

IMPACTOS DA PRESENÇA DE NANOTUBOS DE CARBONO PRODUZIDOS POR PECVD NO ECOSISTEMA TERRESTRE: COMPARAÇÃO COM NANOTUBOS DE CARBONO COMERCIAIS

Impacts of the presence of carbon nanotubes produced by PECVD on the terrestrial ecosystem: comparison with commercial carbon nanotubes

IRAZUSTA, S.P.

*Fatec Sorocaba - Coordenadoria de Tecnologia em Sistemas |Biomédicos
silvia.irazusta@fatec.sp.gov.br*

Eixo Tecnológico: Saúde e Meio Ambiente

Resumo

A nanotecnologia tem conquistado um espaço cada vez maior em diversas áreas científicas, com o intuito de desenvolver a manipulação de matéria nos níveis atômicos e moleculares, para produtos e processos industriais. No setor da nanotecnologia o nanotubo de carbono (NTC) se destaca, pois ele tem uma alta resistência mecânica, alta capilaridade, além de propriedades ópticas e eletrônicas. Entretanto, pelo seu destaque, a sua produção e aplicação tem crescido cada vez mais, podendo assim haver impactos sobre o ambiente, ainda não há comprovação de todos os impactos sobre o ecossistema. O trabalho analisou os possíveis impactos causados pela deposição de NTCs no meio ambiente, de modo especial na matriz terrestre por meio de ensaios ecotoxicológicos, utilizando como bioindicador oligoquetas da espécie *Eisenia andrei*. Os organismos foram expostos em diferentes concentrações de NTCs, incorporados ao solo. Foram avaliados parâmetros de toxicidade aguda, como mortalidade e variação de massa e toxicidade crônica por meio de análise histológica e por microscopia eletrônica de varredura. Os resultados obtidos mostraram que os NTCS não provocaram mortalidade ou perda de massa nos organismos. Entretanto, foram observados efeitos subletais, caracterizados por danos teciduais, como redução da espessura da camada de músculo longitudinal, redução da luz do tubo digestivo e aumento da espessura da cutícula. Este último dano foi bem caracterizado pela MEV. Os danos não se relacionaram positivamente às doses, a concentração de 25mg/Kg de solo foi a que apresentou os maiores efeitos. Estes dados são referentes apenas à exposição das minhocas ao NTC comercial. Os dados da exposição aos NTCs por PECVD estão em execução e análise de dados.

Palavras-chave: *Nanotecnologia, nanotoxicologia, E. andrei; PECVD*

Abstract

Nanotechnology has gained increasing space in several scientific areas, with the aim of developing the manipulation of matter at the atomic and molecular levels, for industrial products and processes. In the nanotechnology sector, carbon nanotube (CNT) stands out, as it has high mechanical resistance, high capillarity, as well as optical and electronic properties. However, due to its prominence, its production and application has grown increasingly, and therefore there may be impacts on the environment, although there is still no proof of all impacts on the ecosystem. The work analyzed the possible impacts caused by the deposition of CNTs in the environment, especially in the terrestrial matrix through ecotoxicological tests, using oligochaetes of the species *Eisenia andrei* as a bioindicator. The organisms were exposed to different concentrations of CNTs, incorporated into the soil. Acute toxicity parameters, such as mortality and mass variation and chronic toxicity, were evaluated through histological analysis and scanning electron microscopy. The results obtained showed that NTCS did not cause mortality or mass loss in organisms. However, sublethal effects were observed, characterized by tissue damage, such as reduced thickness of the longitudinal muscle layer, reduced digestive tract lumen and increased cuticle thickness. This last damage was well characterized by SEM. The damages were not positively related to the doses, the concentration of 25mg/kg of soil was the one that showed the greatest effects. These data refer only to the exposure of earthworms to commercial CNT. Data on exposure to CNTs by PECVD are in progress and data analysis.

Key-words: *nanotechnology, nanotoxicology, E. Andrei, PECVD.*

1. Introdução

As quase infinitas possibilidades das aplicações da nanotecnologia têm motivado estudos de várias áreas científicas ^[1]. As pesquisas que visam o desenvolvimento da nanotecnologia, procurando dominar a manipulação da matéria a níveis atômicos e moleculares a fim de introduzi-los em produtos e processos industriais, movimentam bilhões de dólares em investimento ^{[2] [3] [4]}.

Um dos resultados mais promissores do grande interesse e investimento no setor da nanotecnologia, são os nanotubos de carbono (NTC). Apresentando alta resistência mecânica, alta capilaridade e ótimas propriedades ópticas e eletrônicas, os NTCs possuem diversas aplicações ^{[5] [6]}. O aumento na produção de NTCs incorporados a produtos inovadores tem grande valor comercial, contudo, devido a essas mesmas características dos NTCs, sua crescente produção e aplicações, esses materiais podem também, representar impactos sobre o ambiente, considerando-se que, até o momento, não há consenso sobre todos os possíveis danos atribuídos à sua presença nos ecossistemas ^{[7] [8] [9] [10]}.

Mediante a esta problemática e, considerando-se o incremento no volume de sua produção nos últimos anos, o presente trabalho justifica-se pela necessidade de analisar os possíveis impactos causados pela deposição de NTCs no meio ambiente, a fim de garantir que essa exposição não produza efeitos negativos sobre os organismos vivos. Deste modo, pretende-se analisar a possível toxicidade terrestre de NTCs produzidos por deposição química assistida por plasma (PECVD), por meio de ensaios ecotoxicológicos com diferentes concentrações de NTCs no solo, utilizando oligoquetas da espécie *E. andrei* como bioindicador. O mesmo ensaio será realizado com NTCs comerciais, obtidos por Deposição Química a vapor (CVD) a fim de observar a influência dos processos de síntese. Considerando-se os métodos de obtenção, acredita-se o PECVD represente a uma tecnologia mais limpa para obtenção de nanoestruturas carbonáceas, e por utilizar temperaturas mais baixas que o CVD durante o tratamento, este método também possibilita o uso de uma maior variedade de substratos ^{[11] [12]}. Além disso, o método PECVD tem se mostrado uma opção promissora na funcionalização de NTCs ^{[13] [14]}.

2. Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é estudar o potencial toxicológico de amostras de NTCs, produzidos por PECVD, em ambiente terrestre, utilizando minhocas da espécie *Eisenia andrei* como bioindicador e, comparar os resultados com os obtidos com nanopartículas comerciais produzidas por CVD.

Objetivos Específicos

- Utilizar o teste de toxicidade aguda com o bioindicador *Eisenia andrei*, a fim de analisar os efeitos a curto prazo
- Padronizar a técnica de liofilização dos organismos para posterior ensaios analíticos por microscopia eletrônica de Varredura (MEV).
- Realizar análises histolopatológicas do tubo digestório das minhocas
- Comparar os resultados obtidos com os mesmos ensaios realizados com nanopartículas de carbono de origem comercial, sintetizadas pelo método de deposição química em fase de vapor.

3. Métodos

3.1. Amostras

Anais da VII Mostra de Docentes em RJI

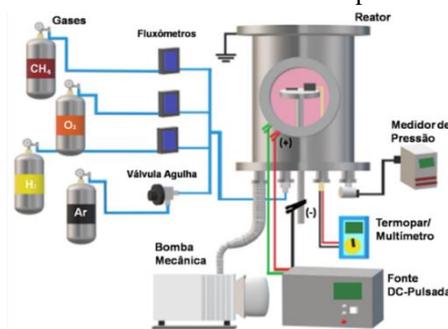
Nesta primeira etapa, a amostra foi constituída pelas nanopartículas de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) comerciais, da marca HELIX®, adquiridas no mercado. Estes NTCs foram sintetizados por CVD.

As nanoestruturas de carbono foram incorporadas ao solo de cultivo das minhocas, nas concentrações de 6,5, 12,5, 25, 50, 100mg/Kg de solo. A homogeneização das nanopartículas no solo foi realizada com o auxílio de uma batedeira.

3.2. PECVD_NTC

Os NTCs produzidos por PECVD foram sintetizados no Laboratório de Tecnologia e Engenharia de Superfície – LabTES, localizado na Faculdade de Tecnologia “José Crespo Gonzales”, Fatec Sorocaba. O sistema utilizado está apresentado na Fig. 1.

Fig. 1. Representação do Sistema do Reator a Plasma para síntese dos NTCs.



Fonte: Autora

3.3. Ensaio De Toxicidade Aguda

Os organismos da espécie *e. andrei*, foram introduzidos nos substratos conforme recomendado em norma (protocolo ABNT NBR 15537:2014) por período de 15 a 30 dias para ambientação. Para o ensaio os organismos-teste foram as minhocas adultas da espécie *E. andrei*, com peso médio de 0,3397 g/Kg e desvio padrão de 0,034464, como sugerido [4].

Para o ensaio de toxicidade os organismos testes foram pesados, separados em grupos de 10 organismos e foram inseridos em potes de plástico de 500g contendo 70% de areia, 20% de argila branca e 10% de fibra de coco, sem NTCs, no grupo controle e com NTC nos tratamentos, cujas concentrações foram descritas acima. Os tratamentos foram realizados em duplicata. Após 7 e 14 dias de exposição, os organismos tiveram suas massas aferidas novamente, foram analisando quanto à mortalidade e mobilidade.

3.4. Histologia

Para esse ensaio, foram retirados três organismos de cada pote, sendo eutanasiados em geladeira por 1 hora. Após esse processo, foram seccionados e retirados fragmentos transversais contendo a região do clitelo. Os fragmentos foram unitariamente depositados em microtubos contendo 1mL de paraformaldeído 4% como fixador, um dia antes do processo histológico. Os fragmentos fixados foram colocados individualmente dentro de cassetes, os quais foram inseridos no processador histotécnico. No equipamento os fragmentos passaram pelas etapas de desidratação, uma vez que a água presente nos tecidos não é miscível em substâncias apolares como a parafina e as resinas de inclusão. A desidratação foi feita através de imersão em bateria de soluções alcoólicas em concentrações graduais e crescentes. Posteriormente, foi realizada a clarificação com xilol. O xilol penetra o tecido no lugar do álcool e promove a diafanização do tecido. A coloração utilizada em lâminas para histologia foi a Hematoxilina e Eosina (H&E).

3.5. Morfometria

As imagens histológicas foram capturadas pelo fotomicroscópio Olympus, modelo BX41, na FATEC de Sorocaba, após a captura das imagens foi utilizado o software ImageJ para

Anais da VII Mostra de Docentes em RJI

a realização das medições do músculo circular e longitudinal, do tubo digestório e da espessura da cutícula. Utilizou-se a câmara de Neubauer para definir as escalas, a unidade de medida utilizada foi micrometro (μm), as imagens foram abertas no programa e utilizando a ferramenta “barra de escala”, a escala foi inserida na imagem da seguinte maneira.

A comparação das médias das medições entre os grupos foi feita pelo método ANOVA ONEWAY não paramétrico, seguido do pos-teste de Tukey, no Programa Prisma 5,0.

3.6. Liofilização

A liofilização consiste no processo de desidratação de um alimento ou organismo utilizando a sublimação da água. Neste processo o objeto a ser liofilizado é mantido a baixas temperaturas sob vácuo.

Para esse ensaio, foram retirados 5 organismos de cada concentração dos NTCs. Esses organismos foram pesados e eutanasiados e congelados para a liofilização. A liofilização dos organismos foi realizada em câmara a vácuo artesanal construída pelo Prof. Dr. Francisco Tadeu Degasperri, docente da Fatec-SP. Os parâmetros empregados foram à pressão de 0,5 tohr, por 8 horas, a -20°C para liofilização.

3.7. Microscopia Eletrônica De Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica de microscopia que utiliza feixes de elétrons para reproduzir imagens detalhadas da superfície de amostras orgânicas e inorgânicas, que podem ser ampliadas até 300.000 vezes. A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica muito versátil, que pode ser utilizada para estudar a topografia das superfícies das amostras, sua estrutura cristalina, composição química e comportamento elétrico.

A liofilização foi o processo adotado para preservação das amostras biológicas para as análises no MEV, de modo que os bioindicadores expostos ao solo contaminado por metais e os controles, após a liofilização, foram metalizados com uma liga de ouro-paládio por meio da deposição por Sputtering. Após a metalização, os bioindicadores foram analisados no MEV-EDS no Laboratório de plasmas tecnológicos-LaPTec, na Unesp de Sorocaba, com a colaboração da Profa. Dra. Elidiane Cipriano Rangel.

4. Resultados e Discussão

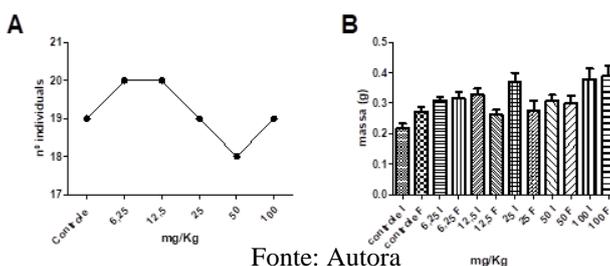
4.1. Caracterização dos Nanotubos de Carbono

Os nanotubos Helix foram caracterizados anteriormente e os parâmetros foram descritos, assim como os nanotubos sintetizados por PECVD foram caracterizados e descritos.

4.2. Toxicidade Aguda

A Fig. 2 a seguir apresenta os resultados da mortalidade e variação de massa dos organismos expostos após 14 dias. A Fig. 3 mostra a mortalidade (A), onde observa-se que na concentração de 50mg/Kg houve a morte de 10% dos indivíduos e, nas concentrações 25mg/Kg e 100mg/Kg houve apenas um óbito (5%). Com relação a massa foi observado um aumento do peso corporal apenas nos organismos expostos a 100 mg/Kg de solo (B).

Fig. 2. Variação de massa e mortalidade dos organismos expostos após 14 dias



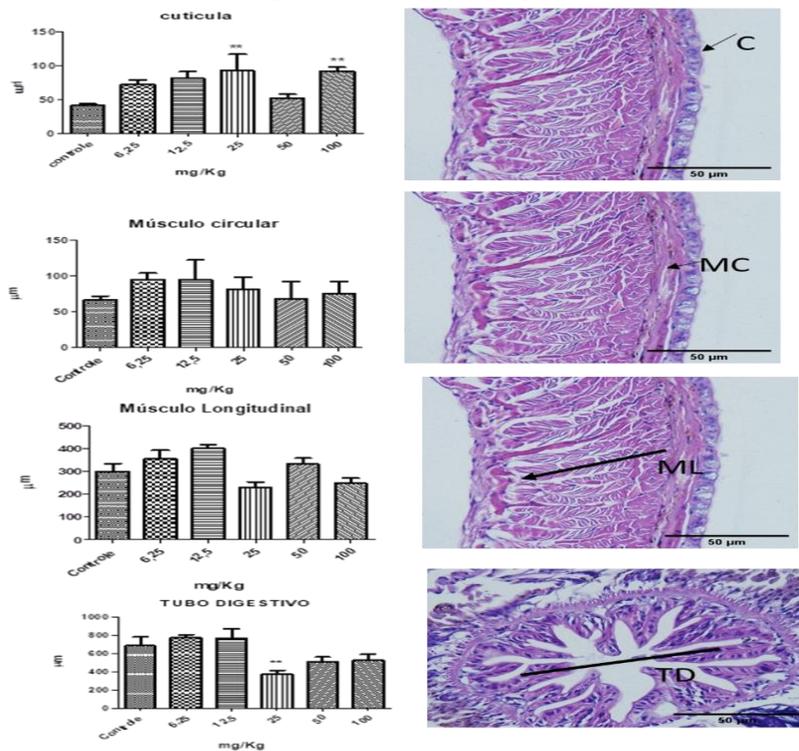
Fonte: Autora

4.3. Histologia e Morfometria

Anais da VII Mostra de Docentes em RJJ

A figura 3 (A, B) apresenta o resultado da análise histológica com morfometria da cutícula dos organismos. Após as medições, foi observada a redução na espessura da cutícula provocada pela exposição aos NTCs, nas concentrações de 25mg/Kg e 100mg/Kg. Na análise morfométrica do músculo circular (C, D) não se observou alterações na sua espessura. Já o músculo longitudinal (E, F) sofreu uma redução da sua espessura nas concentrações 25mg/Kg, 50mg/Kg e 100mg/kg. A Figura 4 (G, H) apresenta os resultados da análise morfométrica do tubo digestivo dos indivíduos, onde se observou uma contração no diâmetro da luz do tubo digestório nas concentrações 25mg/Kg, 50mg/Kg e 100mg/Kg. Os efeitos neste tecido foram independentes das concentrações.

Figura 3- Imagens de gráfico da cutícula da minhoca, representada pela letra A, gráfico do músculo circular, representada pela letra C, gráfico do músculo longitudinal, representada pela letra E, gráfico do tubo digestivo, representada pela letra G. Imagens de lâminas preparadas, representadas pelas letras B, sendo cutícula, letra D, sendo músculo circular, letra F, sendo músculo longitudinal, letra H, sendo tubo digestório. As estruturas medidas das oligoquetas estão representadas por seta e pelas seguintes siglas: cutícula (C), músculo circular (MC), músculo longitudinal (ML), tubo digestório (TD).

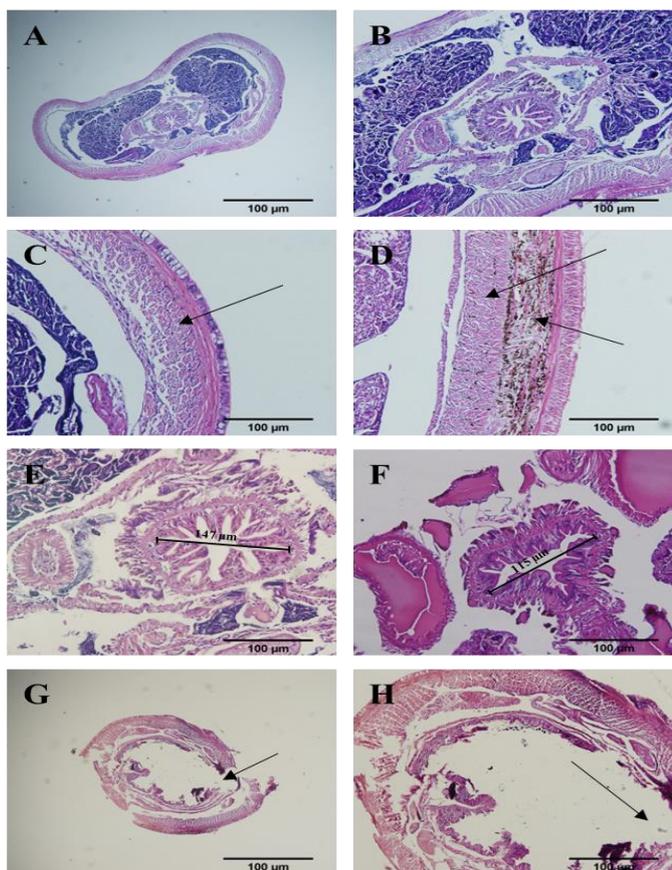


Fonte: Autora

Anais da VII Mostra de Docentes em RJJ

A Fig. 4 apresenta imagens obtidas da análise histopatológica do tubo digestivo das minhocas, onde se observam aspectos estruturais normais em A, B (aumento de 200X e 40X respectivamente). Em C e D observa-se a diferença na espessura do músculo longitudinal numa amostra controle (C) e na concentração de 100mg/Kg (D) (aumento de 200X). Além disso, observou-se sangramento entre as camadas musculares nas concentrações de 50 e 100 mg/Kg, conforme ilustrado em F (aumento 200X). A redução do diâmetro dos tubos está ilustrada nas imagens E e F, respectivamente controle e 100mg/Kg de NTC no solo. Na execução da técnica histológica das amostras com NTC comercial observou-se uma característica frequente no material ao final do processamento histológico, que foi o severo enrijecimento do tecido, o que dificultou o corte com a navalha do micrótomo e, em quase todas as amostras dos tratamentos, impossibilitou a obtenção de cortes viáveis para coloração e análise, como os apresentados em G e H.

Fig. 4- Imagens de lâminas preparadas com minhoca do controle, representadas pelas letras A, B, C e E, as minhocas expostas a 50mg/Kg e 100mg/Kg de NTCS, representadas pelas letras D, F, G H, a fim de observar alterações estruturais. As maiores alterações estão representadas pelas setas, sendo na imagem C o músculo longitudinal normal, na imagem D o músculo longitudinal reduzido e com sangramento. Já as imagens E e F apresentam o tubo digestório, sendo a imagem E o controle e a F o contaminado com redução. A imagem G e H indica o enrijecimento das lâminas histológicas.



Fonte: Autora

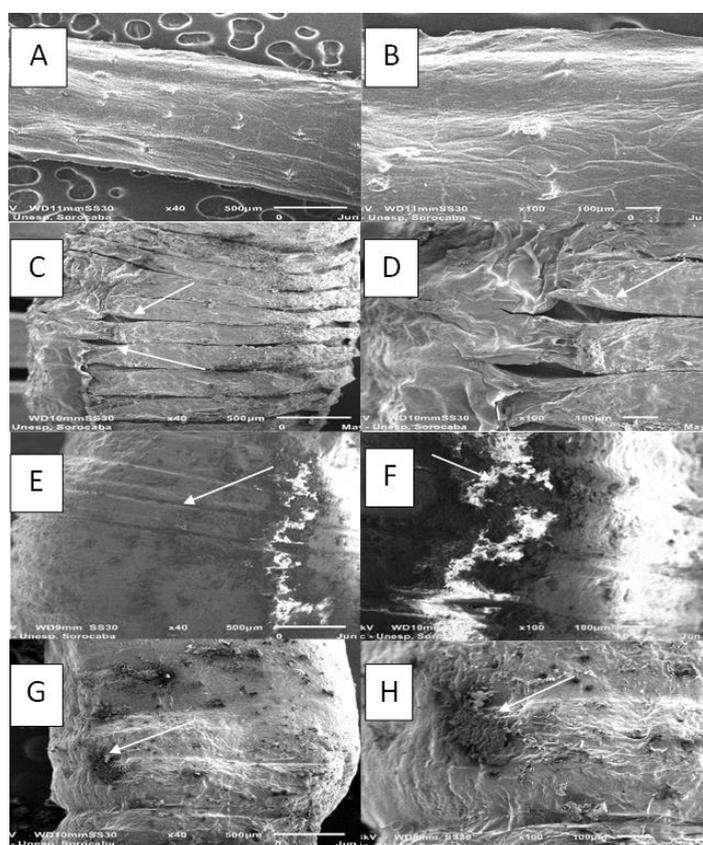
4.4. Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise por MEV foi realizada nas amostras, após a liofilização e a metalização com Au/Pd a fim de observar possíveis alterações na parte externa da cutícula das minhocas. A figura 6 (A,

Anais da VII Mostra de Docentes em RJI

B, C, D, E, F, G, H) apresenta as imagens obtidas pelo MEV para os tratamentos em diferentes concentrações. Em A e B, estão as imagens da superfície dos animais organismos controle não expostos. Observa-se que, nos controles, a superfície se apresenta lisa e regular, evidenciando-se os pelos na sua extensão. Comparando com as imagens C, D, E, F capturadas em diferentes animais expostos à todas concentrações, nota-se que houve intensa desidratação acarretando em enrugamento dos metâmeros e rachaduras na superfície dos organismos (D). Estas alterações estruturais podem explicar o enrijecimento do material nas preparações histológicas, conforme descrito e demonstrado na Fig. 5 (G e H). As imagens ampliadas em G e H também mostram a deposição de material carbonáceo, provavelmente os NTCs.

Fig. 5 - Pranchas da microscopia eletrônica de varredura, sendo os controles representados pelas letras A e B, as imagens C, D, E, F, G e H, estão representando os organismos contaminados. As setas indicadas estão representando desidratação, rigidez e rachaduras.



Fonte: autora

5. Conclusões

Com relação aos resultados aqui apresentados, conclui-se, que os NTCs comerciais sintetizados por CVD, foram danosos a espécie bioindicadora estudada. As minhocas não morreram ou perderam massa, porém sofreram vários efeitos subletais, caracterizados por danos teciduais e enrijecimento de sua cutícula de proteção, o que pode dificultar a absorção de nutrientes por essa via, reduzir sua mobilidade, entre outras consequências para esse ecossistema. Os NTCs assim como os microplásticos estão enquadrados na categoria de contaminantes emergentes e são foco de inúmeros estudos de ecotoxicidade, inclusive no grupo deste laboratório [15].

Referências

1. FERREIRA, S. F; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catpalise. **Quim. Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860-1870, 2009.
2. HERBST, M. H.; MACEDO, M. I. F.; ROCCO, A. M. Tecnologia dos nanotubos de carbono: tendências e perspectivas de uma área multidisciplinar. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 986992, 2004.
3. KLAINE, S. J; ALVAREZ, P. J; BATEY, G. E; FERNANDES, T. F; HANDY, R. D; LYON, D. Y; MAHENDRA, S; MCLAUGHIN, M. J; LEAD, J. R. Nanomaterials in the enviroment:Behavior, fate, bioavaivaibility, and effects. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 27, p. 1825-1851, 2009.
4. NUNES, M. E; ALVES, P. R; SEGAT, J. C; CARDOSO, E. J; EGLER, S. G; CESAR, R. G; COLONESE, R; PASINI, A; BROWN, G. G; NIVA, C. C; SOUSA, J. P; ROMBKE, J; PASCHOALINO, M. P; MARCONE, G. P; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Quim. Nova**, v. 33, n. 2, p. 421-430, 2010.
5. SILVA, L. H; VIANA, A. G; BALDISSERA, M. A; NASCIMENTE, K; SAGRILLO, M. R; LUCHESE, C. Revisão bibliográfica sobre relações entre nanomateriais, toxicidade e avaliação de riscos: a emergência da nanotoxicologia. **Ciências da Saúde**, v. 15, n. 1, p. 19-30, 2014.
6. PAKZAD, Y; FATHI, M; OMIDI, Y; ZAMANIAN, A; MOZAFARI, M. Nanotechnology for ocular and optic drug delivery and targeting. In: Mozafari, M (ed.). *Nanoengineered Biomaterials for Advanced Drug Delivery*. [S.I.]: Elsevier, p. 499-523, 2020.
7. ZHANG, Y.; QUIN, L.; SUN J.; CHEN L.; JIA L.; ZHAO J.; YANG H.; XUE K.; WANG X.; SANG W. Metabolite changes associated with earthworms (eisenia fétida) graphene exposure revealed by matrix-assisted laser desopition/ionization mass spectrometry Imaging. **Ecotoxicology and environmental safety**, 2020.
8. MOTTIER A.; MOUCHET F.; PINELLI É.; GAUTHIER L.; FLAHAUT E.Environmental impacto f engineered carbon nanoparticles:from releases to effects on the aquatic biota. **Review**, 2017.
9. IRAZUSTA S.; OLIVEIRA E.; CERAGLOLL H.; SOUZA B.; MENDOÇA M.; SOARES E.; JÚNIOR R.; HOFLING M.; CRUZ Z. Sress oxidativo e alterações enzimáticas induzidas por nanotubo de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) funcionalizados com polietileno glicol no tecido hepático de camundongos. **Revinter**, v. 11, n. 01, p. 05-25, fev. 2018.
10. HORI, M., TABELI, Y. Role of oxidative stress in nanoparticles toxicity. **Free Radic Res**, 18:1-12, 2020.
11. HUSSAIN, S. AAMADE, R; JOVER, E; BETRAN, E. Growth and plasma funcionalization of carbon nanotubes. **J. Clust Sci.**, v. 26, p. 315-336, 2015.
12. KHOO, Y. S; LAU, W. K; LIANG, Y, Y; KARAMAN, M; GURSOY, M; LAI, G. S; ISMAIL, A. F. Rapid and eco-friendly technique for surface modification of TPC RO membrane for improved filtration performance. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, p. 1-10, 2021.
13. STEFFEN, T. T. Funcionalização de nanotubos de carbono por plasma radio frequência e sua influência em nanocompósitos de epóxi. Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia dos Materiais) – Centro de Ciências Tecnológicas, Universidade do Estado de Santa Catarina, Santa Catarina, 2017.
14. ALMEIDA, L. S. Produção e Caracterização de Nanoestruturas de Carbono por PECVD. Orientador: Luciana Sgarbi Rossino, 2021, f. 111. Dissertação (mestrado em Ciência dos Materiais) – Universidade Federal de São Carlos, campus Sorocaba, Sorocaba, 2021.
15. LUQUE Jr, S.R.S. Microplásticos no Ambiente Terrestre: Impactos Sobre o Bioindicador *E. Andrei*. 2021, Trabalho de Conclusão de Curso, Faculdade de Tecnologia de Sorocaba - Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza, 95p., 2021.

Agradecimentos

Vitoria Cândido Pereira- Bolsista CNPq-CPS- PIBITI
Larissa Solano de Almeida- Doutoranda – UFSCAR
Cesar Augusto Antonio Jr. – MEV-UNESP
Profa. Dra. Elidiane Cipriano Rangel – UNESP
Profa. Dra.Luciana Sgarbi Rossino