos especialistas em nanotecnologia, é preciso definir um termo apropriado para adição de substâncias nano em meio líquido. Portanto, é necessário entender os conceitos de dispersão e solubilidade

propriamente. A avaliação de ecotoxicidade é geralmente realizada utilizando-se a dosagem de material em fase líquida, normalmente água. Os ecotoxicologistas se referem a isto com o termo “em solução” ou “solubilidade”¹⁵. No entanto, para química de partículas este termo não é apropriado. Ao introduzir um nanomaterial insolúvel ou esparsamente solúvel em líquido ou qualquer outro meio para ser criada uma solução envolve, contudo, a dispersão do material. A solução, ao contrário da dispersão, é a dissolução completa do material/substância no meio líquido, de forma a ser indistinguível do meio em que está inserido, formando outra substância com a combinação dos elementos utilizados, como por exemplo água com açúcar. No caso da dispersão de nanomateriais, sua estabilidade no fluido é conhecida como dispersão coloidal. O termo coloidal é aplicado a partículas ou qualquer outro material disperso no meio, com distribuição de tamanho entre 1 nm a 1 µm (IUPAC 1997)¹⁶.

Ademais, a OECD historicamente considera o termo “dissolvido” para componentes de um líquido que passam através de um filtro de aproximadamente 0.45 µm. A terminologia apropriada em termos da química, normalização IUPAC e outros fatores, deve ser a de “dispersão” para qualquer nanomaterial sólido adicionado à fase líquida. O termo solução pode ser aplicado em casos especiais, nos quais existam nanopartículas metálicas que liberam íons de sua superfície para fluido ao seu redor, como no exemplo da prata, em que é possível que o nanomaterial dissolva-se no fluido por efeito da corrosão ou degradação. Mas, caso a prata esteja protegida e degrade muito lentamente (liberação de íons controlada), como no caso do revestimento de Citrato ou PVP (polyvinylpyrrolidone)¹⁷ utilizado para estender a funcionalidade da nanop prata, utiliza-se então o termo “dispersão”. Outro fato importante é que as nanopartículas dispersas podem interagir parcialmente ou completamente com outros elementos encontrados na fase líquida, como impurezas, influenciando o resultado geral da toxicidade e destino no meio ambiente e na saúde humana.

Segundo a OECD, ainda não existem informações suficientes para a criação de testes para sistemas coloidais que geram emulsões e, portanto, não foram projetados TGs para estas situações até o presente momento. No

entanto, a OECD reconhece a importância e a necessidade de TGs para emulsões, ao passo que os nanomateriais vêm evoluindo com funcionalizações e modificações adicionais mais complexas. Importante ressaltar que é preciso selecionar o meio e procedimentos mais adequados para testar o nanomaterial antes de executar qualquer experimento de avaliação de toxicologia ou destino ambiental/saúde humana.

2.1.1.1 Estabilidade da Amostra Preparada

As nanopartículas e nanomateriais são geralmente dispersos em água, mas existem outros meios para dispersão, como meio orgânico e óleos diversos. Muitas vezes é necessário utilizar métodos químicos para garantir uma dispersão consistente; para isto, são aplicados estabilizadores (surfactantes/tensioativos e polímeros), modificada a superfície (topológica e revestimentos) ou mesmo modificada a carga de superfície para repulsão. Existem, entre as partículas, três forças diferentes encontradas em dispersões (Figura 12)^{18, 20}:

- Forças de Van der Waals: são forças fracas de atração ou repulsão entre entidades moleculares (ou entre grupos dentro da mesma entidade molecular), que não resultam de ligações covalentes ou das interações eletrostáticas. Podem se apresentar nas formas: dipolo-dipolo permanentes (Forças de Keesom), dipolo permanente-dipolo induzido (Forças de Debye) e entre dipolos instantaneamente induzidos (Forças de London);
- Interação Eletroestática Pura: são forças de cargas (positivas ou negativas) que se separam por uma distância finita, devido à ionização ou à ligação de espécies iônicas. No vácuo, ou em meio dielétrico (íons livres) no ar ou em líquidos orgânicos não polares, as interações eletrostáticas são regidas pela lei de Coulomb;

- Separação Estérica: é o processo pelo qual os agentes tensoativos não-iônicos são adsorvidos ou polímeros produzem uma forte repulsão entre partículas em uma dispersão. A adsorção dos agentes tensoativos não-iônicos ou de polímeros sobre a superfície das partículas ou gotículas produz uma camada adsorvida com espessura “d”, que pode ser fortemente solvatadas (ou hidratadas) pelas moléculas do solvente, quando este é um bom solvente para a camada de surfactante ou do polímero. Quando a distância de separação entre as partículas é menor que “2d”, as partículas podem se sobrepor ou se comprimir, resultando em uma forte força de repulsão, e gerando dois efeitos principais: a mistura desestabilizada e a redução da entropia configuracional.

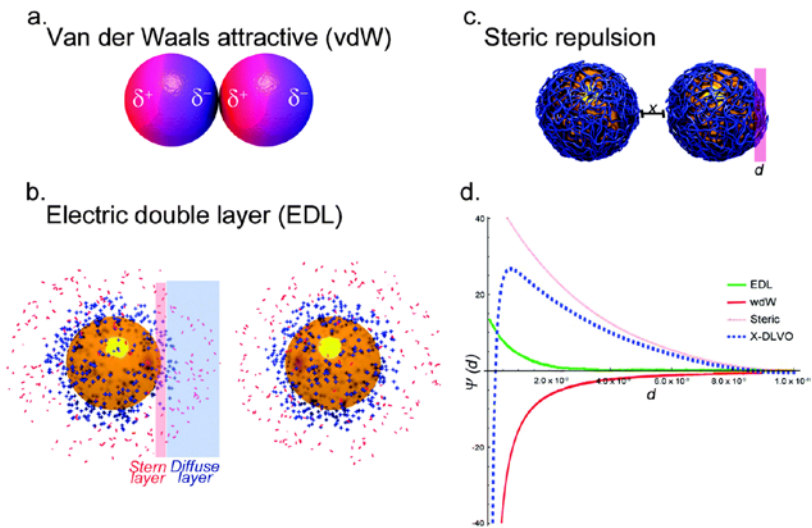


Figura 5 Tipos de forças de dispersão; no item d. DVLO refere-se a Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek¹⁹.

Se os devidos cuidados não forem tomados quanto à estabilidade das partículas primárias na dispersão, as nanopartículas e os nanomateriais sofrerão agregação e aglomeração. A estabilidade depende

exclusivamente do somatório das forças interpartículas, que é determinado pelas propriedades da partícula e meio em que está dispersa, especialmente a sua química de superfície. Um exemplo disto é a dispersão de partículas em água estabilizadas por separação estérica de surfactantes não-iônicos, que seria menos sensível às alterações no pH e às condições eletrolíticas do que aquelas partículas estabilizadas puramente com eletrostática. Em essência, na falta de qualquer modificação ou funcionalização superficial, nanomateriais tendem a formar aglomerados ou agregados, e as partículas primárias não dispersarão no meio, dificultando assim a formação de uma suspensão química estável para a análise e testes de nanomateriais. Ainda, é importante ressaltar que existe uma diferença fundamental entre aglomeração e agregação que são classificadas como NOAA (nano-objetos agregados e aglomerados)²⁰, podendo ser assim definidos:

- **Aglomeração:** conjunto de partículas fracamente ligadas de agregados ou misturas que resultem em uma área da superfície externa similar à soma das áreas das superfícies dos componentes individuais.
- **Agregação:** Partículas obtidas a partir de ligações fortes ou fusões de outras partículas, nas quais a superfície externa pode ser significativamente menor do que a soma das áreas da superfície dos componentes individuais.

Para conceituar o NOAA, pode-se dizer da categoria que engloba nanomateriais e seus agregados e aglomerados superiores a 100 nm. O termo “NOAA” é aplicável a componentes em sua forma original, incorporados a materiais ou soluções dos quais eles possam se desprender durante seu ciclo de vida, incluindo o processo final de descarte.

Para evitar a formação de aglomerado, podem-se utilizar técnicas como a sonicação ou agitação; esta técnica realiza a quebra dos aglomerados em tamanhos menores, o que permite que fiquem suspensos temporariamente no meio. No entanto, uma vez que a sonicação ou a agitação é interrompida, e na ausência de estabilizadores, os aglomerados menores tendem a se reaglomerar em pedaços maiores e precipitar.

Neste sentido, também é necessário obter-se o potencial Zeta e/ou o Ponto Isoelétrico das partículas (ponto em que o potencial Zeta é igual a zero), pois esta informação é importante para a avaliação do destino e integração de partículas no meio ambiente. Porém, para partículas dispersas por separação estérica, o potencial Zeta pode não ser a melhor opção para estimar o destino ou entrega de partículas no meio ambiente.

2.1.1.2 *Dosimetria Apropriada*

Normalmente, para se medir a toxicidade e ecotoxicidade, é necessária uma estimativa da relação de massa (em $\mu\text{g}/\text{GC}$ do animal) em função do efeito deletério, e assim, avaliar a resposta (efeito adverso à saúde) em relação à exposição de um determinado agente tóxico (a dosagem). Desta forma, com a determinação da dosagem-resposta, são obtidos os níveis observáveis (Limite de Dose sem Efeitos Adversos – NOAEL, Menor Limite de Dose com Efeitos Adversos Observados – LOAEL e Dosagem Padrão com Baixo Limite de Confiança – BMDL), antes mesmo de ser evidenciado o evento crítico (morte, falência celular etc)²⁰.

A dosagem de referência RfD é uma dose oral ou cutânea derivada do NOAEL, LOAEL ou BMDL pela aplicação de fatores de incerteza (UF – *Uncertainty Factors*), definida como uma estimativa de uma exposição oral diária para a população humana, incluindo os grupos sensíveis, tais como asmáticos, ou fases da vida, tais como crianças ou idosos, que podem apresentar um risco significativo de efeitos deletérios durante a vida. O RfD é geralmente expressa em unidades de miligramas por quilograma de peso corporal por dia: $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{dia}$. A Figura 6 demonstra como são obtidos os fatores de incerteza e o cálculo do RfD²⁰.

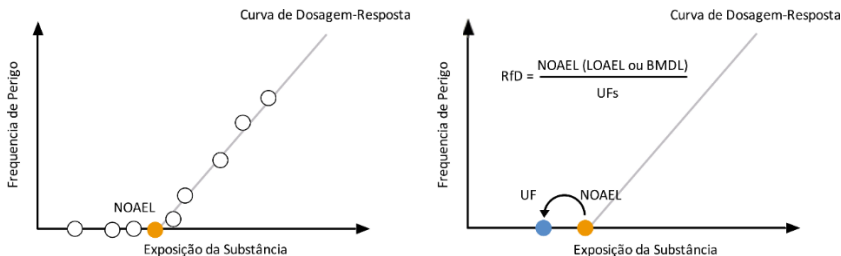


Figura 6: Curvas de Dosagem-Resposta ilustrando o nível NOAEL, UF e cálculo de RfD²⁰.

No entanto, a métrica de massa utilizada nem sempre é a melhor estratégia para se medir a toxicidade ou a ecotoxicidade do nanomaterial. Algumas vezes, a melhor métrica a ser empregada é a número de partículas/distribuição de tamanho de partícula e, mais enfaticamente, a área superficial do nanomaterial. Atualmente, existe um movimento para avaliação de nanomateriais levando em consideração várias propriedades combinadas, em especial a área de superfície e a química de superfície, pois somente a concentração de massa não é suficiente para realizar a comparação de nanomateriais com a mesma composição química. Além disso, a conversão entre as métricas de massa, o número de partículas e a área superficial ainda não foram completamente dominadas e continuam representando um desafio. Portanto, medições das propriedades de área de superfície e número de partículas devem ser utilizados sempre que for possível. Um exemplo de aplicação é a contagem do número de partículas e da área superficial, que são parâmetros relevantes para mensuração e análise de nanomaterial em forma de pó.

Importante salientar o cuidado especial devido na caracterização de nanomateriais (para a obtenção das propriedades-chave) com a menor incerteza possível. Uma adequada caracterização leva em consideração o campo da aplicabilidade e projeto do teste necessário e seleção do método ou instrumentação mais apropriada para o trabalho. Isto é implicado diretamente pela seleção das doses e na preparação da amostra, que tem o potencial real de minimizar a incerteza e os desvios de medições. Embora não exista um consenso definitivo da melhor métrica a ser utilizada, existe

um crescente entendimento e acordo de que a melhor opção, quando se faz teste de nanomateriais, é de executar número suficiente de caracterizações para que seja obtida a dosagem-resposta nas diferentes métricas apresentadas: número de partículas, área superficial e massa.

Devem ser obtidos dados em relação à distribuição de tamanho de partícula, de área específica e de outras propriedades para reduzir as discrepâncias das mensurações. A medição da distribuição de tamanho de partículas deriva da função de concentração de massa do material e, portanto, devem ser realizadas mensurações a cada dose de teste do nanomaterial. Outra observação importante é que a aglomeração é um processo lento e, especialmente para concentrações muito baixas, pode não ser detectada a tempo. Portanto, é necessário repetir as medições em intervalos regulares para garantir a qualidade da métrica, detectar e gravar as informações das mudanças dinâmicas da dose de teste. O mesmo cuidado deve ser aplicado ao se medir a área específica, pois normalmente mensuração é realizada em nanomaterial em pó e, se não estabilizada, agregações e aglomerações podem ocorrer. É possível realizar a medição da área superficial em líquido, porém não diretamente; o que se obtém é uma derivação da área por meio de medições de tamanho. Este procedimento deve ser feito com maior cuidado, pois podem gerar resultados incorretos. Uma maneira de mitigar os riscos de mensurações é utilizar outras técnicas de mensuração para apoiar, com mais propriedade, os resultados observados, como por exemplo, utilizar imagens de MET para identificar o nível de agregação ou aglomeração.

2.1.2 Problemas comuns com a Preparação e a Dosimetria

Os protocolos de preparação podem ser intimamente dependentes do meio e da natureza do material a ser disperso; portanto é sugerido, sempre que possível, realizar um esforço para que os métodos de preparação do meio sejam consistentes com outros meios similares. A desejada uniformização de meios de teste minimiza a variação nos resultados das propriedades de nanomateriais e fortalece a relação dos resultados de destino, testes e efeitos de exposição em organismos. Nem sempre é fisicamente possível realizar a uniformização do meio de teste;

portanto, outras medidas devem ser tomadas, como a modificação/funcionalização de superfície e o devido controle de outras propriedades correlacionadas.

2.1.2.1 *Dispersão de Teste Padrão e Armazenamento*

Existem vários fatores a serem considerados na preparação e dosimetria para testes de nanomateriais, dentre eles a presença de pequenas impurezas, o armazenamento do material e dispersão de teste-padrão (*stock dispersion*), o tipo de meio a ser disperso e a forma como o material é manipulado. Portanto, procedimentos de operações-padrão (SOP – *standard operational procedures*) e boas práticas de laboratório (BPLs) são de grande importância para garantir um ambiente limpo, livre de impurezas, reprodutibilidade e resultados de testes que sejam confiáveis. Estes cuidados são válidos e podem ser aplicados diretamente para testes toxicológicos, ecotoxicológicos e testes de exposição e integração de partículas no meio ambiente, principalmente na garantia do controle de impurezas, um dos fatores mais preocupantes em testes de nanomateriais. Impurezas, mesmo em quantidades ínfimas, podem causar um forte impacto na leitura de mensurações de propriedades bio-físico-químicas e, conseqüentemente, comprometer a qualidade dos resultados dos testes.

Modificações e funcionalizações de superfície em nanomateriais são artifícios muito utilizados para influenciar significativamente a reatividade química e, em contrapartida, reduzem os potenciais efeitos ou interações com organismos vivos e com o meio ambiente. Estas modificações são geralmente empregadas para minimizar os efeitos de aglomeração e agregação, reduzindo a toxicidade do nanomaterial. Este é um passo importante que deve ser usado, quando possível, na intenção de desenvolver uma solução nanotecnológica sustentável. Existem, no entanto, casos em que a introdução de DNA ou proteínas na superfície do nanomaterial cria uma nanopartícula *stealth*¹⁹, que demonstra um aumento da sua captação em células *in vitro*. Este aumento da capacidade de absorção sugere um forte impacto em estudos de ecotoxicologia. Portanto, o tipo de material disperso (partículas primárias, agregados e

aglomerados) pode oferecer uma resposta substancialmente diferente, dependendo do tipo de funcionalização aplicada.

Importante ressaltar que o nanomaterial a ser testado deve sempre ser acondicionado em sua embalagem original e de acordo com recomendações do fabricante, para que exista o mínimo de influência nos resultados dos testes. No entanto, quando as informações do fabricante forem limitadas, deve-se considerar a natureza do nanomaterial e suas principais propriedades conhecidas, obedecer conceitos já estabelecidos para o armazenamento de produtos químicos convencionais, evitando temperaturas extremas, exposição solar e umidade. Por exemplo, nanomateriais em formato de pó devem ser armazenados em local com umidade controlada para que não aglomere. No caso de nanomaterial em pó com atividade fotocatalítica, deve ser mantido no escuro e armazenado em local com umidade, para evitar a adsorção e reação com outros materiais existentes na atmosfera do laboratório.

A realização dos testes depende primariamente de uma boa dispersão de teste livre de impurezas. Uma vez preparada, a dispersão de teste deve ser caracterizada completamente e seu tempo de prateleira definido a fim de confirmar as informações providenciadas pelo fabricante. A obtenção do tempo de prateleira e as características da dispersão de teste são elementos fundamentais para se definir o processo de extração de amostras, as análises necessárias e periodicidades, pois, conforme comentado anteriormente, para manter uma dispersão consistente sem aglomerados ou agregados, pode ser necessário o uso de algum método auxiliar como a sonicação, por exemplo.

Assim, para garantia de uma boa dispersão, aspectos-chave devem ser observados:

1. Se o nanomaterial gradualmente dissolverá ou se transformará em outra espécie, de tal modo que o material sólido desapareça no meio de teste, tal qual no caso de nanopartículas metálicas que formam íons de metal livres no meio externo.

2. Quaisquer alterações temporais na distribuição de tamanho de partículas e na carga de superfície das nanopartículas na dispersão de teste.

Caso alguma mudança ocorra na dispersão de teste, o protocolo deve prever ações para reestabelecer as propriedades originais mensuradas, como, por exemplo, a ressonância da dispersão para desaglomerar as partículas primárias. Se não for possível restabelecer as condições originais, uma nova dispersão de teste deverá ser preparada, utilizando-se o mesmo lote do nanomaterial de teste, e uma nova caracterização completa deve ser realizada. Se não for possível usar o mesmo lote de nanomaterial, então podem ser necessárias caracterizações adicionais para garantir os limites da uniformidade do teste ou iniciar o processo completo novamente.

2.1.2.2 *Composição química do meio de teste padrão*

O meio de teste é tão importante quanto a extração da amostra do nanomaterial a ser testado; portanto, a composição química do meio deve ser construída com o devido cuidado e controle, para que tenha a mínima influência nos resultados dos testes. Os parâmetros a serem controlados para quaisquer testes de ecotoxicologia, toxicologia animal e estudos *in vitro*, são definidos abaixo:

- **Força iônica**²¹: uma quantidade que representa a força do campo eléctrico em uma solução.
 - Nanomateriais tendem a aglomerar em soluções muito diluídas de água salobra. Estudos demonstram que a concentração de sal em solução tem um efeito imediato na aglomeração e consequente toxicidade de nanomateriais, tanto que apenas 2% de sal na água do mar é suficiente para influenciar o estado das partículas primárias. Para qualquer avaliação marinha ou estuarina, deve-se monitorar e registrar os níveis de concentração de sal (NaCl). O mesmo deve ser feito para qualquer

dispersão-teste padrão usada em análises sem/com células ou de animais. Em água natural doce e na água do mar, o sal está normalmente presente dissolvido e age com eletrólito. É importante notar que, em ocasiões em que não são usados surfactantes como em pigmentos de tintas, as partículas formam agregados. A força iônica deve ser mensurada para todos estes casos.

- **Concentração de Cálcio (Ca) e Dureza:** íons de metal divalente podem afetar significativamente o estado de aglomeração, especialmente em dispersões com baixa concentração. Em toda a avaliação de ecotoxicologia, a concentração de Cálcio (Ca) deve ser mensurada. Em avaliações de animais, se for usada água potável como meio, a concentração de Ca, Magnésio (Mg) e a dureza total da água deve ser mensurada. Atenção deve ser dada à mensuração das concentrações dos elementos Ca e Mg em dispersões salinas, especialmente quanto ao ânion utilizado (por exemplo, $MgSO_4$ ou $MgCl_2$).
- **pH:** medição rotineira para qualquer análise. O pH afeta principalmente a aglomeração de nanomateriais carregados. Normalmente, as soluções salinas fisiológicas (soro fisiológico) contêm soluções-tampão e a exata formulação química, nome do químico e outros detalhes devem ser registrados devidamente, independentemente de serem produzidas em laboratório próprio ou compradas.
 - **Alcalinidade:** um caso especial do efeito do fator de pH, que faz parte de análise rotineira para medições de ecotoxicologia, mas não aplicada a análises *in vitro* ou na toxicologia de animais. No entanto, o valor da alcalinidade é especialmente importante quando se utilizam soluções-tampão de bicarbonato para controlar o pH de soluções salinas.

- **Material orgânico dissolvido (DOM – Dissolved Organic Matter):** a presença de qualquer material orgânico (impureza) potencialmente afetará a aglomeração e a dispersão do nanomaterial de teste. É sempre prudente obter-se uma informação geral a respeito da quantidade de matéria orgânica em qualquer meio de teste. Isto pode ser feito com mensuração do total de material orgânico ou da quantidade de carbono orgânico dissolvido na água. Em casos de análises sem/com células ou de animais é adicionada a albumina de soro bovino (BSA)²² e preparações de antibióticos em soro fisiológico e, portanto, uma medição da concentração total de matéria orgânica pode apresentar uma visão geral do tipo de água. Importante também utilizar reagente de alta pureza (BSA livre de ácidos graxos) para melhorar uma medição. Algumas substâncias orgânicas são facilmente adsorvidas na superfície do nanomaterial, as quais modificam as propriedades de carga de superfície e, conseqüentemente, seu comportamento de dispersão. Substâncias orgânicas podem reagir diferentemente a diferentes modificações superficiais e formatos e fases de materiais; por exemplo, os TiO₂ NPs em fase anatase são mais reativos com material orgânico do que sua fase rutilo. Assim, é necessário registrar devidamente cada substância orgânica (proteínas, antibióticos) utilizada na preparação da dispersão-teste padrão.
- **Agentes Dispersantes (surfactantes):** devido à grande área superficial dos nanomateriais, normalmente uma concentração alta de surfactante é adicionada para estabilizar a dispersão. O uso de agentes surfactantes pode modificar a biodisponibilidade do nanomaterial e influenciar fortemente as análises de destino e o comportamento ambiental em condições naturais. A dificuldade aqui é separar o que é surfactante do que é nanomaterial e, por conseqüência, a emulsão gerada aparentar menos tóxica. Muito cuidado deve ser tomado na condução dos testes e na interpretação de resultados, quando o uso desses agentes é

indispensável para a estabilidade das partículas e/ou para dispersão de teste. Deve ser registrada a informação detalhada da fórmula estrutural e concentração do surfactante utilizado.

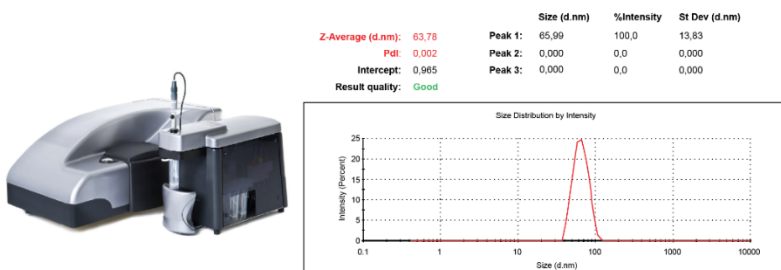
2.1.2.3 *Caracterização da dispersão-teste padrão*

Além de testes de qualidade de água em análises ecotoxicológicas, teste de qualidade de salinidade em análises animais ou mesmo otimização de características de soluções usadas em metodologias *in vitro*, existem outras informações essenciais para testes de nanomateriais em análises toxicológicas humanas e ecológicas. Primeiramente, deve-se obter do fabricante o máximo de informação a respeito do nanomaterial, para então realizar a caracterização completa da dispersão-teste padrão, coletando as principais medidas descritas a seguir:

Tamanho médio da partícula primária: o método para determinar o tamanho da partícula deve ser descrito e o caráter da média (número de partícula, volume, número atômico (z)²³ ou intensidade) definido. Todo o cálculo deve ser registrado em detalhes quando o valor é obtido por derivação da medição de dados primários como, por exemplo, a média de volume obtida por DLS da medida z . Um ME não consegue medir diretamente em dispersão. Em alguns casos (com alta concentração), pode não ser possível medir o tamanho de partícula na dispersão de teste; portanto, para esses casos, é necessário preparar versões diluídas de dispersão de acordo com os TGs já aprovados pela OECD.

Distribuição de tamanho de partícula e indicações de mono e polidispersidade: podem ser avaliados por técnicas de espalhamento dinâmico de luz (DLS), métodos óticos similares, ou qualquer outra tentativa de identificação de agregados e aglomerados, faixas de tamanho partículas e até mesmo a dispersão de partículas primárias na dispersão de teste. É muito importante padronizar a metodologia usada para derivar a medida de distribuição de tamanho e para descrever os procedimentos aplicados para as medições. Informações detalhadas sobre a dispersão-teste padrão devem ser sempre registradas, assim como tipo de solução tampão, salinidade, composição exata do meio, pH medido, temperatura, arejamento e gaseificação, pois todos esses fatores afetam diretamente a

distribuição de tamanho. O método da dispersão deve também ser descrito em detalhes: tipo de agitação, duração, velocidade da agitação, potência de sonicação – preferencialmente em termos de entrada de energia em W/H (KOHASHI), tempo, tipo de equipamento, sonda e profundidade de inserção utilizada, volume da amostra, dentre outros. Uma das formas de se obter medida de tamanho e distribuição de tamanho de partícula primária e de nanomateriais está ilustrada na Figura 7¹⁹.



Intensidade de Flutuações e Movimento Browniano

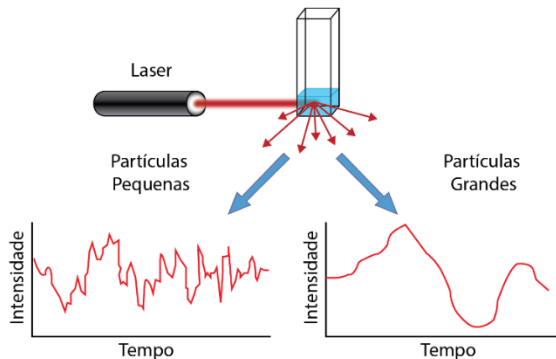


Figura 7: Método de medição do tamanho e distribuição de tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz (DLS)²⁰.

Concentração de massa: unidade mensurada em miligrama por litro (mg/l), a qual descreve a concentração de nanomaterial não dissolvido na dispersão. Em casos em que há dissolução de material, como em nanomateriais metálicos, é necessário medir a concentração de íons

liberados (BET) por meio da centrifugação da suspensão, para determinar a concentração de metal no meio e a massa total do metal em suspensão, conforme ilustrado na Figura 8.

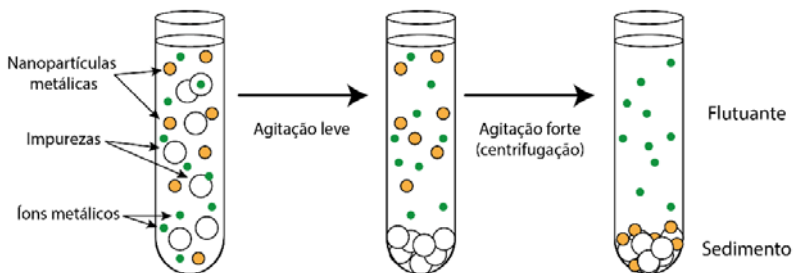


Figura 8: Separação de elementos por agitação²⁴.

Área de superfície: medida realizada em material em formato de pó, em que é calculada, pela adsorção de gás inerte, a soma das áreas das superfícies expostas das partículas por unidade de massa, expressa em m^2/C , denominado método de *Brunauer, Emmett e Teller* (BET). Se as partículas não estiverem ligadas muito fortemente, o gás consegue acessar grande parte da área superficial do pó e apresentar uma mensuração muito precisa do tamanho da partícula, independente do grau de aglomeração, determinando o tamanho das partículas primeiras, as quais constituem o nanomaterial. Para uma medição correta é preciso remover todo e qualquer gás existente no nanomaterial, o denominado processo de *Outgassing*²⁰. Assim, é possível obter uma boa estimativa da área e superfície de partículas primárias quando estas estão levemente agregadas na dispersão. No entanto, é preciso grande cautela para extrapolar a medida em forma de pó para dispersões aquosas. A Figura 9 demonstra o funcionamento da técnica BET.

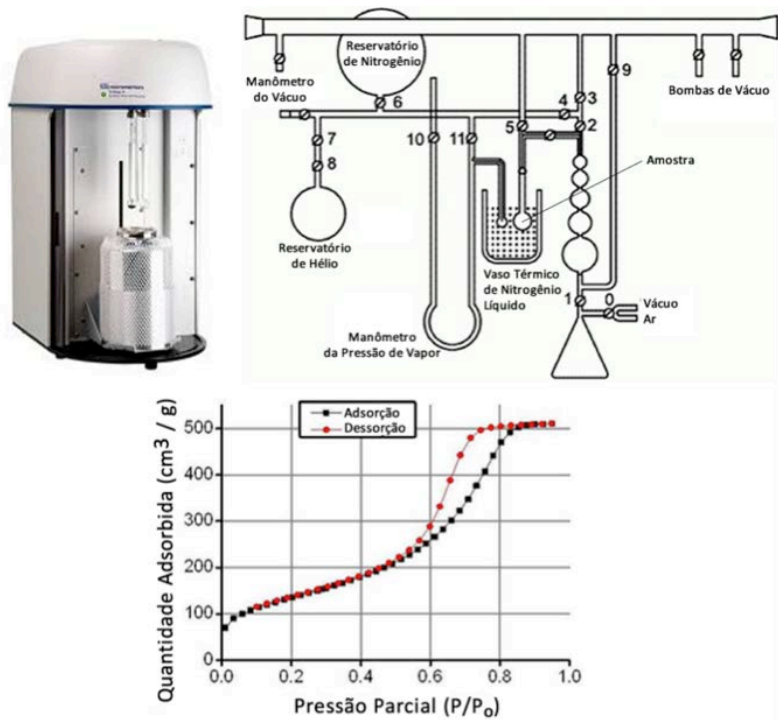


Figura 9: Exemplo de equipamento BET, esquemático de funcionamento e análise da área superficial específica²⁰.

Carga de superfície: o potencial Zeta de uma partícula é a medida de sua carga de superfície. Esta medida é crucial para o processo de aglomeração, que pode influenciar a absorção de íons, contaminantes, a interação da partícula com biomoléculas, a captação em células (fagocitose) e como as células reagem quando expostas à partícula. O potencial Zeta é obtido em função das forças iônicas e da composição do meio de dispersão, e uma pequena perturbação das forças e do meio de teste pode alterar o valor medido. Para uma melhor medição, é preciso monitorar e fixar o valor de pH, a força iônica e outros fatores abióticos³ da dispersão.

A estabilização da solução coloidal é um fator-chave contra a agregação ou aglomeração de nanoestruturas. De acordo com a teoria Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) que depende do potencial Zeta, a estabilidade do coloide é determinada pelo equilíbrio de forças de atração de van der Waals com as forças repulsivas elétricas de dupla camada (Figura 10). Se as forças atrativas dominarem, então as partículas tendem a agregar. Quanto maior for o potencial Zeta, mais forte será a repulsão e, portanto, mais estável será o sistema. Por exemplo, um elevado potencial de Zeta das gotículas de gordura no leite previne coalescência da solução, e reduzir-se o potencial Zeta (com a adição de ácido) leva à formação de queijo a partir da coalescência das gotas²⁰.

³ Abiótico: são elementos químicos e físicos não vivos do meio ambiente que afetam organismos vivos e o funcionamento do ecossistema.

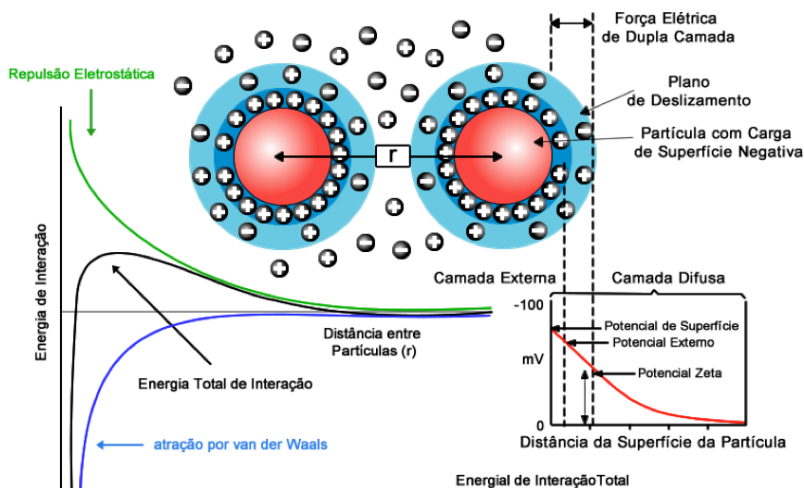


Figura 10: Esquemático do funcionamento da teoria de Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) e Potencial Zeta²⁰.

Concentração e presença de impurezas: é possível que agentes contaminantes possam ter sido incorporados durante o processo de produção, manuseio e de dispersão do nanomaterial. Existem algumas impurezas conhecidas inerentes a diversos processos de produção de nanomateriais, como a contaminação de nanotubos de carbono por ferro, devido ao uso de catalizadores metálicos na fabricação²⁵, a presença do tetrahydrofurano (THF) e seus subprodutos em fulerenos, devido ao processo de preparação da dispersão com permuta de solvente²⁶ e contaminações de nanomateriais por endotoxinas durante o processo de fabricação e manipulação²⁷. Algumas vezes, a contaminação pode ser encontrada em situações do dia-a-dia, como a presença de hidrocarbonos poliaromáticos em partículas originadas na exaustão do diesel em veículos²⁸, as quais devem ser mensuradas para se ter uma comparação válida em todas as avaliações. Em outros casos, os contaminantes não são intrínsecos, mas sim incluídos pela adição de outro reagente, como no caso de surfactantes. Nesta situação, é necessário também mensurar a presença de contaminantes em dispersões de controle. Os processos também podem gerar contaminantes, como a ultrassonificação que às

vezes produz impurezas originadas pela ablação da ponta da sonda de agitação com o recipiente. É aconselhável utilizar etapas de purificação no processo de preparação da dispersão-teste padrão, para garantir remoção das impurezas.

Quando possível e factível, é necessário que seja feita uma avaliação completa da dispersão-teste padrão, identificando impurezas orgânicas e inorgânicas conhecidas e desconhecidas. Portanto, é indispensável obter do fabricante a maior quantidade de informação sobre o produto, quanto aos aditivos utilizados, possíveis subprodutos, condições de uso etc.

O recipiente também é um item a ser considerado com cuidado quando se prepara a dispersão de teste, pois o tipo, volume e o material do recipiente são outros fatores externos que podem influenciar as mensurações das propriedades e a pureza da dispersão de teste²⁹.

Qualquer outra mensuração de propriedades relevantes a um tipo específico de nanomaterial deve ser realizada e devidamente registrada. Por exemplo, para avaliar a situação do paradigma de fibra²⁰ em fibras, é necessário avaliar o comprimento e a funcionalidade superficial.

2.1.2.4 Caracterização de amostras da dispersão-teste

As recomendações apontadas para a caracterização de dispersão-teste devem ser seguidas com o cuidado de se extrair quantidades de pontos de amostragem consistentes ao longo do tempo, no intuito de se obter uma melhor precisão da mensuração das propriedades. Caso não seja definido um ponto de amostragem consistente, os valores de tamanho de partícula e a concentração podem variar bastante com a profundidade de extração da amostra, principalmente quando a dispersão foi deixada descansando. Geralmente, uma boa agitação mecânica/por vórtice feita periodicamente ou antes de coletar a amostra, pode ser útil. Para uma caracterização coerente de amostras devem ser avaliadas as seguintes informações:

- Volumes preparados, tipo de água ou solvente utilizado;

- Valor do pH e o uso de algum tipo de solução-tampão;
- Detalhes exatos dos tempos de sonicação (preferencialmente em J/l) em termos de duração/intensidade/equipamento utilizado e frequência do ultrassom;
- Detalhes exatos de quanto tempo após a sonicação ou mistura/agitação a dispersão teste foi submetida antes de ser transferida para o recipiente de teste. O registro de qualquer período de tempo de sonicação ou mistura/agitação extra utilizada imediatamente antes de realizar o teste, também pode ser útil. Registrar também qualquer recharacterização da dispersão-teste após modificação do pH, sonicação ou outro tratamento realizado;
- Detalhes exatos dos volumes adicionados aos tanques ou recipientes de teste e como foram misturados nos recipientes/tanques. Por exemplo, no caso de se utilizar mistura passiva por difusão de bolhas de ar no sistema. É importante registrar os detalhes a respeito da profundidade do fluido, o tipo de sonda utilizada, a profundidade de contato da sonda com o fluido em tratamento no tanque/recipiente, sempre mantendo as relações constantes em todos os testes;
- Valor do pH final, força iônica e a matéria orgânica dissolvida.

2.2 Protocolos Gerais de Dispersão

Atualmente, não há amplo consenso sobre as melhores abordagens para a preparação de amostras de nanomateriais. Entretanto, publicações descrevem avaliações dos métodos de preparação para nanomateriais específicos (por exemplo, nanop prata), e sugerem procedimentos operacionais padronizados, bem como a utilização de recursos naturais

dispersantes, ao invés de solventes puros como agentes de dispersão ou de suspensão⁶⁵. Uma revisão da literatura também revela que uma vasta gama de métodos de suspensão continua a ser utilizada e inclui o uso de solventes fortes (por exemplo, tetrahidrofurano, THF), agentes de dispersão ou estabilizantes (por exemplo, TWEENTM, citrato etc.), banhos térmicos, ultrassonicação, agitação durante um largo intervalo de tempo, fresagem dos grãos⁶⁶, entre outros que podem influenciar/modificar os resultados do nanomaterial a ser testado. Recentemente, um estudo internacional de avaliação de nanomateriais feito pelo *Environment Canada* confirmou as práticas proibitivas e, além disso, trouxe evidências de que alguns solventes podem alterar as propriedades do nanomaterial e sua toxicidade ou até mesmo ser substâncias tóxicas⁶⁷.

Além disso, na maioria dos casos, a caracterização dos nanomateriais ensaiados é feita muitas vezes limitada à dispersão de trabalho e de teste, ao invés de considerar o meio de exposição após diluição ou mesmo diretamente nos recipientes de teste. Existe uma preocupação que estas ações não produzam resultados semelhantes a todos os nanomateriais ou formas de um nanomaterial específico, como por exemplo, em formas dominantes de dióxido de titânio de cristais anatase ou rutilo com superfície tratadas e não-tratadas.

Estas avaliações, em alguns casos, são fortemente dependentes dos métodos de caracterização utilizados; por exemplo, DLS pode dar respostas diferentes em comparação com TEM ou outras abordagens de microscopia. Por todas estas razões, a preparação de meios de exposição para testes de ecotoxicidade ainda não pode ser totalmente padronizada, e deve continuar a ser vista como experimental e definida caso a caso.

A variabilidade nas propriedades de nanomateriais, notadamente a respeito do tamanho de aglomerados ou agregados, é constantemente demonstrada a partir de dependência significativa dos valores de pH do meio, força iônica, concentração e forma de material orgânico dissolvido (DOM)^{65, 68, 69}. É reconhecido que, até mesmo em distribuições estreitas de íons dissolvidos em um intervalo de 3,4 a 13,3 mg/L (milimol por litro), dentro da faixa de água doce, as variações de aglomerados e agregados

podem ser de duas a três vezes em tamanho⁶⁹. Isto ocorre porque a área da superfície total para um dado volume de material aumenta ao quadrado, em função da redução do tamanho de partícula. Uma área exponencial, praticamente infinita para realizar reações químicas, favorece ainda mais as interações superficiais — como em interações de nanomateriais e sistemas bióticos, nas quais são formados filmes orgânicos sob a superfície do nanomaterial — e além disso, os efeitos de força iônica que atraem outras partículas e impurezas criando partículas ainda maiores. Todos esses efeitos possuem claras implicações para a exposição em testes de toxicidade de nanomateriais. A extensa literatura descreve suas interações de DOM com produtos químicos contaminantes (por exemplo, metais), e sugere que as propriedades, o destino e a toxicidade de nanomateriais podem ser fortemente afetados³⁰.

A influência das DOM tem sido demonstrada em vários estudos de estabilização de partículas em suspensão, e na redução de aglomeração ou agregação. A interação dos nanomateriais e DOM também pode alterar a biodisponibilidade e as taxas de absorção por organismos vivos^{44,70}. É também importante reconhecer que DOM em si é altamente variável entre as fontes de água, sua caracterização é difícil, e pode ser composta por uma ampla gama de materiais aromáticos, de lipídios, proteínas, e outros componentes, além de todos os outros fatores que podem produzir variações em nanomateriais.

Uma preocupação adicional é a degradação dos nanomateriais durante o teste, sendo o mais importante a liberação de espécies solúveis (por exemplo, íons) a partir de superfícies sólidas. Isto é particularmente importante quando as espécies solúveis (por exemplo, íons liberados) são particularmente tóxicos, ou possuem estreita proximidade com potenciais alvos biológicos, como no caso dos íons de prata (Ag^+) liberados a partir de nanopartículas de prata. A literatura identifica que a prata iônica é altamente tóxica para os organismos aquáticos, mesmo com níveis de liberação baixa e lenta, em $10 \mu\text{g/L}$ (micrograma por litro). Este processo é conhecido como degradação, fenômeno que pode ser observado em outros tipos de nanopartículas, como o dióxido de zinco (ZnO) e possivelmente, nanopartículas de cobre (CuO)^{65, 65, 71}.

O controle e medição desses fatores é altamente desejável para assegurar melhores resultados em análises, com dados tão coerentes e comparáveis quanto possível. Todo e qualquer esforço deve ser realizado para quantificar esses fatores em intervalos de tempo suficientes para descrever completamente as condições de exposição e, ainda mais importante, o seu efeito em concentrações mássicas e em tamanho de partícula ao longo da duração dos testes. Sempre que possível, sugere-se também que esforços adicionais sejam feitos para determinar como esses fatores afetam o comportamento das partículas e suas propriedades. Na ausência de métodos amplamente aplicáveis para a produção de meios de exposição para avaliação de efeitos bióticos, é aconselhável envidar esforços para minimizar a variabilidade intra e inter laboratórios. Um exemplo de esforço são os ensaios simples em béquer que podem ser feitos para uma gama de valores típicos de pH no sistema de teste, para que os efeitos no tamanho de partícula⁷² sejam quantificados.

É fortemente recomendado também que, para ensaios que envolvam testes de ecotoxicidade e comportamento ambiental, degradação, transformação e bioacumulação, sejam utilizados métodos comuns para a preparação de meios de teste. Esta abordagem irá maximizar a comparabilidade e integração de avaliações de exposição e efeitos, aumentando a probabilidade dos nanomateriais apresentarem propriedades semelhantes, pelo menos no momento inicial de cada tipo de teste. Podem também ocorrer circunstâncias em que existam métodos bem controlados para preparação de meios para os testes relacionados com o destino, mas não para testes ecotoxicológicos. Devido à variabilidade e incerteza nos níveis de exposição reais, mesmo sob condições controladas de laboratório, é importante mensurar e registrar a exposição em termos de doses internas e/ou carga corporal no final do período exposição.

A seção de bioacumulação oferece recomendações para medir o nível de nanopartículas ou seus produtos de transformação em biota.

2.2.1 Preparação do Meio de Dispersão Aquoso

A dispersão de nanomaterial pode incluir agitação, sonicação, moagem, a utilização de solventes, e agentes estabilizantes⁷³. Isto sugere que alguns nanomateriais podem ser significativamente alterados por sonicação e moagem (por exemplo, os nanotubos de carbono podem ser encurtados, os revestimentos podem ser removidos, as superfícies podem ser hidroxiladas etc.) e que a interação de solventes com alguns nanomateriais pode resultar em subprodutos tóxicos. O método de dispersão dependerá também do material específico se a superfície do material a ser testado foi ou não tratada. Boas práticas científicas devem ser utilizadas na escolha dos métodos, e onde há provas ou uma indicação de que um método de dispersão pode alterar significativamente a toxicidade, esses efeitos devem ser controlados ou quantificados. O objetivo geral dos esforços de dispersão é produzir tamanhos de partículas consistentes com polidispersidade previsível.

É pouco provável que essas propriedades serão estáveis durante períodos de renovação ou de duração do teste. O objetivo deve envolver a existência de um meio de teste inicial reproduzível e o monitoramento das alterações de propriedade com frequência suficiente para quantificar estas alterações. Em alguns casos, podem ser usados filtros para remover as partículas maiores, com malha de 0,45 μm ou de 0,22 μm ⁷⁴. Esta abordagem deve ser alterada, quando existirem informações relevantes disponíveis em relação ao comportamento ambiental dos tamanhos de partículas. Isso pode incluir informações do fabricante em relação aos tamanhos produzidos e incorporados em produtos, e improváveis processos de pós-produção que podem alterar tamanho de partícula ou sua distribuição. Supõe-se que os ensaios serão realizados utilizando abordagens de renovação periódica para evitar despesas extras e desperdício de produtos. A qualidade do meio de teste (pH, força iônica, concentração de DOM) deve ser harmonizada tanto quanto possível entre os estudos comparativos. Uma fonte importante de procedimentos padronizados é a base de dados do Centro para Implicações Ambientais da Nanotecnologia, nos EUA (*CEINT - Center for the Environmental*

Implications Nanotechnology) que, em cooperação com o NIST, mantém uma coleção de protocolos e SOPs⁷⁵.

2.2.2 Qualidade do Meio de Teste

É essencial que o pH, a força iônica, e a concentração de DOM deva ser quantificada e uniformizada tanto quanto seja possível para todos os testes e suas repetições, medições de parâmetros e comparações entre laboratórios. Cuidados devem ser tomados para assegurar que mensuração das propriedades físico-químicas são representativas para as outras condições de ensaio. Por exemplo: é muito difícil determinar todo um conjunto de propriedades físico-químicas de um material em água deionizada, devido à alta força iônica. Portanto, recomenda-se que a caracterização físico-química deva ser efetuada no meio do teste padrão, e sempre que possível, avaliações de qualidade do meio de teste devem ser feitas em intervalos suficientes para determinar a sua variabilidade, tanto em soluções-reserva como no meio do teste. Normalmente, os intervalos descritos em diretrizes atuais devem ser suficientes; contudo, mais avaliações devem ser realizadas quando houver evidência ou indicação de aumento da variabilidade, talvez devido ao material testado, como por exemplo, a interação de DOM com fulerenos ou nanotubos de carbono.

É recomendado usar a mais pura água disponível, ou seja, água ultrapura. Os protocolos mais bem-sucedidos foram testados utilizando ambos Nanopure Diamond® UV system (*Thermo Scientific*) e água filtrada Millipore MilliQ (*MilliPark Gammagold*). Não foram observadas diferenças na qualidade das dispersões de lotes. O controle de qualidade da água pode ser feito antes do uso, especialmente em casos nos quais a análise e os ensaios podem ser influenciados por vestígios orgânicos em baixas concentrações. Para a amostragem geral e de validação, sugere-se a coleta de água em recipientes quimicamente estáveis limpos por ácido, adequada para a análise elementar¹⁰.

2.2.3 Caracterizações Físico-Químicas

A qualidade da água pode ser controlada, verificando-se as partículas por DLS, a concentração elementar por Espectrometria de Absorção Atômica

(AAS - *Atomic Absorption Spectrometry*) ou Massa por Plasma Indutivamente Acochado de Partícula Única (ICPMS), Unidade de Formação de Colônias (CFU - *Colony-Forming Units*) e endotoxinas pelo crescimento em placas de Petri ou análise específica, antes do uso da água. Se a amostra de água passar no teste de qualidade, a água é assegurada como pura e pode ser usada nos testes⁷⁷.

É provável que a aglomeração ocorrerá durante a maioria dos testes de toxicidade e poderá alterar e reduzir a probabilidade de exposição ao organismo de teste, devido a contagens reduzidas de partículas, área de superfície, ou perda de concentração em massa. Por esta razão, partículas e/ou distribuição de tamanho de aglomerado e concentração do material devem ser avaliadas em intervalos suficientes para quantificar exposições. Contando-se com poucos estudos sobre as medições desses parâmetros para nanomateriais — em toda a série de diluição ou em intervalos durante a exposição — ainda é difícil prescrever uma abordagem específica. No entanto, se possível e no mínimo, estas análises devem ser feitas imediatamente antes e depois da renovação do meio de teste. Também é desejável medir a distribuição de tamanho de partículas/agregados/aglomerados, utilizando-se dois ou mais métodos, por exemplo, DLS e SEM, TEM (possivelmente Crio-TEM), e outras técnicas de microscopia auxiliares e disponíveis. Sempre que possível, sugere-se também que os métodos de determinação de tamanho sigam abordagens diferentes e complementares. Por exemplo: obter o tamanho de partícula por DLS com base no diâmetro hidrodinâmico e mobilidade eletroforética (na determinação do tamanho podem ocorrer erros devido à carga da camada), enquanto que a microscopia prevê uma direta observação e medição visual do tamanho físico, mas limita o tamanho da população de partículas que pode ser medida. Estas medições de confirmação podem ser feitas em estudos preliminares com os meios de teste, ou em um subconjunto de ensaios ou níveis de tratamento para determinar a compatibilidade das técnicas de medição. Estas mensurações devem ser consideradas também para meios de teste que contenham organismos de teste, e seu alimento, quando é necessário alimentá-los. Isto pode, e provavelmente irá alterar consideravelmente o comportamento das nanopartículas no meio de teste. É reconhecido que muitas propriedades

físico-químicas não podem ser determinadas em meio aquoso, principalmente a área superficial, quando a medição se baseia em amostras secas. Portanto, os protocolos de teste devem sempre prever estas e outras dificuldades e escolher os melhores/mais apropriados métodos de medição³⁰.

Por último, é importante registrar em detalhes os resultados das várias preparações de meios de teste. Os resultados negativos de casos nos quais os métodos de preparação conduzem à aglomeração excessiva ou à falha completa em exposição, são tão importantes quanto os resultados positivos em fornecer uma base futura de orientação específica para cada teste³⁰.

2.2.4 Preparação do Meio de Dispersão Não-aquoso

Devido à falta de métodos para detectar e quantificar muitos nanomateriais neste tipo de meio de teste complexo, os testes serão necessariamente e relativamente mais exploratórios em comparação com os testes em meio aquoso. A preparação de meios para todos os testes não aquosos, devem incluir os sedimentos (OECE TG 218), solo (OECD TG 222), esterco (OECD TG 228), e aplicação direta (por exemplo, OECD TG 214), nos quais os materiais podem ser colocados nos meios de teste sob a forma de dispersões de base aquosa ou misturados como material seco. Uma vantagem da utilização de suspensões húmidas, é que o ponto de partida para adição de material pode ser uniformizado, tanto para meio aquático, como para sedimentos ou análise de solo. Se o nanomaterial é introduzido e homogeneizado diretamente na forma sólida no meio de testes, deve-se cuidar da homogeneização, de modo que o material de teste não seja acidentalmente danificado. Também na descrição dos métodos, deve-se registrar detalhadamente o tipo de homogeneizador, velocidades ou força aplicada, além de sua duração. Em qualquer aplicação húmida ou seca, o problema para se caracterizar os materiais em meios complexos, tais como o solo, sedimento, ou lamas, precisa ainda ser resolvido e padronizado. No entanto, uma exceção é a extração e análise de SWCNTs, usando solventes e espectroscopia de fluorescência de infravermelho próximo (*NIR – Near-Infrared Fluorescence Spectroscopy*) e

também o uso de TEM para caracterizar os materiais de teste em matrizes sólidas.

2.2.5 Qualidade do Meio de Teste

Todas as questões de qualidade do meio de teste, discutidos para testes aquosos, são aplicadas de acordo com as devidas modificações quando necessário, assim como para preparação de dispersões para integração a outros meios de teste. Além disso, todas as orientações sobre a caracterização destes meios de teste descritos em orientações de ensaio da OECD são apropriadas e devem ser seguidas. Boas práticas científicas devem ser usadas para determinar se o nanomaterial de teste pode exigir medições adicionais ou mais frequentes. Todos os esforços devem ser feitos para minimizar a variação das propriedades do meio de teste e entre testes de laboratórios. Uma abordagem para resolver este problema é homogeneizar e distribuir meios naturais entre todos os pesquisadores, ou usar um único lote de meio de teste construído em laboratório, seguindo orientação das diretrizes de testes (TG) e procedimentos padronizados SOPs reconhecidos³⁰.

2.2.6 Caracterizações Físico-Químicas

É reconhecido que os métodos mais utilizados para muitas das propriedades físico-químicas, principalmente, para a determinação do tamanho de partícula, ainda precisam ser desenvolvidos para meios complexos. No entanto, e sempre que possível, boas práticas científicas são aplicadas para usar os métodos disponíveis para determinação e mensuração das propriedades de nanomateriais, como a medição de nanotubos de carbono (CNT) usando técnicas de microscopia. Portanto, se existem métodos para avaliar ou extrair materiais e determinar sua concentração em volumes mássicos, estas medições devem ser efetuadas observando os mesmos cuidados para meios de teste em água. Os intervalos de mensuração para tais mensurandos devem ser suficientes para documentar a integração correta e consistente de materiais no meio de teste³⁰.

Assim como em teste em meios aquosos é necessário registrar em detalhes, tanto as experiências negativas, como as positivas.

2.2.7 Degradação, Transformação e Acumulação

Diversos tipos de nanomateriais têm sido testados em água doce e comprovaram sua grande tendência em não se manterem dispersos⁶⁶. A tendência em sofrer aglomeração ou agregação depende de diversos parâmetros, tais como forças iônicas, nível de pH, presença de DOM, composição do material, dentre outros. No entanto, indicações recentes demonstram que nanomateriais aglomerados ou agregados podem ficar dispersos em outras condições aquáticas, em altas concentrações de matéria orgânica natural (*NOM – Natural Organic Matter*) podem desaglomerar. Em rios, as nanopartículas ligadas às partículas em suspensão não irão se depositar no fundo, mas sim viajar ao longo da corrente do leito como outros materiais particulados presentes na água. Dependendo de sua química e do meio receptor, a interação entre os nanomateriais e a NOM, pode incrementar a aglomeração, favorecendo a sedimentação/dispersão, mas, dependendo do tipo de nanomaterial e meio receptor, a dispersibilidade pode ampliada ou reduzida, impactando diretamente na biodisponibilidade do material para organismos pelágicos^{70, 78}.

O destino ambiental de nanomateriais no ambiente marinho é caracterizado por acelerar a aglomeração e por consequência a sedimentação, devido à alta concentração de sais e à alta força iônica da água do mar^{66, 69}. Embora a biodisponibilidade seja reduzida, é possível que sistemas biológicos possam ficar obstruídos por nanomaterial aglomerada e outras partículas grandes, e assim a sua atividade debilitada⁷⁹. Esta situação contempla apenas nanopartículas sem funcionalização superficial específica, com interação eletrostática com base na carga de superfície e a variação na carga de superfície por interação com NOM. Os efeitos sem carga, como a separação estérica/entrópica por meio de surfactantes poliméricos anexados à superfície, tornarão a estabilidade da dispersão mais independente dos efeitos eletrostáticos simples, das forças iônicas e da presença das NOM.

Ainda não está claro como alguns tipos de NPs estão propensas a agregar rapidamente em água salgada ou condições marinhas. Uma das razões, além da concentração de sais, pode ser atribuída às reações como a colmatação de floculação, causada por pontes poliméricas, como os polissacarídeos naturais, que parecem ser muito mais eficazes que o simples aumento das forças iônicas em agregar material; porém, este processo complexo não está quantitativamente compreendido. A alta energia ambiental e processos biológicos, como por exemplo, ondas e condições de turbulência da corrente marítima ou fluxo através do sistema opérculo-guelras dos peixes, pode voltar a suspender os nanomateriais e afetar o seu estado de aglomeração e biodisponibilidade³⁰.

Pesquisadores estudaram o coeficiente de partição octanol-água (K_{ow}) do fulereno (C_{60}) e sua capacidade de dispersão aquosa⁸⁰. Apesar da sua característica hidrofóbica, o fulereno C_{60} pode ser disperso em água por agitação ou sonicação ou por meio de permuta de solvente^{74, 81}. Eles obtiveram um valor para K_{ow} de 6,7 e um valor para a solubilidade do C_{60} em água saturada por octanol de 8 ng / L. Com base neste elevado valor de K_{ow} , é esperado que o C_{60} tenha uma elevada afinidade com lípidos e matéria orgânica. Isto indica que em ambientes naturais, o C_{60} tende a adsorver a fases sólidas e se comporta como um intermediário: parte como nanopartícula, parte como uma grande molécula orgânica. Portanto, algumas das técnicas clássicas, como a extração de solução de tolueno e a Cromatografia Líquida com Espectrometria de Massa (*LC-MS - Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*) funcionam para o C_{60} . Os aglomerados de fulereno são capazes de formar suspensões estáveis de água ($n_{C_{60}}$ ou aquoso/ C_{60})⁸².

Em sistemas terrestres, alguns nanomateriais podem ligar-se preferencialmente a NOM, e desta forma tornar-se menos biodisponíveis⁸³, embora organismos de sedimento e do solo sejam capazes de ingerir preferencialmente nanomateriais com NOM, como os vermes e insetos. A biodisponibilidade do material é reduzida, pois podem ter sido absorvidos pelos organismos no solo e estar presos no trato gastrointestinal⁸⁴. A ligação à matéria orgânica em decomposição, detritos, e outros micro-organismos pode facilitar a exposição alimentar a

nanomateriais nos organismos detritívoros, animais que se alimentam de restos orgânicos (plantas ou animais mortos) e onívoros, animais com capacidade para metabolização de diferentes classes alimentícias.

Os organismos selecionados para testes de toxicidade devem contemplar ambos os tipos de exposição, em matriz líquida (em dispersão/solução) e associados à matriz sólida (ligados a partículas). É preferível também conhecer com antecedência a distribuição de nanomaterial e seu tipo relevante de exposição para uma melhor avaliação.

A determinação das características de aglomeração/agregação e sorção dos nanomateriais pode fornecer informações valiosas no desenvolvimento de novas diretrizes de testes, para a modificação das diretrizes de teste existentes ou para a interpretação dos resultados de diretrizes de teste existentes. Além disso, a capacidade potencial de nanomateriais para adsorverem substâncias e se tornarem transportadores de toxinas deve ser sempre observada em relação ao seu comportamento ambiental. Na verdade, é improvável que um nanomaterial se torne transportador de toxinas. Para que isto ocorra, sua concentração deveria ser muita alta e muito além da concentração de outras partículas existentes no sistema, além de possuir maior afinidade aos agentes tóxicos. Assim, para o nanomaterial se tornar um transportador de toxinas é preciso haver mobilidade suficiente da partícula em água (superficiais, subterrâneas e de infiltração) e depender da criação de forte ligação com o agente tóxico⁸⁵.

2.2.8 Degradação e Transformação

Degradação, transformação e persistência dos nanomateriais no ambiente dependem da sua composição química, tanto de núcleo e material de superfície, quanto das condições ambientais, incluindo o valor do pH, NON, concentração iônica e composição e do teor de oxigênio dissolvido. É provável que a maioria dos nanomateriais que estão disponíveis atualmente ficará em sua forma de partícula original, embora níveis de aglomeração/agregação esperados possam ser diferentes. Alguns nanomateriais podem apresentar efeitos biocidas em microorganismos e, portanto, afetar a biodegradação. Apesar da falta de dados nesta área, os

revestimentos orgânicos podem ser degradados ou transformados por fatores ambientais. Recentes estudos⁸⁶ observaram a degradabilidade de suspensões aquáticas envelhecidas de nanopartículas P_{25} (20 °C / .) e constaram que não houve biodegradação de P_{25} em 28 dias. Com a adição de substrato orgânico (acetato de sódio), a biodegradação não foi inibida, mas o substrato orgânico foi completamente mineralizado (degradação de dióxido de carbono).

O protocolo de GHS da ONU para a dissolução/transformação de metais e compostos de metais fracamente solúveis pode ser adaptado para dispersões de nanopartículas de metal. O GHS é usado para determinar a velocidade e extensão em que o metal produz espécies iônicas solúveis e outros subprodutos metálicos em meio aquoso, sob um conjunto de condições de laboratório padrão, representativo das condições naturais no ambiente.

2.2.8.1 *Bioacumulação*

Para fins desse livro, biodegradação significa a degradação de substâncias orgânicas e materiais por microorganismos, resultando, em última análise, em dióxido de carbono e água, além do aumento da biomassa microbiana em condições aeróbicas. Em condições anaeróbicas, a biodegradação pode resultar na formação de metano e outras substâncias reduzidas.

Estudos realizados em pequenos organismos, como espécies de *Daphnia*, Copépodes e vermes como *Lumbriculus* e *Eisenia*, avaliaram a exposição de carga total corporal pela captação/absorção de diferentes quantidades de nanomateriais em intervalos de tempo específico. Para os organismos maiores, estudos específicos centraram-se na detecção, por microscopia eletrônica, de captação/absorção de quantidades de nanomateriais dentro de órgãos específicos, tais como o fígado, rim, músculo, guelras, como por exemplo, a presença de titânio em truta⁸⁸. Nem sempre é possível detectar ou identificar a forma do material bioacumulado, especialmente para os materiais que tendem a transformar e/ou dissolver facilmente, como a prata ou composições químicas com base em elementos presentes abundantemente no ambiente ou nos meios de testes de exposição (Cu, Zn, Fe, etc)⁸⁷.

O primeiro passo para a captação e a possível acumulação de uma substância no meio ambiente aquático, muitas vezes é relacionando a adsorção, anexação e possível acumulação do material na superfície do organismo. Esta situação foi demonstrada pela aglomeração de nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) no muco da guelra de truta arco-íris⁶⁷, por exemplo. Como nanomateriais de primeiras gerações tendem a seguir a química coloidal e colóides podem, eventualmente, aglomerar, estes nanomateriais aglomerado se tornarão parte dos sedimentos⁶⁶. Assim, seria importante seguir a OECD TG 317 para a avaliação de bioacumulação nos sedimentos de organismos.

A dispersão e possível solubilidade/transformação de nanomateriais são propriedades importantes. Mas, ainda não está completamente claro até que ponto os efeitos observados (toxicológicos/ecotoxicológicos) podem ser atribuídos principalmente à forma solúvel ou a uma combinação solúvel e de formas de partículas, e o tamanho da forma de partículas ou de produtos de degradação, tais como íons metálicos. O ensaio da OECD sobre a solubilidade de água (OECD TG 105) pode ser útil para definir esta atribuição, mas muitos dos materiais à base de carbono (tais como fulerenos) são tão insolúveis em água, que são necessários métodos especializados a fim de medir ou estimar a solubilidade. Por exemplo, a solubilidade de fulerenos é normalmente estimada por meio da medição da solubilidade em álcoois e extrapolando para um álcool de carbono zero (água)⁸⁰. Por outro lado, os nanomateriais orgânicos têm a vantagem de, possivelmente, ser rotulados com isótopo radioativo C^{14} , que permite uma determinação quantitativa facilitada, mas não permite a detecção do número de partículas e a caracterização de aglomeração³⁰.

2.2.8.2 Degradação Biótica

É necessária a realização de testes de degradação biótica para os nanomateriais puramente inorgânicos. Portanto, primeiro se examina se o nanomaterial contém carbono que pode ser utilizado como fonte de energia e nutrientes para os micro-organismos. Segundo, as propriedades físico-químicas e compartimentação do material podem fornecer informações se alguns dos testes de simulação são necessários. Por

exemplo, se é improvável que o material resida na coluna de água ou, se não for solúvel em água (como fulerenos e nanotubos de carbono), qualquer teste em água de superfície pode ser desnecessário. No entanto, as diretrizes atuais da OECD para testes de pesticidas (por exemplo, hidrólise TG 111, fotólise TG 316 e outros) não informam qualquer limite inferior para a solubilidade em água. Portanto, é preciso avaliar qualquer substância, independente de quão baixa sua solubilidade possa ser³⁰.

2.2.8.3 Degradação Abiótica

A degradação abiótica significa degradação de substâncias derivadas da atividade físico-química, por exemplo, Luz UV (fotólise). Tal como para os testes de biodegradação, no ensaio de hidrólise, é necessário avaliar se a estrutura química do material possui grupos sujeitos a hidrólise e/ou a liberação de íons e se isto determina ou não a realização do teste. Sabendo que o tempo de vida dos nanomateriais no ambiente pode ser longo, estudos de fotodegradação podem ser relevantes. A OCDE TG 316 para fotodegradação e transformação em água poderia ser um método aplicável para este fim, mas é preciso considerar a caracterização das mudanças do nanomaterial.

2.2.8.4 Métodos de avaliação de bioacumulação e degradação

Do mesmo modo, para o teste de propriedades físico-químicas ou efeitos bióticos, os métodos de dispersão e preparação das amostras para estudos de degradação podem incluir ultrassonicação e/ou agitação por longos períodos de tempo, por exemplo semanas. Especialmente para testes de biodegradação, não é possível medir a produção de dióxido de carbono ou consumo de oxigênio e a utilização de solventes orgânicos, pois os restos do solvente podem interferir na degradação nanomaterial. Poderia ser uma opção, em testes simulados, a utilização de materiais marcados radioativamente, solvente transportador, dispersante ou detergente, mas estes artificios poderão também afetar as características do nanomaterial em teste³⁰.

A detecção de biodegradação em testes de rastreio padrão é geralmente seguida por medição do dióxido de carbono produzido ou de oxigênio

consumido pelos micro-organismos degradadores. Como os materiais à base de carbono ou nanomateriais orgânicos normalmente não são solúveis, a medição do carbono orgânico dissolvido pode não ser relevante. Nos testes simulados, a rotulagem por carbono 14 (C^{14}) e análise química e caracterização de nanomateriais e do número de partículas por outros métodos (por exemplo, microscopia eletrônica ou análise de fluxo de campo Fracionamento com ICP-MS) seria um método de detecção da degradação.

Os métodos da OECD sobre a biodegradação foram desenvolvidos e validados principalmente para avaliação de compostos orgânicos. Os nanomateriais de hoje, no entanto, são principalmente inorgânicos; de fato, mesmo nanomateriais baseados em carbono tendem a ser de natureza inorgânica e persistentes em relação à biodegradação. Portanto, testes para a biodegradação não são relevantes. Em princípio, os métodos de medição de produção de dióxido de carbono ou de absorção de oxigênio são aplicáveis, mas requerem grandes quantidades de material de teste para serem válidos. Também é importante considerar se nanomateriais à base de carbono, tais como fulerenos e nanotubos podem ser degradados sob quaisquer condições. No entanto, dados limitados indicam que fulerenos podem ser assimilados por fungos de deterioração da madeira, o que sugere que o carbono de fulerenos pode ser metabolizado⁸⁸. Isto é geralmente assumido para polímeros orgânicos que também contêm carbonos. Se vários testes de degradação aeróbica conclusivos indicam degradação muito baixa ou insignificante, quaisquer outros testes de degradação aeróbia provavelmente irão também ser negativos e pode ser inútil realizar testes adicionais. Por exemplo, se o resultado de um teste de biodegradação é inferior a 10%, então há possibilidade de que os resultados do teste de simulação de biodegradação em águas de superfície também seja muito baixo e, portanto, testes mais elaborados devam ser ignorados, assumindo que a substância não é biodegradável. Para o propósito de rastreamento de biodegradação, se qualquer biodegradação acontecer, sistemas de teste modificados podem servir melhor do que as diretrizes de teste-padrão da OECD. As condições de ensaio no ensaio de biodegradabilidade inerente da série TG 302 são favoráveis para a degradação. Uma possibilidade seria usar a OCDE TG 310

com medição de CO_2 e melhorar os meios de teste e condições de ensaio para se obter um ambiente mais favorável para a degradação (como em testes de biodegradabilidade inerentes). No sistema fechado com medição da produção de dióxido de carbono do TG 310 ou TG 301B, o material de ensaio não pode ter quantidades solúveis (como nanomateriais), e são necessárias pequenas quantidades de material para avaliar a biodegradabilidade.

2.2.9 Estudos em meio aquoso

Para produtos químicos orgânicos simples, há uma relação estabelecida do coeficiente partição octanol-água (K_{ow}) e fator de bioacumulação ou de bioconcentração (BCF). No entanto, essa relação pode não ser verdadeira para muitos nanomateriais. O principal desafio em testar a bioacumulação de nanopartículas é, mais uma vez, a sua detecção e caracterização nos tecidos e fluidos corporais. Radiomarcagem poderia fazer uma fácil detecção e quantificação, mas também tem limitações; por exemplo, o material marcado pode se comportar diferente do material não marcado. Uma possibilidade poderia ser a ativação de metal e nanopartículas de óxido metálico por nêutrons⁸⁹ (Figura 11). Isto permite tanto a localização, quanto a quantificação dentro dos tecidos ou organismos. Também a química mais tradicional, como a análise ICP-MS para os metais, poderia fornecer valiosas informações sobre os montantes totais do material acumulado pelo organismo. No entanto, estes métodos podem não definir se todo o material encontrado é originário de nanomaterial. Recentemente, técnicas de FFF têm sido utilizadas em combinação com ICP-MS para definir a concentração de material acumulado (bioconcentração), que mede o conteúdo metálico de partículas individuais. Mas, primeiro o nanomaterial deve ser extraído dos animais e dos tecidos.

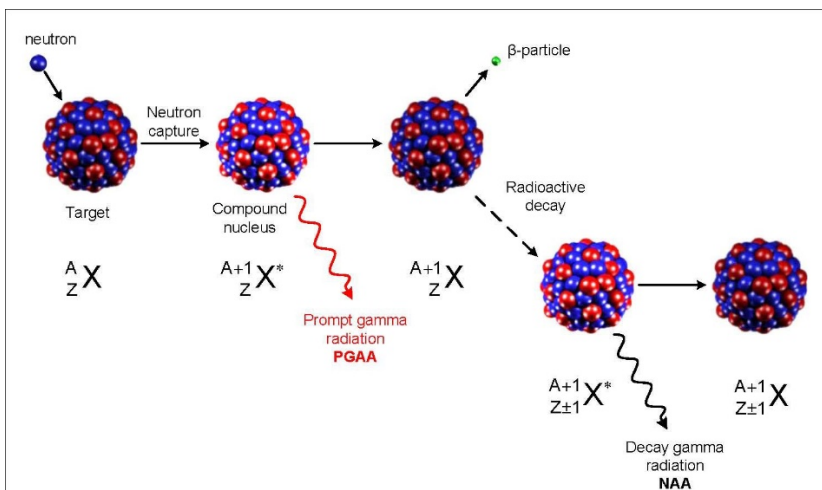


Figura 11: Ativação de partículas por nêutron.

Os protocolos de testes do fator de bioconcentração (BCF – *Bioconcentration Factor*) padrão, tais como o OECD 305, podem ter limitações para determinar bioacumulação de nanopartículas. Pesquisadores observaram que, para substâncias dissolvidas em água, um grande tamanho molecular ($MW > 600$, ou efetivamente um diâmetro $> 0,5$ nm) limita eficazmente a absorção direta. É provável que, na maioria dos casos, um tamanho de nanopartícula entre 1 e 100 nm, em comparação com moléculas dissolvidas, limita a sua absorção direta por transporte mediada por transportador em brânquias de peixes, mas a absorção por endocitose não pode ser excluída⁷³, de acordo com teste de fator de bioacumulação em dieta de peixes (BAF – *Bioaccumulation Factor*)⁹⁰, abrangido pela versão revisada em 2012 da OECD TG 305. De acordo com estes testes de exposição dietética, as diretrizes propostas são recomendadas para as substâncias lipofílicas, super-agentes tensoativos, bem como misturas complexas. No entanto, o método de alimentação de pico seria também apropriado para o teste de moléculas grandes fracamente solúveis, tais como nanopartículas. Deve notar-se que esta abordagem dietética resulta em um fator bioamplificação (BMF – *Bioamplification Factor*), ao invés de um fator de bioconcentração (BCF).

Efeitos tóxicos já foram observados em peixes que possuem dietas contaminadas com nanomateriais⁹¹; no entanto, são necessários mais dados usando o protocolo de dieta harmonizada pela OECD, especialmente para o ensaio de nanomateriais. A seleção da água ou a rota de exposição dietética devem ter como base a relevância esperada da brânquia em relação à exposição alimentar sob relevantes condições ambientais.

Os resultados dos testes de parâmetros toxicológicos de saúde humana, por exemplo, a toxicocinética (ADME), se disponíveis, devem também ser levados em consideração ao serem gerados os planos de testes ambientais para nanomateriais específicos. Os estudos em mamíferos podem produzir também valiosas informações das características de absorção, taxas e mecanismos das nanopartículas para as espécies não-mamíferos.

É especialmente importante, dada a tendência de nanomateriais em aglomerar, avaliar a probabilidade de nanomateriais acabarem sendo associados a sedimentos, ou seja, estudos de bioacumulação nos organismos dos sedimentos⁷⁹. Em 2008, a OECD adotou um novo método TG 315 para a avaliação de bioacumulação em vermes de sedimentos, no caso, usando o *lumbriculus variegatus*. Este método seria usado em uma bateria de testes de avaliação de risco, como publicado no ensaio de toxicidade OCDE TG 225, e se baseado nas mesmas espécies, poderia então também fornecer dados relativos aos efeitos.

A dispersão de nanomaterial pode ser realizada por agitação, ultrassonicação (preferencialmente, por entrada de energia em $\frac{W}{V}$ [Joules /litro]), moagem, utilização de solventes, e estabilização ou agentes de dispersão. Isto sugere que alguns nanomateriais significativamente alterados por sonicação, moagem (por exemplo, os nanotubos de carbono podem ser encurtados), ou com interação de solventes, podem resultar em produtos tóxicos. O método de dispersão também dependerá do material específico a ser testado e se a superfície foi ou não tratada. O bom senso científico deve ser usado ao se escolher as soluções, e onde há provas ou uma indicação de que um método de dispersão possa alterar significativamente a toxicidade, estes efeitos devem ser controlados ou

quantificados. As condições de operação antes e durante o ensaio devem sempre ser descritas em detalhes.

É pouco provável que as propriedades serão estáveis durante períodos de renovação (ou a duração completa de um teste), por isto é necessário ter um meio de teste inicial repetível e monitorar as mudanças de propriedades com suficiente frequência para quantificar estas alterações. Em alguns casos, quando é preciso remover partículas maiores com filtração⁷⁴, a abordagem deve ser adaptada de acordo com a relevância das partículas em um determinado meio ambiente. Deve-se, sempre que possível, incluir informações sobre o fabricante em tamanhos específicos produzidos e incorporados em produtos, e improváveis processos de pós-produção que podem alterar tamanho de partícula ou sua distribuição.

Supõe-se que os testes serão, muitas vezes, conduzidos usando-se abordagens periódicas de renovação para evitar despesas e resíduos de produção de fluxo através de sistemas. Independentemente de dispersão nanomaterial e de métodos de dosagem, a qualidade do meio de teste (pH, força iônica, concentração de NOM) deve ser harmonizada, tanto quanto possível, entre os estudos comparativos. É especialmente importante que as condições e a qualidade dos meios de teste sejam registradas ao longo do estudo, a fim de permitir uma possível análise retrospectiva dos resultados.

2.2.10 Estudos em solo, terra e sedimento

Estudos com nanotubos de carbono (CNT) indicaram o não acúmulo imediato pela minhoca *eisenia foetida*. O resultado informou um acúmulo com fatores de duas ordens de grandeza menores do que aqueles medidos de pireno⁹⁸. No entanto, foram detectados efeitos na reprodução de minhocas (*eisenia veneta*), quando os vermes foram expostos por alimentos com nanotubos de carbono de parede dupla (DWCNT)⁹². Para avaliar a bioacumulação de substâncias químicas nas minhocas, existe um método OECD validado (TG 317 – Bioacumulação Terrestres Oligoquetas).

Efeitos da ingestão de nano dióxido de titânio (TiO_2) sobre a atividade enzimática de isópodes terrestres (*porcellio scaber*) foram detectados⁹³. As

nanopartículas de CuO foram dispersas em água destilada com e sem ser ultrassonicadas e pipetadas em folhas homogeneizadas de árvore de avelã. Os isópodes foram em seguida alimentados com as folhas. A localização das partículas e a sua composição foram analisadas pela transmissão de elétrons por padrão de difração. Foram detectadas a bioacumulação de nanopartículas de cobre insolúveis em células de plantas emergentes e em crescimento testadas em placas de agar. As partículas foram bem caracterizadas e a distribuição homogênea de partículas de cobre no meio de agar foi avaliada por SEM. A distribuição e acúmulo de partículas de cobre nas células da planta foram caracterizados por TEM e espectroscopia de dispersão de energia⁹⁴.

A mistura direta de nanomaterial seca no solo ou no sedimento seco provou gerar uma distribuição mais homogênea de material de teste do que misturar uma dispersão aquática dos nanomateriais no solo. Este tem sido o caso, pelo menos quando AgNPs foram misturados no teste artificial de solo da OECD. Um estudo sistemático de estudos sobre *spiking* do solo⁹⁵ para testes ecotoxicológicos (solo arenoso natural colhido e enriquecido com o pó, usando a solo e areia de sílica como transportadores) revelou que a biodisponibilidade diferiu entre os diferentes procedimentos. As repetições (6 amostras) utilizadas para análises químicas revelaram desvios padrões comparáveis em todos os procedimentos de *spiking* para o solo.

2.2.11 Estudos na cadeia alimentar

Não existem muitos trabalhos sobre os potenciais efeitos de nanomateriais na cadeia alimentar, embora peixes que bebem água contendo nanomateriais mostraram patologia do intestino^{87, 67}. Um estudo sobre a possível transferência de pontos quânticos em uma cadeia alimentar aquática simplificada⁹⁶, verificou que estes materiais podem ser transferidos para rotíferos por captação dietética de protozoários ciliados. Embora tenha havido a transferência através destes níveis nos ciliados, a bioconcentração (acumulação no meio ambiente) foi limitada e não foi detectada a biomagnificação (enriquecimento através de níveis tróficos) nos rotíferos. O estudo indicou potencial de transferência entre os diferentes níveis da cadeia alimentar, mas isso depende muito do tipo de

material e da cadeia alimentar, como no caso de outros estudos de produtos químicos convencionais. A avaliação da bioacumulação deve considerar as vias de captação especiais, como endocitose, pois observaram que nanopartículas fulereno acumularam em células microbianas e subsequentemente em vermes que comeram esses micróbios⁹⁷.

Em geral, em testes que envolvem o comportamento ecotoxicológico é recomendado desenvolver métodos de preparação harmonizados com todos os meios de teste, para a degradação, a transformação, e, especialmente, a bioacumulação. Esta abordagem irá maximizar a comparabilidade e integração de estudos de exposição e efeitos, aumentando a probabilidade dos nanomateriais possuírem propriedades de suspensão semelhantes, pelo menos no momento do início de cada tipo de ensaio. Haverá circunstâncias nas quais existirão métodos bem controlados para a preparação dos meios de detecção e materiais para os testes relacionados com o destino ambiental, mas não para testes ecotoxicológicos.

2.3 Detecção e Caracterização de Nanomateriais no Meio de Teste e na Biota

2.3.1 Detecção de Liberação de Íons

A força iônica, pH, composição cátion-anião, material orgânico dissolvido (DOM e organismo exsudato) podem afetar aglomeração e degradação das partículas primárias, o destino de ambos íons e partículas livres, ou a sua interação com alvos biológicos¹⁰⁸. Os métodos que têm sido testados para a separação de partículas e íons nos meios de teste de exposição são a diálise, a filtração e a ultracentrifugação. Uma abordagem importante é controlar ou manipular o tipo e o nível de agentes quelantes, tais como tiosulfato ou cisteína, os quais se ligam fortemente aos íons de prata e

reduzem ou eliminam seu potencial tóxico. No entanto, estes ligantes quelantes também podem aumentar a taxa de oxidação e de dissolução de partículas de Ag. A diálise ainda não provou ser eficaz, em grande parte devido à adsorção de prata nas membranas e a duração do ensaio; isto tem sido demonstrado em estudos de balanço de massa, em que as perdas para membranas foram contabilizadas. A filtração e a ultracentrifugação estão sendo pesquisadas. Sua eficácia e abordagem específica precisam ainda ser amplamente estabelecidas, embora a facilidade de utilização dos métodos de filtragem ofereça soluções promissoras.

2.3.2 Detecção em matrizes sólidas / meio poroso

Os maiores desafios na detecção e na quantificação de nanomateriais em meios porosos, por exemplo, o solo ou sedimentos, encontram-se no pré-tratamento das amostras. O nanomaterial tem de ser primeiro extraído a partir dos meios de teste, e em seguida, separado da suspensão extraída. No entanto, atualmente não existem formas harmonizadas de extração, a separação de nanomaterial é feita a partir da suspensão por centrifugação. A centrifugação é um método mais apropriado do que filtragem⁹⁸, pois os métodos de pré-tratamento muito provavelmente afetam as características do nanomaterial.

A análise de elementos extraídos e separados, por exemplo metais utilizando ICP-MS ou Espectrometria de Emissão Ótica por Plasma Acoplado Indutivamente- (ICP-OES – *Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry*) e Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES – *Inductively Coupled Plasma – Atomic Emission Spectrometry*)⁹⁹, é relativamente simples. No entanto, é difícil diferenciar o material fabricado e seus átomos do material natural do solo. Ainda não é certo se a impressão digital isotópica de um nanomaterial seria diferente dos materiais naturais. Este desafio pode ser resolvido por meia da rotulagem do metal em nanomateriais por métodos como a já mencionada ativação por nêutrons, a qual fornece um modo para a separação do material de interesse frente ao material natural do solo.

Podem-se utilizar diversas técnicas de microscopia eletrônica nos NMs para determinar seu tamanho e especificação do estado de aglomeração/

agregação em amostra. No entanto, apenas um número limitado de campos microscópicos pode ser rastreado, resultando em uma incerteza estatística. Portanto, no momento, muitos dos métodos de microscopia são considerados métodos qualitativos¹⁰⁰.

Nanomateriais de carbono como fulerenos e nanotubos de carbono podem ser analisados a partir de amostras ambientais por cromatografia LC-MS. Pode-se também utilizar o FFF combinado com a análise química, por exemplo, ICP-MS para medir diferentes quantidades e tamanhos das nanopartículas³⁰.

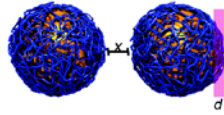
2.3.3 Detecção na biota

A detecção da quantidade total de, por exemplo, material marcado por C^{14} é bastante fácil nos tecidos e em todo o organismo. Outra forma de rotular nanomateriais é a ativação por nêutrons de nanopartículas de óxidos metálicos e de metais (^{60}Co , ou ^{64}Ni , ^{65}Zn , ^{67}Ga e ^{64}Cu). Estes métodos de radiorotulagem poderiam permitir tanto a localização, quanto a quantificação de nanomaterial dentro de tecidos ou organismos. Também podem ser utilizadas análises químicas tradicionais como o ICP-MS para metais e várias técnicas de HPLC baseado para a medição da quantidade total de nanomaterial acumulada. Porém estes métodos ainda não são capazes de separar o nanomaterial acumulado do material mássico e das concentrações de metal de fundo. A microscopia eletrônica proporciona meios para a detecção e análise semi-quantitativa dos materiais nos meios de teste de exposição e dentro dos tecidos e no organismo.

a. Van der Waals attractive (vdW)



c. Steric repulsion



b. Electric double layer (EDL)

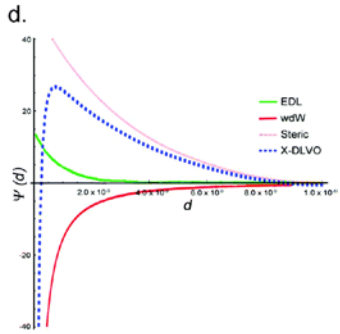
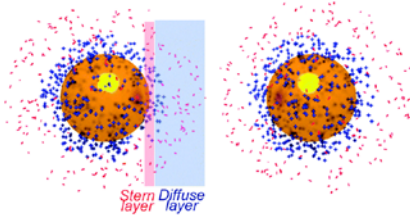


Figura 12 Tipos de forças de dispersão; no item d DVLO refere-se Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek¹⁹.

3 Avaliação de Risco e Conformidade da Produção

A avaliação da toxicidade de nanomateriais e nanoprodutos permanece sendo um desafio ainda em ampla discussão no mundo.

As dificuldades em se obter alguns materiais de referência e as consequentes dificuldades em se promover comparações interlaboratoriais (ou seja, diversos laboratórios terem resultados compatíveis para um mesmo caso), afetam a garantia da reprodutibilidade e, por consequência, da capacidade de monitoramento das propriedades dos produtos que saem da linha de produção dos fornecedores de nanomateriais e fabricantes de nanoprodutos.

Os avanços permanecem acontecendo e, possivelmente durante a sua leitura desse livro, novas conclusões podem ter sido obtidas.

O certo é que, com a dificuldade em se promover análises individuais em cada produto ou lote, seja pela disponibilidade dos ensaios, pelo custo ou pelo prazo, a conformidade da produção deve ser garantida, com uma relacionada análise dos fatores de controle que podem influenciar em alterações do processo de fabricação. Inicialmente, um foco na segurança ocupacional dos colaboradores das empresas – sendo este o grupo de maior risco, devido a constante exposição – seguido pela garantia da conformidade da produção, ou seja, garantir que as características dos nanomateriais e nanoprodutos sejam reproduzidas durante o ciclo de fabricação conforme o plano original.

Garantindo a segurança ocupacional e a conformidade da produção em cada um dos atores da cadeia, tem-se um sistema sustentável e de fácil análise para melhoria contínua. O capítulo desse livro tratará os dois temas nas próximas páginas.

3.1 A avaliação de risco e a segurança ocupacional

Para avaliação do risco e da segurança ocupacional, propõe-se iniciar com os conceitos previstos na ISO/TS 12901-2:2014 (*Nanotechnologies - Occupational risk management applied to engineered nanomaterials*). A norma trata, especificamente, do método de *Control Banding*, ou Controle por Faixas, em que o nanomaterial produzido será submetido à verificação do “Risco Base” e tratadas suas necessidades de contenção ou mesmo reformulação. O *Control Banding* permite o nivelamento de segurança de nanomateriais e seus produtos, levando em consideração a caracterização físico-química dos nanomateriais, seus materiais base, forma de utilização e risco ocupacional. O nanomaterial deve ser caracterizado satisfatoriamente quanto às suas propriedades físico-químicas e biológicas.

Há que se considerar que, além do risco base, a partir dos dados relacionados na metodologia também será possível extrair informações pertinentes à definição de métodos adicionais de caracterização necessários para a completa avaliação da toxicidade. Assim, esta ferramenta requer dados de entrada, independentemente da fase do ciclo de vida do nanomaterial, como algumas informações coletadas no local de trabalho (a partir da observação do trabalho real), bem como os riscos e os dados toxicológicos sobre o material a ser analisado.

Este capítulo trará somente uma revisão do tema, visto que o assunto foi largamente abordado no livro *Nanossegurança: Guia de Boas Práticas em Nanotecnologia para Fabricação e Laboratórios*, de Leandro Antunes Berti, um dos autores do presente livro, publicado pela editora Cengage Learning.

O principal ponto considerado para a abordagem é o processo de identificação de perigo, de acordo com o conhecimento existente sobre a nanomaterial a ser avaliado (dados de toxicologia ou efeito de saúde; propriedades físicas e químicas), combinado com a avaliação da exposição do trabalhador, para determinar os graus qualitativos de risco. Tendo essa relação, o método propõe a aplicação de formas de contenção e controle adequadas, como exaustão ou confinamento.

A abordagem é de controle por faixas, trazendo, a partir da coleta de dados de exposição e de características do produto, a alocação de níveis de perigo, a alocação de níveis de exposição, a alocação das faixas de controle e, por fim, a validação das estratégias de controle.

Porém, a própria coleta de informações é um considerável desafio para essa abordagem, principalmente ao se considerar a dificuldade em estabelecer valores limites que afetem a saúde. Neste caso, muitas das conclusões dependem diretamente da capacidade dos métodos e de opiniões de especialistas e avaliadores. A falta de uma conclusão acerca de métodos pode trazer problemas de rastreabilidade de resultados, sendo assim bastante recomendável o registro contínuo de todas as ações realizadas para esse fim.

A partir de agora, faz-se uma breve descrição das recomendações da norma ISO que trata do Controle por Faixas, a partir de nivelamentos do perigo, da exposição, por faixa de controle e do risco. Como apresentado, não é pretendida uma longa análise, visto o tema já ter sido abordado em livro anterior.

3.1.1 Nivelamento do Perigo

O Nivelamento do Perigo consiste na atribuição de um nanomaterial para uma faixa de perigo com base em uma avaliação completa de todos os dados disponíveis sobre este material, levando em conta parâmetros como a toxicidade, biopersistência *in vivo* e fatores que influenciam a capacidade das partículas em chegar ao trato respiratório, a sua capacidade para se depositar em várias regiões do trato respiratório, a sua capacidade de penetrar ou ser absorvido através da pele e ainda a sua capacidade de induzir respostas biológicas. Estes fatores podem ser relacionados com as propriedades físicas e químicas, tais como a área superficial, química de superfície, o formato e o tamanho de partícula, dentre outras propriedades¹⁰⁸.

O Nivelamento por Perigo deve ser definido de acordo com a periculosidade da substância química, resultante da análise da informação disponível, avaliado por profissional capacitado com conhecimento e

experiência sobre nanomateriais¹⁸. As informações do material podem estar relacionadas a vários critérios de toxicidade, descrita ou suspeita, na literatura ou documentação técnica (rotulagem, classificação do produto, histórico de toxicidade). Diversos grupos internacionais têm tratado o tema, classificando os produtos de acordo com categorias de perigos (a exemplo das categorias de perigo e alocação de nanomateriais, de acordo com as classes GHS para a Saúde¹⁰⁷).

O processo de Nivelamento de Perigo utiliza também uma abordagem em camadas que depende de questões estruturadas para extração das informações possíveis sobre a natureza do material que está sendo avaliado, para que se obtenha a melhor definição de perigo para cada caso. O processo de alocação segue um algoritmo bem definido, baseado em árvore de decisão, e perguntas direcionadas, como¹⁰⁸:

1. **O produto contém nanomaterial?** Caso sim, parte-se para a próxima pergunta.
2. **O nanomaterial identificado já foi classificado de acordo com a legislação ou GHS nacional ou regional?** Neste caso, buscam-se históricos que possam dar esclarecimento inicial. Caso não se tenha informações suficientes, parte-se para a próxima pergunta.
3. **A solubilidade em água do nanomaterial é superior a 0,1 g/l?** Um método possível para avaliação da solubilidade de um nanomaterial está descrito nas diretrizes de teste TG105 do OECD. Se o nanomaterial é altamente solúvel, seu risco potencial deve ser abordado em relação à toxicidade da solução. Caso a solubilidade em água seja inferior a 0,1 g/l deve-se partir para a próxima pergunta.
4. **O nanomaterial contém fibras biopersistentes ou estruturas parecidas com fibras, ou possui paradigma de fibra que faz o nanomaterial se tornar tóxico?** A definição de uma fibra longa biopersistente relaciona-se ao fato de que algumas fibras respiráveis, biopersistentes, longas e rígidas possam penetrar no mesotélio humano (como exemplo, a pleura), induzindo uma resposta inflamatória sustentável como uma consequência de

macrófagos mediada pela frustração da fagocitose, que pode vir a resultar em mesotelioma.

5. **Existem indicações de perigo do nanomaterial?** Quando somente existem informações toxicológicas limitadas a respeito do nanomaterial, e foram obtidos resultados negativos para parâmetros de toxicidade específica, estes dados devem ser avaliados em conjunto com todos os dados disponíveis do material base ou de materiais similares.
6. **Existe um nível de perigo já determinado para o mesmo material na microescala ou macroescala?** Se a informação sobre a toxicidade do nanomaterial é muito limitada ou não existe, a substância quimicamente mais próxima do nanomaterial deve ser considerada: formato em microescala ou macroescala do mesmo material ou material análogo. No caso em que não exista qualquer indicação de um material fora da nanoescala ou de material análogo, então deve ser atribuído o nível de risco máximo ao nanomaterial.

Por fim, é importante considerar que, um alto nível de perigo do nanomaterial deve trazer à mesa a consideração da modificação ou da substituição por uma alternativa potencialmente menos perigosa e que mantenha as mesmas propriedades requeridas para a sua aplicação.

3.1.2 Nivelamento da Exposição

Na utilização proativa de Controle por Faixas, semelhante ao processo de nivelamento de perigo, deve ser determinado o nível esperado de exposição dos trabalhadores. Combinando-se este com o Nivelamento de Perigo, tem-se, ao final, uma matriz de Controle por Faixas que determina o nível apropriado de controle, ou seja, a Faixa de Controle (CB – *Control Band*).

Assim, o objetivo principal do Nivelamento da Exposição é o resumo ou síntese de informação de exposição disponível. O formato geral desse nivelamento inclui os seguintes elementos¹⁰⁸:

- a) A declaração de propósito, o escopo, o nível de detalhamento e a abordagem utilizada na avaliação;
- b) As estimativas de exposição para cada via relevante, tanto para os indivíduos quanto para populações (por exemplo, grupos de trabalhadores); e
- c) A avaliação da qualidade global da avaliação e do grau de confiança nas estimativas de exposição e as conclusões, incluindo as fontes e outras incertezas, podendo-se utilizar, para isso, a proposta da ISO TS 12901-1¹⁰⁸.

No Controle por Faixas, os elementos críticos de caracterização de exposição mais importantes para determinar os níveis de exposição são¹⁰⁸:

- a) A forma física do nanomaterial, ou disponibilidade da exposição;
- b) A quantidade de nanomateriais processados ou fabricados no local;
- c) O potencial de geração de poeira de processos;
- d) Os dados de medição da exposição real;
- e) A caracterização e as medidas de controle implementadas no local de trabalho (redução de emissão, transmissão e imissão).

Os níveis de exposição caracterizam o potencial de nanomateriais em se espalhar pelo ar sob condições normais do processo ou de operação. Estes níveis são definidos de acordo com o potencial de emissão do nanomateriais, livres ou vinculados/ancorados a uma matriz¹⁰⁸.

Quando tratado o nível de exposição, é importante considerar a probabilidade de exposição aos nanomateriais durante os processos de síntese, produção e fabricação. Assim, a análise é dependente diretamente do tipo de processo e do tipo de equipamento envolvido, além das condições existentes de contenção. No entanto, a consideração da contenção é utilizada somente no fim da análise, evitando a subestimação de riscos de vazamentos de nanomateriais, tratando as barreiras como medidas de proteção durante o processo final do *Control Banding*¹⁰⁸.

Por sua vez, para materiais-âncoras em matriz sólida, devem (seja na composição ou no recobrimento), ser consideradas características como a

força da ligação química entre os materiais e o grau de energia envolvido no processo. Neste caso, um material composto por nanomateriais com fraca ancoragem trazem maior probabilidade de liberação de partículas.

Por fim, os nanomateriais suspensos em líquidos devem ter analisadas as probabilidades de que sejam transportados pelo ar (a exemplo da formação de aerossóis), além do risco de exposição dérmica em derramamentos ou respingos.

3.1.3 Nivelamento por Faixas de Controle

Após a avaliação do nível de perigo e nível de exposição, e para alcançar um equilíbrio entre a simplicidade e a eficácia da abordagem, cinco categorias de controle (ou faixas) são propostas, para ajudar a prevenir a exposição de nanomateriais¹⁰⁸:

- CB 1: Ventilação geral natural ou mecânica.
- CB 2: Ventilação Local: exaustor, capa protetora, cobertura de mesa, etc.
- CB 3: Ventilação Fechada: cabine ventilada, capela, reator fechado com abertura normal.
- CB 4: Contenção Completa: caixa de luva / bolsas, salas limpas com acesso controlado.
- CB 5: Contenção Completa e Revisão por um Especialista: consultar agente especializado

O Controle por Faixas é obtido combinando os Níveis de Perigo e os Níveis de Exposição de acordo com a matriz na Tabela 5.

Tabela 5: Matriz de Controle por Faixas com os graus de risco identificados¹⁰⁸.

Níveis		Exposição			
		EB1	EB2	EB3	EB4
Toxicidade	A	CB1	CB1	CB1	CB2
	B	CB1	CB1	CB2	CB3
	C	CB2	CB3	CB3	CB4
	D	CB3	CB4	CB4	CB5
	E	CB4	CB5	CB5	CB5

Como colocado, essa exposição da avaliação de risco fica aqui simplificada, pois já foi abordada em livros anteriores. A mensagem mais importante deixada no capítulo é que a garantia da nanosseguurança deve partir da segurança ocupacional dos trabalhadores das empresas que produzem nanomateriais ou fabricam nanoprodutos. Com a garantia dos trabalhadores, é inferido que os produtos serão mais seguros e o meio ambiente terá impacto minimizado, favorecendo toda a cadeia de sustentabilidade e segurança.

3.2 Conformidade da Produção

Tendo o controle da segurança ocupacional determinado, o próximo passo é buscar a garantir de que a produção do nanomaterial e do nanoproduto tenha conformidade, ou seja, suas características sejam semelhantes, não importando o lote de produção. O requisito tem importância aumentada devido à inviabilidade atual da realização de muitos ensaios ou monitoramento automatizado das propriedades críticas dos nanomateriais, seja pela insuficiência da infraestrutura laboratorial no país, seja pelos custos ou pelos prazos para alguns tipos de ensaios.

Com a qualidade assegurada, a aprovação de modelos ou amostras de produtos tende a ser suficiente.

O caminho sugerido é a implantação de um sistema de gestão da qualidade e a sua certificação, garantindo constantes auditorias em busca da melhoria contínua. Certificações como a ISO9001 ou a BPF (Boas Práticas de Fabricação) são recomendadas para as linhas de produção dos fornecedores de nanomateriais e fabricantes de nanoprodutos, associando o nome da empresa aos organismos de certificação e órgãos como o INMETRO, ANVISA ou MAPA.

3.2.1 Fatores de controle para produção

Inicialmente, há que se considerar que o desconhecimento da influência dos fatores externos na qualidade do produto final pode levar a variações das propriedades até então não previstas.

Está fora dos objetivos desse livro uma profunda discussão acerca dos fatores de influência nas produções de nanomateriais e nanoprodutos, visto ser essa uma discussão específica para cada situação. Neste sentido, recomenda-se uma análise aprofundada (se possível com apoio de especialistas em nanotecnologia) para verificação da consequência de variações de processo na qualidade final.

Em resumo, utilizando-se da conhecida metodologia dos 6M, pode-se admitir que alterações na qualidade final de um nanoproduto ou nanomaterial produzido pode vir de seis causas ou agrupamento delas:

- Matéria-prima – deve-se garantir os insumos para a fabricação a partir de controles de entrada ou de relatórios fornecidos pelos fornecedores. Também, é de se considerar os processos internos da organização ou fábrica, e suas relações fornecedor X cliente.
- Máquinas – as máquinas, por si só, já possuem uma variação aleatória na execução de suas tarefas. Essas variações devem ser mapeadas. Porém, as variações sistemáticas causadas pela deterioração devem ser monitoradas e resolvidas a partir de bons planos de manutenção e monitoramento.

- Medição – assim como as máquinas de produção, as medições estão sujeitas à robustez do equipamento, seu estado de manutenção, calibrações, condições locais (ambiente onde será realizada a medição) e a estratégia de medição utilizada.
- Meio ambiente – diversos fatores ambientais podem influenciar a produção dos nanoproductos, principalmente em processos não contidos. Aspectos como a temperatura, a umidade, vibrações, campos magnéticos, correntes de ar, dentre outros, devem ter suas influências consideradas e, quando necessário, tomadas medidas para minimizar as variações de ambiente.
- Mão de obra – uma boa parte das não conformidades de produção é devida a processos humanos, envolvendo complexidades físicas e mentais. A mitigação de riscos a partir de capacitações e mecanismos “anti-erro” são desejáveis para os pontos em que as variações são críticas.
- Método – a determinação dos métodos a partir de procedimentos e instruções pode levar a dúvidas de interpretação ou mesmo à falta de completude (e consequente falta de instrução) para novos colaboradores daquele processo.

A organização que tratará a nanossegrurança deverá fazer ensaios com variações em fatores da produção para verificação do comportamento de seu processo frente a instabilidades ou mesmo variações inerentes à produção, como alterações de temperatura, luminosidade, processos e matérias-primas ou mesmo condições de armazenamento. Os nanomateriais podem ter suas propriedades alteradas durante esses processos, trazendo novas realidades e resultados em seus testes de toxicidade.

Por fim, um processo de melhoria contínua deve ser instalado, buscando a conformidade dos fatores de influência na produção.

3.2.2 Qualidade dos ensaios laboratoriais

Assim como a garantia da qualidade nos fornecedores de nanomateriais e nos fabricantes de nanoprodutos, também deve ser garantida a confiabilidade dos resultados obtidos em análises laboratoriais. Sugere-se que a organização contratante homologue seus laboratórios fornecedores a partir dos padrões da portaria 118 de 06 de março de 2015, item 6.2.4.3.1 do INMETRO.

Os laboratórios deveriam, assim, ser ranqueados a partir do cumprimento de requisitos da qualidade conforme a ISO/IEC 17025, que devem ser auditados pela organização, criando listas preferenciais, além de suas áreas de atuação e capacidades de medição e atendimento a prazos. Os laboratórios preferenciais seguem a ordem estabelecida na portaria do INMETRO, em resumo:

1. Laboratórios acreditados no escopo nanotecnologia – preferenciais, porém inexistentes até a publicação desse relatório.
2. Laboratórios acreditados para outro(s) escopo(s) de ensaio(s).
3. Laboratório não acreditado.

Neste sentido, fica clara a preferência para aqueles laboratórios que já possuam um sistema de gestão implementado ou encaminhado.

As avaliações podem ser executadas, como recomendação, a partir de aspectos da NIT-DICLA 005, documento orientativo do INMETRO para guiar avaliadores de laboratórios de metrologia. A NIT-DICLA 005 pode ser visualizada no website do INMETRO. Ela contempla instruções operacionais para realização da pré-avaliação, análise da documentação, auditoria de medição/ensaio de proficiência, avaliações e acompanhamento de ações corretivas de laboratórios, criando o contexto para a aprovação dos laboratórios.

4 Avaliação dos Modos de Exposição (MoE)

A Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), foi fundada em 1961, em Paris, na França. Devido ao crescente interesse na produção de nanomateriais e nanoprodutos, a OECD criou o Grupo de Trabalho em Nanomateriais Fabricados (OECD WPMN), no intuito de torna-lo um fórum global no assunto da Nanosseguurança. O OECD WPMN é responsável por produzir e divulgar as Diretrizes de Testes e Documentos Guia para testes e análise de riscos e segurança de produtos químicos.

O Brasil, apesar de não ser país-membro, foi convidado a participar da organização, através dos Programas de Aumento de Engajamento, por meio da assinatura do acordo para Aceitação Mútua de Dados (MAD – *Mutal Acceptance of Data*) como esforço para a harmonização internacional dos métodos de avaliação da segurança de produtos químicos. A MAD é juridicamente vinculativa para todos os países-membros, portanto até mesmo o Brasil é obrigado por lei a adotar os TGs publicados pelas OECD.

A avaliação dos Modos de Exposição (MoE) pressupõe o uso das diretrizes de testes (TG) e guias de testes (GD) da OECD. Além disto, nesta proposta são avaliadas as rotas dérmica, oral e inalação obrigatoriamente para nanoprodutos, a fim de estabelecer os limites de segurança. O limite é chamado de dose/concentração letal mediana (LD50/LC50), que corresponde à dose média de uma substância para levar um indivíduo a óbito.

Neste sentido, para qualquer substância a regra da dose letal mediana é válida. Segundo a escala de toxicidade de Hodge and Sterner⁴, pode-se classificá-la em seis tipos.

⁴ Hodge, A. and Sterner, B. (2005). Toxicity classes. In: Canadian center for occupational Health and safety, disponível em: <http://www.ccohs.ca/oshanswers/chemicals/id50.htm>, acessado em: 06/07/2016

Tabela 6: Escala de classificação de toxicidade de Hodge and Sterner

Classificação de Toxicidade		Rotas de Exposição / valores de LD50				Dose Letal provável para Humanos
		Dérmica	Ingestão	Inalação		
Tipo de Toxicidade	Termo Utilizado	mg/kg	mg/kg	ppm		
1	Extremamente Tóxico	5 ou abaixo	1 ou menos	10 ou abaixo	1 grão / gota	
2	Altamente Tóxico	5 a 43	1 a 50	10 a 100	4 ml	
3	Moderadamente Tóxico	44 a 340	50 a 500	100 a 1.000	30 ml	
4	Pouco Tóxico	350 a 2.810	500 a 5.000	1000 a 10.000	600 ml	
5	Praticamente Não Tóxico	2.820 a 22.590	5000 a 15.000	10.000 a 100.000	1 litro	
6	Relativamente Inofensivo	22.600 ou acima	15.000 ou acima	100.000 ou acima	1 litro	

Porém, como já citado, os valores de LD50/LC50 para nanopartículas atualmente disponíveis não são válidos. As diferenças de absorção, formato de partícula e comportamento criam necessidades de novas análises. Por exemplo, as recomendações diárias de vitamina C poderiam ser muito menores.

Esse capítulo parte da análise de efeitos na saúde para os tipos de exposição possíveis, relacionando-os às sugestões da OECD.

4.1 Efeitos na Saúde

A caracterização de material para estudos de toxicidade (triagem) deve ser realizada de acordo com a finalidade específica para ter validade. Os requisitos para triagens *in vitro* e *in vivo* são variáveis de acordo com o entrega do material, rota ou método utilizados. Portanto, o entendimento da exposição humana, em alguns contextos, pode trazer requisitos adicionais de caracterização. São propostos, ao menos, três tipos de estudos para a triagem de toxicidade⁴³, sendo eles:

1. Caracterização da exposição humana;
2. Caracterização de material administrado;
3. Caracterização de material como foi produzido/ fornecido.

As técnicas de medição devem ser precisas e comparáveis, bem como a definição de normas e procedimentos operacionais (SOPs), são pré-requisitos para uma triagem de toxicidade válida. O uso de materiais de referência adequados, é outro componente importante para se obter caracterizações comparáveis e de alta qualidade.

Atualmente, materiais-padrão incluem ouro, dióxido de titânio, nanotubo de carbono de parede simples e poliestireno, bem como o controle de qualidade de sílica coloidal¹⁰¹. A estes materiais foram atribuídos valores de distribuição de tamanho de partícula por várias técnicas analíticas, o

que permite avaliar a influência da dispersão e de protocolos de dosagem no tamanho, estado de aglomeração e capacidade de dispersão dos nanomateriais. Conforme já mencionado, o Centro Conjunto de Pesquisa da União Europeia (JRC *Nanomaterials Repository*) criou um repositório de nanomateriais comerciais representativos, que são caracterizados de forma independente para fornecer amostras de referências válidas⁶. É importante ressaltar que os fatores mais relevantes para a dosagem interna são a dosimetria, métricas para dosagem apropriadas e os processos ADME (absorção, distribuição, metabolismo e excreção). Estas são informações importantes para se definir os níveis e fatores de avaliação em teste de segurança de nanomateriais¹⁰².

4.2 Caracterização da dispersão de teste

A avaliação do tamanho de partícula e/ou distribuição do tamanho de partícula pode ser feita por diversas técnicas de caracterização, conforme já comentado em capítulos anteriores, incluindo a combinação dos métodos de separação FFF, com a vantagem de cobrir uma grande gama de tamanhos de partícula, e o SAXS para definir o tamanho real da partícula. Alternativamente, podem ser utilizados: Difusão por Nêutrons de Baixo Ângulo (*SANS – Small-angle Neutron Scattering*), Difusão de Luz por Múltiplos Ângulos (*MALS – Multiangle Light Scattering*)¹⁰³ e DLS para a determinação do tamanho. No entanto, o uso de forças maiores do que aquelas geradas pelo método de FFF podem influenciar o comportamento de aglomeração. Estas combinações de métodos vêm sendo utilizadas por muitos anos pela indústria para a avaliação de polímeros.

Tabela 7: Caracterização de nanomateriais em forma de pó (nanopós).

Nanomateriais como produzidos (nanopós)	
Propriedades	Métodos
Tamanho, Distribuição de Tamanho e Forma	Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) Microscopia Eletrônica de Varredura (SEM) Microscopia de Força Atômica (AFM) Difração por Raio-X (XRD) Analisador de Mobilidade Diferencial (DMA)
Cristalinidade, Estrutura cristalina	Difração por Raio-X (XRD) Difração por Elétrons (ED) em Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM)
Composição e pureza química de um conjunto de nanopartículas Propriedades químicas de nanopartículas individuais	Espectrometria de Massa por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS) Espectrometria de Emissão Atômica por Plasma Acoplado Indutivamente (ICP-AES) Espectroscopia de Absorção Atômica (AAS) Espectroscopia de Fluorescência de

	<p>raios-X (XRF)</p> <p>Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios-X (XPS)</p> <p>Tempo de Voo de Espectrometria de Massa de Íon Secundário (ToF-SIMS)</p> <p>Espectrometria de Ultravioleta Visível (UV-Vis)</p> <p>Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)</p> <p>Espectroscopia de raios-X por Dispersão em Energia (EDS / EDX) em microscópio eletrônico.</p>
Química de superfície e reatividade de superfície	<p>Espectroscopia de Fotoelétrons Excitados por raios-X (XPS)</p> <p>Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) ou Espectroscopia Ressonância de Spin Eletrônico (ESR)</p> <p>Espectroscopia Eletrônica de Auger (AES)</p>
Área Superficial como indicador de aglomeração	Brunauer–Emmett–Teller (BET)

Tabela 8: Caracterização de nanomateriais em suspensão líquida

Nanomateriais em suspensão líquida	
Propriedades	Métodos
Distribuição de Tamanho	Difusão Dinâmica de Luz (DLS) , Ultracentrifugação Analítica (AUC), Microscopia Eletrônica de Transmissão por Criogenia (Cryo-TEM), Fracionamento de Campo de Fluxo (FFF) combinado com SAXS
Carga de superfície, Potencial de Superfície, Estado de aglomeração.	Potencial Zeta por Difusão Dinâmica de Luz Eletroforética (ELS)
Espécies de Radicais	Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (EPR) ou Espectroscopia Ressonância de Spin Eletrônico (ESR)
Solubilidade	Condutância/Condutividade Elétrica de íons dissolvidos (EC), Titulação Condutométrica com NaCl, Confirmação visual ao longo do tempo
Atividade Superficial	Degradação fotocatalítica (PCA) ou Processo Avançado de Oxidação (AOP) Ensaio da Vitamina C
Rastreamento de um único elemento autofluorescente ou nanopartículas funcionalizadas por fluoróforo em	Microscopia de Fluorescência

suspensão líquida	
Sedimentação de Nanopartículas	Dosimetria Computacional ¹¹⁷
Coroa proteica de nanopartículas individuais	Espectroscopia de Correlação de Fluorescência (FCS)

Tabela 9. Caracterização de nanomateriais em experimentos in-vitro

Nanomateriais na superfície de células (experimentos in-vitro)	
Propriedades	Métodos
Tamanho e Distribuição de Tamanho	Microscopia de Força Atômica (AFM) Microscopia Eletrônica de Varredura Ambiental (E-SEM)
Composição e Pureza Química de nanopartículas individuais	Espectroscopia de raios-X por Dispersão em Energia (EDS / EDX) em Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM).
Agregação de nanopartículas	Separação de Células Ativadas por Fluorescência (FACS)
Propriedades químicas de nanopartículas individuais (limitado, pois não consegue distinguir as nanopartículas sob a célula com as nanopartículas dentro da célula)	Espectrometria de Massa por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)

Tabela 10: Caracterização de nanomateriais em experimentos in-vivo

Nanomateriais dentro de tecidos e células (experimentos in-vivo)	
Propriedades	Métodos
Tamanho, Distribuição de Tamanho e localização de nanopartículas (em métodos com resolução espacial)	Microscopia de Fluorescência Microscopia Confocal Espectroscopia de Fluorescência de raios-X (XRF) Microscopia de Força Atômica (AFM) em meio líquido Microscopia Eletrônica de Varredura Ambiental (E-SEM) Imagem por Ressonância Magnética (MRI) de nanopartículas superparamagnéticas
Composição e Pureza Química de nanopartículas individuais	Espectroscopia de raios-X por Dispersão em Energia (EDS / EDX) em Microscópio Eletrônico de Varredura (SEM).
Propriedades químicas de nanopartículas individuais (limitado, pois não consegue distinguir as nanopartículas sob a célula com as nanopartículas dentro da célula)	Espectrometria de Massa por Plasma Indutivamente Acoplado (ICP-MS)

A aglomeração e agregação são fatores críticos para a avaliação de nanomateriais. Sua função e efeito para a saúde, tanto *in vitro* como *in vivo*, devem ser investigados com precaução e controlada sua clusterização na preparação da amostra de teste, assim como feito para meios de testes ambientais. No entanto, as nanopartículas em testes de efeitos para a saúde podem se comportar muito diferentemente das partículas dispersas em meios ambientais, dependendo da via de exposição (por exemplo, inalação de aerossóis). Além disso, deve-se considerar as consequências regulatórias, pois o perfil de exposição influenciará o planejamento do teste. Um cenário realista de exposição precisa ser diferenciado de um cenário de pior caso. Um cenário realista refere-se à forma como nanopartículas podem realmente ser consumidas no local de trabalho (normalmente aglomeradas). Um cenário de pior caso significa a máxima dispersão, na qual o tamanho primário é fator mais importante para testes de penetração em barreira de tecidos, biodisponibilidade e efeitos tóxicos. A avaliação da potência tóxica de um nanomaterial no meio ambiente, especialmente na classificação e rotulagem, pode ser diferente do limite de nanopós dentro de um local de trabalho. Portanto, a fim de definir as questões de regulação, deve-se atentar para a preparação da amostra e a geração de ambientes de exposição adequados, conforme a tabela.

Tabela 11 – Geração de ambientes de exposição

Técnica de Dispersão	Veículo	Caracterização da Atmosfera de Exposição	Dispositivos Necessários
Abordagem baseada no risco de aglomerados > 100 nm			
Dispersão seca, com ar pressurizado	Ar limpo	Concentração de aerossóis (massas de partículas; número de partículas);	Moinho de jato, Venturi, Gerador Rotativo de Escova, Alimentador de

		Diâmetro Aerodinâmico em Média de Massa (MMAD – <i>Mass Median Aerodynamic Diameter</i>)	pó de Wright, de aquecedor elétrico cerâmico
Nebulização de formulação líquida	Exemplo, solução tampão de fosfato	Concentração de aerossóis (massas de partículas; número de partículas); MMAD – específica para de nanopartículas; Análise química de amostras filtradas para a determinação de dosagem	Nebulizador a Jato
Sistema acústico de alimentação de CNTs (subaguda, testes subcrônico)	Ar limpo	Concentração de aerossóis (massas de partículas; número de partículas); MMAD – a ser calculada com base em amostra e imagens de SEM	Sistema de membrana para separar/coletar aglomerados individuais/ respiráveis de CNT
Nebulização de formulação	DPPC (dipalmitoilfosfatidilcolina),		Sonda ultrassônica para facilitar a

líquida de CNTs (testes de toxicidade aguda)	BSA (albumina de soro bovino), e solução de glicose		dispersão; sem vortex.
Abordagem baseada no perigo de pequenos aglomerados < 100 nm			
Geração de faísca (abrasão de eletrodo metálico)	Argônio; Ar limpo	Concentração de aerossóis (número de partículas)	Espectrômetro de Mobilidade Eléctrica

É importante distinguir a influência da geometria do diâmetro aerodinâmico de nanomateriais, da influência do comportamento dos nanomateriais. O comportamento dos nanomateriais serve para estimar a dose a ser depositada, enquanto a geometria é importante para a interação entre um nanomaterial e um sistema biológico (tecidos e células).

4.2.1 Considerações especiais para toxicologia animal

Além dos detalhes sobre dispersões de médios de teste, como a força iônica elevada da solução tampão de sal, as soluções podem apresentar problemas específicos de dosimetria, incluindo aglomeração instantânea do material teste, principalmente em meios fisiológicos (toxicologia animal).

A razão para o uso dessas soluções de sais está relacionada, em primeiro lugar, com a harmonização do ambiente iônico (e.g. força iônica, pH), como no caso de administração intravenosa. A utilização de soluções tampões não pode ser evitada. Se o material é dispersível, é possível iniciar

com dispersões de meios de teste com água ultrapura¹⁰, e em seguida dispersar volumes menores na solução salina ou outras soluções tampão. No caso de pequenos volumes, deve ser considerada a dosagem de nanomateriais somente em água ultrapura se for confirmado que ocorreu uma boa dispersão e que causou pouca perturbação na homeostase do sistema. Este fator pode ser controlado pelo uso de água ultrapura como um veículo de controle. Se esta abordagem for adotada, toda a caracterizações posteriores feitas com soluções tampão salinas devem ser refeitas para uniformização dos resultados. Pode ser também útil adicionar agentes de dispersão (como PEG, Tween, Triton ou outros agentes tensoativos similares ou DMSO) na solução salina (soro fisiológico) para melhorar a dispersabilidade do material teste.

No entanto, esta abordagem deve ser plenamente justificada por razões práticas, por exemplo, como a impossibilidade de lidar com o nanomaterial em solução salina sem o uso de surfactante, refletido no controle de dispersantes e com alguma observação de como o agente dispersante funciona no revestimento da superfície do nanomaterial. Antes de selecionar o agente dispersante em estudos de inalação, devem ser considerados dispersantes similares aos encontrados no tecido-alvo, tais como fluido lavado broncoalveolar (*BALF – Bronchoalveolar Lavage Fluid*) ou BALF artificial¹⁰⁴.

Os dispersantes Tween, Triton, e outros produtos semelhantes devem ser obtidos com o maior grau de pureza analítico disponível, para minimizar os efeitos espúrios de contaminantes na química do nanomaterial. Mesmo quando o veículo apropriado ou controles em branco são utilizados¹⁰⁵, a toxicidade inerente do agente de dispersão tem que ser registrada, a fim de evitar uma elevada toxicidade do nanomaterial. Caso não seja observada a toxicidade do dispersante, isto pode interferir na interpretação dos resultados.

As soluções salinas fisiológicas e de meios de cultura para utilização em estudos *in vitro* com células de mamíferos ou em tecidos são frequentemente gaseificadas com altas concentrações de oxigênio e dióxido de carbono (por exemplo, 95% de O_2 : 5% CO_2), em temperatura

corporal natural (37 °%). É importante notar que nestas condições não foram empregadas em estudos de química de aglomeração/química coloidal ambiental. Atualmente, é convencionalizado que estas condições utilizadas em estudos de mamíferos nos sistemas acima mencionados não alteram a química da dispersão. No entanto, é importante registrar se a caracterização de partículas foi feita em solução salina equilibrada ou gaseificada com ar, e em qual temperatura. É reconhecido que o nível de oxigênio afeta diretamente os níveis de enzimas metabolizantes e, portanto, a utilização de níveis elevados de oxigênio não é recomendada para protocolos de cultura de células³⁰. Deve-se, neste sentido, utilizar níveis moderados de oxigênio como, por exemplo, níveis ambientais de 21% O_2 .

As soluções salinas fisiológicas e meios de cultura também contêm substâncias adicionais, que são específicas de diferentes tipos de teste, por exemplo, a utilização de lipopolissacárideos (LPS)/endotoxinas como um ativador imunitário/adjuvante, ou a adição de inibidores metabólicos em estudos ADME. É necessário indicar se a caracterização foi feita antes ou após a adição destas substâncias adicionais, e de preferência com verificações para demonstrar que não causou um efeito considerável sobre a dispersão de partículas e sua toxicidade.

Os protocolos para a preparação de soluções estáveis de dióxido de titânio em nanoescala em solução-padrão estão disponíveis na literatura^{9, 12}. Um dos protocolos utiliza uma solução-padrão preparada por métodos de ultrassonicação¹⁰⁵, seguido da adição da solução-padrão em qualquer solução-tampão de fosfato salino (PBS) e meio essencial de Eagle modificado por Dulbecco, contendo 10% de soro fetal bovino (DMEM-FBS – *Dulbecco Modified Eagle Medium – Fetal Bovine Serum*)¹⁰⁵. As soluções de dióxido de titânio em nanoescala preparadas de acordo com este último protocolo são estáveis sob condições de incubação em período de 48 horas. Outra técnica é a estabilização de dióxido de titânio em nanoescala com Citrato¹⁰⁶; estas suspensões demonstraram ser estáveis no meio de células com até 10% de proteína, em até 25 horas, a 37 ° %.

4.2.2 Rotas de entregas e comportamento de nanomateriais em toxicologia animal

Os testes de toxicidade em mamíferos podem envolver a exposição por inalação/trato respiratório, e as exposições via oral ou via cutânea. As rotas de entrega são descritas assim:

- Trato respiratório:
 - Aspiração ou instilação de suspensões de nanopartículas em soluções salinas.
 - A exposição a nanomateriais em fase gasosa: nestes estudos de inalação de ar, não há necessidade de se produzir dispersões de nanopartículas em soluções salinas fisiológicas, mas sim em veículos adequados de baixa toxicidade, para que se impeça a aglomeração, tanto quanto possível.
 - Exposição por inalação de um aerossol de partículas manométricas: estas partículas podem ser agregadas e/ou aglomeradas de tamanho maior.
- Via oral: dosagem de solução salina via alimentação forçada (teste agudo ou testes de toxicidade repetida). Usar solução tampão fosfato (PBS) para conseguir uma melhor dispersão do nanomaterial;
- Dérmica: aplicação externa de soluções salinas, emulsões (por exemplo, nanopartículas de TiO_2 em óleo de milho para obter suspensão estável), ou cremes;
- Injeção: substância em estudo na solução tamponada adequada, como em estudos de ADME.

Para uma interpretação correta dos efeitos biológicos após a exposição in vivo, pelo menos evidências qualitativas devem ser providenciadas, informando que o nanomaterial alcançou ou não o órgão sob investigação¹⁰⁷. Quando existem técnicas disponíveis, algumas tentativas podem ser feitas para medir as doses eficazes de massa para atingir os

órgãos-alvo, por exemplo, a medição das concentrações de metais por nanopartículas metálicas. Nos estudos de inalação, os dados aerodinâmicos do aerossol (MMAD) e sua concentração permitem uma previsão da dosagem efetivas de massa, usando modelos confiáveis, como o Modelo de Dosimetria por Múltiplos Caminhos de Partículas (MPPD - Multiple-Path Particle Dosimetry Model). Outros modelos baseiam-se na contagem do diâmetro médio (CMD - Count Median Diameter) e uma medida da forma de distribuição, pois muitas vezes, os aerossóis possuem ampla distribuição de tamanho de partículas. Alternativamente, a análise química e na rotulagem por radiação (radiorotulagem), sendo que as doses deverão ser ajustadas com os pesos corporais, a fim de manter constante a dosagem. Além disso, os pesos corporais devem ser monitorados ao longo das avaliações e as doses ajustadas adequadamente com os pesos corporais, a fim de manter constante a dosagem. No entanto, é possível que em alguns casos, a dosagem esteja relacionada com a área superficial ou com o número de partículas depositadas no pulmão.

4.3 Exposição pelo trato respiratório

Embora muitos dos estudos feitos para a toxicidade de nanopartículas tenham utilizado soro fisiológico para entregar o material de teste ao tecido pulmonar através da instilação intra-traqueal¹⁰⁸ ou aspiração, a inalação é o processo fisiológico durante o qual nanopartículas são depositadas nas vias respiratórias, incluindo o nariz e pulmões, permitindo uma bioacumulação de dosagem lenta o suficiente para que os processos de limpeza celular ocorram. É importante também notar que a instilação intratraqueal ou aspiração não estão cobertas pelas TGs e pelos Documentos Guias da OECD.

Neste caso, deve ser enfatizado que o uso dos métodos e TGs da OECD pode ser aceitável para avaliar a toxicidade relativa do material de teste, quando apoiado por um estudo adequado e representativo de inalação. Esses métodos devem ser apoiados por testes de qualidade, incluindo a entrega reprodutível da suspensão de nanopartículas nos pulmões, de

modo a que a deposição das nanopartículas no epitélio das vias aéreas possa ser distinguida daquela do epitélio alveolar. Poucos estudos têm utilizado a exposição por inalação, como em respiração de partículas dispersas no ar e atmosferas de inalação. A comparação das vantagens e limitações de diferentes métodos de exposição das partículas ao trato respiratório estão elencadas na literatura^{109, 110}.

Geralmente, a inalação de aerossóis, gases ou vapores é a primeira escolha para avaliação da rota de exposição prescrita nos TGs padrão da OECD. Esta é a única maneira para determinar o NOEL da concentração de nanopartículas suspensas no ar em forma de pó¹¹¹. De fato, o padrão é a inalação utilizando nanopartículas de aerossol e o desempenho desses estudos deve ser observado com cuidado, pois é importante considerar não só toxicidade, mas também os dados de exposição potencial e interação de nanopartículas (mecanismos) com fluidos/células/tecidos. Isto permite uma plena caracterização da resposta biológica, como relacionado com as propriedades físico-químicas dos nanomateriais¹¹². Idealmente, incluir dados quantitativos sobre cargas em órgãos e sua distribuição, o que poderá ajudar a selecionar nanomateriais com menor risco para determinadas aplicações e a identificar materiais de controle. O estudo de inalação de dose repetida da OECD (28 dias ou 90 dias) ou estudos em prazo mais longos devem incluir investigações específicas de toxicidade pulmonar e de efeitos cardiovasculares, além de ser, preferencialmente, complementados por uma avaliação histopatológica completa, ao invés de estudos de toxicidade aguda, devido à cinética de deposição de partículas nos pulmões e à possível bioacumulação progressiva da dose no corpo/tecido. A determinação da dose administrada de nanopartículas não é uma tarefa fácil e a estimativa dos valores requer um monitoramento cuidadoso da respiração, e dos parâmetros de aerossol e da análise de tecido¹¹³. A toxicidade de partículas e de nanoestruturas depende das suas diferenças no deslocamento de volumes e da sobrecarga precoce do pulmão. A farmacocinética determina as toxicodinâmicas na medida em que influencia os padrões de distribuição em todo o organismo e dosagem no órgão/tecido-alvo¹¹⁴.

Portanto, estudos de inalação devem ser concebidos para verificar o limiar da cinética da homeostase até as adversidades¹¹⁰. Isto pode ser feito usando materiais radiomarcados, e análise química elementar para determinar as concentrações em órgãos. A retenção e a liberação de nanomateriais também devem ser consideradas em estudos de dose repetida. No geral, devido às muitas variáveis complexas associadas com a exposição, a dosimetria de pulmão precisa concentrar-se em cargas cumulativas pulmonares e cinética de partículas. É importante caracterizar os materiais e o aerossol gerado por outras métricas além de massa, como a avaliação da superfície e da distribuição de tamanho. Como exemplo, a atmosfera de ensaio com pó de nanopartículas deve ser caracterizada pelo tamanho da partícula primária, a distribuição de tamanho de partícula, a concentração de massa e a área de superfície. Estas informações devem ser registradas em detalhes e com cuidados para que os resultados sejam úteis nas análises de perigos.

Para a avaliação de perigo, a geração de aerossóis de nanopartículas deve produzir distribuições de tamanho de partículas que permitam a carga máxima do pulmão ($PM_{10} < 3 \mu m$, incluindo aglomerados). Como os estudos de exposição repetida normalmente usam concentrações mais baixas do que em estudos de toxicidade aguda, a ênfase deve ser dada na geração da distribuição de tamanho de partículas que são passíveis de se depositar preferencialmente no trato respiratório inferior, em particular para partículas consideradas inócuas e biologicamente inertes (sem reatividade química). Para tais materiais, é recomendado que se utilizem limites de MMADs adequados para estudos de exposição repetida em roedores, para maximizar a exposição do pulmão. Informações adicionais podem ser encontradas nas TGs da OECD 403, 412, 413 e 436 e no Documento Guia associado GD 39 [OECD (2009)]¹³². Para a avaliação de perigo por inalação, as partículas devem ter características de morfologia e de distribuição de tamanho semelhantes e relevantes àquelas observadas em cenários realistas de exposição humana, mas ajustadas a estudos em roedores para partículas inaláveis e respiráveis. As concentrações de teste devem abranger a esperada Dose Máxima Tolerável (*MTD - Maximum Tolerated Dose*); no entanto, a agregação e aglomeração prejudicam gravemente a geração de um aerossol constituído por partículas de

tamanho nano, a partir de um pó. Existe uma clara correlação entre o número de partículas no ar (por m^3), o tempo de residência e a formação de agregados/aglomerados. Assim, para a preparação da amostra, é preferível gerar o aerossol tão perto quanto possível da zona de respiração de um animal de teste. Esforços máximos devem ser feitos para gerar aerossol com a menor formação de agregados/aglomerados, como transformar pó em aerossol via tubo de Venturi e adicional desaglomeração com moinho de jato^{116, 117}. Devido à aglomeração, as distribuições de tamanho de partículas aerodinâmicas geralmente se encontram no intervalo de 0,3 a 3,0 μm . É possível gerar aerossóis com partículas menores via dispersões suficientemente diluídas (preferencialmente em água) ou por vaporização e subsequente condensação¹¹⁹. Alternativamente, suspensões de nanopartículas em veículos apropriados (por exemplo, PBS), podem ser usadas para gerar partículas intermediárias misturadas que, após a deposição no trato respiratório, quebram facilmente e liberam as nanopartículas insolúveis.

Os métodos de geração de pó seco devem ser utilizados e deve-se tomar cuidado com o fator de respirabilidade de aerossóis em ratos, quando traduzidas as medidas de exposição a aerossóis no local de trabalho. Usando um aerossol intacto, ou seja, sem alteração da superfície da partícula, pode-se simular melhor a situação ocupacional. O objetivo é evitar que artefatos nas superfícies modificadas tragam uma resposta tóxica modificada no teste biológico. Estas grandes partículas podem ser removidas da atmosfera a partir de teste de câmara de exposição, usando um pré-seletor como um elemento de impacto. Portanto, em geral, o aerossol pode ser caracterizado como instrumentos de impacto em cascata ou outros instrumentos convencionais, com base na massa e em forças de inércia. No entanto, para a toxicidade de partículas de tamanho manométrico, formas de mensuração de dose com base em massa não podem ser otimizadas, e o número de partículas ou a área total da superfície pode ser mais relevante. Os instrumentos baseados na massa são insensíveis às partículas de tamanho nanométrico devido ao seu peso baixo como, por exemplo, 1 milhão de partículas de 10 μm pode ter a mesmo peso de uma partícula de 1 μm . Portanto, se partículas nanométricas separadas podem estar presentes, os instrumentos baseados

em medição de massa devem ser suplementados com instrumentos baseados na contagem de partículas individuais, como o Escaneamento de Mobilidade e Tamanho de Partícula (*SMPS - Scanning Mobility Sizer*), Impactador Elétrico de Baixa Pressão (*ELPI - Electrical Low Pressure Impactor*). A concentração e a distribuição de tamanho de área superficial podem ser calculadas a partir da distribuição de número de tamanho de partícula, embora tais cálculos devam ser interpretados com cautela, uma vez que estas abordagens podem subestimar a área de superfície em relação à medição direta por adsorção de gás¹²⁰. Além disso, existem instrumentos distintos para estimar a área superficial da partícula depositada por parte do sistema respiratório humano, como o Monitor de Área de Superfície de Nanopartículas (*NSAM - Nanoparticle Surface Area Monitor*) que é um instrumento concebido para medir a área de superfície de concentrações de nanopartículas no ar que podem se depositar na região alveolar ou traqueobrônquica do pulmão¹⁹. A medição direta da área superficial de partícula utilizando adsorção de gás via BET tem sido historicamente aplicada ao material em pó a granel.

Se for necessário utilizar um veículo para gerar uma concentração e tamanho de partícula apropriados, deve-se utilizar água ou uma solução tampão fisiológica (PBS ou outra), pois essas ferramentas de formulação podem ajudar a desaglomerar os maiores aglomerados iniciais. É importante sempre garantir a consistência e a homogeneidade das concentrações atmosféricas das partículas testadas. Se um veículo diferente de água é utilizado, a concentração do veículo na atmosfera deve ser determinada por um método apropriado (cromatografia em fase gasosa, HPLC).

O fluxo de ar filtrado através da câmara/sistema de exposição deve ser cuidadosamente controlado, continuamente monitorado e registrado pelo menos de hora em hora, durante cada exposição. A concentração nominal é a massa de nanomaterial introduzido na atmosfera-teste, dividido pelo volume total de ar que passa através do sistema de exposição por inalação. Esta medida não deve ser utilizada para caracterizar a exposição em animais, uma vez que a concentração nominal é geralmente maior que a concentração efetiva na zona de respiração do animal na câmara de teste,

devido a fatores como o impacto e a estabilidade do material no gerador de partícula e/ou sobre as superfícies da câmara de teste. A concentração real é a concentração nanomaterial coletado das zonas de respiração dos animais em um sistema de inalação, e deve ser medida e registrada. Para componentes não-voláteis de partículas individuais, as concentrações reais podem, em alguns casos, ser obtidas por filtragem. No caso dos aerossóis de componentes múltiplos, a concentração pode também, algumas vezes, ser determinada por análise gravimétrica. No entanto, isso requer dados analíticos que demonstrem que a composição do material transportado pelo ar é homogênea e semelhante a do material de partida.

As limitações de concentrações de exposição devem demonstrar um intervalo baixo da Dose Máxima Tolerada (MTD) para doses relevantes em exposição humana. A MTD é definida como a dose que produz sinais de toxicidade e que, em níveis de dosagem mais elevadas (baseado no mesmo regime), poderia produzir letalidade. Contudo, o conceito de Dose Máxima Tolerada (MTD com base na massa) pode não se aplicar aos nanomateriais, e é recomendado o uso de concentrações que não excedem a 2 ou 3 ordens de grandeza de uma exposição de cenário de pior caso, baseado em qualquer massa ou número de partículas por volume de ar. Deve-se compreender que, para a exposição de nanopartículas, a dose máxima pode ser limitada pela concentração máxima a ser obtida na solução de dispersão. A distribuição de tamanho das partículas dos aerossóis deve ser determinada pelo menos uma vez durante o estudo para cada nível de concentração, utilizando-se um método de medição apropriado. Para melhorar este processo, a determinação pode ser aumentada para uma vez por dia, antes e depois do estudo. A massa total de concentração obtida por análise de tamanho de partícula deve estar dentro de limites razoáveis da concentração de massa obtida durante a análise de controle de concentração. Além da concentração de massa, a concentração de número de partículas pode ser medida utilizando-se instrumentos como Contadores de Condensação de Partículas no Intervalo de (10 a 1000) nm¹⁹. A distribuição de tamanho pode ser medida utilizando-se os Contadores Ópticos de Partículas (OPC), no intervalo de (300 a 20000) nm, para avaliar a presença de aglomerados e/ou agregados de nanopartículas e partículas de maior diâmetro de materiais nanoestruturados. Para

caracterizar ainda mais a presença de nanopartículas primárias em atmosfera de inalação, deve-se utilizar um sistema DMA. Mais detalhes sobre estes procedimentos podem ser encontrados no Documento Guia associado GD 39 e na ISO 10801¹¹⁵.

4.4 Exposição oral

Os testes regulatórios de toxicidades agudas usam uma dosagem de alimentação forçada (instilação no estômago) de, tipicamente, 10 ou 20 H de solução salina por kg de peso corporal de animais de laboratório (ratos, de 20 ml/kg para 50 ml/kg; ratos de 20 ml/kg ou 30 ml/kg, conforme definido na OECD TG407. Estes volumes são projetados para fornecer uma dose confortável para o estômago do animal, sem dilatação do estômago. Os estudos crônicos de exposição alimentar são melhor realizados pela introdução de nanopartículas na dieta do animal. Como é conhecido que nanomateriais podem conter contaminantes, é possível que os resultados dos estudos de alimentação sejam afetados pela composição alimentar. Poucos estudos publicados descrevem a exposição através do trato digestivo pela ingestão de alimentos contaminados por NP, mas a necessidade de incorporar as nanopartículas na dieta significa que as considerações de agregação/aglomeração podem ser uma preocupação secundária.

No entanto, as técnicas de fabricação de alimentos muitas vezes incluem um passo em que a substância de ensaio é pulverizada na mistura de alimentação, uma vez que a substância é misturada, ou usada como recobrimento do alimento. Em ambos os casos, uma dispersão de teste deve ser usada para assegurar uma propagação uniforme da dose nas porções de alimentos resultantes. Sempre que possível, a dose deve ser medida em alimentos produzidos, juntamente com a análise nutricional habitual do alimento para animais. O armazenamento e degradação da alimentação pode ser um problema, especialmente com NPs oxidantes (alimentos rançosos). O sabor dos alimentos deve também ser considerado, e é possível que as nanopartículas possam causar efeitos tóxicos secundários, a partir da redução da biodisponibilidade ou digestibilidade dos ingredientes da ração por processos de adsorção ou

outros efeitos. Além disso, é necessário avaliar a química dentro do trato digestivo e a circulação entero-hepática. É provável que o baixo pH do estômago gere efeitos sobre qualquer pré-revestimento de proteína e os efeitos do ambiente do estômago possam dispersar ou aglomerar nanopartículas independente dos pré-tratamentos. O trato digestivo também é um ambiente de alta força iônica, contendo muco e outras proteínas solúveis e espécimes microbianas.

A química é muito complexa, não é fácil prever os efeitos somente teoricamente, são necessários teste de biodisponibilidade de nanopartículas para diferentes matrizes de alimentos para uma avaliação completa. Deve-se também avaliar a influência sobre a quantidade excretada de bile e circulação entero-hepática, pois isto pode influenciar a dose absorvida. Podem ser usados modelos *in vitro* para a simulação do ambiente do trato gastrointestinal, e assim avaliar a interação dos nanomateriais com líquidos do trato gastrointestinal.

A administração de nanomateriais utilizando água potável tem sido utilizada para avaliar a dose repetida em teste de toxicidade⁸. Este método está em conformidade geral com as diretrizes de teste OCDE oral, toxicidade de dose repetida (OECD TG 407, 408). No entanto, cuidado especial deve ser tomado para evitar sedimentação. Além disso, devem ser medidos os níveis de Ca, Mg, da dureza total de água, além da estabilidade da dispersão de NP, que também deve ser verificada ao longo do tempo⁸. No caso de materiais fotossensíveis ou fotoativos, cápsulas ou outras formas de dosagem oral podem também ser consideradas.

4.5 Exposição dérmica/cutânea

A exposição dérmica/cutânea para as nanopartículas pode ocorrer no ambiente de trabalho ou por meio de consumo de produtos (agentes, cosméticos, produtos de higiene pessoal, têxteis ou produtos de limpeza, por exemplo). Em produtos de consumo, tais como produtos para cuidados pessoais e cosméticos (HPPLC), as nanopartículas são geralmente dispersas

em algum excipiente, tal como glicerol, permitindo que as partículas sejam aplicadas na pele¹²¹. Em relação a produtos têxteis, a questão está na lixiviação de nanopartículas durante o uso, como após entrar em contato com o suor/saliva ou lavagem. Atualmente, é considerado que as nanopartículas se assemelham com macromoléculas de elevado peso molecular, e sua absorção muito além das camadas da pele é praticamente improvável. Esta expectativa foi verificada no projeto *Nanoderm*, que especialmente estudou TiO_2 em formulações de cosméticos¹²². Todavia, não se pode excluir o fato de que outros nanomateriais podem penetrar a pele¹²¹. De acordo com o Comitê Científico de Produtos Cosméticos¹²³, nanomateriais constituintes podem agir como promotores de penetração, pela penetração de nanomateriais individuais no estrato córneo e, posteriormente, alterar as lamelas de lipídio intercelular dentro da camada de pele. Além disso, os nanomateriais podem servir como um depósito para a libertação sustentada de compostos dermicamente ativos, pois as aberturas dos folículos capilares são compatíveis com dimensões de partículas. A presente discussão centrou-se na penetração de partículas através da barreira da pele intacta, mas, se a barreira de pele tratada for comprometida, a penetração pode ter um fator de quatro ou mais ordens de magnitude em comparação àquela obtida com a pele intacta¹²⁴. Portanto, não é um absurdo antecipar um fenômeno indesejável dependente da dimensão de tamanho das partículas, no qual as partículas alojadas dentro das aberturas cutâneas possam permitir uma maior difusão de ingredientes. As nanopartículas ainda podem aumentar a deposição de material nos sulcos e, portanto, não poderão ser eficientemente removidas por procedimentos de limpeza padrão. Foi demonstrado recentemente que pontos quânticos esféricos e elípticos penetram no estrato córneo e se depositam dentro das camadas epidérmicas e dérmicas. Se a pele é exposta à grande dose de nanopartículas, mesmo pequenas frações podem se acumular em órgãos-alvo secundários.

Os métodos para realizar estudos de absorção da pele são estabelecidos nas diretrizes da OCDE TG 427 (*in vivo*) e TG 428 (*in vitro*) e do Documento Guia 28, bem como as Notas Guia OCDE para orientação sobre absorção cutânea⁴³. O estado de aglomeração não é facilmente observado nas

diretrizes de absorção cutânea *in vivo*. Devido a isso – e a questões científicas e éticas adicionais (como animais geneticamente modificados), relacionadas à orientação de absorção com a pele *in vivo* – é preferível utilizar OCDE TG 428 (Absorção cutânea: método *in vitro*). A OECD TG 428 utiliza amostras de pele humana como um componente estratégico do teste de absorção pela pele¹²⁵. As amostras de pele *in vitro* são usadas para avaliar a absorção de nanopartículas através da pele por meio de células de difusão de Franz ou o modelo de penetração de Saarbruecken. Se, apesar das recomendações anteriores, for escolhido o teste *in vivo* (TG 427), é necessário considerar se o material de teste tem razoavelmente bom acesso à pele sob o pelo do animal de teste. Por outro lado, quando a pele é raspada ou depilada antes do tratamento, existe um risco adicional de danos à função de barreira, exacerbando ainda mais o problema de avaliar de forma confiável a absorção de nanopartículas¹²³. Este problema pode ser importante, dados os efeitos inflamatórios conhecidos de algumas partículas em tecidos epiteliais. É, portanto, função do avaliador garantir que estes casos estão controlados e que não há deposição de nanomateriais além da barreira da pele. Se um agente dispersante ou solvente foi usado para fazer a solução de teste ou creme (emulsão), deve-se usar um solvente de controle para deferir quaisquer efeitos irritantes desses reagentes, ou a sua capacidade para alterar a permeabilidade intrínseca da pele. É necessário também estipular a região precisa na pele onde será aplicado o material teste (ouvido, abdômen ou tórax), porque a espessura e a sensibilidade da pele variam para diferentes locais. A mesma localização de aplicação deve ser utilizada em todos os animais de teste, pois o animal pode lamber a pele tratada e afetar a exposição. Pelas mesmas razões, os animais devem ser acomodados em gaiolas individuais.

A capacidade das partículas de penetrar pele doente não foi estudada com profundidade. No entanto, é bem conhecido que a pele doente possui diferentes propriedades de barreira em relação à pele saudável, o que influencia a penetração. Por exemplo, a difusão passiva de água através do estrato córneo é referida como perda transepidérmica de água (*TEWL – Trans-epidermal Water Loss*) e fornece informações de alterações em função de barreira da água do estrato córneo, que podem ser utilizadas como um marcador da integridade da pele. Geralmente, os valores da

TEWL são mais elevados para a pele doente, em condições tais como a ictiose, psoríase, dermatite esfoliativa, dermatite atópica e dermatite alérgica, do que comparada com a pele saudável¹²⁶.

4.6 Exposição por injeção

A aplicação em injeções em circulação, tecidos ou cavidades corporais é geralmente usada como via de administração em estudos de ADME. No caso dos nanomateriais, as distribuições podem diferir substancialmente da inalação, não só quantitativamente, em função do tempo, como da concentração. Por exemplo, a entrada no cérebro através do bulbo olfativo, como a passagem através de compartimentos em diferentes partes do corpo, é acessada diretamente por injeção¹²⁷. Isto é geralmente realizado com formulações dispersas em solução salina, ou, no caso de um material muito hidrofóbico, em veículos lipofílicos, tais como óleo de milho. Além das considerações sobre as soluções salinas acima, outra preocupação é o comportamento das nanopartículas na seringa. A presença de microbolhas na seringa pode atuar como superfícies de precipitação, e por isso seria importante evitar a criação delas a partir de boas estratégias de dispersão e também evitar que a seringa descanse por um tempo muito longo, pois podem se formar microbolhas na superfície interior da seringa. Também é importante considerar que a dose real pode depender da interação de nanopartículas com o material da parede. O calibre da agulha deve ser suficiente para permitir uma injeção suave, sem o bloqueio da seringa. O uso de tamanhos de agulha maiores pode ser necessário para algumas preparações de nanomateriais, em função da concentração ou viscosidade. Além disso, não podemos excluir a possibilidade de que as injeções de nanopartículas podem ser muito dolorosas, pois os materiais são reativos. Neste caso, considerar o bem-estar animal como importante aspecto. A aplicação de anestesia deve ser feita independentemente do tamanho da agulha.

A falta de penetração dérmica gerando falsos resultados negativos deve ser registrada, sempre que forem realizados testes de regulamentação, tais como a sensibilização da pele. Por exemplo, o ensaio de gânglio linfático

local (LLNA - *Local Lymph Node Assay*), conforme a OECD TG 429 que requer o acesso a células dendríticas em camadas de pele viva.

4.7 Guias de Testes (Teste Guidelines - TG)

Conforme recentemente publicado pelo OECD WPMN, foram avaliados 11 nanomateriais padronizados: Fulerenos C60; Nanotubos de Parede Simples (SWCNT); Nanotubos de Parede Múltipla (MWCNT); Nanopós de Prata (Ag NP); Ag NP coberta por Citrato; Ouro (Au NP); Dióxido de Titânio (TiO₂ NP); Dióxido de Cério (CeO₂ NP); Óxido de Zinco (ZnO NP); Dióxido de Silício (SiO₂ NP); Dendrímeros e Nanoargila.

4.7.1 Parâmetros de Toxicologia e Destino Ambiental

A avaliação dos parâmetros de destino e toxicologia ambiental foram testados com nanopartículas que são prontamente dissolvidas em meio aquoso. Os nanomateriais degradáveis testados são principalmente metais e óxidos metálicos, para os quais o ensaio clássico de degradabilidade biótica (desenvolvido para produtos químicos orgânicos) não é relevante. Os testes de degradabilidade biótica foram realizados com SWCNTs e MWCNTs, que são nanomateriais inorgânicos à base de carbono, e a conclusão foi de que os materiais não são biodegradáveis. Assim, os nanomateriais prontamente absorvíveis devem ser avaliados como produtos químicos tradicionais. Importante ressaltar que os ensaios de produtos adicionais da degradação não foram realizados.

Uma análise dos dados¹²⁸ demonstrou que os alvos ambientais e os parâmetros toxicológicos para cada protocolo de organismos ou de destino ambiental testado para produtos químicos tradicionais, são aplicáveis aos nanomateriais. De acordo com o estado atual do conhecimento sobre o destino e efeitos de nanomateriais, a única exceção para esta conclusão é a biocinética de nanomateriais, pois existem diferenças na absorção e distribuição do nanomaterial, em comparação com produtos químicos tradicionais.

Alguns princípios importantes e necessários foram identificados durante os testes para a caracterização das propriedades físico-químicas de nanomateriais⁸.

- Deve ser criada uma árvore de decisão e estratégias para taxas de dissolução para avaliar o comportamento de aglomeração, e testes de destino ambiental (água, solo e sedimentos), pois existem diferenças de destino e exposição ambiental de nanomateriais em comparação com produtos químicos tradicionais.
- Deve-se estabelecer um regime diferenciado para atingir o destino adequado e testes ecotoxicológicos.
- Os métodos devem ser harmonizados para a preparação de suspensões para testes ecotoxicológicos e de bioacumulação, para permitir uma comparação mais fácil de dados.
- É necessária a definição do melhor procedimento de spiking (seco ou molhado) para testes de toxicidade dos nanomateriais, pois ainda não está claro.
- Deve ser promovida a comparabilidade dos resultados dos testes de ecotoxicidade e de destino ambiental. Devem ser usadas as mesmas condições em testes, por exemplo, parâmetros de suspensão e do meio de teste.
- Importante definir parâmetros para interconverter os valores de massa para contagem de partículas à área superfície, pois as métricas de dose mais apropriadas nem sempre são conhecidas para receptores ambientais e/ou para ancoragem da dose com base na massa de nanomateriais.

Além das conclusões acima, a aplicação das OECD TGs individuais para avaliar a toxicidade e destino ambiental deve ser apoiada por diretrizes e orientações adicionais e até mesmo por OECD TGs consideradas inapropriadas para nanomateriais, adaptadas para cada caso de teste. Também foram identificadas necessidades específicas de investigação: i) para a ecotoxicidade aquática, é necessário determinar possíveis interferências dos efeitos de nanomateriais originais em relação a nanomateriais alterados e aos componentes do meio teste; ii) para solos e

sedimentos, é necessária uma melhor compreensão das frações biodisponíveis de nanomateriais, técnicas apropriadas de spiking, e da aplicabilidade das OECD TGs para a novos receptores ambientais; e iii) para o destino e comportamento no ambiente, dispersão/dissolução/transformação em meios ambientais, uso de diferentes tipos de solos, é necessário mais pesquisa. As tabelas (Tabela 12 e Tabela 13) oferecem um resumo dos TGs aplicáveis para os testes para avaliar a toxicidade e destino ambiental.

Tabela 12: Visão geral dos métodos aplicados para os testes realizados em parâmetros de destino ambiental

Parâmetros de Toxicidade	Fullereno (C ₆₀)	SWCNT	MWCNT	Nano 100	Nano 1000	Nano 10000	Nano 100000	Nano 1000000	Nano 10000000	Nano 100000000	Dendrímero
Estabilidade da dispersão em água	Correlações da literatura	-	-	Estabilidade em água do mar e em água doce monitorada por UV-Vis. Estabilidade da dispersão em fluido sintético de pulmão	-	Protocolos do NIST, PROSPECT, Nanogenotoxic	OECD TG 107, com água purificada e destilada, água do mar peixe, daphnia	OECD TG 107, com água purificada e destilada, água do mar peixe, daphnia	OECD TG 107, com água purificada e destilada, água do mar peixe, daphnia	OECD TG 107, com água purificada e destilada, água do mar peixe, daphnia	• DLS
Degradabilidade Biótica											
Biodegradabilidade Rápida	-	• OECD TG 301F, OECD TG 301C	• OECD TG 301F, OECD TG 301C	ND	-	-	ND	ND	ND	ND	-

Biodegradabilidade Herdada	-	• OECD TG 302C e correlações da literatura.	ND	-	-	ND	ND	ND	ND	-
Testes de Simulação de Tratamento de Esgoto	-	-	• OECD TG 303	-	• OECD TG 303, OECD TG 303A	• OECD TG 303A, OECD TG 209	ND	ND	ND	-
Degradabilidade Abiótica e Destino Ambiental										
Hidrólise	-	-	-	-	-	-	-	-	Correlações da literatura	-

Fototransfor- mação	Correlações da literatura	-	-	-	• OECD TG 316	-	-	-	-	-	-
Absorção- Dessorção	-	-	-	-	• OECD TG 106, teste em lote, teste de percolação	-	• OECD TG 106	• OECD TG 106	Método de equilíbrio em lote	-	-
Absorção do Solo ou Sedimento	• Outro método	-	-	-	• OECD TG 106, teste em lote, teste de percolação	-	• OECD TG 312	• OECD TG 106	Método de equilíbrio em lote	ND	-
Potencial de Bioacumulação	• OECD 202, ISO 14380:2011, correlações da literatura	-	-	-	• OECD TG 317, OECD GD 25 – persistência e bioacumulação de pesticidas	-	• OECD TG 302, revisão da literatura	-	-	ND	ESI-MS*, MALDI-MS*, QIT*, NMR, AFM, UV-Vis, HPLC

<p>Bioacumulação em oligoquetas bentônicas que vivem nos sedimentos</p>	<p>-</p>	<p>Correlações da literatura,</p> <p>definir mudanças temporais nas propriedades físicas e químicas e o transporte de C60/aquoso em meio aquoso</p>	<p>-</p>	<p>Estabilidade em sete tipos de solo. Especificar a prata em tecido antimicrobial antes e depois da exposição a detergente hipoclorito</p>	<p>SIM</p>	<p>SIM</p>	<p>Monitorar os isótopos em comparação aos isótopos naturais para diferenciar e identificar o elemento no ambiente</p>	<p>Monitorar os isótopos em comparação aos isótopos naturais para diferenciar e identificar o elemento no ambiente</p>	<p>-</p>	<p>-</p>
--	----------	---	----------	---	------------	------------	--	--	----------	----------

Tabela 13: Visão geral dos métodos aplicados aos testes realizados para parâmetros de Toxicologia Ambiental

Parâmetros de Toxicidade	Fulereo (C ₆₀)	SWCNT	MWCNT	Nano (C ₆₀)	Nano (C ₆₀)	Nano (C ₆₀)	Nano (C ₆₀)	Nano (C ₆₀)	Nano (C ₆₀)	Nano (C ₆₀)	Dendrímero
Espécies Peiálgicas											
Peixe	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 203 e correlações da literatura 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 203, OECD TG 204* e correlações da literatura 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 203, OECD TG 204 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 203, OECD TG 210, OECD TG 212, toxicidade de embriões de peixe, DIN 38415-6 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 203, OECD draft toxicidade de embriões de peixe 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 212, OECD TG 236 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 212 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 213 (1991) 	<ul style="list-style-type: none"> • Dados da literatura, OECD TG 236 		

		<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 202, OECD TG 211, dados da literatura 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 202, OECD TG 211 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 202 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 202 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 202, OECD TG 219, OECD TG 225 ISO 10872, EPS 1/RM/33 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 202, OECD TG 211 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 202 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 202 (1991) 	<p>Dados da literatura, BS EN ISO 6341, BSI - BS ISO 14380</p>
<p>Algas</p>	<p>-</p>	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 201, dados da literatura 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 201 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 201 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 201, EPS 1/RM/25 	<ul style="list-style-type: none"> • Outro método 	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>-</p>	<p>Dados da literatura, OECD TG 201 e Chlamydomonas reinhardtii</p>

Espécies de Sedimento	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Espécies de Solo	-	-	-	-	-	•	•	•	•	•	•
							OECD TG 207, OECD TG 222, outros métodos de teste, atividade de enzimas em solo, ASTM E2172-01				
Espécies Terrestres	-	OECD TG 216	OECD TG 216	OECD TG 216	OECD TG 207, OECD TG 208, OECD TG	OECD TG 207, OECD TG 208, OECD	OECD TG 207, OECD TG 222	-	-	-	-

Lamas ativadas em estação de tratamento de águas residuais	-	• OECD TG 209	• OECD TG 209	-	-	-	-	-	-	-	-
Outras informações relevantes	-	-	SIM Teste de Micro-núcleos com Xenopus laevis	• OECD TG 221	SIM	SIM	SIM	-	-	-	SIM Teste in vitro com células de RTG-2 tecido gonadal de truta arco-íris

- Avaliação completa (pelo menos um dos testes escolhidos foi feito para os nanomateriais principais).

- Avaliação não realizada / Não existe informação suficiente

SIM/NÃO Informação relevante providenciada ou não

ND Avaliação não disponível

* *Electro spray ionization (ESI); matrix-assisted laser desorption ionization(MALDI); Quadrupole Ion Trap Mass Spectrometry (QIT)*

4.7.2 Parâmetros de Toxicologia em Mamíferos

Embora os testes de toxicidade por inalação de nanopartículas com agregados e aglomerados pareçam ser adequados para avaliações de perigo e de risco para o manuseamento de pós, pode ser relevante incluir testes de toxicidade por inalação de aerossóis de partículas primárias no ambiente de produção. Deve-se ter cuidado com a medição da dose de concentração de aerossóis, pois em altas taxas de concentração de massa, a distribuição de tamanho de partícula tende a se deslocar para a formação de aglomerados, em função do tempo e do número de concentração de partículas.

Para testar a genotoxicidade dos nanomateriais fabricados, sete recomendações foram acordadas consensualmente pelo WPMN e estão declaradas a seguir.

Tabela 14: Recomendações para avaliação de genotoxicidade do WPMN.

- 1) A utilização do teste de Ames (TG 471) não é recomendada para a investigação da genotoxicidade de nanomateriais. O programa de diretrizes de teste deve considerar a modificação do domínio de aplicabilidade.
- 2) As medidas de citotoxicidade com base na proliferação de células, que estão descritas nas TGs, são apropriadas para a determinação da concentração máxima a ser aplicada para testes *in vitro* dos nanomateriais. É conveniente, em alguns casos, considerar um intervalo maior de concentrações, ao invés do padrão ≥ 10 , a fim de assegurar que a concentração-resposta esteja bem caracterizada e em concentrações não associadas com citotoxicidade.
- 3) A caracterização dos materiais deve ser realizada no meio de cultura celular utilizado, tanto no início do tratamento e, se existirem outras metodologias, após o tratamento. A intenção ao aplicar nanomateriais em meio de cultura celular é criar condições que sejam comparáveis, na medida do possível, com o meio biológico e as condições fisiológicas no sistema *in vivo*.

- 4) A extensão da absorção celular é um fator crítico a se considerar quando interpretar os resultados dos testes. Em algumas circunstâncias, a falta de absorção em célula de mamífero pode indicar um perigo intrínseco baixo, na perspectiva de genotoxicidade direta.
- 5) O programa de orientações de ensaio deve considerar a modificação do ensaio de micronúcleos *in vitro*, para recomendar onde cito B é utilizado, a sua adição como um pós-tratamento ou como protocolo de co-tratamento atrasado, a fim de assegurar o período de exposição do sistema de cultura celular a um nanomaterial na ausência de cito B.
- 6) Antes de efetuar um estudo *in vivo* de genotoxicidade, existe a necessidade de se realizar algumas investigações toxicocinéticas para determinar se o nanomaterial atinge o tecido-alvo, o qual não é o local de contato. Na ausência de dados contrários, o teste não é aplicável para a detecção de genotoxicidade primária, quando o nanomaterial não atinge o tecido-alvo.
- 7) Não existem dados suficientes para recomendar uma via de administração em detrimento de outra via. A base para a seleção da via de administração para o teste deve ser a considerada como a via mais aplicável à exposição humana.

Os ensaios *in vitro* foram eficientes na triagem dos nanomateriais¹²⁹ e, embora os efeitos de sedimentação influenciem a dosagem, a dose deve ser ajustada de acordo com o comportamento de transporte do nanomaterial. A relação de dosagem-resposta não pode ser facilmente utilizada para obter níveis sem efeitos. Foi avaliado o potencial genotóxico dos materiais C_{60} – fulerenos, SWCNTs e MWCNTs, tanto em sistemas *in vitro*, como *in vivo*. Além das Diretrizes Japonesas¹³⁰, o OECD TG 471 (Teste Mutação Reversa de Bacteriana *in vitro*), o OECD TG 473 (Teste de Aberração Cromossômica de Mamífero *in vitro*), o OECD TG 474 (Teste de Micronúcleos em Eritrócitos de Mamífero *in vivo*) e várias formas de teste Cometa foram aplicados em nanopartículas carbonáceas.

Apesar das frequências de mutação e aberrações cromossômicas não terem sido *in vitro* observadas com a utilização do OECD TG 471 e TG 473, existem algumas indicações de danos no DNA em fibroblastos de pulmão de hamsters (V79), quando utilizado o teste Cometa com alguns tipos de SWCNT e MWCNT. Curiosamente, as propriedades de dano para DNA, foram confirmadas para poucos CNTs em testes *in vivo* de células do tecido-alvo. Usando o Teste de Mutação em Gene de Célula de Mamífero *in vitro*, OECD TG 476, dois tipos de MWCNT investigados não demonstraram atividade mutagênica em células de linfoma do rato L5178Y, embora um dos MWCNT tenha mostrado aberrações cromossômicas numéricas significativas (OECD TG 473) e formação induzida de micronúcleos em células CHL/IU pelo Teste de Micronúcleos em Célula de Mamífero *in vitro* – OECD TG 487.

Estes resultados confirmaram que a avaliação de risco deve ser uma investigação caso a caso para o perigo genotóxico, tanto para uma entidade química, como para cada tipo de nano-objeto (partículas, fibras, barras e clusters). A Tabela 15 oferece um resumo dos TGs aplicáveis para os testes para avaliar a toxicidade em mamíferos.

Tabela 15: Visão geral dos métodos utilizados para o ensaio realizado para a toxicologia em mamíferos

Parâmetros de Toxicidade	Fulereno (C ₆₀)	SWCNT	MWCNT	Nano (In)	Nano (In)	Nano (In)	Nano (In)	Nano (In)	Nano (In)	Nano (In)
Farmacocinética/ Toxicocinética (ADME)	Dados da literatura em injeção intratraqueal.	Dados da literatura	Dados da literatura (estudos de inalação, injeção, absorção oral, e de radiomarcagem com C ¹⁴ .	• OECD TG 417	• Dados da literatura e testes <i>in vitro</i>	• OECD TG 412, administração intravenosa, oral – alimentação forçada	• OECD TG 428 e outros métodos	• OECD TG 413, outros métodos (intravenosa e oral – alimentação forçada)		
Oral	• OECD TG 474	• OECD TG 423	• OECD TG 474, Outros testes da literatura	• OECD TG 423	-	• OECD TG 423, revisão da literatura	• OECD TG 401, dados da literatura	• OECD TG 401		

Dérmico/ Cutâneo	-	-	• OECD TG 402	• OECD TG 402 modifica do	-	• OECD TG 402, revisão da literatura,	-	• OECD TG 402, 5 dias de absorção dérmica	-
Inalação	-	• OECD TG 412, correla- ção com a literatura (estudos injeção intra- traqueal e aspiração faringeal)	• OECD TG 412, • OECD TG 413, Outros métodos	• OECD TG 403, OECD TG 412, OECD TG 413	• OECD TG 412, OECD TG 413 OECD-STIS	• OECD TG 412, 5 dias de estudo de inalação e injeção intra- traqueal	• OECD TG 412	• OECD TG 402, 5 dias de estudo da toxicidade em pulmão OECD TG 412, OECD TG 413	• OECD TG 413, 5 dias de estudo
Corrosão da Pele	• OECD TG 404	• OECD TG 404	• OECD TG 404	• OECD TG 404	-	-	-	• OECD TG 431	-

Irritação da Pele	• OECD TG 404	• OECD TG 404	• OECD TG 404	• OECD TG 404	• OECD TG 404	• OECD TG 404	• OECD TG 404	• OECD TG 404	• OECD TG 404	-	-	-
Sensibilização da Pele	• OECD TG 406	• OECD TG 406	• OECD TG 406	• OECD TG 406	• OECD TG 406	• OECD TG 406	• OECD TG 406	• OECD TG 406	• OECD TG 406	-	-	-
Irritação do Olho	• OECD TG 405	• OECD TG 405	• OECD TG 405	• OECD TG 405	• OECD TG 405	• OECD TG 405	• OECD TG 405	• OECD TG 405	• OECD TG 405	-	-	-
Oral	• OECD TG 407	• OECD TG 407	• OECD TG 407	• OECD TG 407, OECD TG 408, OECD TG 422	• OECD TG 407, OECD TG 407, administra ção intravenosa	• OECD TG 407, OECD TG 407, outros estudos	• OECD TG 407, OECD TG 407, outros estudos	• OECD TG 407, OECD TG 407, outros estudos	• OECD TG 407 (alimenta- ção forçada), OECD TG 408, OECD TG 412	-	-	-

Se Disponível										
Toxicidade Crônica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toxicidade Reprodutiva	-	Dados da literatura	-	-	-	-	-	-	-	• OECD TG 416
Teste de Triagem	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Toxicidade Desenvolvida	-	-	-	-	-	•	•	•	-	-
Toxicidade Genética										

<p>In Vitro</p>	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 471, OECD TG 473, Guia Japonês de Teste de Mutagenidade por Produtos Químicos 129 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 471, OECD TG 473, Testes Cometa 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 471, OECD TG 473, OECD TG 476 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 473 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 471, OECD TG 473, Testes Cometa 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 471, OECD TG 473, OECD TG 476, OECD TG 478, Testes Cometa e revisão da literatura de fototoxicidade 	<p>-</p>	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 471, OECD TG 473 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 473, OECD TG 476, OECD TG 487, Testes Cometa
<p>In Vitro, genotoxicidade de célula somática e teste de aberração cromossômica de medula óssea</p>	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 474, OECD TG 475 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 474 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 474 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 474 	<p>-</p>	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 474 	<p>-</p>	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 474 	<ul style="list-style-type: none"> • OECD TG 474

In Vivo, teste de mutagenicidade em célula de germinativas	• OECD TG 474, correlação com literatura	-	• OECD TG 474	-	-	-	-	-	-	• OECD TG 474	
Exposição relacionada a humanos	-	-	-	• Estudo de Observação da Saúde	• Estudo de Observação da Saúde	-	Estudo de Observação da Saúde	-	Ref. Park et al 2008	-	-
Outros dados relevantes											
Testes In Vivo	-	SIM	SIM	-	NÃO	SIM	SIM	SIM	• Ref 132, Teste Liberação de LDH*, Teste de MTT*, Teste de NRU*	SIM	SIM

<p>Testes In Vitro</p>	<p>Linagem celular A459, HaCat, TH-1</p>	<p>SIM</p>	<p>SIM</p>	<p>SIM</p>	<p>Absorção Celular, Citotoxicidade, Teste de XXT*, Teste de Liberação de LDH*, Teste de ATP*, Teste de DCFH-DA* e Teste de LAL*</p>	<p>Permeabilidade Celular, Citotoxicidade, Teste de XXT*, Teste de Liberação de LDH*, Teste de ATP, Teste de DCFH-DA e Teste de LAL</p>	<p>SIM, Testes NanoCar e <i>in vitro</i> (Ref 52a)</p>	<p>SIM</p>	<p>SIM</p>
-------------------------------	--	------------	------------	------------	--	---	--	------------	------------

- Avaliação completa (pelo menos um dos testes escolhidos foi feito para os nanomateriais principais).

- Avaliação não realizada / Não existe informação suficiente / Não é necessária

SIM/NÃO Informação relevante providenciada ou não

ND Avaliação não disponível

* Lactate dehydrogenase Cytotoxicity Assay (LDH), Tetrazolium Dye Assay (MTT), Neutral Red Uptake assay (NRU), (2,3-bis-(2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) Dye Assay (XXT), Adenosine Triphosphate Assay (ATP), Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate Assay (DCFH-DA), Limulus amoebocyte lysate Assay (LAL)

Tabela 16: Tabela de definição de Categorias de Perigo e alocação de Nanomateriais de acordo com as classes GHS para a Saúde ¹⁰⁷

	Categoria A	Categoria B	Categoria C	Categoria D	Categoria E
	Sem risco significante para a Saúde	Pouco Perigo – Pouco Risco	Perigo Moderado	Perigo Grave	Perigo Severo
Poeira OEL (8h TWA*) (H) / (E) / (C)	1 – 10	0,1 – 1	0,01 – 0,1	< 0,01	Procure um especialista
Toxicidade Aguda	Baixa	Tox. Aguda 4	Tox. Aguda 3	Tox Aguda 1 – 2	Procure um especialista
LD50 ⁵ rota oral (H) / (E) / (C)	> 2.000	300 – 2.000	50 – 300	< 50	Procure um especialista
LD50 ⁵ rota dérmica	> 2.000	1.000 – 2.000	200 – 1.000	< 200	Procure um especialista
LC50 ⁶ inalação 4h (H) / (E) – Aerosol/ partículas	> 5	1 – 5	0.5 – 1	< 0.5	Procure um especialista

Efeitos Severos e Agudos (risco de morte)		Stot SE 2 – 3 Asp. Tox. 1*	Stot SE 1		Procure um especialista
Efeitos Adversos pela rota oral (I) / (II), exposição única		Efeitos Adversos observados para Q. 2.000	Efeitos Adversos observados para Q. 300		Procure um especialista
Efeitos Adversos pela rota dérmica (I) / (II), exposição única		Efeitos Adversos observados para Q. 2.000	Efeitos Adversos observados para Q. 1.000		Procure um especialista
Sensibilização	Negativa	Pouca Reação Alérgica Cutânea	Moderada/Forte Reação Alérgica Cutânea Skin. Sens. 1**		Prevalência Moderada a Forte Reação Alérgica Respiratória Resp. Sens. 1***
Mutagenicidade/ Genotoxicidade	Negativa	Negativa	Negativa	Negativa	Mutagenicidade na maioria dos ensaios <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> Muta 2 ou Muta 1A – 1B

Irritação/ Corrosividade	Nenhuma Irritação até Irritação Eye Irrit. 2 Skin Irrit 2 EUH 066		Irritação Severa Dérmica e Ocular Irritante para o trato respiratório STOT SE 3; Eye Dam. 1 Corrosivo Skin Cor. 1A – 1B		Confirmado em animais e humanos Carc. 1A – 1B
Carcinogenicidade	Negativa	Negativa	Algumas evidências em animais Carc. 2		
Toxicidade Reprodutiva/ Toxicidade no Desenvolvimento	Negativa	Negativa	Negativa	Tóxica para a reprodução para animais e/ou suspeita e comprovada em humanos Repr. 1A, 1B, 2	
Probabilidade de Efeitos Crônicos	Improvável	Improvável	Possível STOT RE 2	Possível STOT RE 2	

(exemplo Sistêmico)						
Efeitos Adversos pela rota oral (☞ / ☞ F ☞), (90 dias de estudo crônico)		Efeitos Adversos observados para Q 100	Efeitos Adversos observados para Q 10			
Efeitos Adversos pela rota dérmica (☞ / ☞ F ☞), (90 dias de estudo crônico)		Efeitos Adversos observados para Q 200	Efeitos Adversos observados para Q 20			
Saúde Ocupacional	Sem evidência de efeitos adversos à saúde	Baixa evidência de efeitos adversos à saúde	Provável evidência de efeitos adversos à saúde	Alta evidência de efeitos adversos à saúde	Alta evidência de efeitos severos adversos à saúde	

§LD50: dose letal mediana

¶LC50: concentração letal mediana

*Asp. Tox.: Perigo de Aspiração (*Aspiration Hazard*)

** Skin. Sens.: Sensibilização Dérmica (*Skin Sensitization*)

*** Resp. Sens.: Sensibilização Respiratória (*Respiratory Sensitization*)(outras definições, favor verificar as referências [134])

Por fim, foi criada uma tabela de recomendações para ensaios, considerando o tipo de público-alvo do nanoproduto. Essa análise não deve ser simplificada a partir dos riscos de, por exemplo, uma criança ter acesso a um produto para adultos, ou um idoso não considerar possibilidades de aumento de risco pela idade.

Tabela 17 - Recomendações de ensaios para público adulto

Exposição	Frequência (dia)		
	1 vez	até 4 vezes	acima de 5 vezes
Dérmica			
Aplicado diretamente na pele	-	OECD TG 428 OECD TG 404	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406
Aplicado nos olhos/ mucosas	-	OECD TG 405	OECD TG 405
Via líquida	-	OECD TG 428 OECD TG 404	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406
Encapsulado/ carreado via líquida	-	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406 OECD TG 402
Ingestão			
Ingerido	OECD TG 417	OECD TG 417 OECD TG 451	OECD TG 417 OECD TG 476 OECD TG 451

Via líquida	OECD TG 417	OECD TG 417 OECD TG 451	OECD TG 417 OECD TG 476 OECD TG 451
Encapsulado/ carreado via líquida	OECD TG 417	OECD TG 417 OECD TG 451 OECD TG 473*	OECD TG 417 OECD TG 476 OECD TG 451 OECD TG 473*
Encapsulado/ carreado via sólida	OECD TG 417	OECD TG 417	OECD TG 417 OECD TG 451 OECD TG 473*
Via sólida/pó	OECD TG 417	OECD TG 417	OECD TG 417 OECD TG 451
Inalação			
Inalado Encapsulado/ carreado via sólida Via sólida/pó Via aérea/aerossol	OECD TG 403 ou OECD TG 436	OECD TG 403 ou OECD TG 437	OECD TG 403 ou OECD TG 438

* se carregamento menor que 100 nm

XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

Tabela 18 - Recomendações de ensaios para público infantil

Exposição	Frequência (dia)		
	1 vez	até 4 vezes	acima de 5 vezes
Dérmica			
Aplicado diretamente na pele	OECD TG 428	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406
Aplicado nos olhos/mucosas	OECD TG 405	OECD TG 405	OECD TG 405
Via líquida	OECD TG 428	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406
Encapsulado/carreado via líquida	OECD TG 428	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406 OECD TG 402	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406 OECD TG 402
Ingestão			
Ingerido	OECD TG 417 OECD TG 451	OECD TG 417 OECD TG 476 OECD TG 451	OECD TG 417 OECD TG 476 OECD TG 451
Via líquida	OECD TG 417 OECD TG 451	OECD TG 417 OECD TG 451	OECD TG 417 OECD TG 476 OECD TG 451

Tabela 19 - Recomendações de ensaios para público gestante

Exposição	Frequência (dia)		
	1 vez	até 4 vezes	acima de 5 vezes
Dérmica			
Aplicado diretamente na pele	OECD TG 428 OECD TG 406	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406 OECD TG 402
Aplicado nos olhos/ mucosas	OECD TG 405	OECD TG 405	OECD TG 405
Via líquida	OECD TG 428 OECD TG 406	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406 OECD TG 402
Encapsulado/ carreado via líquida	OECD TG 428 OECD TG 406	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406 OECD TG 402	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406 OECD TG 402
Ingestão			
Ingerido	OECD TG 417 OECD TG 451 ²	OECD TG 417 OECD TG 476 OECD TG 451 ²	OECD TG 417 OECD TG 476 OECD TG 451 OECD TG 473 ²
Via líquida	OECD TG 417 OECD TG 451 ²	OECD TG 417 OECD TG 451 ² OECD TG 414	OECD TG 417 OECD TG 476 OECD TG 451 OECD TG 414

Tabela 20 - Recomendações de ensaios para público idoso

Exposição	Frequência (dia)		
	1 vez	até 4 vezes	acima de 5 vezes
Dérmica			
Aplicado diretamente na pele	OECD TG 428 OECD TG 406	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406 OECD TG 402
Aplicado nos olhos/ mucosas	OECD TG 405	OECD TG 405	OECD TG 405
Via líquida	OECD TG 428 OECD TG 406	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406 OECD TG 402
Encapsulado/ carreado via líquida	OECD TG 428 OECD TG 406	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406 OECD TG 402	OECD TG 428 OECD TG 404 OECD TG 406 OECD TG 402
Ingestão			
Ingerido	OECD TG 417 OECD TG 451 ²	OECD TG 417 OECD TG 476 OECD TG 451 ²	OECD TG 417 OECD TG 476 OECD TG 451 OECD TG 473 ²
Via líquida	OECD TG 417 OECD TG 451 ²	OECD TG 417 OECD TG 451 ²	OECD TG 417 OECD TG 476 OECD TG 451

Encapsulado/ carreado via líquida	OECD TG 417 OECD TG 451	OECD TG 417 OECD TG 451 OECD TG 476	OECD TG 417 OECD TG 476 OECD TG 451 OECD TG 473*
Encapsulado/ carreado via sólida	OECD TG 417 OECD TG 451	OECD TG 417 OECD TG 451	OECD TG 417 OECD TG 451 OECD TG 476 OECD TG 473*
Via sólida/pó	OECD TG 417 OECD TG 451	OECD TG 417 OECD TG 451	OECD TG 417 OECD TG 451 OECD TG 476 OECD TG 473*
Inalação			
Inalado Encapsulado/ carreado via sólida Via sólida/pó Via aérea/aerossol	OECD TG 403 ou OECD TG 436	OECD TG 403 ou OECD TG 437	OECD TG 403 ou OECD TG 438

** se carregamento menor que 100 nm*

~~XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX~~

5 Estudo de caso – Normalização de nanosseguurança para nanocosméticos

O desenvolvimento de uma norma para nanosseguurança dependerá do conhecimento prévio dos aplicadores. O nível de detalhamento pode variar, assim como em qualquer procedimento que for desenvolvido e aplicado. O balanço entre o detalhamento extremo e a liberdade total é o segredo de uma norma de referência bem redigida, trazendo fluência e pontos de possível melhoria ao leitor e aplicador da norma.

Para o caso da nanosseguurança, propõe-se uma estrutura que tenha, ao menos, os seguintes tópicos:

1. Restrições de uso da norma,
2. Documentos complementares,
3. Descrição da metodologia,
4. Avaliação da conformidade do fornecedor,
5. Avaliação da conformidade do nanoproduto.

Este capítulo apresentará cada um desses itens, inicialmente com o objetivo e depois exemplificando para a aplicação em nanocosméticos.

A determinação dos testes e métodos utilizados pode estar diretamente declarada na norma, quando se entende que é único o caminho para aquela restrição de nanoproduto, nanomaterial ou família, como também pode estar referenciada em documentos de apoio, preferencialmente àqueles com controle de revisão (documentos dinâmicos) e com validade internacional.

5.1 Restrições de uso da norma

As restrições devem ter claramente definidos os escopos de aplicação da norma. Uma organização pode, por exemplo, focar em cosméticos líquidos

ou camisetas com nanopartículas de prata. Deve também englobar o método de aplicação ou produção, vistos diferentes resultados possíveis em alguns dos ensaios.

A determinação de escopo pode simplificar uma norma.

Caso: Nanocosmético

1. Restrições de uso da norma

Este documento destina-se à avaliação da conformidade de produtos cosméticos nanoencapsulados (nanocosméticos), independentemente do tipo da técnica de produção e do material base utilizado.

5.2 Documentos complementares

O tópico “documentos complementares” deve trazer a lista de normas e procedimentos externos ou internos relacionados à norma em criação. Preferencialmente, devem vincular documentos controlados (com controle de revisões ou documentos oficiais), porém podem trazer bibliografias de referência para justificar métodos.

Caso: Nanocosmético

2. Documentos complementares

Os seguintes documentos complementares são utilizados para o desenvolvimento desse regulamento e compõem o processo de avaliação da conformidade:

- *ISO/TS 12901-2:2014 - Nanotechnologies - Occupational risk management applied to engineered nanomaterials -- Part 2: Use of the control banding approach;*
- *ISO10801 (2010) Nanotechnologies – Generation of metal nanoparticles for inhalation toxicity testing using the evaporation/condensation method;*
- *OECD GD 36: Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety testing of Manufactured Nanomaterials, Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials No. 36, 2012b. ENV/JM/MONO(2012)40;*
- *OECD GD 28: Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies*
- *OECD GD 39: Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing;*
- *OECD TG 428: Skin Absorption In Vitro Method;*
- *OECD TG 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion;*
- *OECD TG 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test;*
- *OECD TG 406: Skin Sensitisation;*
- *OECD TG 402: Acute Dermal Toxicity;*
- *OECD TG 405: Acute Eye Irritation/Corrosion;*
- *OECD TG 417: Toxicokinetics;*
- *OECD TG 476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes;*
- *OECD TG 414: Prenatal Development Toxicity Study;*
- *OECD TG 451: Carcinogenicity Studies;*
- *OECD TG 473: In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test;*
- *OECD TG 403: Acute Inhalation Toxicity;*
- *OECD TG 436: Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method.*

5.3 Descrição da metodologia

A descrição da metodologia introduzirá os capítulos de avaliação do fornecedor e avaliação do nanoproduto, sendo semelhante a um sumário

de passos para a avaliação. Podem ser utilizados fluxogramas ou outras representações gráficas, sempre com foco no maior entendimento do leitor.

Caso: Nanocosmético

3. Descrição da Metodologia

Deve-se realizar uma análise completa do nanomaterial e do nanoproduto, em acordo com os passos descritos abaixo, seguindo as metodologias e atendendo aos critérios descritos nos capítulos seguintes.

- 1. Validar as restrições de uso da norma.*
- 2. Avaliar o risco a partir de auditoria nos processos de fabricação;*
- 3. Homologar sistemas de gestão, do fornecedor do nanomaterial e do fabricante do nanoproduto;*
- 4. Coletar amostras para os ensaios;*
- 5. Executar o plano de ensaio para o nanoproduto, utilizando os modos de exposição (MoE);*
- 6. Registrar.*

5.4 Avaliação da conformidade do fornecedor do nanomaterial

Conforme proposto em metodologia, a empresa fabricante do nanocosmético também deve atentar à nanosseguurança de seus fornecedores, tornando a cadeia de produção sustentável e garantindo a conformidade da matéria-prima.

Propõe-se, para fins da norma, um processo de avaliação dos fornecedores, ou cadastramento dos mesmos, a partir de critérios de amostragem, classificação de nanomateriais, avaliação de riscos e controle de segurança. Por fim, o cadastramento dos fornecedores como “homologados para fornecimento”, que deve ser validado periodicamente pela organização.

Caso: Nanocosméticos

4. Avaliação da conformidade do fornecedor do nanomaterial

O nanocosmético só poderá ser produzido caso utilize fornecedores de nanomateriais homologados. A homologação do fornecedor de nanomateriais segue a metodologia abaixo explicitada.

4.1. Amostragem

Devem ser coletadas amostras (prova e contraprova) de todos os materiais utilizados para o nanoencapsulamento e para cada técnica/processo utilizado. As amostras devem ser caracterizadas e testadas individualmente.

As amostras devem ser coletadas pelos laboratórios de ensaios também devidamente homologados, nas quantidades suficientes para a caracterização das propriedades necessárias à caracterização físico-química.

4.2. Classificação de Nanomateriais:

A classificação dos nanomateriais obedece ao sistema que leva em consideração faixas de tamanho definidas, respeitando a terminologia internacional vigente.

A. $0 < \text{④} < 100 \text{ JI} \rightarrow \text{Nanomateriais Naturais (NN) / Nanomateriais Projetados (NMP)}$

B. $100 < \text{④} < 500 \text{ JI} \rightarrow \text{NN e NMP / NOAA}$

C. $500 < \text{④} < 1000 \text{ JI} \rightarrow \text{NOAA}$

D. $\text{④} > 1000 \text{ JI} \rightarrow \text{Microestruturas}$

Para cada amostra coletada, devem ser executados ensaios de Tamanho e Distribuição de Partícula. Caso seja constatado que o material não esteja nas classes A até C (menor que 1000 nm), o processo será cancelado e o fornecedor não será homologado para esse fim.

4.3. Avaliação de risco

A avaliação de risco inicial do nanomaterial segue a norma ISO/TS 12901-2:2014, sendo que alguns dos parâmetros toxicológicos (endpoints) são pré-fixados para a aplicação da metodologia de Controle por Faixas (Control Banding). A avaliação dos parâmetros variáveis deve ser realizada a partir de auditoria na empresa fornecedora do nanomaterial.

Cada metodologia e cada nanomaterial utilizado para encapsulamento devem ser analisados, resultando em diferentes análises de Control Banding. O pior caso deve ser considerado para comprovação das medidas mitigatórias de risco.

<p>Informações Básicas</p> <p>Valores Auditáveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Nome / Descrição do Nanomaterial</i> • <i>Número CAS (Chemical Abstracts Service)</i> • <i>Classificação da Atividade</i> • <i>Controle de Segurança Atual</i> 	<p>Material Base</p> <p>Valores Auditáveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>OEL Mínimo (Nível de Exposição)</i> • <i>É Carcinogênico?</i> • <i>Existe Perigo para Reprodução Animal?</i> • <i>É Mutagênico?</i> • <i>Existe Perigo Dérmico?</i> • <i>Causa Asma?</i>
<p>Avaliação Ocupacional</p> <p>Valores Auditáveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Quantidade Estimada Máxima de Nanomaterial processado (dia/pessoa)</i> • <i>Número de Empregados com o mesmo Nível de Exposição</i> • <i>Pulverulência</i> • <i>Frequência de Operação</i> • <i>Duração de Operação por Turno</i> 	<p>Nanomaterial</p> <p>Valores Fixos:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Solubilidade: Solúvel</i> <p>Valores Auditáveis:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Grau de Reatividade da Superfície</i> • <i>Química de Superfície</i> • <i>Formato de Partícula</i> • <i>Diâmetro da Partícula</i> • <i>Solubilidade</i> • <i>É Carcinogênico?</i> • <i>Existe Perigo para Reprodução Animal?</i> • <i>É Mutagênico?</i> • <i>Existe Perigo Dérmico?</i> • <i>Causa Asma?</i>

Durante a execução da avaliação do Control Banding, as caracterizações de formato, diâmetro, química e grau de reatividade das partículas podem ser obtidas por ensaios em laboratórios homologados, buscando-se reduzir a pontuação de risco total, ficando esses custos sob responsabilidade do fornecedor. Da mesma forma, os dados de CMR (Carcinogenia, Mutagenicidade, Reprodução Animal) podem ser obtidos pelos Modos de Exposição (MoE). Caso o fornecedor opte por não os executar, deverão ser caracterizados como “não há informação” na planilha de avaliação de risco da ISO/TS 12901:2014, resultando no pior caso.

A Pontuação Final (PF) é calculada com a soma da pontuação de severidade e a pontuação da probabilidade, conforme as Equações 1 e 2:

$$PS = MB + NM$$

em que PS: pontuação da severidade, MB: parâmetros toxicológicos do material base e NM: parâmetros toxicológicos do nanomaterial.

$$PB = AV$$

em que PB: pontuação da probabilidade, AV: parâmetros toxicológicos da avaliação ocupacional.

O valor de PS é traduzido para Nível de Severidade, no qual o valor Baixo é atribuído para pontuações $PS < 25$; o valor Médio é atribuído ao intervalo de pontuação $25 < PS < 50$; o valor Alto é atribuído ao intervalo de pontuação $50 < PS < 75$; e o valor Muito Alto é atribuído ao intervalo de pontuação $PS > 75$. Com o valor de PS, calcula-se então o Nível de Pontuação do Usuário (NPU), que pode ser descrito da seguinte forma:

$$NPU = \begin{cases} 25 & \text{Baixo} \\ 50 & \text{Médio} \\ 75 & \text{Alto} \\ 100 & \text{Muito Alto} \end{cases}$$

O valor de PB é traduzido para Nível de Probabilidade, no qual o valor Extremamente Improvável é atribuído para pontuações $PB = 0$ e $PB < 25$; o valor Improvável é atribuído ao intervalo de pontuação $25 < PB < 50$; o valor Pouco Provável é atribuído ao intervalo de pontuação $50 < PB < 75$; e o valor Provável é atribuído ao intervalo de pontuação $PB > 75$. Com o valor de PB, calcula-se então o Nível de Pontuação Ocupacional (NPO), que pode ser descrita da seguinte forma:

$$\begin{aligned}
 \text{NPU} &= \frac{\text{NPO} \times \text{NPA}}{\text{NPA}} = 25 \\
 \text{NPA} &= \frac{\text{NPO} \times \text{NPA}}{\text{NPA}} = 50 \\
 \text{NPO} \times \text{NPA} &= 75 \\
 \text{NPA} &= 100
 \end{aligned}$$

Com os valores de NPU e NPO, é possível então se obter a Pontuação Final (PF), conforme Equação 3:

$$PF = NPU + NPO$$

4.4. Controle de Segurança e Critérios de Aceitação:

Para alcançar um equilíbrio entre a simplicidade e a eficácia da abordagem, quatro categorias de controle (ou faixas) são estabelecidas com suas contramedidas necessárias abaixo apresentadas, para mitigar o Nível de Risco de nanomateriais, de acordo com o valor da PF.

Nível de Pontuação	Nível de Risco	Contramedidas
Q 125	RL1	Ventilação Geral natural ou mecânica
Muito Alto + Extremamente Improvável (125)	RL1	Ventilação geral natural ou mecânica
125 F 150	RL2	Ventilação Fechada: cabine ventilada, capela, reator fechado com abertura normal
Alto + Extremamente Improvável (100)	RL3	Contenção Completa
150 F 175	RL3	Contenção Completa
175 F 200	RL4	Procure um Especialista

Se a Contramedida for “Contenção Completa” e a linha de produção estiver contida e sem presença de nanomaterial no ar, então será aprovada.

Caso a linha de produção não esteja contida, não será homologado o fornecedor. Deve, portanto, utilizar um NSAM – (Nanoparticle Surface Area Monitor), ou equipamento equivalente, que mensure a área de superfície de concentrações de nanopartículas no ar que podem se depositar na região alveolar ou traqueobrônquica do pulmão, gerando curvas de deposição para alveolar, brônquica, nasal e os totais em deposições. A equipe de avaliação ainda poderá debater acerca de quais pontos da linha de produção devem ser mensurados. Somente após a medição da área de superfície de concentrações de nanopartículas e contenção estabelecida, o fornecedor poderá ser homologado. O instrumento que realizará as medições deve ser avaliado periodicamente para verificação de sua performance e rastreabilidade.

4.5. Homologação do Sistema de Gestão do Fornecedor de Nanomateriais

Além de garantir as contramedidas, apresentando evidências das implantações, o fornecedor de nanomateriais deve homologar o seu sistema de gestão, garantindo a conformidade da produção. O fornecedor deve ter certificação ISO9001:2015 ou deverá contratar um avaliador de terceira parte para assegurar que os itens estão implantados.

Com o sistema de gestão auditado e as contramedidas aplicadas, o fornecedor e seus nanomateriais são homologados.

5.5 Avaliação da conformidade do nanoproduto

Por fim e no contexto do exemplo em trabalho nesse capítulo, após a confirmação de escopo da norma, a vinculação com normativas indexadas nacionais ou internacionais e a validação do fornecedor e da matéria prima, parte-se para a análise interna do fabricante do nanoproduto.

Da mesma forma que o fornecedor de nanomaterial, devem ser regulados:

- Os processos e amostragem,
- A classificação do nanoproduto,
- A avaliação de risco,
- A caracterização físico-química, e
- Os ensaios de toxicidade.

A diferença principal neste exemplo, que o leitor deve ficar atento, é a sugerida compulsoriedade dos ensaios de toxicidade. Neste ponto, é trazida novamente uma das premissas da toxicidade, quando qualquer material é tóxico, dependendo diretamente das propriedades versus a quantidade que chegará ao ser humano (seja por via dérmica, ingestão ou inalação). Assim, quando há um fornecimento de nanomaterial em negociações entre empresas, pode-se considerar, de antemão, a toxicidade existente, porém as medidas de mitigação a partir de contenções e procedimentos devem ser suficientes para anular essa possibilidade.

Porém, quando tratados os nanoproductos — aqueles que vão ao consumidor final — não é suficiente acreditar em instruções de rotulagem. As diferenças entre consumidores podem ser significativas, considerando adultos e crianças, alguns acometidos por doenças ou em situações de risco grande como uma gravidez. Mesmo um indivíduo adulto, de boa saúde, ao ultrapassar uma quantidade recomendada de uso de um nanocosmético (voltando ao exemplo), pode apresentar problemas.

O exemplo abaixo buscar uma completude de dados, considerando uma terceira parte avaliando o nanoproducto. No caso de uma avaliação interna em um fabricante de nanoproducto (norma interna), alguns dos itens devem ser reavaliados e a linguagem alterada. Além disso, alguns dados limítrofes, como o apresentado no item de classificação de nanoproducto (0,1% em massa), são convenções adotadas pelos autores desse livro e devem ser avaliadas.

Caso: Nanocosmético

5. Avaliação da conformidade do nanoproduto

O nanoproduto será aprovado caso atenda a três condições: ter nanomaterial em sua composição, ter homologado seu sistema de gestão e executar os ensaios de Modos de Exposição.

5.1. Amostragem

Devem ser coletadas amostras (prova e contraprova) de cada nanoproduto a ser avaliado. Os nanoprodutos devem ser retirados da linha de produção do fabricante pelo laboratório homologado, responsável pela avaliação.

5.2. Classificação de Nanoproduto

A classificação dos nanoprodutos segue os mesmos conceitos da classificação do nanomaterial apresentada em 0. O nanoproduto deve ter em sua composição um mínimo de 0,1% em massa de nanomateriais para ser considerado um nanocosmético.

5.3. Avaliação de risco

A avaliação de risco inicial do nanomaterial segue a norma ISO/TS 12901-2:2014, e é executada da mesma forma que a apresentada no item 0, porém, são obrigatórios os ensaios de caracterização físico-químicos e de Modos de Exposição (MoE), conforme descritos nos itens a seguir. Os ensaios devem ser executados em laboratórios homologados.

5.4. Caracterização Físico-Química

Devem ser investigadas as propriedades físico-químicas do nanomaterial apresentadas pelo fabricante, realizando uma caracterização independente de alguns parâmetros toxicológicos (endpoints) chave para compreender sua contribuição para o risco de uso e ocupacional, conforme apresentado a seguir.

Parâmetros Toxicológicos para a nanocosmético (endpoints)

- *Fórmula Estrutural / Estrutura Molecular*
- *Composição do NM a ser testado (incluindo grau de pureza, impurezas conhecidas ou aditivos)*
- *Morfologia Básica*
 - *Imagens MET representativas;*
 - *Formato de Partícula;*
 - *Distribuição de Tamanho de Partícula;*
 - *Potencial Zeta.*
- *Descrição da Química de Superfície (ex. revestimento ou modificação)*
- *Química de Superfície.*

5.5. Ensaio de Toxicidade

A avaliação da toxicidade do nanomaterial passa pela avaliação dos Modos de Exposição (dérmica, ingestão e inalação), conforme os critérios de aceitação descritos a seguir:

- *Dérmica: OECD TG 428 – Skin Absorption In Vitro Method: avalia a exposição em pele artificial por 24h, com concentração superior a 1 mg/mL e inferior a 5 mg/mL para sólidos e 10 mg/mL para líquidos. Os seguintes critérios devem ser seguidos:*
 - i) Não causar Irritação Cutânea, conforme a OECD TG 404: Acute Dermal Irritation/Corrosion ou OECD TG 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test.*
 - ii) Não causar Sensibilidade Cutânea, conforme OECD TG 406: Skin Sensitisation.*
 - iii) Não causar Toxicidade Aguda, conforme a OECD TG 402: Acute Dermal Toxicity.*

iv) Não causar Irritação no Olho, conforme OECD TG 405: Acute Eye Irritation/Corrosion.

- *Ingestão: OECD TG 417 – Toxicokinetics (ADME): avalia o limite superior de 50% para atingir a mortalidade (LD50) da ingestão intencional ou acidental de nanoproduto. O LD50 final deve ser superior a 2000 mg/kg de massa corporal. Além disso, para materiais biopersistentes, 90% do material ingerido devem ser excretados. Caso existam substâncias biocidas, protetoras como inseticidas, deve-se realizar, adicionalmente, os seguintes testes de diretrizes:*

i) Mutagenicidade (OECD TG 476: In Vitro Mammalian Cell Gene Mutation Tests using the Hprt and xprt genes)

ii) Teratogenicidade (OECD TG 414: Prenatal Development Toxicity Study),

iii) Carcinogenicidade (OECD TG 451: Carcinogenicity Studies) e

iv) Genotoxicidade (OECD TG 473: In vitro Mammalian Chromosome Aberration Test).

- *Inalação: Somente para caso de o nanocosmético ter sido veiculado por meio de pó ou aerossol. Executar o OECD TG 403: Acute Inhalation Toxicity ou OECD TG 436: Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method, que avaliam a concentração x tempo (C x t) do limite de exposição da substância durante 4h. São avaliadas as concentração letal média (LC50) e a concentração limiar não-letal (LC01), que podem ser expressas em $\mu\text{g}/\text{L}$, $\mu\text{g}/\text{L}^7$ ou PPM . O LC50 final deve ser superior a $5 \text{ C}/\text{h}$ para poeira e 5000 L para gases.*

6 O Futuro da Nanosseguurança

O conteúdo até o momento apresentado no livro remete o leitor (e é essa a intenção dos autores) à conclusão de que ainda há um longo caminho a ser percorrido para que todas as dúvidas e restrições sejam sanadas, criando algo único, padronizado e harmonizado pelos principais agentes e padrões internacionais. Porém, da mesma forma, é um erro supor que essa possibilidade exista no curto prazo. Isto gera dúvidas para o público em geral pois, se por um lado, são inegáveis os benefícios que a nanotecnologia pode trazer para o avanço da humanidade, por outro lado, seus potenciais danos também podem existir assim como com qualquer tecnologia emergente.

Neste momento, há no mercado algumas correntes e disputas sendo travadas, da pesquisa básica ao produto final. Constantemente, vê-se diferentes pontos de vistas e discordâncias acadêmicas em métodos e procedimentos, há dificuldade no desenvolvimento e disponibilização de materiais de referência, impossibilitando, algumas vezes, as comparações de resultados entre laboratórios envolvidos com o tema nanotecnologia. Neste embalo, mesmo os documentos de instituições de referência, como a ISO e a OECD, vêm sendo alvo de críticas. Nada que não seja esperado, tendo em vista as descobertas e as evoluções emergem que ocorrem dia a dia no tema nano.

Na outra ponta, é possível encontrar nanoprodutos sem uma única referência à nanotecnologia em suas etiquetas ou declarações de composição, mas sim nas descrições de desempenho, enquanto poucas empresas tentam ancorar seu potencial competitivo nesse pilar de modernidade. A estratégia mercadológica pondera o receio da população com as novidades e a nanotecnologia, neste caso penalizada, tem sua atenção desviada e suas possibilidades de avanço contidas.

É importante, a partir daí, elevar o patamar de nanosseguurança e o nível da disputa mercadológica da atenção do consumidor para um viés de

funcionalidade e eficiência associada à tecnologia. Neste sentido, é opinião dos autores que um início deve ser promovido. Mesmo que não tenham todas as conclusões, já há uma base normativa interessante e diversas redes formadas.

A entrada da nanosseguurança na normalização brasileira pode bem iniciar com alguns pontos, seguindo as atuais normas já desenvolvidas internacionalmente, as quais devem ter seus avanços monitorados, além de fortalecidos os laços internacionais. É um erro tentar travar o desenvolvimento da nanotecnologia em um mercado aberto como o atual. Fatalmente, entrarão produtos importados e as barreiras tecnológicas somente serão eficazes em um primeiro momento, podendo se transformar em empecilhos à indústria nacional se o debate for muito longo.

O desenvolvimento de novos nanomateriais está mais acelerado do que a capacidade de análise da toxicidade. Para somar, a especificidade de cada um deles exige estudos direcionados. Eis o paradigma a ser resolvido. Uma das ações seria trabalhar com famílias de produtos, considerando suas propriedades físico-químicas, modo de uso, ou trazer regras generalistas para iniciar a aplicação e a atenção à nanosseguurança. Promover o desenvolvimento de “inteligência computacional”, a partir de modelos simulados, para os testes *in vitro* e *in vivo*, ou então buscar uma integração de computação cognitiva para o apoio à tomada de decisão, com base no conhecimento mundial, opções que devem ser consideradas, tendo em conta a complexidade dos modelos e inter-relações. Uma das tecnologias computacionais atuais que pode alavancar o desenvolvimento de ferramentas para análise de toxicologia em nanoescala, é a *materials informatics*⁵ (informática dos materiais). Esta nova fronteira, visa à aplicação de técnicas de química quântica, como por exemplo, a DFT (*Density functional theory* – Teoria de Densidade Funcional), aliada a técnicas de inteligência artificial (*machine learning*), análise de dados não estruturados (*big data, big sea*) e dados reais de experimentos para

⁵ NIST - Materials Informatics, <https://www.nist.gov/programs-projects/materials-informatics>; DARPA - Turning to Chemistry for New “Computing” Concepts, <http://www.darpa.mil/news-events/2017-03-23>; Citrine - <https://www.citrine.io/>

descoberta de novas composições química estáveis, com propriedades físico-químicas e biológicas desejadas. Praticamente, é possível projetar um novo material com economia de tempo, recursos e de trabalho laboratorial.

A aversão ao risco, natural do ser humano, deve ser moderada com os benefícios das aplicações. Um debate com a sociedade deve ser promovido nesse sentido, com amplos programas de capacitação desde a base educacional. Diversos relatórios que avaliaram a questão saúde-benefício da nanotecnologia, apresentam um cenário futuro encorajador, pois foi constatado que todo e qualquer produto, de uma maneira ou de outra, como acontece na Natureza, tem ou terá algum componente nanotecnológico. Portanto, esse medo, de certa forma primário, que emana da consciência humana no intuito de autopreservação, é um tanto quanto descabido. Uma análise racional da situação demonstra claramente que o tratamento dado à nanotecnologia deve ser o mesmo já empregado a qualquer produto químico e qualquer essência natural produzida por plantas e animais. Devemos, sim, tratar com o máximo respeito nossas limitações e como manipular e produzir esses produtos. É importante garantir a segurança dos trabalhadores com processos controlados, gerenciados com planos de risco. Esta atitude não só favorece a produção segura de nanomateriais e nanoprotudos, como também blinda e protege o meio ambiente. Uma vez que a segurança ocupacional esteja estabelecida, dificilmente ocorrerão grandes vazamentos de produtos químicos e tampouco ocorrerão exposições acidentais de substâncias tóxicas à saúde.

No entanto, esse trabalho deve ser um esforço coordenado entre as entidades reguladoras nacionais, a exemplo do Brasil: a ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, IBAMA – Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis; agentes do Poder Judiciário: MPT – Ministério Público do Trabalho, agentes legislativos, como a Câmara do Deputados e Senadores, agentes do Poder Executivo, compreendido por todos os Ministérios, e por fim, toda a cadeia produtiva, representada por associações de classes e federações industriais. Com o

alinhamento das expectativas e o modo de operação de um sistema nacional de governança para o tema da nanossecurança, teremos grande força para construir políticas públicas de qualidade, que descrevam e direcionem o desenvolvimento pleno da nanotecnologia no Brasil.

O tema da nanossecurança é de igual importância para a soberania nacional, pois assim como os produtos convencionais, de livre acesso no mercado, existem também aqueles de caráter estratégico para a nação. Estes produtos estratégicos estão relacionados à área de Defesa, produtos de proteção que serão base integrante de sistemas militares e nucleares. Desta forma, as Forças Armadas, bem como a indústria nuclear, devem proporcionar segurança aos seus respectivos colaboradores no manuseio e uso desses materiais avançados. Somente com a implantação de um sistema nacional de garantia da Nanossecurança, será possível a avaliação destes produtos estratégicos e avançados e assim, garantir o bem-estar de todos e do meio ambiente.

A nanotecnologia é uma realidade hoje, uma revolução silenciosa sem precedentes, que caminha incrementalmente, mas com repercussão imensa em nossas vidas. Acima de tudo, é um esforço global e não local, e aqueles que priorizarem seu desenvolvimento, sairão na frente e terão uma das chaves para o futuro sustentável e transformador.

7 Referências

- 01 - OECD. **The OECD's Relations with its Key Partners**. Disponível em: <<http://www.oecd.org/general/theoecdrelationswithitskeypartners.htm>>. Acesso em: 14 Abr. 2016.
- 02 - OECD. **Testing Programme of Manufactured Nanomaterials**. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/nanosafety/testing-programme-manufactured-nanomaterials.htm>>. Acesso em: 14 Abr. 2016.
- 03 - OECD. **Organisation of the Environment, Health and Safety Programme**. Disponível em: <<http://www.oecd.org/env/ehs/organisationoftheenvironmenthealthandsafetyprogramme.htm>>. Acesso em: 14 Abr. 2016.
- 04 - OECD. **Legal Instruments**. Disponível em: <<http://www.oecd.org/legal/legal-instruments.htm>>. Acesso em: 14 Abr. 2016.
- 05 - OECD. **Sponsorship Programme for the Testing of Manufactured Nanomaterials**. Disponível em: <<http://www.oecd.org/science/nanosafety/sponsorshipprogrammeforthetestingofmanufacturednanomaterials.htm>>. Acesso em: 14 Abr. 2016.
- 06 - EU SCIENCE HUB. **JRC Nanomaterials Repository**. Disponível em: <<https://ec.europa.eu/jrc/en/scientific-tool/jrc-nanomaterials-repository>>. Acesso em: 14 Abr. 2016.
- 07 - RASMUSSEN, Kirsten et al. **Review of achievements of the OECD Working Party on Manufactured Nanomaterials' Testing and Assessment Programme. From exploratory testing to test guidelines**. Disponível em: <<http://DOI: 10.1016/j.yrtph.2015.11.004>>. Acesso em: 13 abr. 2017.
- 08 - OECD. **Guidance on Sample Preparation and Dosimetry for the Safety Testing of Manufactured Nanomaterials**. Disponível em: <[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2012\)40&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2012)40&doclanguage=en)>. Acesso em: 22 jun. 2016.
- 11 - JENSEN , K.A., et al. **The generic NANOGENOTOX dispersion protocol**: Web report, The Nanogenotox third General Assembly meeting, Denmark. Disponível

em: <<http://www.nanogenotox.eu/files/PDF/web%20nanogenotox%20dispersion%20protocol.pdf>>. Acesso em: 09 ago. 2016.

12 - Jacobsen, NR. et al., '**Nanomaterial dispersion protocol for toxicological studies in ENPRA**'. 07 mar. 2010.

13 - TANTRA, R. et al. **Comparison of the effects of different protocols on the particle size distribution of TiO₂ dispersions**. Disponível em: <<http://DOI: 10.1016/j.partic.2014.03.017>>. Acesso em: 22 jun. 2016.

14 - HARTMANN, N. B. et al. **Techniques and Protocols for Dispersing Nanoparticle Powders in Aqueous Media: Is there a Rationale for Harmonization?**. Disponível em: <<http://DOI: 10.1080/10937404.2015.1074969>>. Acesso em: 07 mar. 2017.

15 - OECD. **Ecotoxicology and Environmental Fate of Manufactured Nanomaterials: Test Guidelines**. Disponível em: <[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2014\)1&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2014)1&doclanguage=en)>. Acesso em: 14 abr. 2016.

17 - TUGULEA, AM et al. **Nano-silver in drinking water and drinking water sources: stability and influences on disinfection by-product formation**. Disponível em: <<http://DOI: 10.1007/s11356-014-2508-5>>. Acesso em: 14 Abr. 2016.

18 - TADROS, Tharwat. **Encyclopedia of Colloid and Interface Science**. Wokingham: Springer, 2013.

19 - L. MOORE, Thomas et al. **Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions**. Disponível em: <<http://DOI: 10.1039/C4CS00487F>>. Acesso em: 14 abr. 2016.

20 - ANTUNES BERTI, Leandro; MARQUES PORTO, Luismar . **Nanossegurança: Guia de Boas Práticas em Nanotecnologia para Fabricação e Laboratório**. 1. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2017. 256 p.

21 - Oxford Dictionaries: Dictionary ionic strength. Disponível em: <https://en.oxforddictionaries.com/definition/ionic_strength>. Acesso em: 20 jul. 2016.

22 - D. VILLARREAL, Fernando et al. **Sublethal Effects of CuO Nanoparticles on Mozambique Tilapia (Oreochromis mossambicus) Are Modulated by**

Environmental Salinity. Disponível em: <<http://DOI:10.1371/journal.pone.0088723>>. Acesso em: 07 jun. 2017.

22 - I A PEREIRA, Dora ; LEDERER, Bianca ; J POWELL, Jonathan. **A balanced salt solution that prevents agglomeration of nano iron oxo-hydroxides in serum-free cellular assays.** Disponível em: <<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/2053-1591/2/1/015403>>. Acesso em: 08 jun. 2016.

23 - J. PENNYCOOK, S. **Structure Determination Through Z-Contrast Microscopy.** Disponível em: <<http://stem.ornl.gov/papers/reviews/pdfs/z-contrast.pdf>>. Acesso em: 14 Abr. 2016.

24 - **BIO 161: Introduction to Cell and Molecular Biology Lab.** Disponível em: <<http://www.calpoly.edu/~21> - Oxford Dictionaries: Dictionary ionic strength. Disponível em: <https://en.oxforddictionaries.com/definition/ionic_strength>. Acesso em: 20 jul. 2016.

[bio/bio161/html/week5.html](http://www.calpoly.edu/~21)>. Acesso em: 09 ago. 2016.

25 - JURKSCHAT, Kerstin et al. Super-washing does not leave single walled carbon nanotubes iron-free. **The Analyst**, [S.l.], p. 21-23, nov. 2006. Disponível em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2007/an/b615824b>>. Acesso em: 06 dez. 2016.

26 - MARKOVIC, Z. et al. **The mechanism of cell-damaging reactive oxygen generation by colloidal fullerenes.** Disponível em: <<http://DOI:10.1016/j.biomaterials.2007.09.002>>. Acesso em: 08 jun. 2016.

27 - VALLHOV, Helen et al. The Importance of an Endotoxin-Free Environment during the Production of Nanoparticles Used in Medical Applications. **Nano Letters**, [S.l.], p. 1682-1686, jul. 2006. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl060860z>>. Acesso em: 08 nov. 2016.

28 - T, Xia et al. Quinones and aromatic chemical compounds in particulate matter induce mitochondrial dysfunction: implications for ultrafine particle toxicity. **Environ Health Perspect**, [S.l.], n. 112, p. 1347-1358, out. 2004.

- 29 - TAUROZZI, J. S. ; HACKLEY, V. A. . **Reporting Guidelines for the Preparation of Aqueous Nanoparticle Dispersions from Dry Materials.**[S.l.: s.n.], 2012. 9 p. Disponível em: <<http://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/specialpublications/nist.sp.1200-1.pdf>>. Acesso em: 12 set. 2016.
- 30 - OECD. REPORT OF THE OECD EXPERT MEETING ON THE PHYSICAL CHEMICAL PROPERTIES OF MANUFACTURED NANOMATERIALS AND TEST GUIDELINES . **OECD Environment, Health and Safety Publications**, [S.l.], n. 41 , p. 1-56, jul. 2014. Disponível em:<[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?co te=env/jm/mono\(2014\)15&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?co te=env/jm/mono(2014)15&doclanguage=en)>. Acesso em: 06 set. 2017.
- 31 - JILLAVENKATESA, Ajit ; DAPKUNAS, Stanley J. ; LUM, Lin-Sien H. . Particle Size Characterization. **NIST Recommended Practice Guide**, [S.l.],n. 960-1, p. 1-167, jan. 2001. Disponível em: <http://ws680.nist.gov/publication/get_pdf.cfm?pub_id=850451>. Acesso em: 01 jun. 2016.
- 32 - **ISO 14887:2000**: Sample preparation -- Dispersing procedures for powders in liquids. [S.l.: s.n.], 2000. 24 p.
- 33 - **ISO 14488:2007**: Particulate materials — Sampling and sample splitting for the determination of particulate properties . [S.l.: s.n.], 2007. 38 p.
- 34 - **ISO 13322-1:2004**: Particle size analysis -- Image analysis methods -- Part 1: Static image analysis methods. [S.l.: s.n.], 2004. 46 p.
- 35 - **ISO 9276-1:1998**: Representation of results of particle size analysis -- Part 1: Graphical representation. [S.l.: s.n.], 1998. 9 p.
- 35 - **ISO 9276-2:2001**: Representation of results of particle size analysis -- Part 2: Calculation of average particle sizes/diameters and moments from particle size distributions. [S.l.: s.n.], 2001. 20 p.
- 35 - **ISO 9276-6:2008**: Representation of results of particle size analysis -- Part 6: Descriptive and quantitative representation of particle shape and morphology. [S.l.: s.n.], 2008. 23 p.
- 36 - LINSINGER, T. et al. **Requirements on measurements for the implementation of the European Commission definition of the term** .Luxembourg: JRC Reference Report, 2012. 56 p.Disponível

em:<http://publications.jrc.ec.europa.eu/repository/bitstream/JRC73260/ir_mn_nanomaterials%20%28online%29.pdf>. Acesso em: 18 ago. 2016.

37 - PAL, Mou et al. Size-Controlled Synthesis of Spherical TiO₂ ~~Environ~~ Morphology, Crystallization, and Phase Transition. **The Journal of Physical Chemistry C**, [S.l.], n. 111, p. 96-102, dez. 2006. Disponível

em:<<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/jp0618173>>. Acesso em: 13 set. 2016.

38 - LABORDA, F.; BOLEA, E.; JIMÉNEZ-LAMANA, J. Single Particle Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Nanoanalysis. **Analytical Chemistry**, [S.l.], n. 86 (5), p. 2270-2278, dez. 2013. Disponível

em:<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ac402980q>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

39 - BERTI L.A. **Modeling Mobility**: Nanodevices swimming at nanoscale. The University of Sheffield, 2010.

40 - KUNTSCHE, Judith; HORST, Jennifer C. ; BUNJES, Heike . Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. **International Journal of**

Pharmaceutics, [S.l.], v. 417, p. 120-137, set. 2011. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517311001153>>. Acesso em: 04 abr. 2016.

41 - KLOBES, Peter ; MEYER, Klaus; MUNRO, Ronald G. **Porosity and Specific Surface Area Measurements for Solid Materials**. [S.l.: s.n.],2006. 91 p. Disponível

em:<http://ws680.nist.gov/publication/get_pdf.cfm?pub_id=854263>. Acesso em: 12 set. 2016.

42 - BARRETT, Elliott P. ; JOYNER, Leslie G. ; HALENDA, Paul P. . The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms. **J. Am. Chem. Soc.**, [S.l.], n. 73 (1), p. 373-380, jan. 1951. Disponível

em:<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01145a126>>. Acesso em: 10 out. 2016.

43- BALBUS, John M. et al. Meeting Report: Hazard Assessment for Nanoparticles—Report from an Interdisciplinary Workshop. **Environ Health**

Perspect, [S.l.], n. 115(11), p. 1654-1659, nov. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2072837/>>. Acesso em: 15 ago. 2016.

43 - OBERDÖRSTER, Günter et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. **Particle and Fibre Toxicology**, [S.l.], n. 2(8), p. 1-35, out. 2005. Disponível em: <<https://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-2-8>>. Acesso em: 17 ago. 2016.

44 - LOUX, Nicholas T. ; SAVAGE, Nora . An Assessment of the Fate of Metal Oxide Nanomaterials in Porous Media. **Water, Air, and Soil Pollution**, [S.l.], n. 194, p. 227-241, jun. 2008. Disponível em: <http://download.springer.com/static/pdf/263/art%253A10.1007%252Fs11270-008-9712-1.pdf?originUrl=http%3A%2F%2Flink.springer.com%2Farticle%2F10.1007%2F11270-008-9712-1&token2=exp=1497468955~acl=%2Fstatic%2Fpdf%2F263%2Fart%25253A10.1007%25252Fs11270-008-9712-1.pdf%3ForiginUrl%3Dhttp%253A%252F%252Flink.springer.com%252Farticle%252F10.1007%252Fs11270-008-9712-1*~hmac=e28e42dca0237e1cf0ac144629de70496de443b8459d5ca4d78bce0c35dac86a>. Acesso em: 04 maio 2016.

45 - RICHMAN, Erik K. ; HUTCHISON, James E. . The Nanomaterial Characterization Bottleneck. **ACS Nano**, [S.l.], n. 3 (9), p. 2441-2446, set. 2009. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/nn901112p>>. Acesso em: 13 abr. 2016.

45 - SHAW, Duncan J. . **Introduction to Colloid and Surface Chemistry**. 4. ed. UK: Butterworth-Heinemann, 2013. 320 p.

46 - CHITHRANI, B. Devika ; GHAZANI, Arezou A. ; CHAN, Warren C. W. . Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells. **Nano Letters**, [S.l.], n. 6 (4), p. 662-668, mar. 2006. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/nl052396o>>. Acesso em: 09 maio 2016.

- 46 - GOODMAN, Catherine M. et al. Toxicity of Gold Nanoparticles Functionalized with Cationic and Anionic Side Chains. **Bioconjugate Chem**, [S.l.], n. 15 (4), p. 897-900, jun. 2004. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bc049951i>>. Acesso em: 21 nov. 2016.
- 46 - SURESH, AK et al. Cytotoxicity induced by engineered silver nanocrystallites is dependent on surface coatings and cell types. **Langmuir**, [S.l.], n. 28 (5), p. 2727-2735, jan. 2012. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la2042058>>. Acesso em: 13 jun. 2016.
- 46 - WALKEY, Carl D. et al. Nanoparticle Size and Surface Chemistry Determine Serum Protein Adsorption and Macrophage Uptake. **J. Am. Chem. Soc.**, [S.l.], n. 134 (4), p. 2139-2147, dez. 2011. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja2084338>>. Acesso em: 14 abr. 2016.
- 47 - DEBOUTTIÈRE, Pierre-Jean et al. Design of Gold Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging. **Advanced Functional Materials**, [S.l.], n. 16, p. 2330-2339, nov. 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/adfm.200600242/epdf>>. Acesso em: 01 ago. 2016.
- 47 - BUI, Tot et al. Novel Gd Nanoparticles Enhance Vascular Contrast for High-Resolution Magnetic Resonance Imaging. **PlosOne**, [S.l.], n. 5(9), p. 13082-13092, set. 2010. Disponível em: <<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0013082>>. Acesso em: 16 set. 2016.
- 48 - JONGE, Niels de ; ROSS, Frances M. . Electron microscopy of specimens in liquid. **NATURE NANOTECHNOLOGY**, [S.l.], n. 6, p. 695-704, out.2011. Disponível em: <<https://www.nature.com/nano/journal/v6/n11/pdf/nnano.2011.161.pdf>>. Acesso em: 14 jul. 2017.
- 49 - KOLMAKOV, Andrei et al. Graphene oxide windows for in situ environmental cell photoelectron spectroscopy. **NATURE NANOTECHNOLOGY**, [S.l.], n. 6, p. 651-657, ago. 2011. Disponível em: <<http://www.nature.com/nano/journal/v6/n10/full/nnano.2011.130.html>>. Acesso em: 23 ago. 2016.

50 - HAMAKER, H. C. **The London:** van der Waals attraction between spherical particles. Disponível em: <<http://adsabs.harvard.edu/abs/1937Phy.....4.1058H>>. Acesso em: 28 abr. 2017.

50 - TREFAL, Gregor; BORKOVEC, Michal. **Overview of DLVO Theory.** Disponível em: <http://www.colloid.ch/grouppage/pdfs/Overview_DLVO_Theory1.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2017.

51 - OGURA, Isamu ; SAKURAI, Hiromu ; GAMO, Masashi . Dustiness testing of engineered nanomaterials. **Journal of Physics: Conference Series**, [S.l.], v. 170, n. 1, p. 1-4, jan. 2009. Disponível em: <<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/170/1/012003/pdf>>. Acesso em:14 set. 2016.

52 - BUNDESMINISTERIUM FÜR BILDUNG UND FORSCHUNG. .. **NanoCare** : Health related Aspects of Nanomaterials. Disponível em:<http://www.nanopartikel.info/files/projekte/NanoCare/NanoCare_Final_Report.pdf>. Acesso em: 11 maio 2016.

52 - MANAGING Risk of Nanomaterials. Disponível em: <<http://www.marina-fp7.eu/>>. Acesso em: 02 ago. 2016.

53 - OECD. **Proposal of the Netherlands for a new OECD guideline:** Partition Coefficient n-Octanol/Water (Pow) Slow-Stirring Method for Highly Hydrophobic Chemicals. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/1954386.pdf>>. Acesso em: 22 jun. 2016.

54 - SIRIUS Analytical. Disponível em: <<http://www.sirius-analytical.com/science/log-p/log-p-definitions>>. Acesso em: 07 jun. 2016.

55 - PETERSEN, EJ; HUANG, Q.; WEBER , WJ Jr. Relevance of octanol-water distribution measurements to the potential ecological uptake of multi-walled carbon nanotubes. **Environ Toxicol Chem**, [S.l.], n. 29(5), p. 1106-1112, maio. 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20821546>>. Acesso em: 21 set. 2016.

56 - BODOR, Nicholas ; BUCHWALD, Peter . Recent advances in the brain targeting of neuropharmaceuticals by chemical delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [S.l.], v. 36, n. 2-3, p. 229-254, abr. 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X98000908>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

56 - MORIGUCHI, I. et al. Simple method of calculating octanol/water partition coefficient. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, [S.l.], v. 40, n. 1, p. 127-130, jan. 1992. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb1958/40/1/40_1_127/_pdf>. Acesso em: 20 set. 2016.

57 - SCM: GUI tutorials. Disponível em: <https://www.scm.com/documentation/Tutorials/COSMO-RS/The_COSMO-RS_compound_database/>. Acesso em: 02 set. 2016.

58 - STUMM, Werner ; MORGAN, James J. . **Aquatic Chemistry**: an introduction emphasizing chemical equilibria in natural waters. [S.l.]: New York John Wiley And Sons, 1981. 780 p

59 - VETTER, Thomas et al. Modeling Nucleation, Growth, and Ostwald Ripening in Crystallization Processes: A Comparison between Population Balance and Kinetic Rate Equation. **Crystal Growth & Design**, [S.l.], v. 13, n. 11, p. 4890-4905, out. 2013. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cg4010714>>. Acesso em: 15 set. 2016.

60 - CLARKE, Chris . The physics of ice cream. **Physics Education**, [S.l.], v. 38, n. 3, p. 248-253, maio. 2003. Disponível em: <<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-9120/38/3/308/pdf>>. Acesso em: 07 set. 2016.

60 - CANCELIERE, Carlotta ; MCCLEMENTS, David Julian. Mass Transport Phenomena in Oil-in-Water Emulsions Containing Surfactant Micelles: Ostwald Ripening. **Langmuir**, [S.l.], v. 17, n. 16, p. 6833-6838, jul. 2000. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/la991477v>>. Acesso em: 21 set. 2016.

60 - CLARKE, Chris . The physics of ice cream. **Physics Education**, [S.l.], v. 38, n. 3, p. 248-253, maio. 2003. Disponível em:

em:<<http://iopscience.iop.org/article/10.1088/0031-9120/38/3/308/pdf>>. Acesso em: 07 set. 2016.

61 - NEL, Andre et al. Toxic Potential of Materials at the Nanolevel. **Science**, [S.l.], v. 311, n. 5761, p. 622-627, fev. 2007. Disponível em:<<https://safety.fsu.edu/training/hazwaste/Toxic%20Potential%20of%20Materials%20at%20the%20Nanolevel.pdf>>. Acesso em: 30 mar. 2016.

62 - SAHU S. C.; Casciano, D. A., **Nanotoxicity**: From In Vivo and In Vitro Models to Health Risks. [S.l.]: New York John Wiley And Sons, 1981. 630 p

63 - BELLO, Dhimiter et al. Nanomaterials properties vs. biological oxidative damage: Implications for toxicity screening and exposure assessment. **Nanotoxicology**, [S.l.], v. 3, n. 3, p. 249-261, set. 2009. Disponível em:<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17435390902989270?scroll=top&needAccess=true>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

64 - SANDERS, Kristen et al. In Vitro Phototoxicity and Hazard Identification of Nano-scale Titanium Dioxide. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S.l.], v. 258, n. 2, p. 226-236, jan. 2012. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041008X11004315>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

65 - ALLEN, H. Joel et al. Effects from filtration, capping agents, and presence/absence of food on the toxicity of silver nanoparticles to *Daphnia magna*. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S.l.], v. 29, n. 12, p. 2742-2750, dez. 2010. Disponível em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.329/full>>. Acesso em: 13 jul. 2016.

65 - BADAWY, Amro M. El et al. Impact of Environmental Conditions (pH, Ionic Strength, and Electrolyte Type) on the Surface Charge and Aggregation of Silver Nanoparticles Suspensions. **Environmental Science & Technology**, [S.l.], v. 44, n. 4, p. 1260-1266, jan. 2010. Disponível em:<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es902240k>>. Acesso em: 26 abr. 2016.

65 - KENNEDY, A. J. et al. Factors influencing the partitioning and toxicity of nanotubes in the aquatic environment. **Environ Toxicol Chem**, [S.l.], v. 27, n. 9, p. 1932-1941, set. 2008. Disponível em:<http://www.academia.edu/20726796/FACTORS_INFLUENCING_THE_PA>

RTITIONING_AND_TOXICITY_OF_NANOTUBES_IN_THE_AQUATIC_ENVIRONMENT>. Acesso em: 06 jul. 2016.

66 - KLAINE, Stephen J. et al. Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S.l.], v. 27, n. 9, p. 1825-1851, set. 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/08-090.1/full>>. Acesso em: 22 nov. 2016.

66 - HANDY, Richard D. et al. The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles. **Ecotoxicology**, [S.l.], v. 17, n. 4, p. 287-314, maio.2008. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10646-008-0199-8>>. Acesso em: 06 abr. 2016.

66 - HANDY, Richard D. et al. **Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials**: Practical experiences and recommendations from the bench. Disponível em: <<http://DOI: 10.1002/etc.706>>. Acesso em: 18 maio 2016.

66 - HUND-RINKE, K.; SCHLICH, K.; WENZEL, A. TiO₂ nanoparticles : Relationship between dispersion preparation method and ecotoxicity in the algal growth test. **Umweltwiss Schadst Forsch**, [S.l.], v. 22, n. 5, p. 517-528, jun. 2010. Disponível em:<https://www.researchgate.net/publication/225601594_TiO2_nanoparticles_-_Relationship_between_dispersi_on_preparation_method_and_ecotoxicity_in_the_algal_growth_test>. Acesso em: 22 jul. 2016.

67 - SMITH, Catherine J. ; SHAW, Benjamin J. ; HANDY, Richard D. . Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, [S.l.], v. 82, n. 2, p. 94-109, maio. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X07000574?via%3Dihub>>. Acesso em: 04 out. 2016.

67 - HENRY, Theodore B. et al. Attributing Effects of Aqueous C₆₀ Nano-Aggregates to Tetrahydrofuran Decomposition Products in Larval Zebrafish by Assessment of Gene Expression. **Environ Health Perspect**, [S.l.], v. 115, n. 7, p. 1059-1065, fev. 2007. Disponível

em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1913576/>>. Acesso em: 01 ago. 2016.

68 - DOMINGOS, RF; TUFENKJI, N.; WILKINSON, KI. **Aggregation of titanium dioxide nanoparticles: role of a fulvic acid**. Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19350891>>. Acesso em: 11 maio 2016.

69 - FRENCH, R.A et al. Influence of Ionic Strength, pH, and Cation Valence on Aggregation Kinetics of Titanium Dioxide Nanoparticles. **Environmental Science & Technology**, [S.l.], v. 43, n. 5, p. 1354-1359, jan. 2009. Disponível em:<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es802628n>>. Acesso em: 11 ago. 2016.

69 - STOLPE, B.; HASSELLÖV, M. Changes in size distribution of fresh water nanoscale colloidal matter and associated elements on mixing with seawater. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, [S.l.], v. 71, n. 13, p. 3292-3301, jul. 2007. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016703707002256>>. Acesso em: 15 set. 2016.

70 - HYUNG, Hoon et al. **Natural Organic Matter Stabilizes Carbon Nanotubes in the Aqueous Phase**. Disponível em:<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es061817g>>. Acesso em: 11 maio 2016.

71- FRANKLIN, Natasha M. et al. Comparative Toxicity of Nanoparticulate ZnO, Bulk ZnO, and ZnCl₂ to a Freshwater Microalga (*Pseudokirchneriella subcapitata*): The Importance of Particle Solubility. **Environmental Science & Technology**, [S.l.], v. 41, n. 24, p. 8484-8490, nov. 2007. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es071445r>>. Acesso em: 08 jun. 2016.

71 - LIU, Jingyu; HURT, Robert H. . Ion Release Kinetics and Particle Persistence in Aqueous Nano-Silver Colloids. **Environmental Science & Technology**, [S.l.], n. 443, p. 2169-2175, fev. 2010. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es9035557>>. Acesso em: 03 nov. 2016.

72 - OECD. **Guidance Manual For The Testing Of Manufactured Nanomaterials: Oecd Sponsorship Programme** . Disponível em:

<[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2009\)20/rev&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2009)20/rev&doclanguage=en)>. Acesso em: 31 mar. 2016.

73 - CRANE, M. et al. Ecotoxicity test methods and environmental hazard assessment for engineered nanoparticles. **Ecotoxicology**, [S.l.], v. 17, n. 5,p. 421-437, jul. 2008. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10646-008-0215-z>>. Acesso em: 06 set. 2016.

74 - MA, Xin ; BOUCHARD, Dermont . Formation of Aqueous Suspensions of Fullerenes. **Environmental Science & Technology**, [S.l.], v. 43, n. 2,p. 220-336, dez. 2008. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/es801833p>>. Acesso em: 15 set. 2016.

75 - CEINT. **Theme 1. Exposure: Transport and Transformations**. Disponível em: <<http://www.ceint.duke.edu/research/transport-and-transformations>>. Acesso em: 11 maio 2016.

76 - EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY . . **Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain**. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.2903/j.efsa.2011.2140/pdf>>. Acesso em: 11 maio 2016.

77 - SCHIERZ, P., Parks, A.N., and Ferguson, P.L. Novel Approaches for the Detection of Single Walled Carbon Nanotubes in Environmental Matrices, Society for Environmental Toxicology and Chemistry,.

78 - BAALOUSHA, Mohammed et al. **Aggregation and surface properties of iron oxide nanoparticles**: Influence of ph and natural organic matter. Disponível em: <<http://DOI: 10.1897/07-559.1>>. Acesso em: 11 maio 2016.

79 - NIELSEN, H. D. et al. Interactions between carbon black nanoparticles and the brown algae *Fucus serratus*: Inhibition of fertilization and zygotic development. **Nanotoxicology**, [S.l.], v. 2, n. 2, p. 88-97, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/17435390802109185>>. Acesso em: 16 set. 2016.

80 - JAFVERT, Chad T. ; KULKARNI, Pradnya P. . Buckminsterfullerene's (C60) Octanol-Water Partition Coefficient (Kow) and Aqueous

Solubility. **Environmental Science & Technology**, [S.l.], v. 42, n. 16, p. 5945-5950, ago. 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18767649/>>. Acesso em: 13 abr. 2016.

81 - PYCKE, Benny F.G et al. Strategies for quantifying C60 fullerenes in environmental and biological samples and implications for studies in environmental health and ecotoxicology. **Trends in Analytical Chemistry**, [S.l.], v. 30, n. 1, p. 44-57, jan. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3045199/>>. Acesso em: 09 jun. 2016.

82 - SCHARFF, P. et al. Structure of C60 fullerene in water: spectroscopic data. **Carbon**, [S.l.], v. 42, n. 5-6, p. 1203-1206, dez. 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008622303006250>>. Acesso em: 08 dez. 2016.

82 - ISAACSON, Carl et al. Temporal Changes in Aqu/C60 Physical–Chemical, Deposition, and Transport Characteristics in Aqueous Systems. **Environmental Science & Technology**, [S.l.], v. 45, n. 12, p. 5170-5177, maio. 2011. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es1041145>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

83 - LI, D. et al. **Effect of soil sorption and aquatic natural organic matter on the antibacterial activity of a fullerene water suspension**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19086207>>. Acesso em: 14 abr. 2016.

84 - ROBERTS, Aaron P. et al. In vivo Biomodification of Lipid-Coated Carbon Nanotubes by *Daphnia magna*. **Environmental Science & Technology**, [S.l.], n. 41 (8, p. 3025-3029, mar. 2007. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es062572a>>. Acesso em: 11 out. 2016.

85 - CHRISTIAN, P. et al. Nanoparticles: structure, properties, preparation and behaviour in environmental media. **Ecotoxicology**, [S.l.], n. 17, p. 326-343, maio. 2008. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10646-008-0213-1>>. Acesso em: 06 set. 2016.

86 - HARTMANN, N. B. et al. Degradability of aged aquatic suspensions of C60 nanoparticles. **Environmental Pollution**, [S.l.], v. 159, n. 10, p. 3134-3137, out. 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749111002892>>. Acesso em: 08 jul. 2016.

87 - FEDERICI, G.; SHAW, B. J.; HANDY, R. D. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects. **Gill injury, oxidative stress, and other physiological effects**, [S.l.], v. 84, n. 4, p. 415-430, out. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X0700272X?via%3Dihub>>. Acesso em: 23 ago. 2016.

88 - FILLEY, T. R. et al. **“Investigations of fungal mediated (C60-C70) fullerene decomposition.** Disponível em: <<http://oasys2.confex.com/acs/229nm/techprogram/P847812.HTM>>. Acesso em: 07 jun. 2016.

89 - NMI3. For chemical analysis: **Neutron Activation Analysis: Techniques and the facilities where you can find them.** Disponível em: <<http://nmi3.eu/neutron-research/techniques-for-/chemical-analysis.html>>. Acesso em: 13 abr. 2016.

89 - OUGHTON, DH et al. **Neutron activation of engineered nanoparticles as a tool for tracing their environmental fate and uptake in organisms..** Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19086315>>. Acesso em: 13 abr. 2016. Toxicology of dietary

90- FISK, A.T et al. Dietary accumulation and depuration of hydrophobic organochlorines: Bioaccumulation parameters and their relationship with the octanol/water partition coefficient. **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S.l.], n. 17, p. 951961, maio. 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/etc.5620170526/full>>. Acesso em: 25 mar. 2016.

90 - STAPLETON, H.M et al. Dietary accumulation and metabolism of polybrominated diphenyl ethers by juvenile carp (*Cyprinus carpio*). **Environmental Toxicology and Chemistry**, [S.l.], n. 23, p. 1939-1946, ago. 2004. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/03-462/full>>. Acesso em: 10 ago. 2016.

- 91 - SMITH, Catherine J. ; SHAW, Benjamin J. ; HANDY, Richard D. . Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, [S.l.], v. 82, n. 2, p. 94-109, maio. 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0166445X07000574?via%3Dihub>>. Acesso em: 04 out. 2016.
- 92 - SCOTT-FORDSMAND, J.J et al. The toxicity testing of double-walled nanotubes-contaminated food to *Eisenia veneta* earthworms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, [S.l.], v. 71, n. 3, p. 616-619, nov. 2008. Disponível em:<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0147651308001243>>. Acesso em: 14 abr. 2016.
- 93 - JEMEC, ANITA et al. EFFECTS OF INGESTED NANO-SIZED TITANIUM DIOXIDE ON TERRESTRIAL ISOPODS (*PORCELLIO SCABER*). **Environmental Toxicology and Chemistry** , [S.l.], v. 27, n. 9, p. 1904-1914, mar. 2008. Disponível em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1897/08-036.1/pdf>>. Acesso em: 08 ago. 2016.
- 94 - LEE , WM et al. Oxicity and bioavailability of copper nanoparticles to the terrestrial plants mung bean (*Phaseolus radiatus*) and wheat (*Triticum aestivum*): plant agar test for water-insoluble nanoparticles. **Environmental Toxicology and Chemistry** , [S.l.], n. 27(9), p. 1915-1921, set.2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19086317>>. Acesso em: 17 mar. 2016.
- 95 - BRINCH, U. C.; EKELUND, F.; JACOBSEN , C. S. Method for Spiking Soil Samples with Organic Compounds. **Appl. Environ. Microbiol**, [S.l.], v. 68, n. 4, p. 1808-1816, abr. 2002. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC123833/>>. Acesso em: 09 jun. 2017.
- 96 - HOLBROOK, R.D., et al. Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web. **Nature Nanotechnology** , [S.l.], n. 3, p. 352-355, jun. 2008. Disponível em: <<http://www.nature.com/nnano/journal/v3/n6/abs/nnano.2008.110.html>>. Acesso em: 21 set. 2016.
- 97 - FORTNER, J. D. et al. C60 in water: Nanocrystal formation and microbial response. **Environmental Science and Technology** , [S.l.], n. 39(11,p. 4307-

- 4316, jun. 2005. Disponível
em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es048099n>>. Acesso em: 14 jun. 2016.
- 98 - GIMBERT, L.J et al. The influence of sample preparation on observed particle size distributions for contrasting soil suspensions using field-flow fractionation. **Environmental Chemistry**, [S.l.], n. 3, p. 184-191, jun. 2006. Disponível
em: <<http://www.publish.csiro.au/en/EN06029>>. Acesso em: 11 ago. 2016.
- 99 - GERANIO, L.; HEUBERGER, M.; NOWACK, B. The Behavior of Silver Nanotextiles during Washing. **Environmental Science & Technology**, [S.l.], n. 43 (21), p. 8113-8118, set. 2009. Disponível
em: <<http://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/es9018332>>. Acesso em: 22 ago. 2016.
- 100 - DOUCET, Frederic J. et al. Visualisation of natural aquatic colloids and particles – a comparison of conventional high vacuum and environmental scanning electron microscopy. **Journal of Environmental Monitoring**, [S.l.], n. 7, p. 115-121, jan. 2005. Disponível
em: <<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2005/em/b413832e>>. Acesso em: 22 abr. 2016.
- 101 - NIST. **Search for Materials - Find an SRM/RM**. Disponível
em: <<http://www.nist.gov/srm/>>. Acesso em: 13 abr. 2017.
- 101 - QualityNano . **Research Infrastructure - QualityNano** . Disponível
em: <<http://www.qualitynano.eu/>>. Acesso em: 13 abr. 2017.
- 102 - GANGWAL, Sumit et al. Informing Selection of Nanomaterial Concentrations for ToxCast in Vitro Testing Based on Occupational Exposure Potential. **Environ Health Perspect**, [S.l.], n. 119(11), p. 1539-1546, jul. 2011. Disponível
em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3226507/>>. Acesso em: 20 out. 2016.
- 102 - OBERDÖRSTER, Günter . Nanotoxicology: in Vitro–in Vivo Dosimetry. **Environ Health Perspect**, [S.l.], n. 120(1), p. 1539-1539, jan. 2012. Disponível
em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3261953/>>. Acesso em: 15 set. 2016.

103 - JACKSON, A. J. **Introduction to Small-Angle Neutron Scattering and Neutron Reflectometry**. Disponível em: <https://www.ncnr.nist.gov/summerschool/ss10/pdf/SANS_NR_Intro.pdf>. Acesso em: 14 abr. 2017.

103 - NOBBMANN, Ulf . **Multi Angle Light Scattering (MALS): What is multi angle light scattering MALS / MALLS?.** Disponível em: <<http://www.materials-talks.com/blog/2014/08/12/multi-angle-light-scattering-mals/>>. Acesso em: 14 abr. 2016.

104 - PORTER, D.W et al. **A biocompatible medium for nanoparticle dispersion**. Disponível em: <<http://DOI:10.1080/17435390802318349>>. Acesso em: 14 abr. 2017.

105 - ZHU , S.; OBERDÖRSTER , E.; HAASCH , ML. **Toxicity of an engineered nanoparticle (fullerene, C60) in two aquatic species, Daphnia and fathead minnow**. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16709433>>. Acesso em: 07 jun. 2016

106 - TAUROZZI, J. S. ; HACKLEY, V. A. ; WIESNER, M. R. . Preparation of a Nanoscale TiO₂ Aqueous Dispersion for Toxicological or Environmental Testing. **NIST Special Publication**, [S.l.], p. 1-11, jun. 2012. Disponível em: <<http://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/SpecialPublications/NIST.SP.1200-3.pdf>>. Acesso em: 14 set. 2016.

106 - TAUROZZI, Julian S. ; HACKLEY, Vincent A. ; WIESNER , Mark R. . Preparation of Nanoscale TiO₂ Dispersions in an Environmental Matrix for Eco-Toxicological Assessment SHARE Facebook Google Plus Twitter . **NIST Special Publication**, [S.l.], p. 1-16, jun. 2013. Disponível em:<<http://nvlpubs.nist.gov/nistpubs/SpecialPublications/NIST.SP.1200-5r1.pdf>>. Acesso em: 25 ago. 2016.

107 - RAMIREZ-GARCIA, Sonia et al. A new methodology for studying nanoparticle interactions in biological systems: Dispersing titania in biocompatible media using chemical stabilisers. **Nanoscale**, [S.l.], n. 3(11), p. 4617-4624, jun. 2016. Disponível em:<<http://pubs.rsc.org/en/content/articlepdf/2011/NR/C1NR10488H>>. Acesso em: 26 ago. 2016.

108 - BLANK, Fabian et al. Role of dendritic cells in the lung: in vitro models, animal models and human studies. **Expert Review of Respiratory**

Medicine, [S.l.], n. 2, p. 215-233, jan. 2014. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1586/17476348.2.2.215>>. Acesso em: 15 ago. 2016.

108 - BLANK, F.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; GEHR, P. Dendritic Cells and Macrophages Form a Transepithelial Network against Foreign Particulate Antigens. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, [S.l.], v. 36, n. 6, p. 669-677, jan. 2007. Disponível em: <<http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1165/rcmb.2006-0234OC#readcube-epdf>>. Acesso em: 16 jun. 2016.

108 - BLANK, Fabian et al. An Optimized In Vitro Model of the Respiratory Tract Wall to Study Particle Cell Interactions. **Journal of Aerosol Medicine**, [S.l.], n. 19(3), p. 392-405, out. 2006. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/pdf/10.1089/jam.2006.19.392>>. Acesso em: 16 nov. 2016.

109 - PAULUHN, Jürgen. Comparative pulmonary response to inhaled nanostructures: considerations on test design and endpoints. **Inhalation Toxicology**, [S.l.], n. 21, p. 40-54, abr. 2009. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08958370902962291?journalCode=iiht20>>. Acesso em: 08 jun. 2016.

110 - GEISE, Marianne et al. Ultrafine Particles Cross Cellular Membranes by Nonphagocytic Mechanisms in Lungs and in Cultured Cells. **Environ Health Perspect**, [S.l.], n. 113 (11), p. 1555-1560, maio. 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1310918/>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

110 - JONES, Clinton F. ; GRAINGER, David W. . In vitro assessments of nanomaterial toxicity. **Science Direct**, [S.l.], v. 61, p. 438-456, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X09001021>>. Acesso em: 19 jul. 2017.

110 - ROTHEN-RUTISHAUSER, Barbara et al. A newly developed in vitro model of the human epithelial airway barrier to study the toxic potential of nanoparticles. **ALTEX**, [S.l.], n. 25(3), p. 191-196, mar. 2008. Disponível em: <<http://www.altex.ch/All-issues/Issue.50.html?iid=101&aid=4>>. Acesso em: 28 jul. 2016.

- 111 - JH, Ji et al. **Twenty-eight-day inhalation toxicity study of silver nanoparticles in Sprague-Dawley rats**. Disponível em: <<http://DOI:10.1080/08958370701432108>>. Acesso em: 22 jun. 2016.
- 112 - MA-HOCK, Lan et al. Inhalation Toxicity of Multiwall Carbon Nanotubes in Rats Exposed for 3 Months. **Toxicological Sciences**, [S.l.], n. 112 (2),p. 468-481, jul. 2009. Disponível em: <<https://academic.oup.com/toxsci/article/1713643/Inhalation>>. Acesso em: 13 out. 2016.
- 112 - STEBOUNOVA, Larissa et al. **Nanosilver induces minimal lung toxicity or inflammation in a subacute murine inhalation model**. Disponível em: <<http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-8-5>>. Acesso em: 14 abr. 2017.
- 113 - JONG, Wim H. De et al. **Opinion on the Appropriateness of the Risk Assessment Methodology in Accordance with the Technical Guidance Documents for new and Existing Substances for Assessing the Risks of Nanomaterials**. Disponível em: <https://cfpub.epa.gov/si/si_public_file_download.cfm?p_download_id=503223>. Acesso em: 07 jun. 2016.
- 114 - SOLOMON, Paul A. et al. **Macroscopic to microscopic scales of nanoparticle dosimetry: from source to fate in the body**. Disponível em: <https://cfpub.epa.gov/si/si_public_file_download.cfm?p_download_id=503223>. Acesso em: 07 jun. 2016.
- 115 - **ISO 10801:2010**. NANOTECHNOLOGIES: Generation of metal nanoparticles for inhalation toxicity testing using the evaporation/condensation method. [S.l.: s.n.],2010. 22 p. Disponível em: <<https://www.iso.org/standard/46129.html>>. Acesso em: 24 jul. 2016.
- 115 - OECD. **.. Guidance Document on Acute Inhalation Toxicity Testing** . Disponível em: <[http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono\(2009\)28&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/jm/mono(2009)28&doclanguage=en)>. Acesso em: 07 jun. 2016.
- 116 - CHENG, Y.-S; BARR, E. B. ; YEH, H. C. . A Venturi Dispenser as a Dry Powder Generator for Inhalation Studies. **Inhalation Toxicology**, [S.l.], n. 1 (4), p. 365-371, jun. 1989. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/08958378909145239>>. Acesso em: 09 mar. 2016.

117 - CASTRANOVA, V. et al. Augmentation of pulmonary reactions to quartz inhalation by trace amounts of iron-containing particles. **Environ Health Perspect**, [S.l.], n. 105 (5), p. 1319-1324, set. 1997. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1470157/>>. Acesso em: 02 jun. 2016.

117 - KUHNBUSCH, TA et al. **Nanoparticle exposure at nanotechnology workplaces: a review**. Disponível em: <<http://DOI: 10.1186/1743-8977-8-22>>. Acesso em: 24 jun. 2016.

117 - THOMAS AJ , Kuhlbusch et al. Nanoparticle exposure at nanotechnology workplaces: A review. **Particle and Fibre Toxicology**, [S.l.], n. 8, p. 8-22, jul. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3162892/>>. Acesso em: 16 jun. 2016.

118 - M. MAHURIN, Shannon ; CHENG, Meng-Dawn . **Generating nanoscale aggregates from colloidal nanoparticles by various aerosol spray techniques**. Disponível em: <<http://DOI: 10.1080/17435390701423760>>. Acesso em: 08 jun. 2016.

119 - WEIBEL, A. et al. **The Big Problem of Small Particles: A Comparison of Methods for Determination of Particle Size in Nanocrystalline Anatase Powders**. Disponível em: <<http://DOI: 10.1021/cm0403762>>. Acesso em: 08 jun. 2016.

120 - MORTENSEN, LJ et al. **In vivo skin penetration of quantum dot nanoparticles in the murine model** : the effect of UVR. Disponível em:<<http://DOI:10.1021/nl801323y>>. Acesso em: 08 jun. 2016.

121 - GAMER , AO ; LEIBOLD , E.; VAN, Ravenzwaay B. **The in vitro absorption of microfine zinc oxide and titanium dioxide through porcine skin**. Disponível em: <<http://DOI: 10.1016/j.tiv.2005.08.008>>. Acesso em: 14 Abr. 2016.

122 - EUROPEAN COMMISSION. **Opinion on the Safety of Nanomaterials in Cosmetic Products**. Disponível em: <<http://https://ethics.iit.edu/NanoEthicsBank/node/199> >. Acesso em: 08 jun. 2016.

123 - LARESE , FF et al. **Human skin penetration of silver nanoparticles through intact and damaged skin**. Disponível em:<<http://DOI:10.1016/j.j.tox.2008.09.025>>. Acesso em: 14 abr. 2017.

124 - BAROLI, B. et al. **Penetration of metallic nanoparticles in human full-thickness skin.** Disponível em: <<http://DOI: 10.1038/sj.jid.5700733>>. Acesso em: 14 Abr. 2016.

124 - MAVON, A. et al. **In vitro Percutaneous Absorption and in vivo Stratum Corneum Distribution of an Organic and a Mineral Sunscreen.** Disponível em: <<http://DOI: 10.1159/000096167>>. Acesso em: 14 abr. 2017.

124 - SA, Wissing; RH, Müller. **Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens:** in vitro release and in vivo skin penetration. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12044563>>. Acesso em: 14 Abr. 2016.

125 - A GRICE, K. ; R BETTLEY, F. . **Skin water loss and accidental hypothermia in psoriasis, ichthyosis, and erythroderma.** Disponível em:<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1748609/>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

125 - GIORGINI , S.; BRUCI, C.; SERTOLI, A. **Evaporimetry in the differentiation of allergic, irritant and doubtful patch test reactions.** Disponível em: <<http://DOI: 10.1111/j.1600-0846.1996.tb00055.x>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

125 - LAVRIJSEN , AP et al. **Barrier function parameters in various keratinization disorders: transepidermal water loss and vascular response to hexyl nicotinate.** Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8251350>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

125 - TAGAMI , H.; KOBAYASHI , H.; KIKUCHI , K. **A portable device using a closed chamber system for measuring transepidermal water loss: comparison with the conventional method.** Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12005122>>. Acesso em: 19 abr. 2017.

126 - OBERDÖRSTER, G.. **Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine:** concepts of nanotoxicology. Disponível em: <<http://DOI: 10.1111/j.1365-2796.2009.02187.x>>. Acesso em: 06 mar. 2017.

127 - KÜHNEL, D.; NICKEL, C. **The OECD expert meeting on ecotoxicology and environmental fate:** towards the development of improved OECD

guidelines for the testing of nanomaterials. Disponível em: <<http://DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.11.055>>. Acesso em: 06 mar. 2017.

128 - NEL, A. et al. **Nanomaterial toxicity testing in the 21st century: use of a predictive toxicological approach and high-throughput screening.** Disponível em: <<http://DOI: 10.1021/ar300022h>>. Acesso em: 13 abr. 2017.

129 - DELOID, Glen et al. **Estimating the effective density of engineered nanomaterials for in vitro dosimetry.** Disponível em: <<http://DOI: 10.1038/ncomms4514>>. Acesso em: 06 mar. 2017.

129 - TEEGUARDEN , JG et al. **Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments..** Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17098817>>. Acesso em: 06 mar. 2017.

130 - SHINOHARA, N. et al. **In vitro and in vivo genotoxicity tests on fullerene C60 nanoparticles.** Disponível em: <<http://DOI: 10.1016/j.toxlet.2009.09.012>>. Acesso em: 06 mar. 2017.

131 - MA , JY et al. Cerium oxide nanoparticle-induced pulmonary inflammation and alveolar macrophage functional change in rats. Disponível em: <<http://DOI: 10.3109/17435390.2010.519835>>. Acesso em: 08 mar. 2017.

132 - INMETRO. **Definições de Regulamento Técnico, Norma e Procedimento de Avaliação da Conformidade.** Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/barreirastecnicas/definicoes.asp>>. Acesso em: 28 Abr. 2016

133 - LIGUORIA, Biase et al. **Control banding tools for occupational exposure assessment of nanomaterials: Ready for use in a regulatory context?.** Disponível em: <<http://DOI: 10.1016/j.impact.2016.04.002>>. Acesso em: 06 mar. 2017.