

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

GABRIELA HELENA DA SILVA

Nanomaterial híbrido (TiO₂-MWCNT):
síntese, caracterização e ecotoxicidade aquática

Piracicaba
2019

GABRIELA HELENA DA SILVA

Nanomaterial híbrido (TiO₂-MWCNT):
síntese, caracterização e ecotoxicidade aquática

Tese apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientadora: Prof^a. Dr^a Regina Teresa Rosim Monteiro

Co-orientador: Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez

Co-orientadora: Dr^a. Vera Lúcia Scherholz Salgado de Castro

Piracicaba
2019

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Da Silva, Gabriela Helena

Nanomaterial híbrido (TiO₂-MWCNT): síntese, caracterização e ecotoxicidade / Gabriela Helena Da Silva; orientadora Regina Teresa Rosim Monteiro, co-orientador Diego Stéfani Teodoro Martinez, co-orientadora Vera Lúcia Scherholz Salgado de Castro. - - Piracicaba, 2019.

112 p. : il.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo, 2019.

1. Bioindicadores 2. Ecotoxicologia 3. Fotocatálise 4. Nanopartículas
5. Nanotecnologia 6. Nanotubos de carbono. 7. Propriedades dos materiais
8. Química ambiental 9. Toxicologia ambiental I. Título.

CDU 574.64 : 620.3

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei
CRB-8/3631

Resolução CFB N° 184 de 29 de setembro de 2017

À minha mãe, com amor, admiração e gratidão por sua
compreensão, carinho, presença e incansável apoio ao longo
de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a minha família, sempre presente em todos os momentos, dando o suporte necessário para continuar caminhando, mesmo nos momentos mais difíceis.

A Prof^a. Dr^a. Regina Monteiro, pela orientação, apoio e amizade nesses mais de 10 anos sob sua supervisão.

Aos meus Co-orientadores Diego Stéfani Teodoro Martinez e Vera Lucia Scherholz de Castro por toda a orientação, por terem aberto as portas do CNPEM e Embrapa Meio Ambiente. E pela transmissão de conhecimentos fundamentais para este trabalho.

Ao CENA e a Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de doutorado.

A Embrapa Meio Ambiente e ao CNPEM, duas instituições que me acolheram, colocando à disposição toda a infraestrutura para a realização deste projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e do CNPQ – Processo Nº 148608/2016-7.

Ao Governo Irlandês, pela concessão do auxílio para a realização do doutorado sanduíche em Dublin na Irlanda.

Ao Prof. Dr. Alan Casey e Prof. Dr. Hugh Byrne, do Instituto de Pesquisa FOCAS e Nanolab (Instituto de Tecnologia de Dublin), pelo acolhimento, suporte e disponibilização da infraestrutura para o desenvolvimento dos experimentos *in Vitro* com a linhagem celular RTG-2.

Aos meus amigos do Nanotox, (LNNano) pela incrível amizade, pela ajuda durante a realização dos experimentos, pelos momentos divertidos no laboratório, pelos ensinamentos. Enfim, por todo o suporte científico e emocional durante essa jornada.

"A imaginação é mais importante que a ciência, porque a ciência é limitada, ao passo que a imaginação abrange o mundo inteiro."

Albert Einstein

RESUMO

DA SILVA, G. H. **Nanomaterial híbrido (TiO₂-MWCNT): Síntese, Caracterização e Ecotoxicidade aquática**. 2019. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

A combinação de nanopartículas de dióxido de titânio com nanotubos de carbono de parede múltipla possibilita a geração de um nanomaterial híbrido, com atividade fotocatalítica aprimorada, denominado TiO₂-MWCNT. Existe um grande interesse científico e tecnológico em materiais fotocatalíticos, estes apresentam potencial para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, nanocompósitos, catalisadores e remediação ambiental. Apesar de muitos trabalhos enfatizarem os benefícios na utilização de nanohíbridos, ainda são escassos estudos de impactos ambientais e toxicidade. O objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar o nanohíbrido TiO₂-MWCNT, bem como avaliar sua ecotoxicidade aquática através de ensaios *in vivo* (embriões de Zebrafish - *Danio rerio*) e *in vitro* (linhagem celular RTG-2 - fibroblastos de *Oncorhynchus mykiss*). O TiO₂-MWCNT foi sintetizado pelo método mecanoquímico (moagem em estado sólido) e caracterizado empregando as seguintes técnicas: microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, espectroscopia Raman, análise termogravimétrica, espalhamento dinâmico de luz e espalhamento de luz eletroforético. O nanohíbrido sintetizado apresentou atividade fotocatalítica aprimorada, confirmada através de ensaios de fotocatalise. Nos ensaios *in vivo*, o TiO₂-MWCNT não apresentou ecotoxicidade aguda até 100 µg mL⁻¹ (na presença ou ausência de radiação UV). No entanto, foi observada a ingestão do nanohíbrido pelos embriões (via oral) através da técnica microfluorescência de raios-X (µ-XRF). Também não foi observado ecotoxicidade para o nanohíbrido nos ensaios *in vitro* até 100 µg mL⁻¹; porém foi verificado a capacidade de internalização celular deste material. Em geral, aspectos coloidais (agregação/aglomeração) e a formação de *protein corona* apresentaram importantes implicações para a determinação precisa da ecotoxicidade. Os resultados obtidos neste trabalho suportam futuras aplicações do nanohíbrido TiO₂-MWCNT na área de fotocatalise, e contribui de maneira proativa para sua avaliação ecotoxicológica.

Palavras-chave: Nanotecnologia. Nanoecotoxicologia. Nanohíbrido. Nanotoxicidade. Dióxido de titânio. Nanotubos de carbono. Fotocatálise.

ABSTRACT

DA SILVA, G. H. S. **Hybrid Nanomaterial (TiO₂-MWCNT): Synthesis, Characterization and Ecotoxicity**. 2019. 112 p. Tese (Doutorado em Ciências) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2019.

The combination of titanium dioxide nanoparticles with multiwall carbon nanotubes enables the generation of a hybrid nanomaterial with improved photocatalytic activity, called TiO₂-MWCNT. There is great scientific and technological interest in photocatalytic materials, which present potential for the development of new antimicrobial agents, nanocomposites, catalysts and environmental remediation. Although many papers emphasize the benefits of using nanohybrids, there are still a small number of studies about its environmental impacts and toxicity. The objective of this work was to synthesize and characterize a TiO₂-MWCNT nanohybrid. As well as to evaluate its aquatic ecotoxicity through *in vivo* (Zebrafish embryos - *Danio rerio*) and *in vitro* (RTG-2 cell line - *Oncorhynchus mykiss* fibroblasts) assays. TiO₂-MWCNT was synthesized by the mechanochemical method (solid state milling) and characterized using the following techniques: scanning and transmission electron microscopy, Raman spectroscopy, thermogravimetric analysis, dynamic scattering light and electrophoretic scattering light. The synthesized nanohybrid showed enhanced photocatalytic activity, confirmed by photocatalysis studies. In the *in vivo* assays, TiO₂-MWCNT did not show acute ecotoxicity up to 100 µg mL⁻¹ (in the presence or absence of UV radiation). However, the ingestion of the nanohybrid by the embryos (oral route) was observed through µ-probe X-ray fluorescence spectroscopy (µ-XRF). Also, no toxicity was observed in the *in vitro* assays up to 100 µg mL⁻¹; however, the cellular internalization capacity of this material was verified. In general, colloidal aspects (aggregation / agglomeration) and the formation of protein corona presented important implications for the precise determination of ecotoxicity. The results obtained in this work support future applications of the nanohybrid TiO₂-MWCNT in the area of photocatalysis and contributes proactively to its ecotoxicological evaluation.

Keywords: Nanotechnology. Nanoecotoxicology. Nanohybrid. Nanotoxicity Titanium dioxide. Carbon nanotubes. Photocatalysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de publicações relacionadas a CNT e TiO ₂ , termo pesquisado: TiO ₂ -CNT e suas variações.....	25
Figura 2 - Fluxograma experimental.....	29
Figura 3 - Representação esquemática dos três tipos de nanotubo de carbono. A) Chiral; B) Armchair; C) Zigzag.....	34
Figura 4 - (A) Espectro Raman e (B) relação Id/Ig dos ox-MWCNT nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas	38
Figura 5 - (A) Análise termogravimétrica, curva de perda de peso por temperatura; (B) Porcentagem de perda de massa a 400 °C das amostras de MWCNT oxidado por 0, 6, 12, 24 e 48 horas	39
Figura 6 – Análise de XPS do ox-MWCNT, oxidado nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas. (A) Espectros de levantamento XPS; (B) porcentagem de razões atômicas de oxigênio por XPS ocupando o pico de O 1s das amostras de ox-MWCNT	40
Figura 7 - Imagens de MEV em isopropanol: (A) ox-MWCNT-6, (B) ox-MWCNT-48	41
Figura 8 - Estudos de estabilidade coloidal de dispersões de ox-MWCNT. (A) Fotos (B) medidas de absorvância e (C) potencial zeta das dispersões de ox-MWCNT após 0, 10, 30, 60 e 120 minutos	42
Figura 9 - Espectro de UV-VIS de debris oxidativos extraídos do MWCNT após diferentes períodos de oxidação	43
Figura 10 - Mecanismo proposto para a atividade fotocatalítica do nanomaterial híbrido TiO ₂ -MWCNT.....	49
Figura 11 - Imagens de SEM em isopropanol: (A) TiO ₂ -MWCNT (10:1), (B) TiO ₂ -MWCNT (10:3). Imagens de TEM e HRTEM em água reconstituída: (C) TiO ₂ -MWCNT (10:1), (D) TiO ₂ -MWCNT (10:3) e transformada de Fourier (FFT) correspondente, calculada a partir da área marcada com quadrados amarelos e vermelhos para TiO ₂ e MWCNT, respectivamente.....	53
Figura 12 - Análise termogravimétrica (TGA) do ox-MWCNT, TiO ₂ e TiO ₂ -MWCNT (10:3 e 10:1).....	54
Figura 13 - (A) Espectro Raman dos nanomateriais ox-MWCNT, TiO ₂ , TiO ₂ -MWCNT (10:1 e 10:3). (B) Relação ID/IG das amostras Ox-MWCNT e TiO ₂ -MWCNT (10:1 e 10:3).....	56

- Figura 14** - Estudo fotocatalítico do TiO₂ e TiO₂-MWCNT (10: 3 e 10: 1) sob luz visível e UV. Tempo de irradiação: 60 minutos. média ± erro padrão..... 57
- Figura 15** Estágios de desenvolvimento do peixe *Danio rerio* 64
- Figura 16** Esquema de como é feita a medição das larvas de *Danio rerio* 67
- Figura 17** - Embriões de *Danio rerio* expostos por 48 horas a: (A) Controle, (B) ox-MWCNT; (C) TiO₂; (D) TiO₂-MWCNT 10:3 e (E) TiO₂-MWCNT 10:1. Larvas de *Danio rerio* expostas por 96 horas a: (F) Controle (G) ox-MWCNT; (H) TiO₂; (I) TiO₂-MWCNT 10:3 e (J) TiO₂-MWCNT 10:1 71
- Figura 18** - Taxa de eclosão de embriões de *D. rerio* expostos a TiO₂, ox-MWCNT, TiO₂-MWCNT 10:3, TiO₂-MWCNT 10:1 sob diferentes exposições à luz. (A) Taxa de eclosão após 48 horas. (B) Taxa de eclosão após 72 horas. Média ± erros padrão 71
- Figura 19** - (A) Tamanho do saco vitelino e (B) Comprimento total de larvas de *D. rerio* expostas durante 96 horas a MWCNT oxidado, TiO₂ e TiO₂-MWCNT (10:3) e TiO₂-MWCNT (10:1) sob luz visível e UV. Média ± erros padrão 72
- Figura 20** - Comprimento do sarcômero. (A) Esquema ilustrativo de um sarcômero. (B) Geração de segunda harmônica (SHG) de alta resolução dos músculos do peixe-zebra (barra de escala: 5 µm). (C) Gráficos representativos de corte transversal. O comprimento do sarcômero foi determinado a partir da distância entre as duas linhas tracejadas, como mostrado nas parcelas transversais. (D) comparação do comprimento médio do sarcômero determinado a partir de amostras de imagens obtidas do SHG. Análise estatística baseada em 12 imagens obtidas de somitos abaixo do saco vitelino de três zebrafish após 96 horas de fertilização 73
- Figura 21** - Distribuição de Ti em larvas de *Danio rerio* exposto por 96 horas a 0, 100, 130 e 110 mg L⁻¹ de (A) controle; (B) TiO₂; (C) TiO₂-MWCNT (10:3); (D) TiO₂-MWCNT (10:1), respectivamente 75
- Figura 22** - Relação entre as propriedades das nanopartículas, os processos bioquímicos afetados e os resultados biológicos finais..... 85
- Figura 23** - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão, modo crio, do TiO₂-MWCNT (100 mg L⁻¹) em DMEM com SFB (A e B), sem SFB (C) e em água ultra pura (D)..... 92
- Figura 24** - Estabilidade da nanopartícula de TiO₂ e do nanomaterial híbrido TiO₂-MWCNT em meio DMEM com e sem adição de soro fetal bovino (SFB) e em água ultrapura por 24 horas. (A) Gráfico de estabilidade por UV-VIS (350 nm) do TiO₂ e (B) do TiO₂-MWCNT 94

- Figura 25** - Estudo de estabilidade da nanopartícula de TiO_2 e do nanomaterial híbrido TiO_2 -MWCNT em meio DMEM com e sem adição de soro fetal bovino (SFB) e em água ultrapura por 24 horas95
- Figura 26** - Gel 1D de SDS-PAGE 15%, corado com Comassie blue, das proteínas do soro fetal bovino (SFB) que foram adsorvidas na superfície do TiO_2 , TiO_2 -MWCNT e MWCNT, após incubação por 1h à 22°C em meio DMEM suplementado com 10% de SFB97
- Figura 27** - Ensaio de viabilidade celular, por Alamar blue, com a linhagem RTG-2. (A) e (B) células tratadas com TiO_2 e TiO_2 -MWCNT, respectivamente.....98
- Figura 28** - Ensaio de viabilidade celular, por Neutral red, com a linhagem RTG-2. (A) e (B) células tratadas com TiO_2 e TiO_2 -MWCNT, respectivamente.....99
- Figura 29** - Ensaio de viabilidade com tripan blue nas concentrações de 0 (C-), 1,56 e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A) TiO_2 e (B) com TiO_2 -MWCNT 100
- Figura 30** - Análise de ciclo celular de células RTG-2 expostas a $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de TiO_2 -MWCNT. (A) exposição com soro fetal bovino e (B) sem soro fetal bovino 101
- Figura 31** - Imagem hiperspectral de células (RTG-2) tratadas com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de (A) TiO_2 e (B) TiO_2 -MWCNT. Pontos vermelhos indicam a localização do nanomaterial nas células. (C), (D) e (E) imagens de microscopia de campo escuro de células não expostas, expostas a TiO_2 e TiO_2 -MWCNT, respectivamente. Imagens capturadas com objetiva de 100x 102
- Figura 32** - Perfil espectral das (A) nanopartículas de TiO_2 e TiO_2 -MWCNT e análise de componente principal (PCA) dos espectros obtidos. (B) perfil espectral das células (RTG-2) não exposta e exposta às nanopartículas TiO_2 e TiO_2 -MWCNT... 103
- Figura 33** - (A) Espectro Raman de uma célula controle (Azul) e de uma célula exposta a NP de TiO_2 -MWCNT (vermelho). Mapa de intensidade no eixo Z de uma célula controle (B e C) e mapa de intensidade no eixo Z de uma célula exposta a TiO_2 -MWCNT com SFB(D) sem SFB (E). Bandas utilizadas para o mapa: 1008 cm^{-1} referente a fenilalanina, 1350 cm^{-1} referente a banda D e 1580 cm^{-1} referente a banda G 104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Alamar blue (ensaio de citotoxicidade)
CNT	Nanotubos de carbono
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMEM	Meio nutriente modificado de Dullbeco
DTT	Ditiotreitol
ELS	Espalhamento de luz eletroforético
FET	Ensaio com embriões de peixes
HEPES	4-(2-hydroxietil)-1-ácido piperazineetanosulfonico
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MWCNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas
NH	Nanohíbridos
NM	Nanomateriais
NP	Nanopartículas
NR	Neutral red (ensaio de citotoxicidade)
Ox-MWCNT	Nanotubos de carbono de paredes múltiplas oxidado
PBS	Tampão fosfato
PCA	Análise de componentes principais
PdI	Índice de polidispersividade
PFA	Paraformaldeído

POAS	Processos oxidativos avançados
PTFE	Politetrafluoretileno
PZ	Potencial zeta
RAW	Nanotubos de carbono bruto (pós-síntese)
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
SHG	Geração de segundo harmônico
SWCNT	Nanotubos de carbono de parede única
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TGA	Análise termogravimétrica
UV	Ultravioleta
UV-Vis	Espectroscopia Uv-visível
XPS	Espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raio X

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
1.1 Justificativa e Objetivo.....	26
1.2 Estrutura da tese e fluxograma experimental.....	28
Referências	30
2 OXIDAÇÃO QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO	33
2.1 Introdução	33
2.2 Objetivo	35
2.3 Materiais e Métodos	35
2.3.1 Oxidação	35
2.3.2 Caracterização	36
2.4 Resultados e Discussão	37
2.5 Conclusões.....	44
Referências	44
3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO NANOMATERIAL HÍBRIDO TiO ₂ -MWCNT COM ATIVIDADE FOTOCATALÍTICA APRIMORADA	47
3.1 Introdução	47
3.2. Objetivo	50
3.3 Materiais e Métodos	50
3.3.1 Síntese do TiO ₂ -MWCNT	50
3.3.2 Caracterização do TiO ₂ -MWCNT	51

3.3.3 Ensaio de Atividade Fotocatalítica.....	51
3.3.4 Análise Estatística.....	52
3.4 Resultados e Discussão	52
3.4.1 Caracterização do Nanohíbrido TiO ₂ -MWCNT	52
3.4.2 Atividade Fotocatalítica.....	56
3.5 Conclusões	58
Referências.....	58
4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO NANOMATERIAL HÍBRIDO TiO₂-MWCNT EM EMBRIÕES DE <i>DANIO RERIO</i> (ZEBRAFISH).....	63
4.1 Introdução.....	63
4.2 Objetivo.....	65
4.3 Materiais e Métodos.....	66
4.3.1 Caracterização da Dispersão do TiO ₂ -MWCNT	66
4.3.2 Avaliação da Toxicidade	66
4.3.3 Mapeamento e Quantificação do Ti por μ -XRF.....	68
4.3.4 Análise Estatística.....	69
4.4 Resultados e Discussão	69
4.4.1 Caracterização da Dispersão de TiO ₂ -MWCNT	69
4.4.2 Avaliação da Toxicidade	70
4.4.3 Mapeamento μ -XRF e Quantificação de Ti.....	74
4.5 Conclusões	76
Referências.....	77

5 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO NANOMATERIAL TiO ₂ -MWCNT EM FIBROBLASTOS DE TRUTA ARCO-IRÍS (RTG-2)	83
5.1 Introdução	83
5.2 Objetivo	86
5.3 Materiais e Métodos	86
5.3.1 Caracterização da Dispersão e Estudo de Estabilidade Coloidal	86
5.3.3 Caracterização da <i>Protein corona</i>	87
5.3.4 Condições da cultura da linhagem celular RTG-2	88
5.3.5 Análise de Citotoxicidade	88
5.3.5.1 Ensaio de Viabilidade Celular por Alamar Blue	88
5.3.5.2 Ensaio de Viabilidade por Neutral Red	89
5.3.5.3 Ensaio de Viabilidade Celular por Trypan blue	89
5.3.5.4 Ensaio de Ciclo Celular por Citometria de Fluxo	90
5.3.6 Espectroscopia RAMAN	90
5.3.7 Microscopia Hiperespectral (CytoViva)	91
5.3.8 Análise estatística	92
5.4 Resultados	92
5.4.1 Caracterização da Dispersão e Estudo da Estabilidade Coloidal	92
5.4.2 Caracterização da <i>Protein corona</i>	95
5.4.3 Citotoxicidade	97
5.4.4 Análise da Distribuição do NM em Células RTG-2 Através da Microscopia CytoViva	101

5.4.5 Análise da Internalização de NM por Espectroscopia Raman	103
5.5 Conclusões	105
Referências.....	105
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	111

1 INTRODUÇÃO

Por definição a nanotecnologia é: “a capacidade de controlar e reestruturar a matéria em níveis atômicos e moleculares na faixa de aproximadamente 1 a 100 nm, e explorar as propriedades e fenômenos distintos nessa escala em comparação àqueles associados a átomos individuais, moléculas, ou do comportamento do material estendido (“bulk”). O objetivo é criar materiais, dispositivos e sistemas com propriedades e funções fundamentalmente novas, construindo-as a partir da sua pequena estrutura. A transição do comportamento de átomos individuais ou moléculas para o comportamento coletivo de conjuntos atômicos e moleculares é encontrada na natureza, e a nanotecnologia explora esse limiar natural.” Esta definição foi acordada em 1998-1999 após consulta com especialistas em mais de 20 países (SIEGEL et al., 1999). Desde então, houve uma explosão impressionante de produtos que utilizam nanotecnologia em sua composição.

Além dos benefícios tecnológicos esperados do desenvolvimento da nanotecnologia, a potencial entrada no mercado de várias centenas de nanoprodutos levanta questões cruciais, que lidam com a avaliação de riscos tanto humanos, quanto ambientais. A identificação tanto do modo de ação, quanto dos mecanismos que causam a toxicidade dos nanomateriais (NMs) tornou-se uma área de preocupação significativa. Questões referentes às propriedades químicas, tamanho e estabilidade, da dispersão aquosa, podem ter consequências importantes para a toxicidade, assim como tamanho, composição, morfologia e estrutura (BELLO; LEONG, 2017). Como consequência existe uma enorme discrepância nos dados de nanotoxicidade adquiridos em materiais semelhantes, criando confusão e impedindo a avaliação precisa dos riscos dos NMs para a saúde humana e meio ambiente (QIU; CLEMENT; HAYNES, 2018).

Ao contrário das moléculas, que são objetos de estudo na toxicologia tradicional, as propriedades únicas das nanopartículas (NPs) podem afetar a medição precisa da nanotoxicidade. Por exemplo, o status dos NMs sob diferentes condições de teste, como estado de agregação e presença de moléculas adsorvidas na superfície (“corona”), pode variar drasticamente de um meio de teste para outro e resultar em mudanças na toxicidade (NEL et al., 2009). Além disso, os ensaios de nanotoxicidade estão sujeitos às propriedades óticas, catalíticas, magnéticas, entre

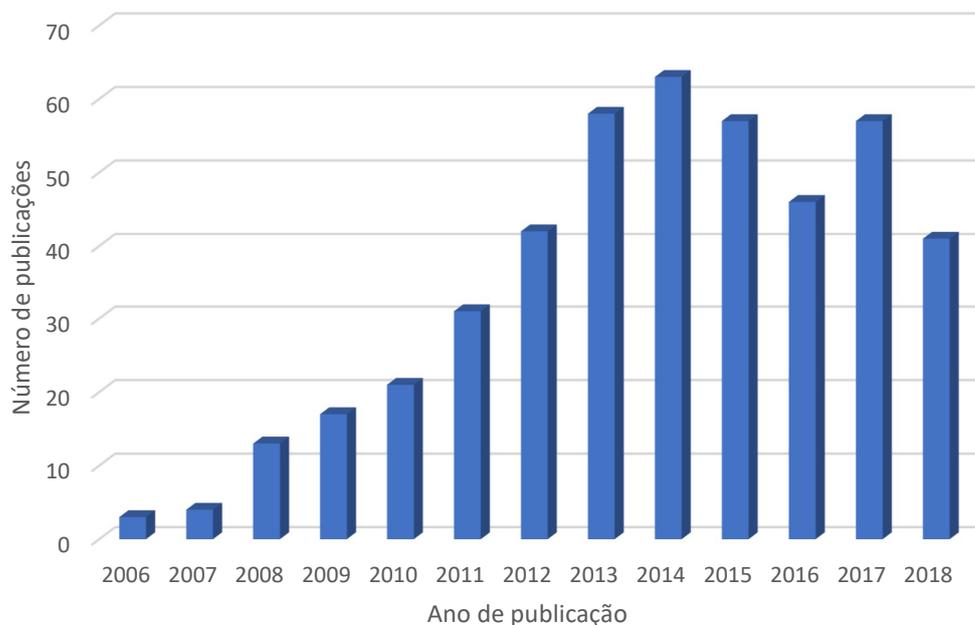
outras, que são específicas para cada tipo de NM e levam a sub ou superestimação da toxicidade (DUSINSKA et al., 2015).

O gerenciamento dessas discrepâncias tem sido um desafio para químicos analíticos e toxicologistas. Recentemente esse desafio tem sido ainda maior, pois a síntese de nanomateriais não mais tem se baseado em uma única nanopartícula (NP), mas em um conjunto hierárquico de nanopartículas, formando os chamados nanohíbridos (NHs) (SALEH et al., 2015). Esse material híbrido tem como objetivo criar NMs com múltiplas e/ou novas funcionalidade. No entanto, não está claro se o nosso conhecimento quanto aos riscos ambientais de NM singulares também pode ser aplicado a um NH, composto por mais de um NM. A incerteza na avaliação da saúde ambiental e segurança desta classe de material é devido às suas propriedades físico-químicas alteradas e ao surgimento de novas propriedades, não tipicamente manifestadas pelos NMs que compõem o NH (SALEH et al., 2014).

Novos estudos nessa área têm indicado que a combinação de dióxido de titânio (TiO_2) com nanotubos de carbono (CNT) possibilita uma maior foto-sensibilidade, melhorando a eficiência fotocatalítica (ZHANG et al., 2014). Os CNT são excelentes suportes para este tipo de material, devido às suas propriedades mecânicas, grande área superficial específica, estabilidade química e também pela presença de mesoporos que favorecem a difusão das espécies reagentes (OH; CHEN, 2008). Recentes descobertas indicam que com a adição de CNT a absorção de luz do TiO_2 pode ser estendida para a região de luz visível, aumentando significativamente a eficiência fotocatalítica (WOAN; PYRGIOTAKIS; SIGMUND, 2009). Além disso, espera-se que com o aumento da área superficial ocorra um aumento da quantidade de poluentes adsorvidos, conseqüentemente da atividade fotocatalítica. A união dos CNT com TiO_2 realmente tem se mostrado promissor na degradação de diversos poluentes, como dos corantes alaranjado de metila (DA DALY; ALVES; BERGMANN, 2013), anilina (SILVA; FARIA, 2010), azul de metileno (CHEN; ZHANG; OH, 2008), rodamina B (KRISANASAERANEE et al., 2010), azul índigo (DA SILVA et al., 2018) e também dos poluentes fenol (YAO et al., 2008) e atrazina (CHEN et al., 2011). Esses estudos indicam a importância do desenvolvimento dessa tecnologia na descontaminação ambiental.

Devido à grande importância dessa tecnologia, a produção dessas NPs vem sendo cada vez mais incentivada (figura 1), porém a preocupação quanto a sua toxicidade e segurança, quando liberadas no ambiente, é grande. A toxicidade dos materiais fotoreativos tem sido claramente demonstrado em vários estudos. Ma, Brennan e Diamond (2012a) estudaram a toxicidade do TiO_2 após a fotoativação e observaram um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e consequentemente um aumento na toxicidade. O mesmo foi encontrado por Miller et al. (2012) e Li et al. (2014) ao estudarem a fototoxicidade do TiO_2 em *Isochrysis galbana* e *Hyalella azteca*, respectivamente. Clemente et al. (2014b) estudaram o efeito das NP de TiO_2 em *Danio rerio* e observaram que após a exposição a luz ultravioleta, essas NPs causam um aumento da taxa de mortalidade e efeitos subletais, como eclosão prematura, problemas durante o desenvolvimento e alterações no equilíbrio. Além disso, Federici, Shaw e Handy (2007) reportaram que a ingestão de TiO_2 por peixes pode causar erosão no epitélio intestinal e Zhang e et al. (2007) observaram que, após a exposição de peixes ao TiO_2 por 25 dias, este promoveu a bioacumulação do material.

Figura 1 - Número de publicações relacionadas a CNT e TiO_2 , termo pesquisado: TiO_2 -CNT e suas variações



Fonte: Web of Knowledge (<http://www.webofknowledge.com>). Acessado em 27/10/2018.

Os CNT também já foram estudados quanto a sua toxicidade. Smith, Shaw e Handy (2007) observaram que este material pode provocar inflamação nas guelras de peixes e um aumento da produção de muco, podendo causar problemas respiratórios. Cheng e Cheng (2012) estudaram o efeito da exposição dos CNT em embriões de *Danio rerio* e os resultados mostraram que essas partículas podem causar malformação e edemas. Estudos realizados com Daphnias mostraram que quando ingeridos os CNTs não são eliminados pelos organismos, podendo causar entupimento do trato intestinal e, acarretar a transferência pela cadeia alimentar (PETERSEN et al., 2009; EDGINGTON et al., 2010). As algas *Raphidocelis subcapitata*, *Chlorella vulgaris* e *Chlorella pyrenoidosa* também podem sofrer com a exposição ao CNT, já que alguns estudos indicam que essas NPs podem causar inibição do crescimento para esses organismos (SOHN et al., 2015; ZHANG et al., 2015).

Apesar de existirem diversos trabalhos enfatizando os benefícios do uso das NP de TiO₂-CNT, ainda não existem publicações abordando sua ecotoxicidade. Visto que, como mostrado acima, a toxicidade destes NMs, individualmente, podem causar efeitos deletérios em diversos organismos, além de que, a toxicidade pode aumentar em proporção direta com o aumento da fotoreatividade (LI et al., 2014b), é importante o estudo da toxicidade deste NH, para controle e proteção da saúde humana e do ambiente.

Assim, ensaios ecotoxicológicos *in vivo* e *in vitro* são extremamente importantes para garantir a segurança no uso destes materiais.

1.1 Justificativa e Objetivo

A nanotecnologia oferece a perspectiva de grandes avanços que poderão melhorar a qualidade de vida e ajudar a preservar o meio ambiente. Entretanto, como qualquer área da tecnologia que faz uso intensivo de novos materiais e substâncias químicas, traz consigo alguns riscos ao meio ambiente e à saúde humana (QUINA, 2004). As características que tornam as nanopartículas fotorreativas interessantes, do ponto de vista de aplicação tecnológica, podem ser indesejáveis quando liberadas no meio ambiente, como é o caso do TiO₂ que pode

ter sua toxicidade aumentada quando fotoativado (MA; BRENNAN; DIAMOND, 2012b; MILLER et al., 2012; CLEMENTE et al., 2014a, 2015).

Visto que, a funcionalização dos nanotubos de carbono com TiO_2 , traz um aumento da fotossensibilidade e da eficiência fotocatalítica (WOAN; PYRGIOTAKIS; SIGMUND, 2009; ZHANG et al., 2014), pode causar um aumento da toxicidade. Diversos autores têm estudado a produção de nanopartículas de TiO_2 -CNT e os benefícios que ela pode trazer ao ambiente, em termos de remediação ambiental (CHEN; ZHANG; OH, 2008; YAO et al., 2008; DA DALY; ALVES; BERGMANN, 2013). Porém, uma vez que não existem dados a respeito da sua ecotoxicidade, os resultados obtidos neste trabalho poderão auxiliar os órgãos legisladores e comunidade científica na delimitação de níveis máximos permissíveis nos compartimentos ambientais ou não permitir sua liberação ao meio ambiente.

Existem diversos modelos biológicos utilizados na nanotoxicologia. Eles podem ser animais (*in vivo*), tecidos ou células (*in vitro*). Nos ensaios *in vivo* são avaliados parâmetros como: mortalidade, desenvolvimento, respostas fisiológicas, etc. Nos ensaios *in vitro* geralmente é utilizado células, nestes ensaios é possível analisar o mecanismo de interação entre o nanomaterial e células. Esses ensaios são complementares e juntos correlacionar os resultados permite uma compreensão mais profunda do modo de toxicidade das nanopartículas (MAURER-JONES; HAYNES, 2012).

Um modelo, para ensaios *in vivo*, que vem se destacando é o peixe *Danio rerio*. Principalmente devido a facilidade na manutenção, rápido ciclo de vida e principalmente por possuir 70% de similaridade genética a mamíferos (HOWE et al., 2013). Além disso, o ensaio com embriões de peixes (FET), utilizando *D rerio*, é uma alternativa para substituir o teste com peixes adultos, portanto estando dentro do princípio de redução, refinamento e substituição (3Rs). Ainda dentro deste princípio ensaios *in vitro* baseados em células são promissores para o estudo da nanotoxicidade. Uma linhagem celular amplamente utilizada em ensaios ecotoxicológicos é a de fibroblastos de truta arco-íris (RTG-2), esta foi a primeira linhagem de células de animais de sangue frio a ser estabelecida (WOLF; QUIMBY, 1962). Desde então vem sendo amplamente utilizada em ensaios ecotoxicológicos (DENIZEAU, 2018).

Portanto o presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a nanotoxicidade *in vitro* e *in vivo* do nanomaterial híbrido TiO₂-MWCNT, utilizando embriões do peixe *Danio rerio* e a linhagem celular (RTG-2).

1.2 Estrutura da tese e fluxograma experimental

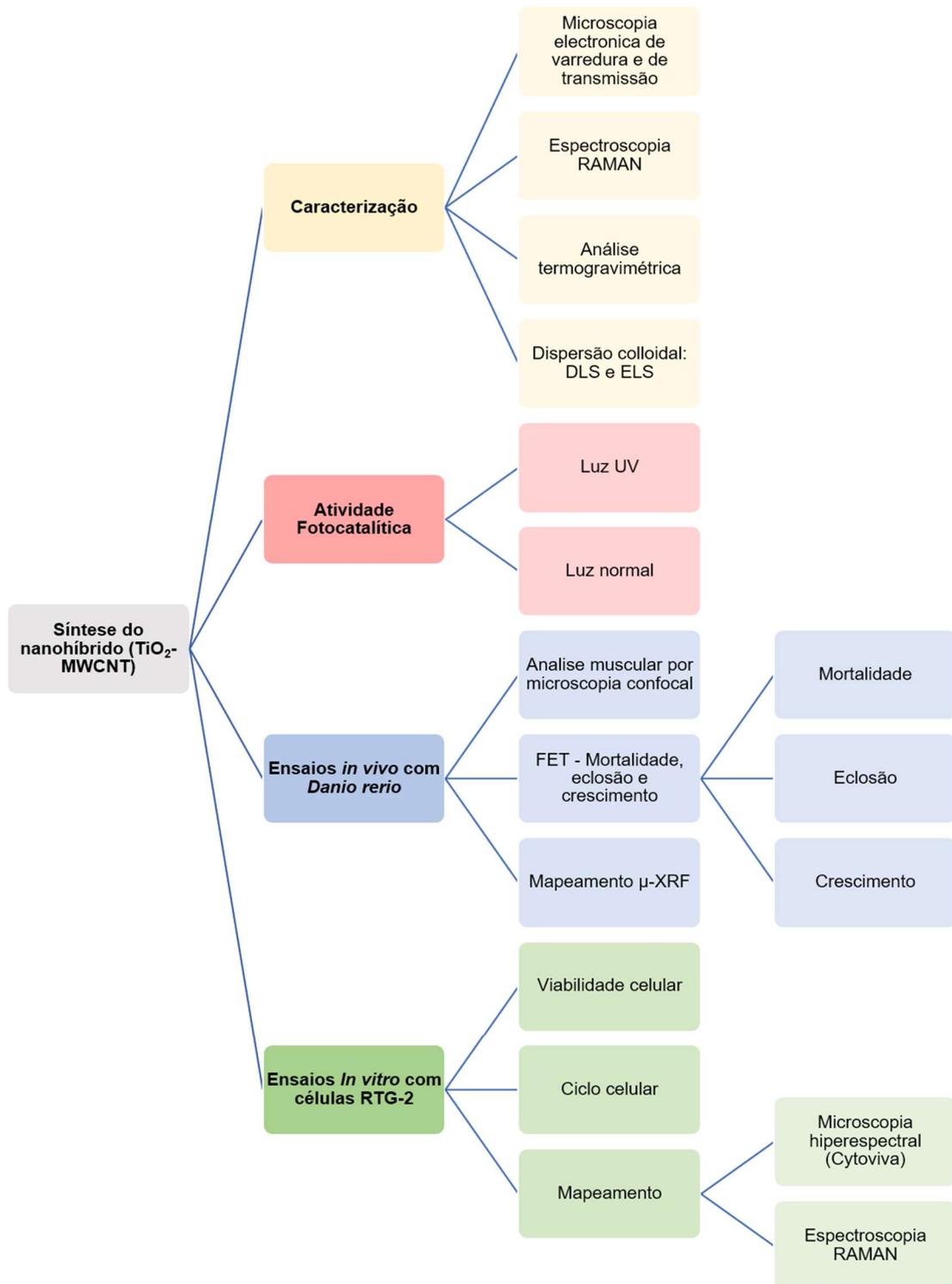
Este documento compreende um texto introdutório seguido de quatro capítulos apresentados em formato de artigos científicos. Os capítulos são intitulados:

- 1: Oxidação química e caracterização de nanotubos de carbono;
- 2: Síntese e caracterização do nanomaterial híbrido TiO₂-MWCNT com atividade fotocatalítica aprimorada;
- 3: Avaliação da toxicidade do nanomaterial híbrido TiO₂-MWCNT em embriões de *Danio rerio* (zebrafish);
- 4: Avaliação toxicológica do nanomaterial híbrido TiO₂-MWCNT em fibroblastos de truta arco-íris (RTG-2).

Parte desta tese já foi publicada na revista *Ecotoxicology and Environmental Safety* em 2018. O trabalho foi intitulado: “Toxicity assessment of TiO₂-MWCNT nanohybrid material with enhanced photocatalytic activity on *Danio rerio* (Zebrafish) embryos” (DA SILVA et al., 2018)

A Figura 2 mostra o fluxograma experimental das principais técnicas utilizadas no o desenvolvimento deste trabalho.

Figura 2 - Fluxograma experimental



Referências

BELLO, D.; LEONG, D. T. A decade of nanotoxicology: Assessing the impact on human health and the environment! **NanoImpact**, Amsterdam, v. 7, p. 15–16, Apr. 2017.

CHEN, H.; YANG, S.; YU, K.; JU, Y.; SUN, C. Effective photocatalytic degradation of atrazine over Titania-Coated Carbon Nanotubes (CNTs) coupled with microwave energy. **The Journal of Physical Chemistry A**, Washington, v. 115, n. 14, p. 3034–3041, Apr. 2011.

CHEN, M. L.; ZHANG, F. J.; OH, W. C. Photocatalytic degradation of methylene blue by CNT/TiO₂ composites prepared from MWCNT and titanium n-butoxide with benzene. **Journal of the Korean Ceramic Society**, Seosan, v. 45, n. 11, p. 651–657, Nov. 2008.

CHENG, J.; CHENG, S. H. Influence of carbon nanotube length on toxicity to zebrafish embryos. **International Journal of Nanomedicine**, Jerusalem, v. 7, p. 3731–3739, Jul. 2012.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V. L. S. S.; MOURA, M. A. M.; JONSSON, C. M.; FRACETO, L. F. Toxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in zebrafish embryos under different exposure conditions. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 147, p. 129–139, Fev. 2014b.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V. L.; FEITOSA, L. O.; LIMA, R.; JONSSON, C. M.; N. MAIA, a. H.; FRACETO, L. F. Biomarker evaluation in fish after prolonged exposure to Nano-TiO₂: Influence of illumination conditions and crystal phase. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Washington, v. 15, n. 7, p. 5424–5433, Jul. 2015.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V. L.; JONSSON, C. M.; FRACETO, L. F. Minimal levels of ultraviolet light enhance the toxicity of TiO₂ nanoparticles to two representative organisms of aquatic systems. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 16, n. 8, p. 2559, Ago. 2014a.

DA DALT, S.; ALVES, A. K.; BERGMANN, C. P. Photocatalytic degradation of methyl orange dye in water solutions in the presence of MWCNT/TiO₂ composites. **Materials Research Bulletin**, Boise, v. 48, n. 5, p. 1845–1850, May 2013.

DA SILVA, G. H.; CLEMENTE, Z.; KHAN, L. U.; CÔA, F. NETO, L. L. R.; CARVALHO, H. W. P.; CASTRO, V. L.; MARTINEZ, D. S. T.; MONTEIRO, R. T. R. Toxicity assessment of TiO₂-MWCNT nanohybrid material with enhanced photocatalytic activity on Danio rerio (Zebrafish) embryos. **Ecotoxicology and environmental safety**, Amsterdam, v. 165, p. 136-143, 2018.

DUSINSKA, M. et al. Towards an alternative testing strategy for nanomaterials used in nanomedicine: Lessons from NanoTEST. **Nanotoxicology**, London, v. 9, p. 118–132, 25 May 2015. Suppl. 1.

EDGINGTON, A. J.; ROBERTS, A. P.; TAYLOR, L. M.; ALLOY, M. M.; REPERT, J.; RAO, A. M.; MAO, J.; KLAINE, S. J. The influence of natural organic matter on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 29, n. 11, p. 2511–2518, Nov. 2010.

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. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 84, p. 415–430, 2007.

KRISSANASAERANEE, M.; WONGKASEMJIT, S.; CHEETHAM, A. K.; EDER, D. Complex carbon nanotube-inorganic hybrid materials as next-generation photocatalysts. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 496, n. 1, p. 133–138, 2010.

LI, S.; WALLIS, L. K.; MA, H.; DIAMOND, S. a. Phototoxicity of TiO₂ nanoparticles to a freshwater benthic amphipod: Are benthic systems at risk? **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 466–467, p. 800–808, 2014.

MA, H.; BRENNAN, A.; DIAMOND, S. a. Photocatalytic reactive oxygen species production and phototoxicity of titanium dioxide nanoparticles are dependent on the solar ultraviolet radiation spectrum. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 31, n. 9, p. 2099–2107, 2012a.

MA, H.; BRENNAN, A.; DIAMOND, S. A. Phototoxicity of TiO₂ nanoparticles under solar radiation to two aquatic species: *Daphnia magna* and Japanese medaka. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 31, n. 7, p. 1621–1629, jul. 2012b.

MAURER-JONES, M. A.; HAYNES, C. L. Toward correlation in in vivo and in vitro nanotoxicology studies. **The Journal of Law, Medicine & Ethics**, v. 40, n. 4, p. 795–801, 2012.

MILLER, R. J.; BENNETT, S.; KELLER, A. a.; PEASE, S.; LENIHAN, H. S. TiO₂ nanoparticles are phototoxic to marine phytoplankton. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 1, 2012.

NEL, A. E.; MÄDLER, L.; VELEGOL, D.; XIA, T.; HOEK, E. M. V.; SOMASUNDARAN, P.; KLAESSIG, F.; CASTRANOVA, V.; THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. **Nature Materials**, London, v. 8, n. 7, p. 543–557, jul. 2009.

OH, W.-C.; CHEN, M.-L. Synthesis and Characterization of CNT/TiO₂ Composites Thermally Derived from MWCNT and Titanium(IV) n-Butoxide. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, Seoul, v. 29, n. 1, p. 159–164, jan. 2008.

PETERSEN, E. J.; AKKANEN, J.; KUKKONEN, J. V. K.; WEBER, W. J. Biological Uptake and Depuration of Carbon Nanotubes by *Daphnia magna*. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 43, n. 8, p. 2969–2975, apr. 2009.

QIU, T. A.; CLEMENT, P. L.; HAYNES, C. L. Linking nanomaterial properties to biological outcomes: analytical chemistry challenges in nanotoxicology for the next decade. **Chemical Communications**, Cambridge, v. 54, n. 91, p. 12787–12803, nov. 2018.

QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 1028–1029, dez. 2004.

SALEH, N. et al. Emergent Properties and Toxicological Considerations for Nanohybrid Materials in Aquatic Systems. **Nanomaterials**, Basel, v. 4, n. 2, p. 372–407, jun. 2014.

SIEGEL, R. W.; HU, E.; ROCO, M. C.; COX, D. M.; GORONKIN, H. **Nanostructure science and technology**. A worldwide study. Washington, DC: National Science and Technology Council, 1999.

SILVA, C. G.; FARIA, J. L. Photocatalytic oxidation of phenolic compounds by using a carbon nanotube-titanium dioxide composite catalyst. **ChemSusChem**, Weinheim, v. 3, n. 5, p. 609–618, 2010.

SMITH, C.; SHAW, B.; HANDY, R. Toxicity of single walled carbon nanotubes to rainbow trout, (*Oncorhynchus mykiss*): Respiratory toxicity, organ pathologies, and other physiological effects. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 82, n. 2, p. 94–109, may 2007.

SOHN, E. K.; CHUNG, Y. S.; JOHARI, S. A.; KIM, T. G.; KIM, J. K.; LEE, J. H.; LEE, Y. H.; KANG, S. W.; YU, I. J. Acute Toxicity Comparison of Single-Walled Carbon Nanotubes in Various Freshwater Organisms. **BioMed Research International**, New York, v. 2015, p. 1–7, jan. 2015.

WOAN, K.; PYRGIOTAKIS, G.; SIGMUND, W. Photocatalytic Carbon-Nanotube-TiO₂ Composites. **Advanced Materials**, Weinheim, v. 21, n. 21, p. 2233–2239, 2009.

YAO, Y.; LI, G.; CISTON, S.; LUEPTOW, R. M.; GRAY, K. a. Photoreactive TiO₂/Carbon Nanotube Composites: Synthesis and Reactivity. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 42, n. 13, p. 4952–4957, 2008.

ZHANG, L.; LEI, C.; CHEN, J.; YANG, K.; ZHU, L.; LIN, D. Effect of natural and synthetic surface coatings on the toxicity of multiwalled carbon nanotubes toward green algae. **Carbon**, New York, v. 83, p. 198–207, mar. 2015.

ZHANG, X.; SUN, H.; ZHANG, Z.; NIU, Q.; CHEN, Y.; CRITTENDEN, J. C. Enhanced bioaccumulation of cadmium in carp in the presence of titanium dioxide nanoparticles. **Chemosphere**, New York, v. 67, n. 1, p. 160–166, feb. 2007.

ZHANG, Y.; UTKE, I.; MICHLER, J.; ILARI, G.; ROSSELL, M. D.; ERNI, R. Growth and characterization of CNT–TiO₂ heterostructures. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, Frankfurt, v. 5, p. 946–955, 2014.

2 OXIDAÇÃO QUÍMICA E CARACTERIZAÇÃO DE NANOTUBOS DE CARBONO

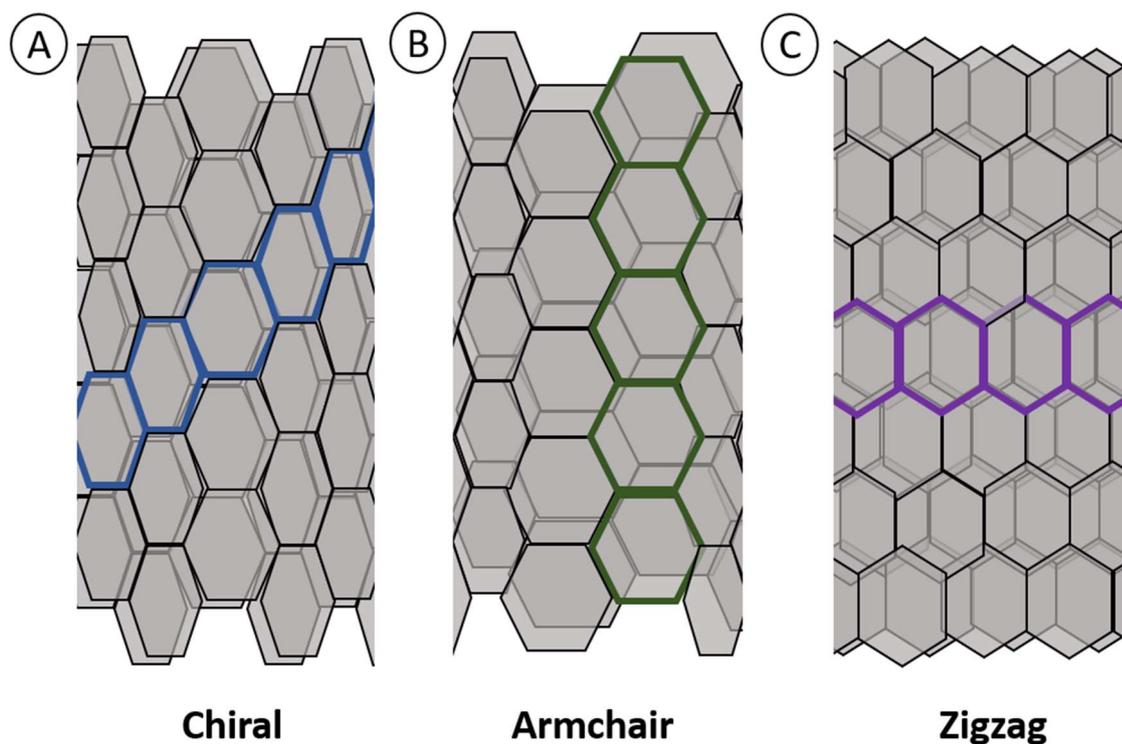
2.1 Introdução

Os CNTs foram descobertos em 1991 por Iijima (1991), desde então é um dos NMs mais estudados em diversos ramos, como na biotecnologia, eletrônica, agricultura, química e diversos outros. Essa diversidade de aplicações acontece em razão de suas propriedades extraordinárias, como, grande área superficial, condutividade térmica, grande resistência mecânica, flexibilidade e estabilidade química (EATEMADI et al., 2014).

Existem basicamente dois tipos de CNT: o de parede única (SWCNT) e o de parede múltipla (MWCNT). O SWCNT consiste, basicamente, em uma folha de grafeno enrolada em um cilindro, com diâmetro na ordem de 1,4 nm. O MWCNT consiste em cilindros concêntricos com um espaçamento entre camadas de 3,4 Å e um diâmetro tipicamente na ordem de 10 a 20 nm. O comprimento dos nanotubos pode ser de centenas de microns até centímetros (DAI, 2002).

Além disso, podem ter três diferentes formas, dependendo da posição que o cilindro é enrolado: “zigzag”, “armchair” e “chiral” (Figura 3). Essa estrutura é caracterizada por um par de índices (n, m) que descreve a quiralidade do vetor e um ângulo quiral θ , determinando a direção de enrolamento da folha. Quando $n = m$ o nanotubo é denominado “armchair” ($\theta = 0^\circ$), quando $m = 0$ é denominado “zigzag” ($\theta = 30^\circ$) e quando $n \neq m$ o nanotubo é denominado “chiral” ($0^\circ < \theta < 30^\circ$). As propriedades eletrônicas do NTC estão diretamente relacionadas com a sua quiralidade, nanotubos do tipo “armchair” são sempre metálicos, enquanto que os “chiral” ou zigzag podem ser metálicos ou semicondutores. No MWCNT, o enrolamento das folhas pode variar de parede para parede, portanto, é difícil prever suas propriedades eletrônicas (EATEMADI et al., 2014).

Figura 3 - Representação esquemática dos três tipos de nanotubo de carbono. A) Chiral; B) Armchair; C) Zigzag



Fonte: Do autor.

Os métodos mais comumente utilizados para a síntese deste tipo de NM são: deposição química de vapor, ablação a laser ou descarga por arco. Uma vez sintetizado, esse material é denominado bruto (“RAW”), sendo um material extremamente hidrofóbico, e, portanto, possuindo baixa dispersabilidade e estabilidade em qualquer tipo de solvente. Além disso, após a síntese, são geradas impurezas, como resíduos metálicos, compostos poliaromáticos e carbono amorfo (ANDRADE et al., 2013).

Um passo importante para a aplicação do CNT é a sua purificação, afim de remover as impurezas da amostra e funcionalização, para melhorar a estabilidade do material. O tratamento mais utilizado para esta finalidade é a oxidação. Esse processo consiste em submeter o CNT a um refluxo com ácidos fortes e altas temperaturas. Sabe-se que a toxicidade dos CNTs está intimamente relacionada a quantidade de resíduo metálico (HURT; MONTHIOUX; KANE, 2006) e, portanto, a purificação é extremamente importante.

Além disso, o processo de purificação também introduz defeitos na estrutura do material, criando grupos funcionais contendo oxigênio, como grupos carboxílicos, hidroxílicos e cetonas. Esses grupos ajudam na estabilização eletrostática do material quando em água ou outros solventes, e servem como ancora para a funcionalização do CNT com outros NMs (STÉFANI et al., 2011). Embora a expectativa quanto a utilização dos CNTs seja muito alta em diversas áreas, ainda existem muitos desafios a serem superados, principalmente visando a sua aplicação em larga escala.

2.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo foi avaliar o efeito da oxidação química dos MWCNT com ácido nítrico (9M à 150 °C) em função do tempo (6 a 48 horas). E se este tratamento gera nanotubos com maior quantidade de oxigênio na superfície, sem que ocorra alterações estruturais significativas no material, melhorando sua dispersividade.

2.3 Materiais e Métodos

2.3.1 Oxidação

O MWCNT foi adquirido da CNT Co. Ltd - Incheon, Coreia do Sul. Eles possuem diâmetro de ~ 10 a 40 nm e comprimento de ~ 1 a 25 nm. A oxidação química do MWCNT foi realizada de acordo com a metodologia proposta por CÔa e colaboradores (CÔA et al., 2017), com modificações. Inicialmente, 1,0 g de MWCNT foi adicionado a 200 mL de ácido nítrico (HNO_3) 9,0 mol L^{-1} a 150° C, em sistema de refluxo. Foram preparadas seis oxidações, variando o tempo de refluxo em: 6, 12, 24 e 48 horas. Após a oxidação as amostras foram filtradas a vácuo, utilizando uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE) com porosidade de 0,2 μm e lavadas com água ultrapura até o pH atingir a neutralidade. Após esse processo as amostras foram congeladas e liofilizadas. Os materiais obtidos foram denominados nanotubos de parede múltipla oxidados (ox-MWCNT) no tempo de 6, 12, 24 e 48 horas, respectivamente.

2.3.2 Caracterização

Para a microscopia eletrônica de varredura (MEV), as amostras foram preparadas utilizando suspensões de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ da amostra dos ox-MWCNT, em isopropanol. A dispersão foi sonicada por 10 min, em ultrassom de banho, depositadas em pastilhas de silício e secas à temperatura ambiente. As imagens foram obtidas utilizando o microscópio FEI Quanta 650 FEG, operado a 5 kV.

A estabilidade coloidal dos ox-MWCNT foi analisada utilizando um espectrofotômetro de luz visível (Multiskan GO, Thermo Scientific, UK), em 400 nm, após 0, 30, 60 e 120 min. Os ensaios de potencial zeta foram realizados em triplicata ($n = 3$) à temperatura ambiente, em um equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS90. Para essas análises foram preparadas suspensões dos NMs ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas em água ultrapura e estas foram dispersas em ultrassom de banho por 1 hora. A leitura foi feita logo após o preparo das dispersões.

Para avaliar o grau de oxidação dos ox-MWCNT, foi utilizada a espectroscopia Raman, a qual é muito utilizada na caracterização de materiais de carbono. Esses materiais apresentam três bandas características, as bandas D (1200 a 1400 cm^{-1}), G (1500 a 1600 cm^{-1}) e G' (2500 a 2700 cm^{-1}). Através dessas bandas pode-se determinar, utilizando a relação ID/IG, o grau de desordem dos carbonos, além de ser um indicador qualitativo de modificações químicas no CNT, é muito utilizada para a determinação do grau de oxidação destes materiais (ANDRADE et al., 2013). Foi utilizado o equipamento Horiba Jobin-Yvon LabRAM HR800, equipado com um laser de diodo com linha de excitação de 532 nm e potência de 50 mW. O espectro, da região de 500 cm^{-1} a 3500 cm^{-1} , foi obtido com grade de 600 linhas/mm e abertura confocal de $100 \mu\text{m}$. O mapa de uma região de $30 \times 30 \mu\text{m}^2$, com 25 pontos, incremento de $5 \mu\text{m}$, foram coletados com tempo de aquisição de 5 segundos, e 5 acumulações. A análise dos espectros foi realizada pelo cálculo da área sob a curva dos espectros referentes a banda D (1240 a 1460 cm^{-1}) e da banda G (1480 a 1700 cm^{-1}) das amostras. Em seguida foi calculado a razão ID/IG.

Para quantificar a extensão da oxidação do ox-MWCNT foi utilizada a análise termogravimétrica (TGA), monitorando a quantidade relativa de grupos oxigenados nas superfícies do material. Os testes ($n = 3$) foram feitos sob ar sintético a

100 mL min⁻¹ e de 5 °C min⁻¹ em um analisador termogravimétrico PerkinElmer Pyris 1 (Norwalk, CT) com temperatura iniciando em 20 °C e chegando a 800 °C. As extensões de modificação da superfície dos ox-MWCNT foram determinadas por espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raios-X (XPS). Os testes foram feitos em um espectrômetro Thermo Fisher Scientific K-Alpha (Waltham, MA). A pressão na câmara foi de aproximadamente 10 a 7 Pa e o método de Shirley foi utilizado para subtração de “background”. Os espectros exploratórios foram obtidos em três áreas por amostra, com resolução espacial de 400 µm e energia de 200 eV.

Para avaliar a quantidade de debris gerados pela oxidação do MWCNT foi feita uma dispersão de 1 mg mL⁻¹ do ox-MWCNT em 0,1 molar de NaOH. Essas amostras foram sonicadas por 2 min em ultrassom de banho, em potência máxima, seguida de agitação a temperatura ambiente por 1 hora. Após esse período as amostras foram filtradas em filtro seringa de celulose de 0,2 µm e a absorbância foi medida em espectrofotometro de UV-Vis (Multiskan GO, Thermo Scientific, UK) a 400 nm.

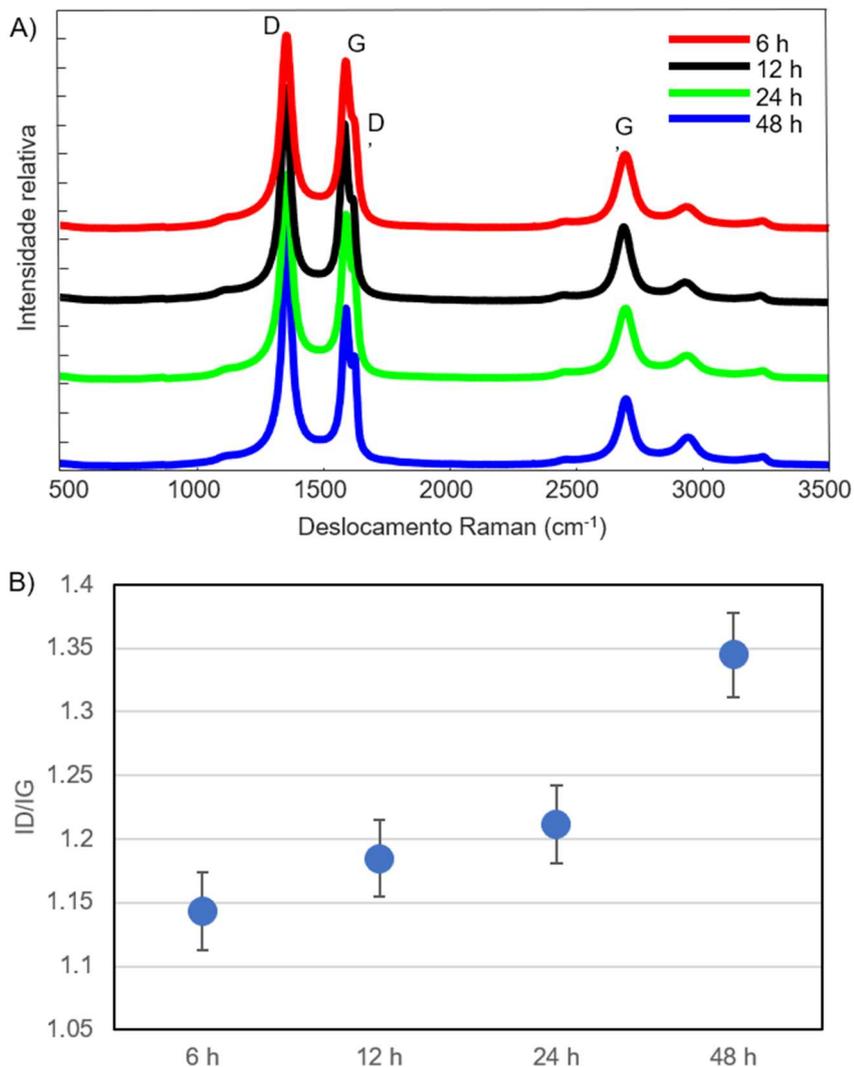
2.4 Resultados e Discussão

O uso de HNO₃ em altas temperaturas é importante para a criação de grupos funcionais na superfície do MWCNT. A presença desses grupos é crucial para a estabilização e dispersão do MWCNT em água, e de extrema importância para sua aplicação, tornando possível o manuseio e uso deste material em ambientes aquosos e fisiológicos, tornando-os então adequados para uma variedade de aplicações, como funcionalização, avaliação de toxicidade, e estudos ambientais (STÉFANI et al., 2011; ANDRADE et al., 2013). No entanto, além da funcionalização dos MWCNT, a caracterização físico-química integrada deste material, após a purificação e modificação química, é um ponto crítico a ser abordado, a fim de melhorar a qualidade e relevância dos dados obtidos (FADEEL et al., 2015). Para caracterizar o MWCNT diversas técnicas foram utilizadas, após o processo de oxidação.

Para avaliar os defeitos estruturais criados na superfície dos ox-MWCNT, devido à oxidação, foi utilizada a microscopia Raman. Através da Figura 4 A,

podemos observar o perfil dos espectros Raman dos ox-MWCNTs. Através da razão ID/IG é possível notar que o aumento do tempo de oxidação leva a um aumento na razão ID/IG (Figura 4 B). O aumento da intensidade da banda D, pode ser atribuído a mudanças estruturais dos ox-MWCNT causada pela oxidação. O mesmo foi observado por Andrade et al. (2013) ao aumenta a temperatura de oxidação para nanotubos de carbono.

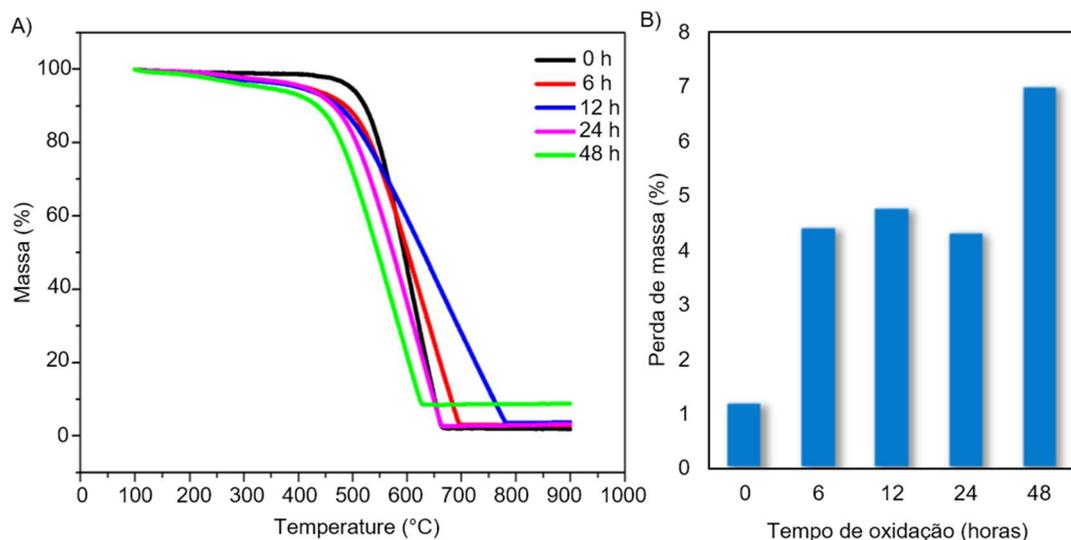
Figura 4 - (A) Espectro Raman e (B) relação ID/IG dos ox-MWCNT nos tempos de 6, 12, 24 e 48 horas



Para quantificar o grau de oxidação das amostras foi utilizado o TGA e XPS. A Figura 5 A refere-se a curva de decomposição dos ox-MWCNTs, em função do

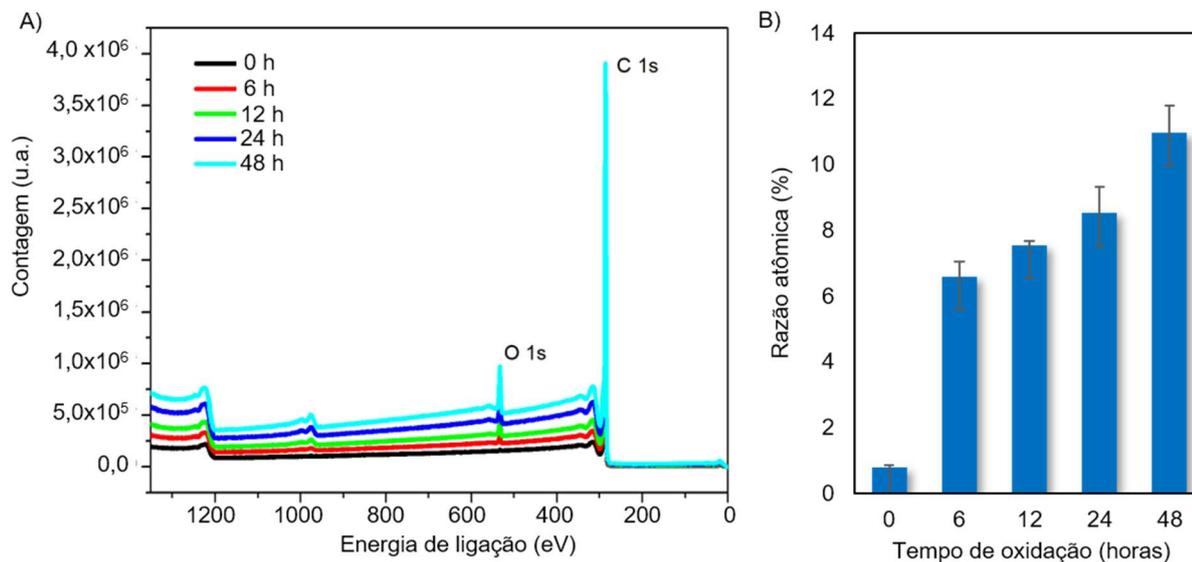
aumento da temperatura. Os grupos funcionais criados pela oxidação se decompõem em temperaturas de até 400 °C (SILVA et al., 2012). Portanto, as perdas de massa por TGA nesta temperatura, observadas na Figura 5 B, são relativas ao número de grupos oxigenados nas superfícies dos nanotubos de carbono. No entanto, os percentuais de perda de massa não mostraram relação direta com o tempo de oxidação, indicando uma baixa sensibilidade da TGA para essa caracterização.

Figura 5 - (A) Análise termogravimétrica, curva de perda de peso por temperatura; (B) Porcentagem de perda de massa a 400 °C das amostras de MWCNT oxidado por 0, 6, 12, 24 e 48 horas



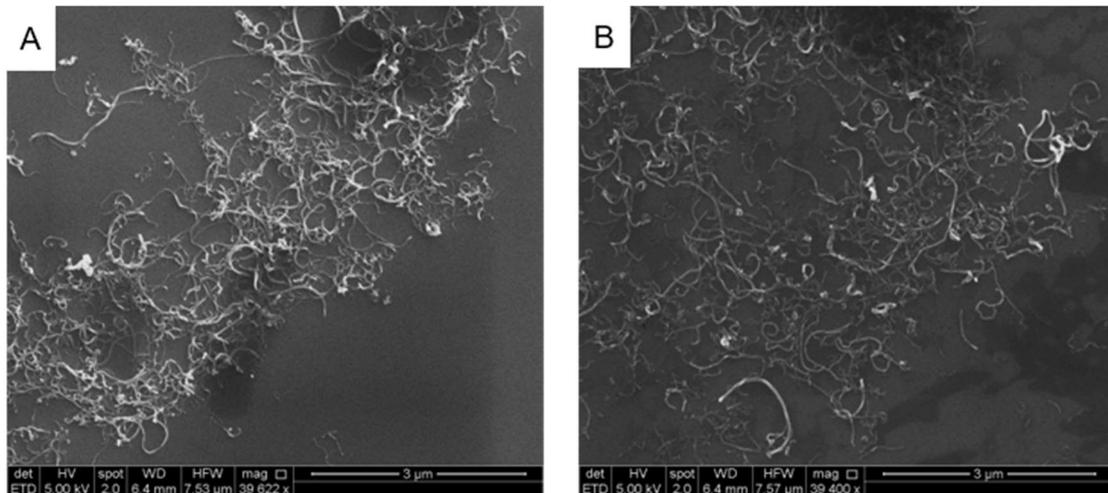
Em contraste, as diferenças entre os MWCNTs oxidados foram avaliadas com sucesso por XPS (Figura 6 A), sendo possível calcular as proporções atômicas de oxigênio dos picos de O 1s (aproximadamente 530 eV). Enquanto a proporção de oxigênio da amostra bruta (não oxidada) foi de 0,8% ($\pm 0,1$), a do ox-MWCNTs aumentaram com o tempo de oxidação variando de 6,5% a 11,0% com uma diferença menor que 2,5% em todas as situações (Figura 6 C).

Figura 6 – Análise de XPS do ox-MWCNT, oxidado nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas. (A) Espectros de levantamento XPS; (B) porcentagem de razões atômicas de oxigênio por XPS ocupando o pico de O 1s das amostras de ox-MWCNT



A fim de avaliar a morfologia do ox-MWCNT, e detectar se havia diferenças entre as oxidações, foi utilizado a microscopia eletrônica de varredura das amostras de 6 e 48 horas. Primeiramente, é possível observar pela Figura 7 que não houve outro tipo de partícula, que não nanotubos, confirmando a pureza da amostra. Também foi possível observar a tendência desse material em aglomerar, e como estavam enovelados, não foi possível medir os tubos. No entanto foi possível observar a presença de tubos curtos na amostra de ox-MWCNT por 48 horas (Figura 7 B).

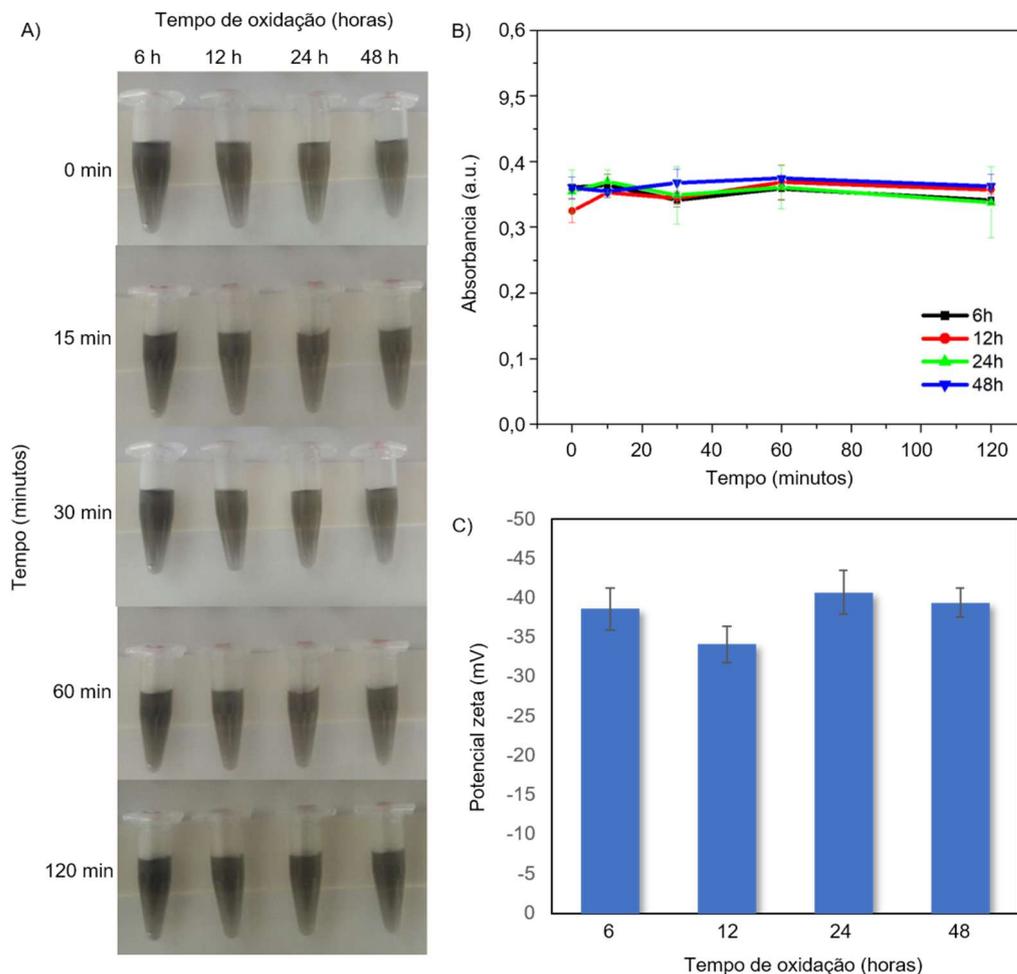
Figura 7 - Imagens de MEV em isopropanol: (A) ox-MWCNT-6, (B) ox-MWCNT-48



O comprimento do CNT é um parâmetro fundamental para estudos toxicológicos, visto que a penetração dos tubos na membrana celular depende do tamanho (KOSTARELOS, 2008). Por exemplo, Wang et al. (2018) estudaram o efeito de SWCNT em células epiteliais, macrófagos e *E. coli* e observaram que, tanto para macrófagos quanto para *E. coli*, a toxicidade estava relacionada com o tamanho dos nanotubos.

A dispersão dos materiais também foi analisada devido à importância de uma dispersão estável após a oxidação do NM para os ensaios nanotoxicológicos. Através das imagens apresentadas na Figura 8 A é possível observar que as amostras não apresentaram sedimentação após o tempo estudado. Além disso, não houve mudanças significativas nos valores de absorvância (Figura 8 C), e os valores de potencial zeta foram maiores que -30 mV (Figura 8 B), indicando uma estabilidade coloidal satisfatória. Wick et al. (2007) estudaram o efeito da aglomeração de nanotubos de carbono na citotoxicidade e observaram que, quando dispersos, os CNTs apresentaram menor toxicidade para células mesoteliais do que quando agregados. Resultados similares foram encontrados por Davoren et al. (2007) ao estudar o efeito de CNT em células epiteliais. Esses estudos reforçam a importância da dispersão em estudos nanotoxicológicos.

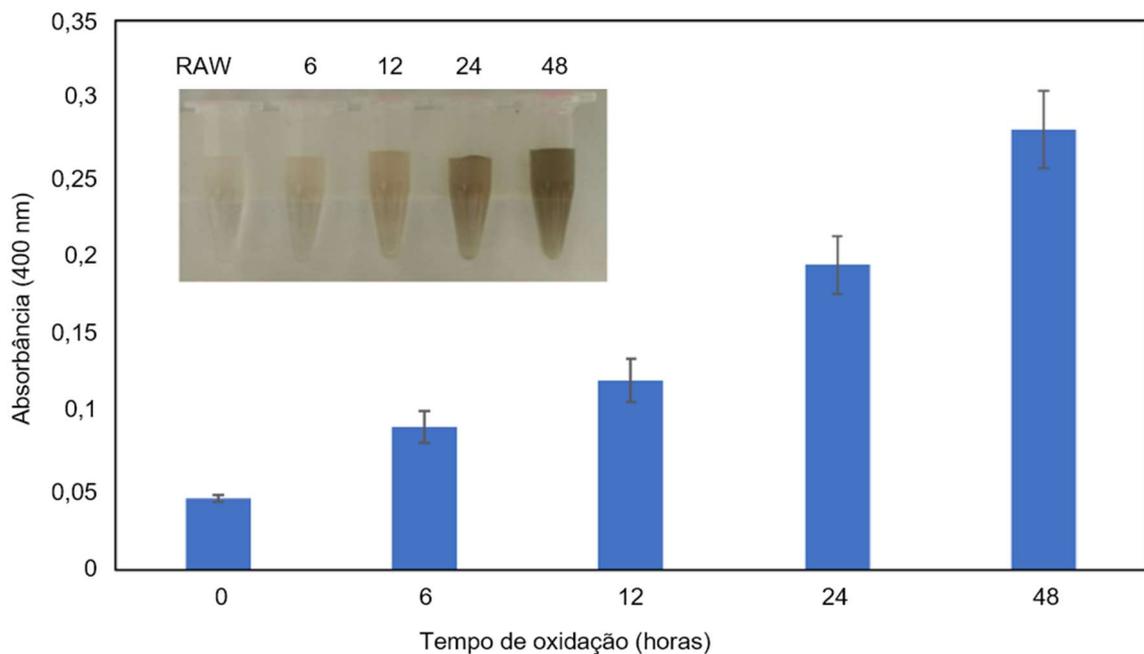
Figura 8 - Estudos de estabilidade coloidal de dispersões de ox-MWCNT. (A) Fotos (B) medidas de absorvância e (C) potencial zeta das disperões de ox-MWCNT após 0, 10, 30, 60 e 120 minutos



Um dos problemas relacionados ao tratamento ácido do CNT é a geração de debris oxidativos. Esses são, basicamente, pedaços de carbono amorfo liberados após o processo de purificação, ou folhas de compostos aromáticos policíclicos (STÉFANI et al., 2011). Através do UV-Vis foi possível observar, que com o aumento do tempo de oxidação, ocorreu um aumento da quantidade de debris oxidativos nas amostras de ox-MWCNT (Figura 9). Esse material pode influenciar o comportamento do NTC. Já existem estudos que comprovam que a presença de debris oxidativos pode ajudar na estabilização do NTC em água e outros solventes (HEISTER et al., 2010). Andrade et al. (2013) estudaram o efeito da temperatura de oxidação dos MWCNTs na geração de debris oxidativos, e em seus estudos observaram que esses debris eram formados por uma variedade de grupos oxigenados, tais como:

cetonas, éteres, álcoois, fenóis, ácidos carboxílicos, quinonas, lactonas e anidridos. Além disso a temperatura foi um fator crítico na formação de debris oxidativos na amostra de MWCNT.

Figura 9 - Espectro de UV-VIS de debris oxidativos extraídos do MWCNT após diferentes períodos de oxidação



Uma preocupação quanto a geração de debris oxidativos é a toxicidade que este subproduto pode trazer para a amostra. Stéfani et al. (2011) estudaram a toxicidade dos debris oxidativos em fibroblastos (BALB/c 3T3) e queratinócitos (HaCaT) na concentração de até 100 mg L^{-1} e não obtiveram resultados negativos para viabilidade celular. No entanto, Clemente et al. (2017) estudaram a toxicidade do oxido de grafeno (GO) com e sem debris oxidativos e observaram que a presença dos debris aumentou a toxicidade do GO para larvas de zebrafish. A presença dos debris aumenta a estabilidade do GO e, portanto, aumenta também a interação com o organismo, explicando a maior toxicidade. Este estudo mostra a influência e as implicações dos debris quando adsorvidos na superfície do grafeno, mostrando que seus efeitos sinérgicos não podem ser ignorados.

2.5 Conclusões

O aumento do tempo de oxidação do MWCNT causou um aumento da quantidade de grupos oxigenados na superfície do ox-MWCNT. Além disso, obtivemos amostras com grande estabilidade coloidal. Porém, essas características podem estar relacionadas com a geração de debris oxidativos durante o processo de oxidação, cujo aumento foi diretamente proporcional ao aumento do tempo de oxidação.

Referências

ANDRADE, N. F.; MARTINEZ, D. S. T.; PAULA, A. J.; SILVEIRA, J. V.; ALVES, O. L.; SOUZA FILHO, A. G. Temperature effects on the nitric acid oxidation of industrial grade multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Nanoparticle Research**, Dordrecht, v. 15, n. 7, p. 1761, jul. 2013.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V. L. S. S.; FRANQUI, L. S.; SILVA, C. A.; MARTINEZ, D. S. T. Nanotoxicity of graphene oxide: Assessing the influence of oxidation debris in the presence of humic acid. **Environmental Pollution**, Albany, v. 225, p. 118–128, jun. 2017.

CÔA, F.; STRAUSS, M.; CLEMENTE, Z.; RODRIGUES NETO, L. L.; LOPES, J. R.; ALENCAR, R. S.; SOUZA FILHO, A. G.; ALVES, O. L.; CASTRO, V. L. S. S.; BARBIERI, E.; MARTINEZ, D. S. T. Coating carbon nanotubes with humic acid using an eco-friendly mechanochemical method: Application for Cu(II) ions removal from water and aquatic ecotoxicity. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 607–608, p. 1479–1486, dec. 2017.

DAI, H. Carbon nanotubes: opportunities and challenges. **Surface Science**, Wisconsin, v. 500, n. 1–3, p. 218–241, mar. 2002.

DAVOREN, M.; HERZOG, E.; CASEY, A.; COTTINEAU, B.; CHAMBERS, G.; BYRNE, H. J.; LYNG, F. M. In vitro toxicity evaluation of single walled carbon nanotubes on human A549 lung cells. **Toxicology in Vitro**, Utrecht, v. 21, n. 3, p. 438–448, apr. 2007.

EATEMADI, A.; DARAEE, H.; KARIMKHANLOO, H.; KOUHI, M.; ZARGHAMI, N.; AKBARZADEH, A.; ABASI, M.; HANIFEHPOUR, Y.; JOO, S. Carbon nanotubes: properties, synthesis, purification, and medical applications. **Nanoscale Research Letters**, New York, v. 9, n. 1, p. 393, 2014.

FADEEL, B.; FORNARA, A.; TOPRAK, M. S.; BHATTACHARYA, K. Keeping it real: The importance of material characterization in nanotoxicology. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 468, p. 498–503, 2015.

HEISTER, E.; LAMPRECHT, C.; NEVES, V.; TÎLMACIU, C.; DATAS, L.; FLAHAUT, E.; SOULA, B.; HINTERDORFER, P.; COLEY, H. M.; SILVA, S. R. P.; MCFADDEN, J. Higher Dispersion Efficacy of Functionalized Carbon Nanotubes in Chemical and Biological Environments. **ACS Nano**, Washington, v. 4, n. 5, p. 2615–2626, may 2010.

HURT, R. H.; MONTHIOUX, M.; KANE, A. Toxicology of carbon nanomaterials: Status, trends, and perspectives on the special issue. **Carbon**, New York, v. 44, n. 6, p. 1028–1033, may 2006.

IJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, London, v. 354, n. 6348, p. 56–58, nov. 1991.

KOSTARELOS, K. The long and short of carbon nanotube toxicity. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 7, p. 774–776, jul. 2008.

SILVA, W. M.; RIBEIRO, H.; SEARA, L. M.; CALADO, H. D. R.; FERLAUTO, A. S.; PANIAGO, R. M.; LEITE, C. F.; SILVA, G. G. Surface properties of oxidized and aminated multi-walled carbon nanotubes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 23, n. 6, p. 1078–1086, jun. 2012.

STÉFANI, D.; PAULA, A. J.; VAZ, B. G.; SILVA, R. A.; ANDRADE, N. F.; JUSTO, G. Z.; FERREIRA, C. V.; FILHO, A. G. S.; EBERLIN, M. N.; ALVES, O. L. Structural and proactive safety aspects of oxidation debris from multiwalled carbon nanotubes. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 189, n. 1–2, p. 391–396, may 2011.

WANG, X.; LEE, J.-H.; LI, R.; LIAO, Y.-P.; KANG, J.; CHANG, C. H.; GUINEY, L. M.; MIRSHAFIEE, V.; LI, L.; LU, J.; XIA, T.; HERSAM, M. C.; NEL, A. E. Toxicological Profiling of Highly Purified Single-Walled Carbon Nanotubes with Different Lengths in the Rodent Lung and *Escherichia Coli*. **Small**, Weinheim, v. 14, n. 23, p. 1703915, jun. 2018.

WICK, P.; MANSER, P.; LIMBACH, L. K.; DETTLAFF-WEGLIKOWSKA, U.; KRUMEICH, F.; ROTH, S.; STARK, W. J.; BRUININK, A. The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 168, n. 2, p. 121–131, jan. 2007.

3 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DO NANOMATERIAL HÍBRIDO TiO₂-MWCNT COM ATIVIDADE FOTOCATALÍTICA APRIMORADA

3.1 Introdução

A nanotecnologia envolve um amplo espectro de áreas de pesquisa e atividades industriais, desde ciências fundamentais (física, química e biologia) até ciências aplicadas (eletrônica e materiais). A área ambiental é uma que vem se beneficiando destas tecnologias, as NPs vêm demonstrando desempenho promissor na remoção de poluentes e/ou na mitigação da toxicidade (LIU, 2006).

Desde sua descoberta em 1991 (IJIMA, 1991), os nanotubos de carbono atraíram atenção de várias comunidades científicas. Eles possuem propriedades únicas como alta resistência, rigidez, condutividade térmica, elétrica e grande área superficial (KOSTARELOS, 2008). Assim, vem inspirando tecnologias inovadoras na área ambiental, podendo ser utilizados como adsorventes, catalisadores, filtros e membranas (UPADHYAYULA et al., 2009). Vários estudos já demonstraram o potencial do CNT como adsorventes para a remoção de diversos tipos de poluentes, orgânicos e inorgânicos, como: 1,2-diclorobenzeno (PENG et al., 2003), trihalometanos (LU; CHUNG; CHANG, 2005), vários íons metálicos (LI et al., 2002, 2003; LU; LIU, 2006), entre outros. As propriedades de adsorção dos CNTs dependem de diversas características, como: pureza, porosidade, grupos funcionais de superfície, área superficial, densidade e do tipo de CNTs (aberto, fechado, de paredes múltiplas, etc.). Além disso, sua capacidade de adsorção pode ser aumentada através de modificações em sua superfície, como a oxidação. Essas modificações alteram as propriedades da superfície dos CNTs, tais como área, carga de superfície, hidrofobicidade e dispersão facilitando e aumentando a interação com o poluente (IHSANULLAH et al., 2016).

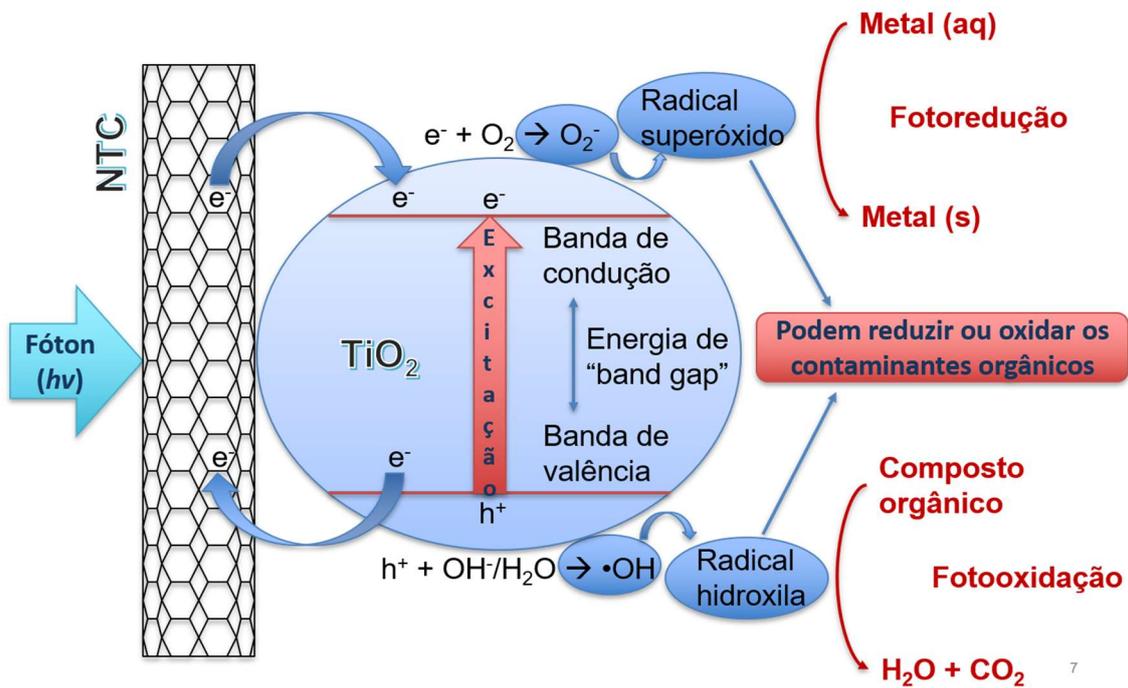
Outro NM que vem sendo amplamente empregado na área de descontaminação ambiental é a nanopartícula de dióxido de titânio (TiO₂). Utilizando processos oxidativos avançados (POAs), o TiO₂ pode fazer a eliminação de muitos compostos orgânicos tóxicos em águas residuais, ar e solo. O princípio dos POAs é o uso de um semicondutor como fotocatalisador (ex. TiO₂), para produzir radicais hidroxilas em água, sendo este um oxidante muito poderoso, capaz de oxidar uma

ampla gama de compostos orgânicos (DAGHRIR; DROGUI; ROBERT, 2013). Atualmente, o processo fotocatalítico, utilizando o TiO_2 , sob irradiação ultravioleta (UV) tem sido extensivamente aplicado para a oxidação de vários poluentes orgânicos e inorgânicos (CHATTERJEE; DASGUPTA, 2005; FUJISHIMA; ZHANG, 2006; BINAS; VENIERI; KOTZIAS, 2017; PUEYO et al., 2017).

Na fotocatalise, a luz, com energia maior que a da banda de condução do semicondutor, excita um elétron da banda de valência para a banda de condução, gerando um “buraco” positivo na banda de valência. Os “Buracos” positivos podem oxidar OH^- ou a água na superfície do semicondutor, produzindo radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$), que podem posteriormente oxidar espécies orgânicas. Além disso, os elétrons na banda de condução podem ser rapidamente capturados pelo oxigênio molecular adsorvido na partícula de titânio, sendo reduzidos, formando o radical superóxido (O_2^-) que pode reagir com H^+ para gerar o radical hidroperoxila ($\text{OOH}\cdot$), que por redução eletroquímica pode produzir peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Essas espécies reativas de oxigênio também podem contribuir para as vias oxidativas, como a degradação de um poluente (PELAEZ et al., 2012).

Duas limitações significativas para esse processo são a quantidade de energia necessária para ativar a fotocatalise, de aproximadamente 3,2 eV, fazendo-se necessário o uso de luz UV (abaixo de 380 nm) para a ativação do TiO_2 (DAIMEI CHEN et al., 2007), e a recombinação do elétron excitado, diminuindo a geração de espécies reativas e conseqüentemente a eficiência do processo (SCHNEIDER et al., 2014). Estudos recentes indicam que a combinação entre TiO_2 com MWCNT aumenta significativamente a eficiência fotocatalítica do material. O processo de adsorção é fundamental na degradação de poluentes orgânicos. O MWCNT pode adsorver poluentes, devido à sua grande área superficial específica e locais ativos de alta qualidade. Além disso, quando o TiO_2 interage com MWCNT há melhoras na separação entre as bandas e ocorre o transporte mais eficiente do elétron excitado, diminuindo a taxa de recombinação, a energia necessária para a excitação do elétron e aumentando a produção de radicais reativos (Figura 10). Como conseqüência, o nanomaterial híbrido TiO_2 -MWCNT, possui maior eficiência fotocatalítica, podendo ocorrer com ativação da luz visível (MIANDOAB; FATEMI, 2015).

Figura 10 - Mecanismo proposto para a atividade fotocatalítica do nanomaterial híbrido TiO₂-MWCNT



Fonte: Do autor.

A síntese de nanomateriais híbridos, como o TiO₂-MWCNT pode ser feita a partir de dois métodos de funcionalização: covalente e não covalente. Ambas possuem vantagens e desvantagens. A não covalente interfere pouco nas propriedades e estrutura do MWCNT, sendo os grupos funcionais mantidos por forças de van der Waals. A desvantagem é que este tipo de ligação é fraca e, portanto, os grupos podem ser separados com facilidade. No caso da funcionalização covalente, devem ser criados grupos funcionais na superfície do MWCNT, procedimento feito através da oxidação do material, causando a introdução de defeitos em sua estrutura. Este tipo de funcionalização garante uma ligação mais forte com os grupos funcionais (HIRSCH, 2002; BALASUBRAMANIAN; BURGHARD, 2005). A escolha do tipo de síntese depende da aplicação do material a ser desenvolvido.

A obtenção do TiO₂-MWCNT pode ocorrer por uma gama de métodos, desde simples, como a mistura mecânica, até os mais complexos, como deposição de vapor químico e "electrospinning". Os mais comumente utilizados são a síntese sol-gel e deposição hidrotérmica (YEN et al., 2008). Ambas as técnicas produzem

híbridos com eficiência fotocatalítica aprimorada, porém, demandam tempo, solventes, controle de pH e temperatura. Um método promissor para a funcionalização de CNT é o método mecanoquímico. Neste procedimento a energia mecânica pode ser transformada em força motriz para a modificação química de estruturas sólidas. Ele é geralmente realizado na ausência de qualquer solvente, portanto, pode ser considerado um método simples, de baixo custo e “eco-friendly” para a funcionalização de nanomateriais (MUÑOZ-BATISTA et al., 2018).

3.2. Objetivo

Este capítulo tem como objetivo sintetizar um nanomaterial híbrido, composto por nanopartículas de TiO_2 e MWCNT oxidado, com atividade fotocatalítica aprimorada, através do método mecanoquímico (moagem).

3.3 Materiais e Métodos

3.3.1 Síntese do TiO_2 -MWCNT

As nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2 , Aeroxide - P25) foram adquiridas da Degussa Evonik, e são constituídas de 20% rutilo e 80% anatase, possuem tamanho primário de 25 nm, área superficial de $50 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ e 99% de pureza. O MWCNT foi adquirido da CNT Co. Ltd - Incheon, Coreia do Sul. Esse material foi sintetizado através de deposição química de vapor e possui uma distribuição de comprimento de 1 a 25 μm e de 10 a 40 nm de diâmetro.

Antes da síntese do nanohíbrido foi realizado a oxidação do nanotubo de carbono realizada por 12 horas em ácido nítrico ($\text{HNO}_3 - 9,0 \text{ mol L}^{-1}$), sob sistema de refluxo, como descrito no capítulo 1 deste documento, sendo denominado ox-MWCNT.

Para a síntese do nano-híbrido o ox-MWCNT foi decorado com TiO_2 (Aeroxide - P25) por moagem manual, utilizando um almofariz e pistilo durante 15 minutos. O NH foi preparado em duas proporções, sendo 100 mg de TiO_2 com 30 mg de ox-MWCNT (10:3) e 100 mg de TiO_2 com 10 mg de ox-MWCNT (10:1).

3.3.2 Caracterização do TiO₂-MWCNT

Para avaliar a interação entre o ox-MWCNT com o TiO₂, e a morfologia das amostras foram utilizadas as técnicas de microscopia eletrônica de varredura (MEV), com o equipamento SEM-FEG FEI Inspecionar F50 e a microscopia eletrônica de transmissão (TEM), com o equipamento JEOL JEM 2100F TEM-FEG (tensão de 200 kV, Spot Size 1, Alpha Selector 3). Para a TEM, as amostras foram preparadas em água reconstituída e, adicionadas em grades de cobre revestidas de carbono (malha 400). Já para o MEV, as amostras foram preparadas em álcool isopropílico e, 3 microlitros da amostra foi adicionado sobre uma placa de silício e a análise foi realizada após secagem completa do material.

Para analisar a estabilidade térmica das amostras foi utilizada a análise termogravimétrica (TGA). Foi utilizado o instrumento STA 449 F3 Jupiter @ (NETZSCH, Selb, Alemão), utilizando ar sintético (50,0 mL min⁻¹) com taxa de aquecimento de 5 °C min⁻¹ até a temperatura de 750 °C.

As propriedades óticas das amostras foram investigadas através da espectroscopia Raman. As amostras foram preparadas a partir de uma solução estoque de 1 mg L⁻¹ em água ultrapura. Amostras de 100 µL desta dispersão foram acondicionadas em um porta-amostra de fluoreto de cálcio. Após a secagem, os espectros foram obtidos, a temperatura ambiente, utilizando o equipamento Horiba Jobin-Yvon LabRAM HR800, equipado com laser de diodo ($\lambda = 532$ nm). Em cada amostra foram medidos 25 pontos distintos, e o deslocamento Raman foi obtido entre 200 a 3500 cm⁻¹.

3.3.3 Ensaio de Atividade Fotocatalítica

A atividade fotocatalítica do TiO₂-MWCNT (10:3 e 10:1) foi avaliada através da decomposição do corante azul índigo (n ° 18, Guarany Ind.), em condições de luz visível e UV. Este estudo foi feito em placas de 24 poços, a 28 °C e em água reconstituída (composta de: 60,0 mg L⁻¹ de CaSO₄.2H₂O, 60,0 mg L⁻¹ de MgSO₄, 96,0 mg L⁻¹ de NaHCO₃ e 4,0 mg L⁻¹ de KCl), a fim de mimetizar as condições utilizadas nos ensaios de toxicidade (que serão descritos no capítulo 3). A luz foi

fornecida a partir de lâmpadas fluorescentes padrão (Phillips, 40 W), e a irradiação UV fornecida por lâmpadas de 40 W UVA340 Q-Panel®. As condições de iluminação foram as mesmas utilizadas em estudos anteriores com TiO₂ (CLEMENTE et al., 2014b).

A concentração do corante utilizada foi de 0,25 mg L⁻¹ e a concentração do NH na solução corante foi de 0,5 g L⁻¹ (KUO, 2009; WU; KUO; CHEN, 2013; HAMID et al., 2014; KAMIL et al., 2018). Inicialmente, a fim de alcançar o equilíbrio de adsorção (KIM; CHOI, 2015), o TiO₂-MWCNT foi adicionado à solução do corante e mantido em sonicação, no escuro, por 30 min. Após esse período, a solução foi irradiada com luz UV e visível por 60 min. Uma amostra controle mantida no escuro. Após 60 minutos, as amostras foram coletadas e então centrifugadas a 8000 xg (centrífuga Hitachi - F16RxII) por 15 min e colocadas em uma placa de 96 poços. A absorbância para cada amostra foi registrada por espectroscopia UV-Vis, no comprimento de onda de 580 nm. A eficiência de descoloração foi calculada pela razão entre a exposição à luz e ao escuro.

3.3.4 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas através do software Graphpad Prism v.5. Para analisar a atividade fotocatalítica dos materiais, considerando a interação entre as condições de iluminação (luz visível e ultravioleta) e os grupos de exposição (TiO₂, TiO₂-MWCNT 10:3 e TiO₂-MWCNT 10:1), foi utilizado ANOVA de duas vias. Para a comparação dos grupos, foi empregado o pós-teste de Bonferroni, adotando nível de significância de 5%. A normalidade dos dados foi determinada usando o teste de Shapiro-Wilk.

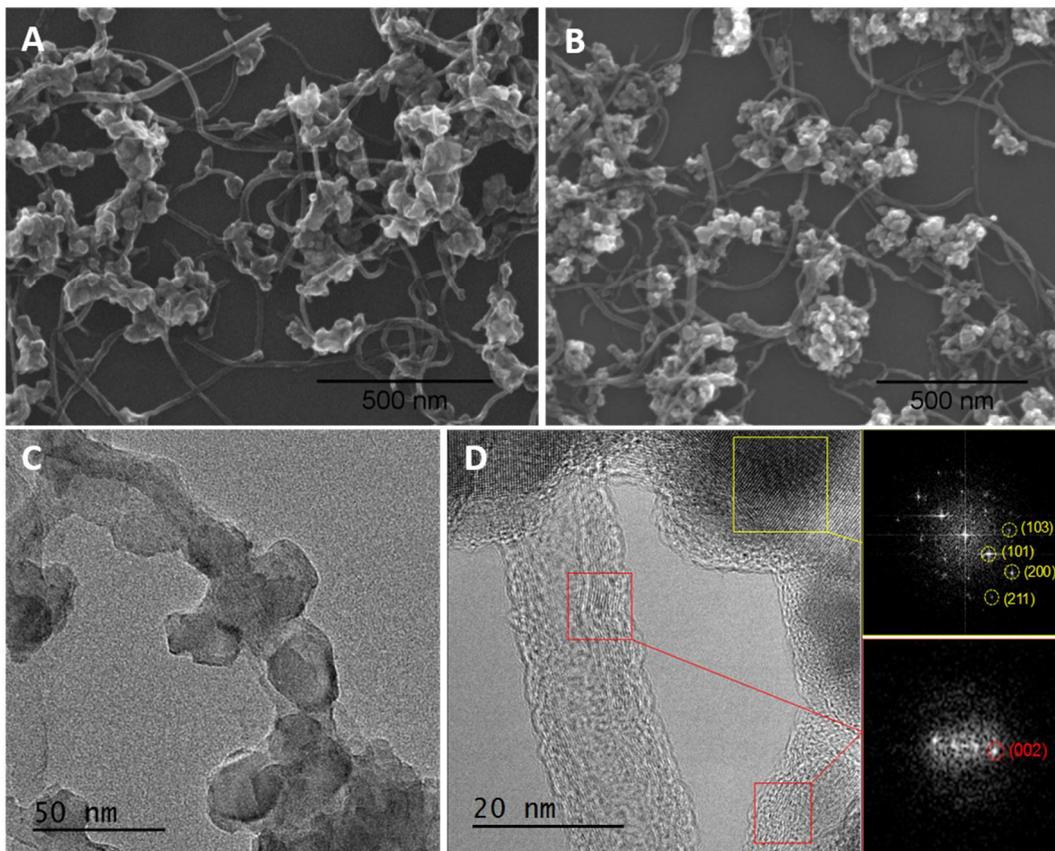
3.4 Resultados e Discussão

3.4.1 Caracterização do Nanohíbrido TiO₂-MWCNT

A distribuição homogênea de TiO₂ na superfície do ox-MWCNT tem um papel importante na atividade fotocatalítica (CAO et al., 2013). Portanto, para a análise de TEM o material foi preparado em água reconstituída, a fim de avaliar se os sais

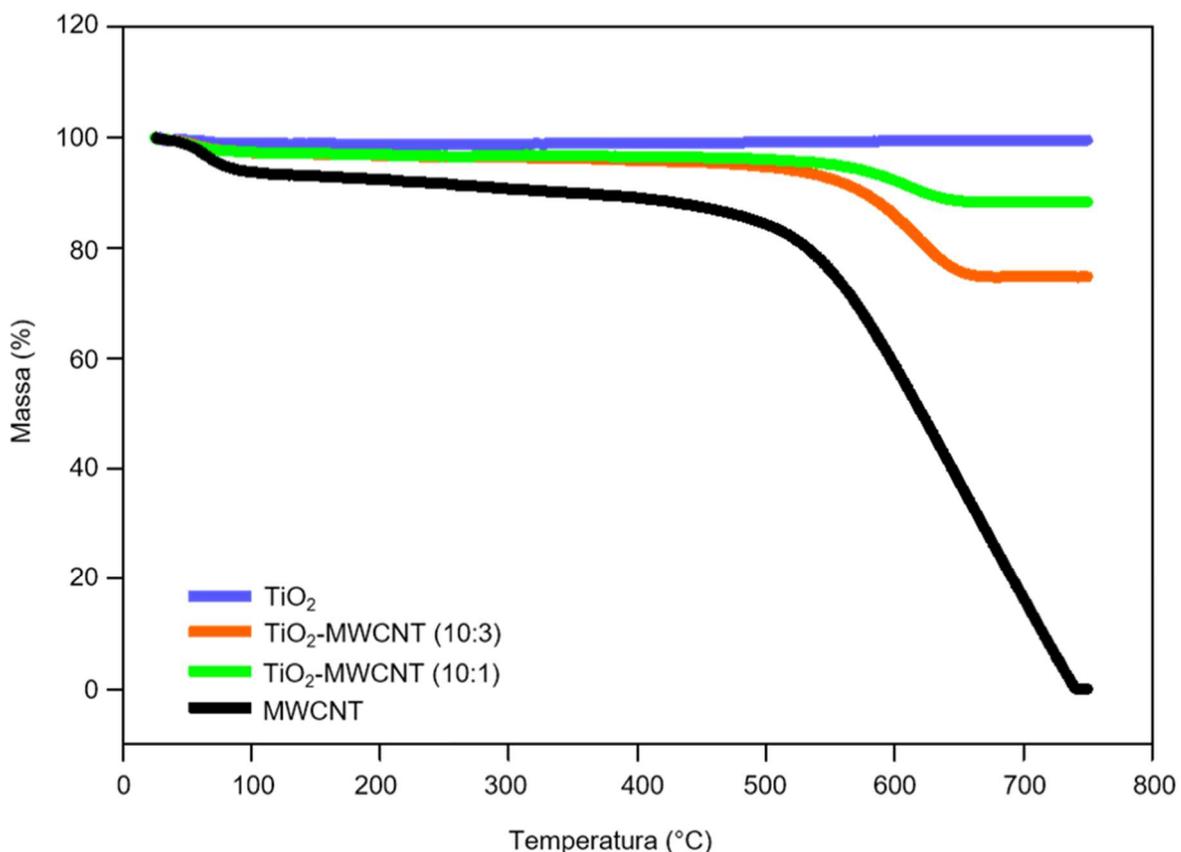
presentes neste meio de cultura, utilizado nos ensaios de toxicidade, influenciou na morfologia das amostras, ou na distribuição do TiO_2 . No entanto, as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV – Figura 11 A) e transmissão (TEM – figura 11 C e D) do TiO_2 -MWCNT 10:1 (Figura 11 A) e 10:3 (Figura 11 B) mostraram morfologias similares, demonstrando a interação entre o TiO_2 e o ox-MWCNT. As imagens de microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução (HRTEM) também foram obtidas. O padrão de transformada rápida de Fourier (FFT) mostra os pontos de difração de 101, 103, 200 e 211, que correspondem aos espaçamentos interplanares de 3,5, 2,4, 1,8 e 1,6 Å, respectivamente, confirmando a presença do TiO_2 anatase (Figura 11 D). Considerando que, o ponto de difração 002 corresponde ao espaçamento interplanar 3,6 Å confirmamos a presença do ox-MWCNT, indicando que o TiO_2 está decorado na superfície do ox-MWCNT.

Figura 11 - Imagens de SEM em isopropanol: (A) TiO_2 -MWCNT (10:1), (B) TiO_2 -MWCNT (10:3). Imagens de TEM e HRTEM em água reconstituída: (C) TiO_2 -MWCNT (10:1), (D) TiO_2 -MWCNT (10:3) e transformada de Fourier (FFT) correspondente, calculada a partir da área marcada com quadrados amarelos e vermelhos para TiO_2 e MWCNT, respectivamente



Para analisar a estabilidade térmica dos materiais estudados foi utilizado a análise termogravimétrica. De acordo com a Figura 12, podemos observar que o TiO_2 não apresenta perda significativa de peso, apresentando estabilidade térmica a $750\text{ }^\circ\text{C}$. Para o ox-MWCNT, foi observado uma perda de massa de 5% até $400\text{ }^\circ\text{C}$, esta perda é referente a queima dos grupos oxigenados da amostra (SILVA et al. 2012), a rampa de degradação do material ocorreu entre 510 e $740\text{ }^\circ\text{C}$. No entanto, o TiO_2 -MWCNT (10:1 e 10:3) apresentou eventos de perda de peso iniciados em temperaturas mais altas (580 a $650\text{ }^\circ\text{C}$), este fato é um indicativo que a ligação entre o TiO_2 e o ox-MWCNT está ocorrendo nos grupos oxigenados, corroborando com os dados da literatura (DA DALT; ALVES; BERGMANN, 2013). Além disso, a partir de $650\text{ }^\circ\text{C}$ não houve perda significativa de massa no híbrido, indicando somente a presença de TiO_2 . Deste modo a perda de peso total no caso do TiO_2 -MWCNT foi proporcional à quantidade de ox-MWCNT em cada amostra, cerca de 10% e 30% para 10:1. e 10:3, respectivamente.

Figura 12 - Análise termogravimétrica (TGA) do ox-MWCNT, TiO_2 e TiO_2 -MWCNT (10:3 e 10:1)

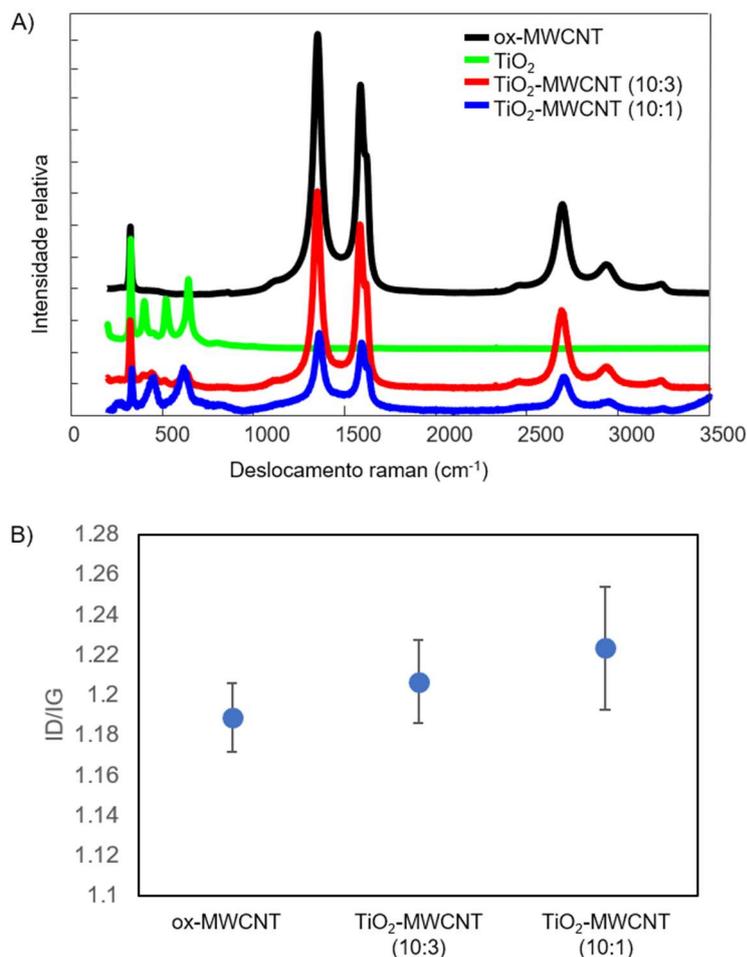


Os espectros Raman das amostras são apresentados na Figura 13 A. O pico observado em 326 cm^{-1} , em todos os nanomateriais, é referente ao porta-amostra, composto de fluoreto de cálcio. O ox-MWCNT apresenta quatro picos distintos em 1350 , 1581 , 1611 e 2685 cm^{-1} , representando as bandas D, G, D' e G', respectivamente. Para a nanopartícula de TiO_2 os modos de vibração da fase anatase são observados em 399 , 516 e 640 cm^{-1} enquanto que para a fase rutilo em 440 cm^{-1} , estando de acordo com valores reportados na literatura (AN et al., 2018).

Os mesmos picos observados no ox-MWCNT e TiO_2 podem ser encontrados no espectro do TiO_2 -MWCNT. No entanto, os TiO_2 -MWCNTs (10:1 e 10:3) apresentam uma alteração nas intensidades dos picos para rutilo e anatase, tendo a intensidade de rutilo aumentado significativamente para ambos os TiO_2 -MWCNT. Orge et al. (2017), estudaram a atividade fotocatalítica de nanomateriais híbridos de TiO_2 e MWCNT sintetizados por moagem, e também observaram que a moagem promove um aumento da fase Rutilo. A ação mecânica durante a síntese promove a deformação e indução de defeitos nos nanomateriais, podendo ocorrer a transformação da fase anatase em rutilo (CARNEIRO et al., 2014; XIAOYAN et al., 2004).

A proporção das áreas integradas das bandas D e G no espectro Raman tem sido amplamente utilizada como uma medida da qualidade dos CNT. A razão entre as intensidades das bandas D e G está apresentada na Figura 13 B. Não houve diferenças significativas na razão ID/IG Ao comparar os híbridos com o ox-MWCNT. No entanto, é possível observar uma tendência a uma maior razão ID/IG para os híbridos. Isto poderia indicar uma maior quantidade de ligações químicas entre carbono e TiO_2 , podendo ser interpretado como formação de defeitos, ou seja, ligações de interface entre TiO_2 e ox-MWCNT, proveniente do processo de obtenção (GUERRA-NUÑEZ et al., 2015).

Figura 13 - (A) Espectro Raman dos nanomateriais ox-MWCNT, TiO₂, TiO₂-MWCNT (10:1 e 10:3). (B) Relação ID/IG das amostras Ox-MWCNT e TiO₂-MWCNT (10:1 e 10:3)



3.4.2 Atividade Fotocatalítica

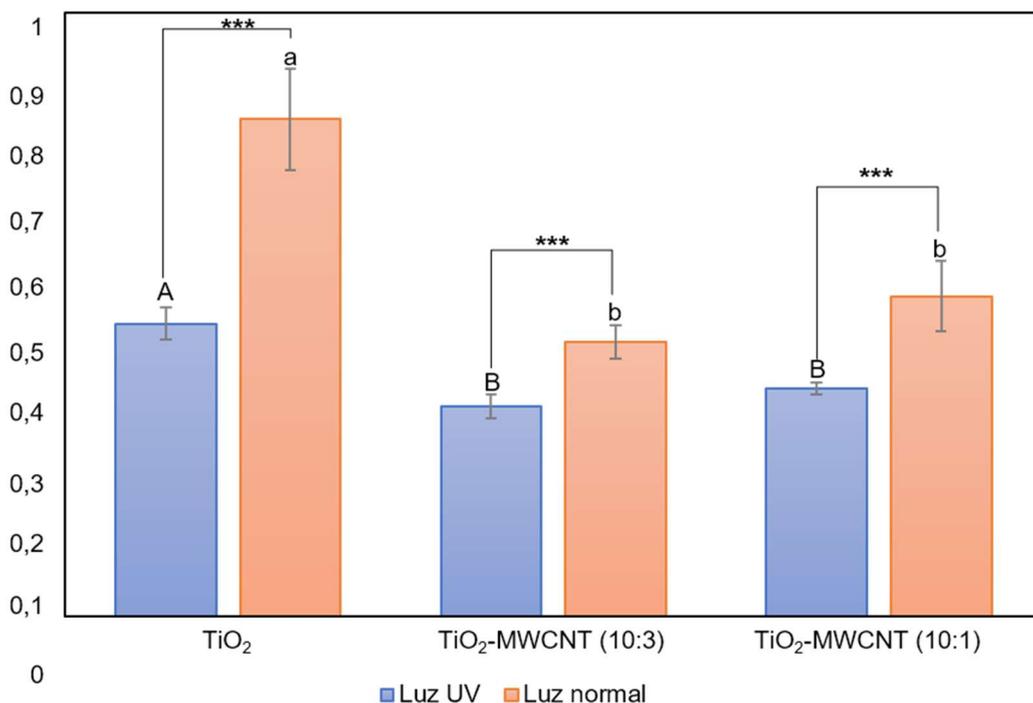
A atividade fotocatalítica do TiO₂ e TiO₂-MWCNT foi avaliada pela degradação do corante índigo blue. Os resultados mostraram que o TiO₂-MWCNT foi mais eficiente para a degradação do corante do que o TiO₂ em condições de iluminação visível e exposição a UV ($p < 0,001$) (Figura 14). Além disso, a exposição aos raios UV foi mais eficiente para a fotocatalise para todas as partículas estudadas ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa entre o TiO₂-MWCNT 10:1 e 10:3.

Muitos autores estudaram a atividade fotocatalítica do TiO₂-MWCNT, no entanto poucos utilizaram a mecanoquímica como via para a síntese do material. Kuo (2009) e Orge et al. (2017) estudaram a atividade fotocatalítica do TiO₂-MWCNT, sintetizado por métodos mecanoquímicos, e seus resultados

corroboram com os resultados obtidos neste trabalho, indicando uma maior eficiência do TiO₂-MWCNT quando comparado com a nanopartícula de TiO₂. Portanto, a síntese por vias mecanoquímicas é um método eficaz para melhorar o desempenho do TiO₂-MWCNT. Adicionalmente, o método é simples, de baixo custo e não requer mão de obra especializada, o que é uma vantagem para aplicação industrial.

Outro passo importante neste estudo foi a utilização da água reconstituída nos ensaios de atividade fotocatalítica. De nosso conhecimento este é o primeiro trabalho que não usa água ultrapura para ensaios de atividade fotocatalítica. Nos ensaios de toxicidade e no ambiente os nanomateriais irão interagir com diversos compostos, como: sais, matéria orgânica, proteínas, entre outros. Tudo isso pode alterar o mecanismo de ação da partícula e, portanto, ensaios em condições mais realistas são extremamente importantes para o conhecimento dos possíveis efeitos deste material no ambiente ou nos ensaios utilizados. Os resultados mostraram que mesmo com a presença dos sais na água reconstituída o NH apresentou atividade fotocatalítica aprimorada, inclusive sob as condições de luz visível (Figura 14).

Figura 14 - Estudo fotocatalítico do TiO₂ e TiO₂-MWCNT (10: 3 e 10: 1) sob luz visível e UV. Tempo de irradiação: 60 minutos. média ± erro padrão



3.5 Conclusões

Neste estudo o método mecanoquímico (moagem) foi eficaz para a síntese do TiO₂-MWCNT (10:1 e 10:3) a partir de NP de TiO₂ e MWCNT oxidado, gerando amostras com boa distribuição do TiO₂ no MWCNT oxidado. E, ambas as sínteses (10:1 e 10:3) apresentaram atividade fotocatalítica superior ao da nanopartícula de TiO₂, para luz visível e UV.

Referências

AN, X.; HU, C.; LIU, H.; QU, J. Hierarchical Nanotubular Anatase/Rutile/TiO₂ (B) Heterophase Junction with Oxygen Vacancies for Enhanced Photocatalytic H₂ Production. **Langmuir**, Washington, v. 34, n. 5, p. 1883–1889, feb. 2018.

BALASUBRAMANIAN, K.; BURGHARD, M. Chemically functionalized carbon nanotubes. **Small**, Weinheim, v. 1, n. 2, p. 180–192, feb. 2005.

BINAS, V.; VENIERI, D.; KOTZIAS, D. Modified TiO₂ based photocatalysts for improved air and health quality. **Journal of Materiomics**, Beijing, v. 3, n. 1, p. 3–16, mar. 2017.

CAO, Q.; YU, Q.; CONNELL, D. W.; YU, G. Titania/carbon nanotube composite (TiO₂/CNT) and its application for removal of organic pollutants. **Clean Technologies and Environmental Policy**, Berlin, v. 15, n. 6, p. 871–880, dec. 2013.

CARNEIRO, J. O.; AZEVEDO, S.; FERNANDES, F.; FREITAS, E.; PEREIRA, M.; TAVARES, C. J.; LANCEROS-MÉNDEZ, S.; TEIXEIRA, V. Synthesis of iron-doped TiO₂ nanoparticles by ball-milling process: the influence of process parameters on the structural, optical, magnetic, and photocatalytic properties. **Journal of Materials Science**, Norwell, v. 49, n. 21, p. 7476–7488, nov. 2014.

CHATTERJEE, D.; DASGUPTA, S. Visible light induced photocatalytic degradation of organic pollutants. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, Osaka, v. 6, n. 2–3, p. 186–205, oct. 2005.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V. L. S. S.; MOURA, M. A. M.; JONSSON, C. M.; FRACETO, L. F. Toxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in zebrafish embryos under different exposure conditions. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 147, p. 129–139, feb. 2014.

DA DALT, S.; ALVES, A. K.; BERGMANN, C. P. Photocatalytic degradation of methyl orange dye in water solutions in the presence of MWCNT/TiO₂ composites. **Materials Research Bulletin**, Boise, v. 48, n. 5, p. 1845–1850, may 2013.

DAGHRIR, R.; DROGUI, P.; ROBERT, D. Modified TiO₂ For Environmental Photocatalytic Applications: A Review. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, Washington, v. 52, n. 10, p. 3581–3599, 13 mar. 2013.

FUJISHIMA, A.; ZHANG, X. Titanium dioxide photocatalysis: present situation and future approaches. **Comptes Rendus Chimie**, Paris, v. 9, n. 5–6, p. 750–760, may 2006.

HAMID, S. B. A.; TAN, T. L.; LAI, C. W.; SAMSUDIN, E. M. Multiwalled carbon nanotube/TiO₂ nanocomposite as a highly active photocatalyst for photodegradation of Reactive Black 5 dye. **Chinese Journal of Catalysis**, Dalian, v. 35, n. 12, p. 2014–2019, dec. 2014.

HIRSCH, A. Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. **Angewandte Chemie International Edition**, Weinheim, v. 41, n. 11, p. 1853, jun. 2002.

IHSANULLAH; ABBAS, A.; AL-AMER, A. M.; LAOUI, T.; AL-MARRI, M. J.; NASSER, M. S.; KHRAISHEH, M.; ATIEH, M. A. Heavy metal removal from aqueous solution by advanced carbon nanotubes: Critical review of adsorption applications. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 157, p. 141–161, jan. 2016.

IJJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Nature**, London, v. 354, n. 6348, p. 56–58, nov. 1991.

KAMIL, A. M. et al. A. Synthesis, Characterization and Photocatalytic Activity of Carbon Nanotube/Titanium Dioxide Nanocomposites. **Arab J Sci Eng**, Berlin, v. 43, p. 199–210, 2018.

KIM, S. P.; CHOI, H. C. Preparation of Carbon-Nanotube-supported TiO₂ for Enhanced Dye-degrading Photocatalytic Activity. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, Seoul, v. 36, n. 1, p. 258–264, jan. 2015.

KOSTARELOS, K. The long and short of carbon nanotube toxicity. **Nature Biotechnology**, New York, v. 26, n. 7, p. 774–776, jul. 2008.

KUO, C. Y. Preventive dye-degradation mechanisms using UV/TiO₂/carbon nanotubes process. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 163, n. 1, p. 239–244, 2009.

LI, Y.-H.; DING, J.; LUAN, Z.; DI, Z.; ZHU, Y.; XU, C.; WU, D.; WEI, B. Competitive adsorption of Pb²⁺, Cu²⁺ and Cd²⁺ ions from aqueous solutions by multiwalled carbon nanotubes. **Carbon**, New York, v. 41, n. 14, p. 2787–2792, jan. 2003.

LI, Y.-H.; WANG, S.; WEI, J.; ZHANG, X.; XU, C.; LUAN, Z.; WU, D.; WEI, B. Lead adsorption on carbon nanotubes. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 357, n. 3–4, p. 263–266, may 2002.

LIU, W.-T. Nanoparticles and their biological and environmental applications. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, Osaka, v. 102, n. 1, p. 1–7, jul. 2006.

LU, C.; CHUNG, Y.-L.; CHANG, K.-F. Adsorption of trihalomethanes from water with carbon nanotubes. **Water Research**, Oxford, v. 39, n. 6, p. 1183–1189, mar. 2005.

LU, C.; LIU, C. Removal of nickel(II) from aqueous solution by carbon nanotubes. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, Oxford, v. 81, n. 12, p. 1932–1940, dec. 2006.

MIANDOAB, E. S.; FATEMI, S. Upgrading TiO₂ Photoactivity under Visible Light by Synthesis of MWCNT/TiO₂ Nanocomposite. **International Journal of Nanoscience Nanotechnology**, Tehran, v. 11, n. 1, p. 1-12, 2015.

MUÑOZ-BATISTA, M. J.; RODRIGUEZ-PADRON, D.; PUENTE-SANTIAGO, A. R.; LUQUE, R. Mechanochemistry: Toward Sustainable Design of Advanced Nanomaterials for Electrochemical Energy Storage and Catalytic Applications. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, Washington, v. 6, n. 8, p. 9530–9544, 2018.

ORGE, C. A.; SOARES, O. S. G. P.; FARIA, J. L.; PEREIRA, M. F. R. Synthesis of TiO₂-Carbon Nanotubes through ball-milling method for mineralization of oxamic acid (OMA) by photocatalytic ozonation. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, Amsterdam, v. 5, n. 6, p. 5599–5607, dec. 2017.

PELAEZ, M.; NOLAN, N. T.; PILLAI, S. C.; SEERY, M. K.; FALARAS, P.; KONTOS, A. G.; DUNLOP, P. S. M.; HAMILTON, J. W. J.; BYRNE, J. A.; O'SHEA, K.; ENTEZARI, M. H.; DIONYSIOU, D. D. A review on the visible light active titanium dioxide photocatalysts for environmental applications. **Applied Catalysis B: Environmental**, Amsterdam, v. 125, p. 331–349, 21 aug. 2012.

PENG, X.; LI, Y.; LUAN, Z.; DI, Z.; WANG, H.; TIAN, B.; JIA, Z. Adsorption of 1,2-dichlorobenzene from water to carbon nanotubes. **Chemical Physics Letters**, Amsterdam, v. 376, n. 1–2, p. 154–158, jul. 2003.

PUEYO, N.; MIGUEL, N.; MOSTEO, R.; OVELLEIRO, J. L.; ORMAD, M. P. Synergistic effect of the presence of suspended and dissolved matter on the removal of cyanide from coking wastewater by TiO₂ photocatalysis. **Journal of Environmental Science and Health, Part A**, Philadelphia, v. 52, n. 2, p. 182–188, jan. 2017.

SCHNEIDER, J.; MATSUOKA, M.; TAKEUCHI, M.; ZHANG, J.; HORIUCHI, Y.; ANPO, M.; BAHNEMANN, D. W. Understanding TiO₂ Photocatalysis: Mechanisms and Materials. **Chemical Reviews**, Washington, v. 114, n. 19, p. 9919–9986, oct. 2014.

UPADHYAYULA, V. K. K.; DENG, S.; MITCHELL, M. C.; SMITH, G. B. Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water: A review. **Science of The Total Environment**, Amsterdam, v. 408, n. 1, p. 1–13, dec. 2009.

WU, C.-H.; KUO, C.-Y.; CHEN, S.-T. Synergistic effects between TiO₂ and carbon nanotubes (CNTs) in a TiO₂/CNTs system under visible light irradiation. **Environmental Technology**, London, v. 34, n. 17, p. 2513–2519, sep. 2013.

XIAOYAN, P.; YI, C.; XUEMING, M.; LIHUI, Z. Phase Transformation of Nanocrystalline Anatase Powders Induced by Mechanical Activation. **Journal of the American Ceramic Society**, Westerville, v. 87, n. 6, p. 1164–1166, jun. 2004.

GUERRA-NUÑEZ, C.; ZHANG, Y.; LI, M.; CHAWLA, V.; ERNI, R.; MICHLER, J.; GYU PARK, H.; UTKE, I. Morphology and Crystallinity Control of Ultrathin TiO₂ Layers Deposited on Carbon Nanotubes by Temperature-Step Atomic Layer Deposition. **Nanoscale**, Cambridge, v. 7, n. 24, p. 10622-10633, 2015.

YEN, C.-Y.; LIN, Y.-F.; HUNG, C.-H.; TSENG, Y.-H.; MA, C.-C. M.; CHANG, M.-C.; SHAO, H. The effects of synthesis procedures on the morphology and photocatalytic activity of multi-walled carbon nanotubes/TiO₂ nanocomposites. **Nanotechnology**, Bristol, v. 19, n. 4, p. 045604, jan. 2008.

4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO NANOMATERIAL HÍBRIDO TiO₂-MWCNT EM EMBRIÕES DE *DANIO RERIO* (ZEBRAFISH)

4.1 Introdução

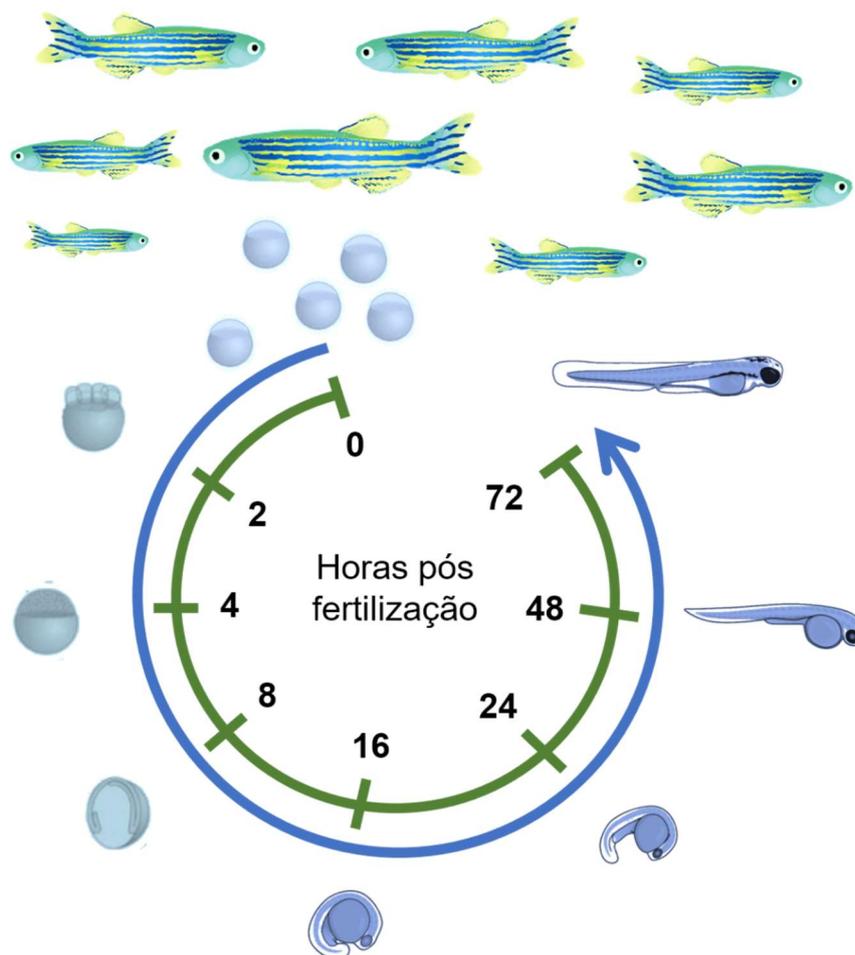
Embora benefícios claros sejam esperados do surgimento contínuo de produtos que utilizam da nanotecnologia, é crescente a preocupação quanto aos perigos que as NP possam ter na saúde humana e ambiental. A associação de CNT e TiO₂ tem mostrado aplicações promissoras na degradação de diversos poluentes (CHEN; ZHANG; OH, 2008; YAO et al., 2008; CHEN et al., 2011; SAMPAIO et al., 2015), demonstrando a importância desse material na remediação ambiental. Portanto, a produção desses NH tem sido cada vez mais incentivada. Conseqüentemente, as preocupações quanto à sua toxicidade quando liberado no meio ambiente vem crescendo. Vários estudos que evidenciam os benefícios do uso de TiO₂-CNT (ZOUZELKA et al., 2016; CHAUDHARY et al., 2017; NATARAJAN et al., 2017; RHOUATI et al., 2018). Contudo, ainda não há publicações sobre sua ecotoxicidade.

Um modelo que tem se mostrado atraente para a triagem rápida dos efeitos nanotoxicológicos de vários tipos de NM, incluindo CNTs e TiO₂, é o peixe ornamental *Danio rerio*, também conhecido como zebrafish ou paulistinha (DAI et al., 2014; FANG et al., 2015; CHAKRABORTY et al., 2016). Por exemplo, Clemente et al. (2014b) estudaram o efeito do TiO₂ sobre o *Danio rerio* e observaram que após a exposição à luz ultravioleta houve um aumento na taxa de mortalidade e de efeitos subletais, como eclosão precoce, problemas no desenvolvimento e alterações no equilíbrio. Recentemente, Shih et al. (2016) relataram os efeitos do TiO₂ na eclosão do zebrafish e sugeriram que baixas concentrações desse material, pode promover eclosão, enquanto concentrações mais elevadas retardam. Além disso, estudos com CNTs sugeriram que características físico-químicas, como tamanho e agregação, podem afetar fortemente o desenvolvimento de embriões de zebrafish (CHENG; CHENG, 2012; FILHO et al., 2014).

Danio rerio, comumente conhecido como paulistinha aqui no Brasil, é um pequeno peixe de água doce tropical que vive nas bacias hidrográficas da Índia, Paquistão, Nepal, Butão e do sul da Ásia. Pertence à família dos Cyprinidae, da

ordem dos Cypriniformes. Os adultos possuem entre 4 e 5 cm de comprimento e, portanto, podem ser facilmente manejados em grande número no laboratório, sua manutenção é relativamente fácil e barata. Eles possuem uma alta taxa reprodutiva, podendo liberar centenas de ovos em um único dia. Após a fertilização o embrião se desenvolve rápido, eclodindo em aproximadamente 72 h (Figura 15). Além disso, o ovo é transparente, facilitando a visualização direta de processos de desenvolvimento, incluindo estrutura e função de órgãos e tecidos (HILL et al., 2005; LIN et al., 2013; CHAKRABORTY et al., 2016).

Figura 15 Estágios de desenvolvimento do peixe *Danio rerio*



Fonte: Do autor

As principais vantagens do uso deste modelo incluem a capacidade de avaliar respostas em um organismo inteiro, 70% de similaridade genética a mamíferos (HOWE et al., 2013), além de disponibilidade de cepas geneticamente manipuladas. Grandes esforços foram feitos para incorporar o princípio de redução, refinamento e substituição (3Rs) no FET (teste com embriões de peixes - “fish embryo test”) como uma alternativa para substituir o teste em animais em peixes adultos / juvenis. Este teste destina-se a determinar a toxicidade aguda de substâncias químicas em estágios embrionários de peixes (OECD, 2013), onde, devido ao estágio inicial do desenvolvimento do sistema nervoso, considera-se que nem a dor, nem o desconforto, possam ser percebidos. De acordo com a Diretiva Europeia 2010/63/EU, a alimentação ativa é considerada como o estágio a partir do qual as larvas de vida livre estão sujeitas aos regulamentos para a experimentação animal. Portanto, os embriões de zebrafish não são considerados de acordo a esta norma.

O zebrafish já é amplamente utilizado para pesquisa biomédica e toxicológica, com protocolos internacionalmente aceitos para seu uso em estudos de biologia do desenvolvimento e toxicidade (OECD, 2013). Nos últimos anos, o uso deste modelo para os ensaios de toxicidade de nanopartículas vem crescendo exponencialmente. Isso pois, além de todas as vantagens discutidas acima, muitos parâmetros podem ser utilizados para a avaliação da toxicidade, tais como taxa de eclosão, malformação, crescimento, danos nas brânquias e na pele, comportamento anormal, toxicidade reprodutiva, mortalidade, entre outros (BRUNDO; SALVAGGIO, 2018). Portanto, este modelo vem fornecendo uma visão inestimável da toxicidade dos NMs, inclusive substituindo os testes com roedores (VARGAS; PONCE-CANCHIHUAMÁN, 2017; HORIE et al., 2017).

4.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo foi investigar a toxicidade do TiO₂-MWCNT em embriões de zebrafish, sob diferentes condições de exposição (com e sem luz UV), utilizando os parâmetros: mortalidade, deformação, edema, crescimento, tamanho do saco vitelínico, tamanho e organização de fibras musculares e a possível biodistribuição das nanopartículas nas larvas.

4.3 Materiais e Métodos

4.3.1 Caracterização da Dispersão do TiO₂-MWCNT

O tamanho hidrodinâmico e índice de polidispersividade (PDI) das partículas em água reconstituída foram avaliados pelas medidas do espalhamento dinâmico de luz (DLS) e a carga superficial (potencial zeta, ZP) pelas medidas do espalhamento de luz eletroforético (ELS). Ambos usando o instrumento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, UK). A água reconstituída foi preparada de acordo com a USEPA (US.EPA, 2002). As características foram 60,0 mg L⁻¹ de CaSO₄.2H₂O, 60,0 mg L⁻¹ de MgSO₄, 96,0 mg L⁻¹ de NaHCO₃ e 4,0 mg L⁻¹ de KCl, temperatura 27 ± 1 °C, condutividade: 600 ± 10 µS cm⁻¹, dureza: 5 °dGH, pH 7,5 ± 0,5 e teor de oxigênio dissolvido (DO): 6,0 ± 0,6 mg L⁻¹.

4.3.2 Avaliação da Toxicidade

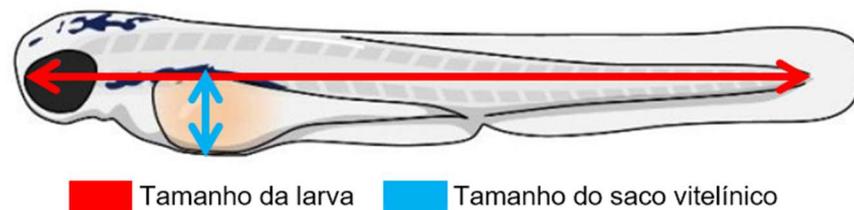
Embriões de *D. rerio* (tipo selvagem) foram obtidos do Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), CNPEM, Campinas, Brasil. O ensaio de toxicidade baseou-se nas diretrizes da OECD TG 236 (OECD, 2013), os procedimentos de manejo dos animais foram aprovados pela Comissão de Ética em Uso Animal da Embrapa Meio Ambiente (CEUA-EMA, protocolo número 006/2015). Um dia antes do experimento, peixes machos e fêmeas (2:1, respectivamente) foram colocados separadamente durante a noite, no mesmo tanque de criação. Na manhã do ensaio, antes de acender as luzes, o divisor foi removido e os peixes começaram a se reproduzir. Os embriões foram coletados, 1 hora pós-fertilização, lavados com água reconstituída e os ovos viáveis foram selecionados sob um estereoscópio. Os organismos foram expostos em grupos de 24 indivíduos, por 96 horas, nas concentrações de 30,0, 100,0, 130,0 e 110,0 mg L⁻¹ de ox-MWCNT, TiO₂, TiO₂-MWCNT (10:3) e TiO₂-MWCNT (10:1) em placas de poliestireno de 24 poços.

Os embriões foram mantidos individualmente em volumes de 2,0 mL da suspensão por 96 horas, a 28 ± 1 ° C. Sob duas condições de iluminação, luz visível e ultravioleta (UV) com fotoperíodo de 16/8 h (claro / escuro). A luz visível foi fornecida a partir de lâmpadas fluorescentes padrão (Phillips, 40 W) e a UV foi

fornecida usando lâmpadas UWAS340 Q-Panel® de 40W, ambas posicionadas 80 cm acima da superfície de exposição à água. A dose de exposição à UV no ensaio foi de 1,45 J/cm²/h (97% de UVA e 0,06% de UVB), a mesma utilizada por (CLEMENTE et al., 2014b).

Os embriões e larvas foram examinados sob um estereomicroscópio (Stereo Discovery V20, Zeiss) a cada 24 horas. No final do período de exposição, as larvas vivas foram fotografadas e medidas usando o Software Axion Vision. As medidas do tamanho das larvas foram realizadas desde o início do olho até a ponta da cauda, e o diâmetro para o tamanho do saco vitelino (Figura 16).

Figura 16 Esquema de como é feita a medição das larvas de *Danio rerio*



Fonte: Do autor

O tecido muscular e o comprimento dos sarcômeros das larvas expostas (96 h) também foram analisados, por microscopia confocal. Uma vez que os embriões de *D. rerio* produzem pigmentação por volta de 1 dia após a fertilização, esta foi removida com soluções aquosas de peróxido de hidrogênio (3%) e hidróxido de potássio (1%), por 15 min a fim de permitir a observação do sistema muscular das larvas. Após a exposição, as larvas foram coletadas, lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS), fixadas em 4% de paraformaldeído (PFA) durante a noite, lavadas novamente com PBS (3 vezes) e mantidas em PBS a 4 °C, no escuro até a análise no microscópio confocal.

As larvas foram observadas sob um microscópio confocal invertido (Zeiss LSM 780), com uma lente objetiva de imersão em óleo de 40X (abertura numérica de 1,3). Utilizou-se um laser pulsado (800 nm, 100 fs) a um comprimento de onda de excitação de 415 nm e um filtro de passo curto para a geração de segundo

harmônico (SHG). As imagens foram obtidas com o software axion observer e analisadas com o software ImageJ. As medidas do comprimento do sarcômero foram realizadas de acordo com o procedimento, relatado por (HUANG et al., 2011).

4.3.3 Mapeamento e Quantificação do Ti por μ -XRF

A distribuição espacial 2D do Ti foi investigada por microscopia de fluorescência de raios X por μ -sonda, empregando um equipamento de bancada Orbis PC, EDAX. Três indivíduos de cada tratamento (expostos apenas à luz visível) foram mapeados. Eles foram colocados no topo de uma folha kapton de 7,6 μm e digitalizados usando um feixe de raios X quase circular de 30 μm (em Mo $K\alpha$), fornecido por um tubo Rh e sistema policapilar. A fim de melhorar o sinal para a taxa de ruído uma folha de Al de 25 μm foi usada como filtro primário, a corrente e tensão do tubo de raios-X foi 400 μA e 40 kV, respectivamente. Fótons de fluorescência de raios X foram detectados por um dispositivo SDD de 50 mm^2 coberto por uma janela Be de 12,5 μm , a resolução de energia em Mn $K\alpha$ foi de 140 eV e o “deadtime” mantido $\leq 3\%$, o tempo de permanência foi de 2 s por ponto. As medições foram realizadas sob ar, usando uma matriz de 50 x 64 pontos.

Usando um disco metálico Ti observamos que nenhuma atenuação mensurável da linha Ti $K\alpha$ foi causada pelo zebrafish do grupo controle, ou seja, a amostra que não possuía TiO_2 . Assim, o zebrafish foi considerado como um filme infinitamente fino. Na abordagem de filme fino para análise quantitativa, a intensidade de fluorescência de raios X (I_{Ti}) é o produto entre a concentração (CT_{Ti}) e a sensibilidade elementar (ST_{Ti}), como mostrado pela Equação 1.

$$I_{\text{Ti}} = CT_{\text{Ti}} ST_{\text{Ti}} \quad \text{Equação 1}$$

A sensibilidade do espectrômetro em relação ao Ti foi determinada usando uma película fina de padrão de calibração de $43,3 \pm 0,3 \mu\text{g cm}^{-2}$ depositada sobre um filme mylarTM. A intensidade média da área mapeada do padrão foi de $1406,2 \pm 1,0$ Cps por pixel. Assim, a sensibilidade elementar do Ti foi de $32,5 \pm 0,2$ Cps $\text{cm}^2 \mu\text{g}^{-1}$. Usando a equação 1, é calculada a concentração de Ti por unidade de área, portanto, transformados os mapas de qualitativos em quantitativos.

O limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ) foram determinados pela estimativa do número de contagens do "background" das amostras controle. Foi calculado a média e o desvio padrão (σ) das contagens do detector no canal Ti K α . O LOD foi calculado como a intensidade média do "background" na região de interesses Zn K α , sendo $+3\sigma$ e LOQ $+10\sigma$. Os valores encontrados foram LOD = 0,4 $\mu\text{g cm}^{-2}$ e LOQ = 1,0 $\mu\text{g cm}^{-2}$.

4.3.4 Análise Estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o software Graphpad Prism v.5. Para analisar o comprimento, o tamanho do saco vitelino e a taxa de eclosão, considerando a interação entre as condições de iluminação (luz visível e ultravioleta) e os grupos de exposição (TiO₂, ox-MWCNT, TiO₂-MWCNT 10:3 e TiO₂-MWCNT 10:1), foi utilizada ANOVA de duas vias. Para a comparação dos grupos, foi empregado o pós-teste de Bonferroni, adotando nível de significância de 5%. A normalidade dos dados foi determinada usando o teste de Shapiro-Wilk. Para a análise do comprimento do sarcômero, empregou-se ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 5%.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Caracterização da Dispersão de TiO₂-MWCNT

A estabilidade da dispersão de TiO₂, ox-MWCNT e TiO₂-MWCNT em água reconstituída foi avaliada através de medidas de DLS (Tabela 1). A diluição das NPs em água reconstituída aumentou substancialmente o diâmetro hidrodinâmico de todas as partículas para um intervalo de 2,0 a 3,0 μm .

A força iônica, determinada pelos sais nutrientes na água reconstituída, pode afetar a cinética de aglomeração e a estabilidade dos NMs (WEHMAS et al., 2015). Essa intensa formação de agregados e a rápida precipitação dos materiais afetaram a qualidade das leituras, como mostram os altos valores do índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta (PZ) obtidos para todas as suspensões na

água reconstituída. Esse comportamento também foi observado por outros estudos com TiO₂ (MA; BRENNAN; DIAMOND, 2012a; PAGNOUT et al., 2012; CLEMENTE et al., 2014b).

Tabela 1. Diâmetro médio das partículas em suspensão (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta (ZP) das suspensões de ox-MWCNT, TiO₂ e TiO₂-MWCNT (10:1 e 10:3) em água reconstituída e água ultrapura obtida usando DLS e ELS. Os resultados são apresentados como a média (\pm desvio padrão, n = 3)

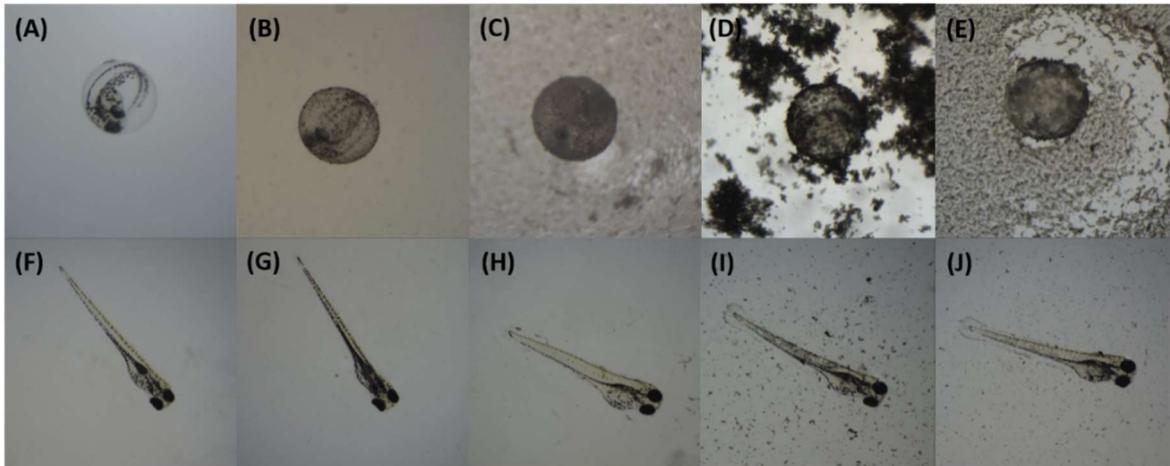
	Nanopartículas	Diâmetro hidrodinâmico (d.nm)	Pdl	ZP (mV)
Água reconstituída	ox-MWCNT	3613,00 (\pm 140,62)	0,42 (\pm 0,04)	-22,53 (\pm 1,19)
	TiO ₂	2125,66 (\pm 237,81)	0,28 (\pm 0,01)	-10,15 (\pm 0,43)
	TiO ₂ -MWCNT (10:3)	1970,66 (\pm 167,93)	0,49 (\pm 0,07)	-24,66 (\pm 0,51)
	TiO ₂ -MWCNT (10:1)	2668,66 (\pm 224,07)	0,38 (\pm 0,06)	-22,23 (\pm 0,15)
Água ultrapura	ox-MWCNT	155,90 (\pm 2,02)	0,25 (\pm 0,01)	-31,70 (\pm 0,10)
	TiO ₂	172,03 (\pm 0,83)	0,23 (\pm 0,01)	-14,55 (\pm 3,21)
	TiO ₂ -MWCNT (10:3)	227,50 (\pm 3,43)	0,36 (\pm 0,01)	-26,30 (\pm 0,52)
	TiO ₂ -MWCNT (10:1)	1489,00 (\pm 329,83)	0,85 (\pm 0,25)	-23,63 (1,30)

4.4.2 Avaliação da Toxicidade

Existem várias aplicações para materiais fotocatalíticos, desde a atividade antimicrobiana até a remediação ambiental. Portanto, um material com uma atividade fotocatalítica aumentada, baixa toxicidade e baixos custos de produção tem um enorme potencial em muitos campos.

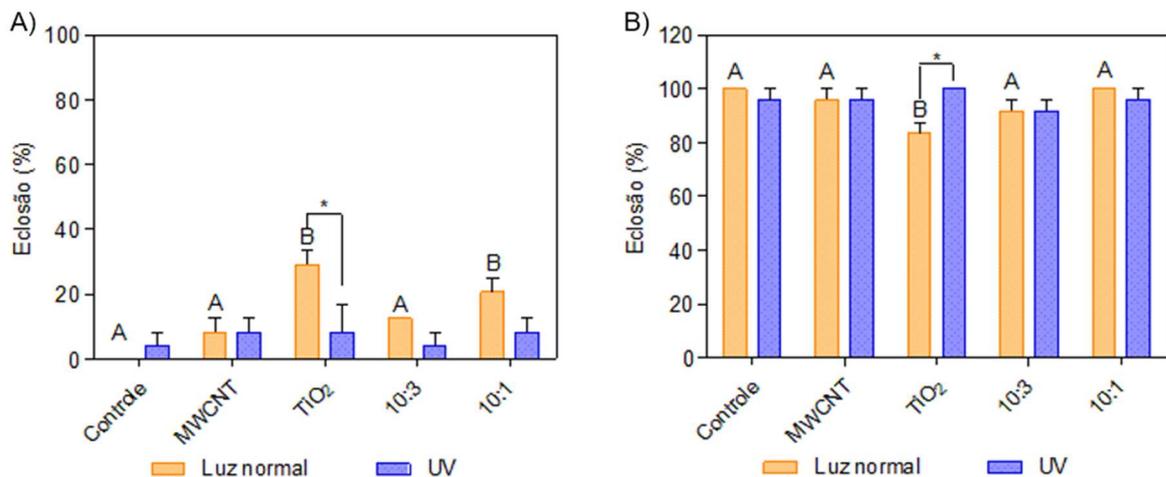
Em nossos estudos, o TiO₂ e TiO₂-MWCNT tendem a aderir ao córion, formando uma camada externa branca e preta, impedindo a visão clara do embrião (Figura 17) e impossibilitando a avaliação de malformações durante o período embrionário. Esse fato também foi relatado por outros estudos (CHEN; LIN; TSENG, 2011; CLEMENTE et al., 2014b), mas após a eclosão, não foram observadas malformações ou edemas em nenhum dos grupos estudados.

Figura 17 - Embriões de *Danio rerio* expostos por 48 horas a: (A) Controle, (B) ox-MWCNT; (C) TiO₂; (D) TiO₂-MWCNT 10:3 e (E) TiO₂-MWCNT 10:1. Larvas de *Danio rerio* expostas por 96 horas a: (F) Controle (G) ox-MWCNT; (H) TiO₂; (I) TiO₂-MWCNT 10:3 e (J) TiO₂-MWCNT 10:1



Não houve mortalidade em nenhum dos grupos estudados. No entanto, as taxas de eclosão das larvas variaram entre os grupos expostos a TiO₂, sendo maiores nos grupos expostos a luz visível em comparação ao grupo exposto à luz UV, após 48 horas de exposição ($p = 0,0134$) (Figura 18 A). Após 72 horas a taxa de eclosão foi menor para o grupo TiO₂ exposto à luz visível ($p = 0,0220$) (Figura 18 B), e após 96 horas todos os embriões eclodiram.

Figura 18 - Taxa de eclosão de embriões de *D. rerio* expostos a TiO₂, ox-MWCNT, TiO₂-MWCNT 10:3, TiO₂-MWCNT 10:1 sob diferentes exposições à luz. (A) Taxa de eclosão após 48 horas. (B) Taxa de eclosão após 72 horas. Média \pm erros padrão



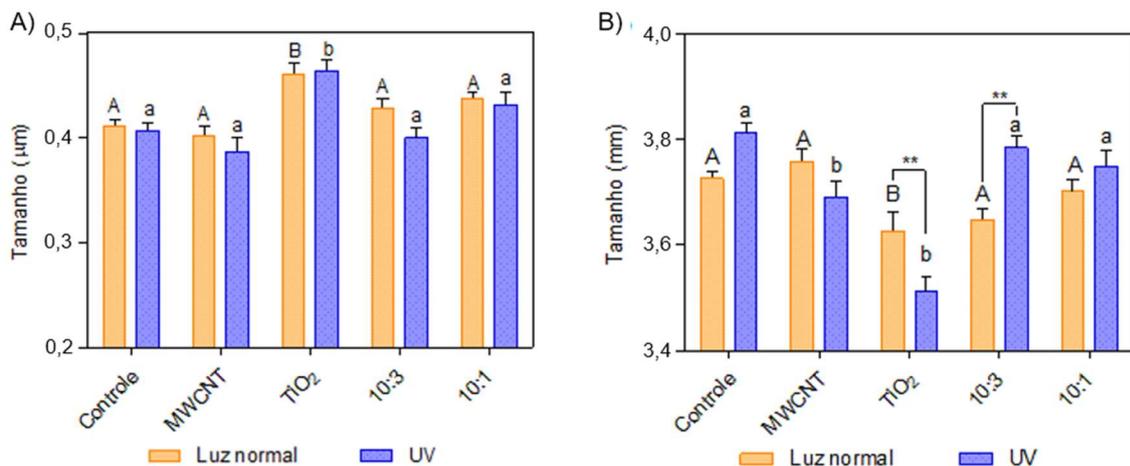
Análises estatísticas revelaram que a variável comprimento total da larva foi significativamente menor para organismos expostos à nanopartícula de TiO₂, sob luz UV, do que para grupo controle ($p < 0,001$). Tendo uma redução de 7,8% em seu comprimento (Figura 17 B). Também houve interação ($p < 0,0001$) entre as

condições de iluminação, para o TiO_2 e o TiO_2 -MWCNT 10:3. Clemente et al. (2014b), também observaram redução do comprimento total em larvas expostas a 100 mg L^{-1} de TiO_2 , sob condições de luz UV.

Após 96 horas de exposição, foi observado um aumento de 14% no tamanho do saco vitelino (Figura 19 A) no grupo exposto a TiO_2 , sob exposição UV ($p = 0,0002$) e 12% no grupo TiO_2 sob exposição à luz visível ($p = 0,0001$), quando comparado ao controle. Esse resultado também foi relatado para medaka (PATERSON et al., 2011) e zebrafish expostos às nanopartículas de TiO_2 (SAMAEE et al., 2015). A combinação entre menor tamanho e aumento do saco vitelino indica que houve uma eclosão prematura dos embriões e não um desenvolvimento mais rápido, conforme descrito por vários estudos da literatura (IWAMATSU, 2004; KASHIWADA, 2006; PATERSON et al., 2011; FOUQUERAY et al., 2013). No entanto, o mesmo não foi observado para organismos expostos ao TiO_2 -MWCNT.

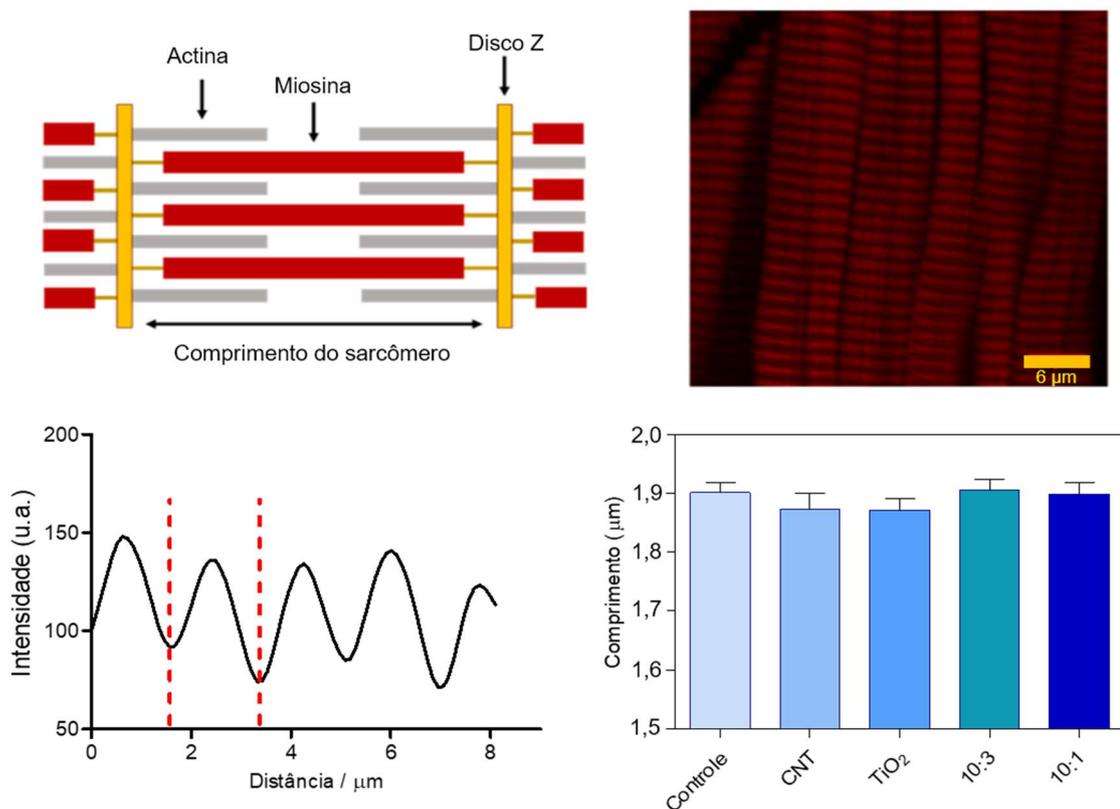
Estudos anteriores evidenciam que as larvas de zebrafish são mais sensíveis à fototoxicidade do TiO_2 do que peixes juvenis e adultos. Dessa forma, embora a mortalidade não tenha sido observada em nosso estudo, o TiO_2 causou efeito adverso nas larvas, o que pode torná-las mais suscetíveis a fatores externos (MA; DIAMOND, 2013).

Figura 19 - (A) Tamanho do saco vitelino e (B) Comprimento total de larvas de *D. rerio* expostas durante 96 horas a MWCNT oxidado, TiO_2 e TiO_2 -MWCNT (10:3) e TiO_2 -MWCNT (10:1) sob luz visível e UV. Média \pm erros padrão



Peng et al. (2015) correlacionaram alterações em fibras musculares de embriões de zebrafish, expostos a Arecolina, com a diminuição no crescimento das larvas. Além disso, estudos *in vitro* e *in vivo* realizados por Savi et al. (2014) mostraram que o TiO_2 pode causar encurtamento de sarcômero em miócitos ventriculares de ratos. Portanto, para avaliar se o encurtamento das larvas poderia ser explicado por alterações de fibras musculares somíticas, foi realizada uma análise confocal com geração de segundo harmônico de alta resolução. No entanto, não foi observado desarranjo nas fibras, e não houve diferenças no comprimento do sarcômero, em nenhum dos tratamentos (Figura 20).

Figura 20 - Comprimento do sarcômero. (A) Esquema ilustrativo de um sarcômero. (B) Geração de segunda harmônica (SHG) de alta resolução dos músculos do peixe-zebra (barra de escala: 5 μm). (C) Gráficos representativos de corte transversal. O comprimento do sarcômero foi determinado a partir da distância entre as duas linhas tracejadas, como mostrado nas parcelas transversais. (D) comparação do comprimento médio do sarcômero determinado a partir de amostras de imagens obtidas do SHG. Análise estatística baseada em 12 imagens obtidas de somitos abaixo do saco vitelino de três zebrafish após 96 horas de fertilização



Os TiO₂-MWCNTs (10:3 e 10:1) apresentaram menor toxicidade sob luz visível e foram mais fotocatalíticos que o TiO₂. Além disso, na caracterização coloidal, foi demonstrado que tanto o TiO₂ quanto o TiO₂-MWCNT apresentaram baixa estabilidade em água reconstituída e, portanto, sofreram agregação com o passar do tempo. Assim, esse fato pode ter facilitado à recombinação das espécies reativas com elétrons de partículas adjacentes (HOTZE; BOTTERO; WIESNER, 2010). Além disso, a agregação pode provocar um efeito de sombreamento diminuindo a atividade fotocatalítica das partículas, levando a uma menor geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (JASSBY; FARNER BUDARZ; WIESNER, 2012), o que pode explicar a menor toxicidade desses compósitos.

Espera-se que uma fotoatividade mais alta leve a uma maior toxicidade e, de fato, muitos trabalhos demonstraram essa correlação. Por exemplo, a toxicidade do TiO₂ após a fotoativação leva a um aumento na produção de ROS (MA; BRENNAN; DIAMOND, 2012a). O mesmo foi encontrado por Miller et al. (2012) e Li et al. (2014b) estudando a fototoxicidade do TiO₂ em *Isochrysis galbana* e *Hyalella azteca*, respectivamente. No entanto, existem resultados contraditórios. Por exemplo, a fototoxicidade de um nano-híbrido baseado em TiO₂ e grafeno foi estudado por Li et al. (2014a) e apesar do compósito ser mais fotocatalítico do que o TiO₂, não apresentou diferenças significativas na toxicidade. Portanto, assumir que a existência de uma correlação positiva entre maior fotoatividade e um aumento da toxicidade em todas as situações estudadas pode levar a previsões incorretas.

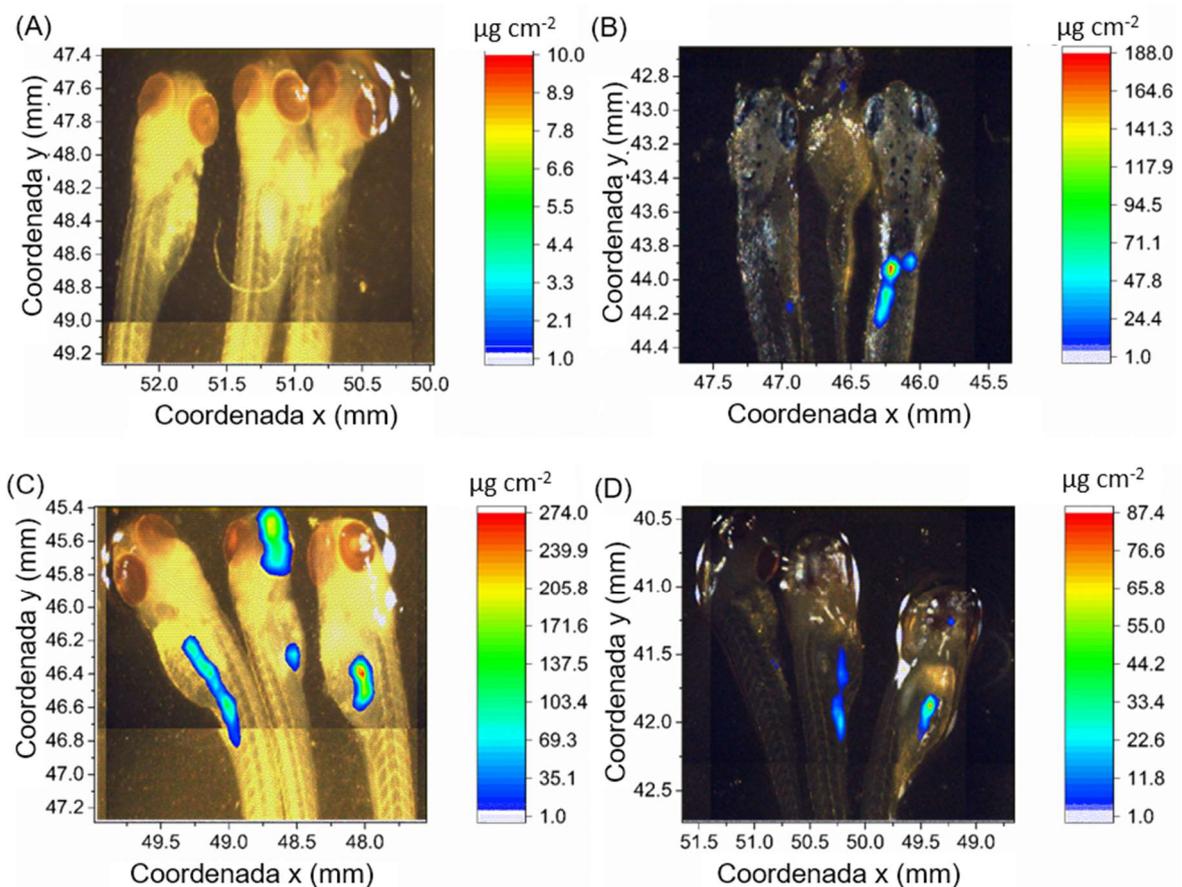
4.4.3 Mapeamento μ -XRF e Quantificação de Ti

A fim de estudar a possível absorção das NP pelas larvas de zebrafish, e em consequência a sua bioacumulação no ambiente, foi utilizada espectroscopia de fluorescência de raios-x com μ sonda. O Ti foi encontrado nos três tratamentos, mas não igualmente distribuído em todos os três indivíduos mapeados (Figura 21). A exposição 10:1 resultou na maior absorção de Ti. Neste caso, foi encontrado Ti em todos os três zebrafish. Além disso, um “hotspot” de Ti que atingiu 274,0 $\mu\text{g cm}^{-2}$ foi encontrado no intestino de um dos indivíduos.

É importante destacar que o Ti só foi encontrado no intestino do zebrafish. Assim, parece que nenhuma quantidade apreciável de Ti foi absorvida pelo intestino e transportada para outros tecidos. Nenhuma correlação clara entre o tipo de tratamento e o padrão de acumulação pode ser feita. Como esperado, o Ti não foi encontrado nas amostras controle.

Além do Ti, foram obtidos mapas químicos para S, P e K foram obtidos. Esses mapas não mostram qualquer inter-relação no espaço entre esses elementos e o Ti. Como o Ti foi encontrado como foco no intestino e nenhuma interação com outros elementos pôde ser detectada por XRF, podemos inferir que ele permaneceu como TiO_2 e não foi dissolvido ou quimicamente modificado no zebrafish. No entanto, esse assunto pode ser estudado usando espectroscopia de absorção de raios X que prontamente revelaria o ambiente químico do Ti.

Figura 21 - Distribuição de Ti em larvas de *Danio rerio* exposto por 96 horas a 0, 100, 130 e 110 mg L⁻¹ de (A) controle; (B) TiO_2 ; (C) TiO_2 -MWCNT (10:3); (D) TiO_2 -MWCNT (10:1), respectivamente



Além da absorção de TiO_2 pelas brânquias, os peixes também podem captar o TiO_2 por ingestão induzida por estresse, acumulando-se no intestino (FEDERICI; SHAW; HANDY, 2007). Estudar o acúmulo potencial e o transporte de NPs dentro do organismo oferece uma visão importante sobre o impacto que este material pode causar no ambiente aquático, visto que há evidências que indicam que o TiO_2 pode ser transferido através de redes alimentares (ZHU et al., 2010; MIELKE et al., 2013; CHEN et al., 2015).

Em um estudo realizado com uma cadeia alimentar simples, a transferência trófica de TiO_2 foi resultado de uma transferência de *D. magna* para *D. rerio*. Contudo, não foi observada biomagnificação (ZHU et al., 2010). Apesar de que neste estudo a taxa de depuração foi muito rápida, indicando que os peixes excretam o TiO_2 rapidamente, existem vários outros fatores a serem considerados na cadeia trófica. Presas e predadores têm diferentes modos de alimentação, fisiologia digestiva, residência intestinal, pH intestinal, e tudo isso pode afetar o caminho pelo qual a NP é absorvida e assimilada (TANGAA et al., 2016).

4.5 Conclusões

Embora o TiO_2 -MWCNT tenha apresentado maior atividade fotocatalítica, não foi observado toxicidade aguda (mortalidade) e nem efeitos subletais (deformações, edema, efeitos no crescimento, tamanho do saco vitelínico, tamanho e desarranjo dos sarcômeros) para os embriões de zebrafish (com e sem exposição à luz UV). Resultados que podem ser explicados pela baixa estabilidade deste material, causando uma possível recombinação das espécies reativas de oxigênio (ROS) com elétrons de partículas adjacentes ou devido ao efeito de sombreamento causando uma menor geração de ROS. Apesar da baixa toxicidade foi observada a ingestão do TiO_2 -MWCNT pelas larvas de zebrafish podendo causar a biocumulação e transferência pela cadeia trófica.

Referências

BRUNDO, M. V.; SALVAGGIO, A. Zebrafish or Danio rerio: A new model in nanotoxicology study. In: BOZKURF, Y (Ed.). **Recent advances in zebrafish researches**. London: Intech Open Limited, 2018. chap. 7.

CHAKRABORTY, C.; SHARMA, A. R.; SHARMA, G.; LEE, S.-S. Zebrafish: A complete animal model to enumerate the nanoparticle toxicity. **Journal of Nanobiotechnology**, London, v. 14, n. 1, p. 65, dec. 2016.

CHAUDHARY, D.; ANSARI, M. Z.; KHARE, N.; VANKAR, V. D. Preparation, Characterization and Photocatalytic Activity of Anatase, Rutile TiO₂ /Multiwalled Carbon Nanotubes Nanocomposite for Organic Dye Degradation. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, Washington, v. 17, n. 3, p. 1894–1900, mar. 2017.

CHEN, H.; YANG, S.; YU, K.; JU, Y.; SUN, C. Effective Photocatalytic Degradation of Atrazine over Titania-Coated Carbon Nanotubes (CNTs) Coupled with Microwave Energy. **The Journal of Physical Chemistry A**, Washington, v. 115, n. 14, p. 3034–3041, apr. 2011.

CHEN, J.; LI, H.; HAN, X.; WEI, X. Transmission and Accumulation of Nano-TiO₂ in a 2-Step Food Chain (Scenedesmus obliquus to Daphnia magna). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 95, n. 2, p. 145–149, aug. 2015.

CHEN, M. L.; ZHANG, F. J.; OH, W. C. Photocatalytic degradation of methylene blue by CNT/TiO₂ composites prepared from MWCNT and titanium n-butoxide with benzene. **Journal of the Korean Ceramic Society**, Seoul, v. 45, n. 11, p. 651–657, nov. 2008.

CHEN, T.-H.; LIN, C.-Y.; TSENG, M.-C. Behavioral effects of titanium dioxide nanoparticles on larval zebrafish (Danio rerio). **Marine Pollution Bulletin**, London, v. 63, n. 5–12, p. 303–308, 2011.

CHENG, J.; CHENG, S. H. Influence of carbon nanotube length on toxicity to zebrafish embryos. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 7, p. 3731–3739, jul. 2012.

CLEMENTE, Z.; CASTRO, V. L. S. S.; MOURA, M. A. M.; JONSSON, C. M.; FRACETO, L. F. Toxicity assessment of TiO₂ nanoparticles in zebrafish embryos under different exposure conditions. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 147, p. 129–139, feb. 2014.

DAI, Y.-J.; JIA, Y.-F.; CHEN, N.; BIAN, W.-P.; LI, Q.-K.; MA, Y.-B.; CHEN, Y.-L.; PEI, D.-S. Zebrafish as a model system to study toxicology. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 33, n. 1, p. 11–17, jan. 2014.

FANG, T.; YU, L. P.; ZHANG, W. C.; BAO, S. P. Effects of humic acid and ionic strength on TiO₂ nanoparticles sublethal toxicity to zebrafish. **Ecotoxicology**, London, v. 24, n. 10, p. 2054–2066, dec. 2015.

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. **Aquatic Toxicology**, Amsterdam, v. 84, p. 415–430, 2007.

FILHO, J. de S.; MATSUBARA, E. Y.; FRANCHI, L. P.; MARTINS, I. P.; RIVERA, L. M. R.; ROSOLEN, J. M.; GRISOLIA, C. K. Evaluation of carbon nanotubes network toxicity in zebrafish (*danio rerio*) model. **Environmental Research**, Amsterdam, v. 134, p. 9–16, 2014.

FOUQUERAY, M.; NOURY, P.; DHERRET, L.; CHAURAND, P.; ABBACI, K.; LABILLE, J.; ROSE, J.; GARRIC, J. Exposure of juvenile *Danio rerio* to aged TiO₂ nanomaterial from sunscreen. **Environmental Science and Pollution Research**, Berlin, v. 20, n. 5, p. 3340–3350, may 2013.

HILL, A. J.; TERAOKA, H.; HEIDEMAN, W.; PETERSON, R. E. Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity. **Toxicological Sciences**, London, v. 86, n. 1, p. 6–19, jul. 2005.

HORIE, Y., YAMAGISHI, T., TAKAHASHI, H., SHINTAKU, Y., IGUCHI, T., TATARAZAKO, N. Assessment of the lethal and sublethal effects of 20 environmental chemicals in zebrafish embryos and larvae by using OECD TG 212. **Journal of Applied Toxicology**, London, v. 37 n. 10, p. 1245-1253, 2017.

HOTZE, E. M.; BOTTERO, J.-Y.; WIESNER, M. R. Theoretical Framework for Nanoparticle Reactivity as a Function of Aggregation State. **Langmuir**, Washington, v. 26, n. 13, p. 11170–11175, jul. 2010.

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

HUANG, S.-H.; HSIAO, C.-D.; LIN, D.-S.; CHOW, C.-Y.; CHANG, C.-J.; LIAU, I. Imaging of Zebrafish In Vivo with Second-Harmonic Generation Reveals Shortened Sarcomeres Associated with Myopathy Induced by Statin. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 6, n. 9, p. e24764, sep. 2011.

IWAMATSU, T. Stages of normal development in the medaka *Oryzias latipes*. **Mechanisms of Development**, Limerick, v. 121, n. 7, p. 605–618, 2004.

JASSBY, D.; FARNER BUDARZ, J.; WIESNER, M. Impact of Aggregate Size and Structure on the Photocatalytic Properties of TiO₂ and ZnO Nanoparticles. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 46, n. 13, p. 6934–6941, jul. 2012.

KASHIWADA, S. Distribution of nanoparticles in the see-through medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental health perspectives**, New York, v. 114, n. 11, p. 1697–702, nov. 2006.

LI, S.; PAN, X.; WALLIS, L. K.; FAN, Z.; CHEN, Z.; DIAMOND, S. a. Comparison of TiO₂ nanoparticle and graphene-TiO₂ nanoparticle composite phototoxicity to *Daphnia magna* and *Oryzias latipes*. **Chemosphere**, Oxford, v. 112, p. 62–69, 2014a.

LI, S.; WALLIS, L. K.; MA, H.; DIAMOND, S. a. Phototoxicity of TiO₂ nanoparticles to a freshwater benthic amphipod: Are benthic systems at risk? **Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 466–467, p. 800–808, 2014b.

LIN, S.; ZHAO, Y.; NEL, A. E.; LIN, S. Zebrafish: An In Vivo Model for Nano EHS Studies. **Small**, Weinheim, v. 9, n. 9–10, p. 1608–1618, may 2013.

MA, H.; BRENNAN, A.; DIAMOND, S. a. Photocatalytic reactive oxygen species production and phototoxicity of titanium dioxide nanoparticles are dependent on the solar ultraviolet radiation spectrum. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 31, n. 9, p. 2099–2107, 2012.

MA, H.; DIAMOND, S. A. Phototoxicity of TiO₂ nanoparticles to zebrafish (*Danio rerio*) is dependent on life stage. **Environmental Toxicology and Chemistry**, New York, v. 32, n. 9, p. 2139–2143, sep. 2013.

MIELKE, R. E.; PRIESTER, J. H.; WERLIN, R. A.; GELB, J.; HORST, A. M.; ORIAS, E.; HOLDEN, P. A. Differential growth of and nanoscale TiO₂ accumulation in *Tetrahymena thermophila* by direct feeding versus trophic transfer from *Pseudomonas aeruginosa*. **Applied and environmental microbiology**, Washington, v. 79, n. 18, p. 5616–24, sep. 2013.

MILLER, R. J.; BENNETT, S.; KELLER, A. a.; PEASE, S.; LENIHAN, H. S. TiO₂ nanoparticles are phototoxic to marine phytoplankton. **PloS One**, San Francisco, v. 7, n. 1, 2012.

NATARAJAN, T. S.; LEE, J. Y.; BAJAJ, H. C.; JO, W.-K.; TAYADE, R. J. Synthesis of multiwall carbon nanotubes/TiO₂ nanotube composites with enhanced photocatalytic decomposition efficiency. **Catalysis Today**, Amsterdam, v. 282, p. 13–23, mar. 2017.

OECD. **Test No. 236**: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test. Guideline. Paris: OECD Publishing, 2013.

PAGNOUT, C.; JOMINI, S.; DADHWAL, M.; CAILLET, C.; THOMAS, F.; BAUDA, P. Role of electrostatic interactions in the toxicity of titanium dioxide nanoparticles toward *Escherichia coli*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, Amstedam, v. 92, p. 315–321, 2012.

PATERSON, G.; ATARIA, J. M.; HOQUE, M. E.; BURNS, D. C.; METCALFE, C. D. The toxicity of titanium dioxide nanopowder to early life stages of the Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Chemosphere**, Oxford, v. 82, n. 7, p. 1002–1009, feb. 2011.

PENG, W.-H.; LEE, Y.-C.; CHAU, Y.-P.; LU, K.-S.; KUNG, H.-N. Short-Term Exposure of Zebrafish Embryos to Aroclorine Leads to Retarded Growth, Motor Impairment, and Somite Muscle Fiber Changes. **Zebrafish**, Larchmont, v. 12, n. 1, p. 58–70, feb. 2015.

RHOUATI, A.; NASIR, M.; MARTY, J.-L.; HAYAT, A. Photoinduced discharge of electrons stored in a TiO₂-MWCNT composite to an analyte: application to the fluorometric determination of hydrogen peroxide, glucose and aflatoxin B₁. **Microchimica Acta**, Wien, v. 185, n. 1, p. 26, jan. 2018.

SAMAEI, S.-M.; RABBANI, S.; JOVANOVIĆ, B.; MOHAJERI-TEHRANI, M. R.; HAGHPANAH, V. Efficacy of the hatching event in assessing the embryo toxicity of the nano-sized TiO₂ particles in zebrafish: A comparison between two different classes of hatching-derived variables. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, Amsterdam, v. 116, p. 121–128, 2015.

SAMPAIO, M. J.; SILVA, C. G.; SILVA, A. M. T.; PASTRANA-MARTÍNEZ, L. M.; HAN, C.; MORALES-TORRES, S.; FIGUEIREDO, J. L.; DIONYSIOU, D. D.; FARIA, J. L. Carbon-based TiO₂ materials for the degradation of Microcystin-LA. **Applied Catalysis B: Environmental**, Amsterdam, v. 170–171, p. 74–82, jul. 2015.

SAVI, M. et al. Titanium dioxide nanoparticles promote arrhythmias via a direct interaction with rat cardiac tissue. **Particle and Fibre Toxicology**, London, v. 11, n. 1, p. 63, dez. 2014.

SHIH, Y.-J.; SU, C.-C.; CHEN, C.-W.; DONG, C.-D.; LIU, W.; HUANG, C. P. Adsorption characteristics of nano-TiO₂ onto zebrafish embryos and its impacts on egg hatching. **Chemosphere**, Oxford, v. 154, p. 109–117, 2016.

STRÄHLE, U.; SCHOLZ, S.; GEISLER, R.; GREINER, P.; HOLLERT, H.; RASTEGAR, S.; SCHUMACHER, A.; SELDERSLAGHS, I.; WEISS, C.; WITTERS, H.; BRAUNBECK, T. Zebrafish embryos as an alternative to animal experiments—A commentary on the definition of the onset of protected life stages in animal welfare regulations. **Reproductive Toxicology**, Elmsford, v. 33, n. 2, p. 128–132, apr. 2012.

TANGAA, S. R.; SELCK, H.; WINTHER-NIELSEN, M.; KHAN, F. R. Trophic transfer of metal-based nanoparticles in aquatic environments: a review and recommendations for future research focus. **Environ. Sci.: Nano**, London, v. 3, n. 1, p. 966–981, 2016.

USEPA. **Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms**. 5. ed. Washington, 2002.

VARGAS, R.; PONCE-CANCHIHUAMÁN, J. Emerging various environmental threats to brain and overview of surveillance system with zebrafish model. **Toxicology Reports**, London, v. 4, p. 467–473, 2017.

WEHMAS, L. C.; ANDERS, C.; CHESS, J.; PUNNOOSE, A.; PEREIRA, C. B.; GREENWOOD, J. A.; TANGUAY, R. L. Comparative Metal Oxide Nanoparticle Toxicity Using Embryonic Zebrafish. **Toxicology reports**, Dublin, v. 2, p. 702–715, 2015.

YAO, Y.; LI, G.; CISTON, S.; LUEPTOW, R. M.; GRAY, K. a. Photoreactive TiO₂ /Carbon Nanotube Composites: Synthesis and Reactivity. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 42, n. 13, p. 4952–4957, 2008.

ZHU, X.; WANG, J.; ZHANG, X.; CHANG, Y.; CHEN, Y. Trophic transfer of TiO₂ nanoparticles from daphnia to zebrafish in a simplified freshwater food chain. **Chemosphere**, Oxford, v. 79, n. 9, p. 928–933, 2010.

ZOUZELKA, R.; KUSUMAWATI, Y.; REMZOVA, M.; RATHOUSKY, J.; PAUPOURÉ, T. Photocatalytic activity of porous multiwalled carbon nanotube-TiO₂ composite layers for pollutant degradation. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 317, p. 52–59, nov. 2016.

5 AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DO NANOMATERIAL TiO₂-MWCNT EM FIBROBLASTOS DE TRUTA ARCO-IRÍS (RTG-2)

5.1 Introdução

Atualmente base de dados europeia lista 3036 produtos contendo NMs (THE NANODATABASE, 2013), sendo que 1829 foram documentadas como produtos de consumo (PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES, 2013). Uma vez que estes materiais interagem com sistemas vivos, é necessário conhecer a relação entre as características físico-química dos NMs, a exposição, os processos bioquímicos afetados e os resultados biológicos finais (citotoxicidade, mortalidade, etc.) para a compreensão total de seus mecanismos de toxicidade. Este conhecimento irá auxiliar na manutenção da saúde ambiental e humana (QIU; CLEMENT; HAYNES, 2018).

As NPs podem variar em suas propriedades físico-químicas, como composição, tamanho, carga e superfície. Conseqüentemente, também podem ser afetados os processos bioquímicos, os eventos nos níveis celulares e moleculares envolvendo diferentes espécies (Figura 22). Os efeitos biológicos observados, dependendo do escopo do estudo, podem ser citotoxicidade para testes *in vitro* ou resultados de sobrevivência e reprodução, quando utilizado organismos inteiros, estudos *in vivo* (QIU; CLEMENT; HAYNES, 2018). As relações causais entre estes efeitos refletidos em diferentes níveis (citotoxicidade, sobrevivência e reprodução) são fundamentais para entender como os NMs afetam os organismos e, em consequência, impactam a saúde humana e ambiental.

Recentemente, as linhagens celulares derivadas de peixes são muito utilizadas para a análise citotoxicológica de contaminantes ambientais (GALBIS-MARTÍNEZ et al., 2018; LUNGU-MITEA; OSKARSSON; LUNDQVIST, 2018; YURDAKÖK-DIKMEN et al., 2018). A partir dessas linhagens é possível averiguar os mecanismos pelos quais os contaminantes exercem sua toxicidade; determinar a toxicidade relativa de diferentes contaminantes químicos e avaliar a toxicidade de amostras ambientais.

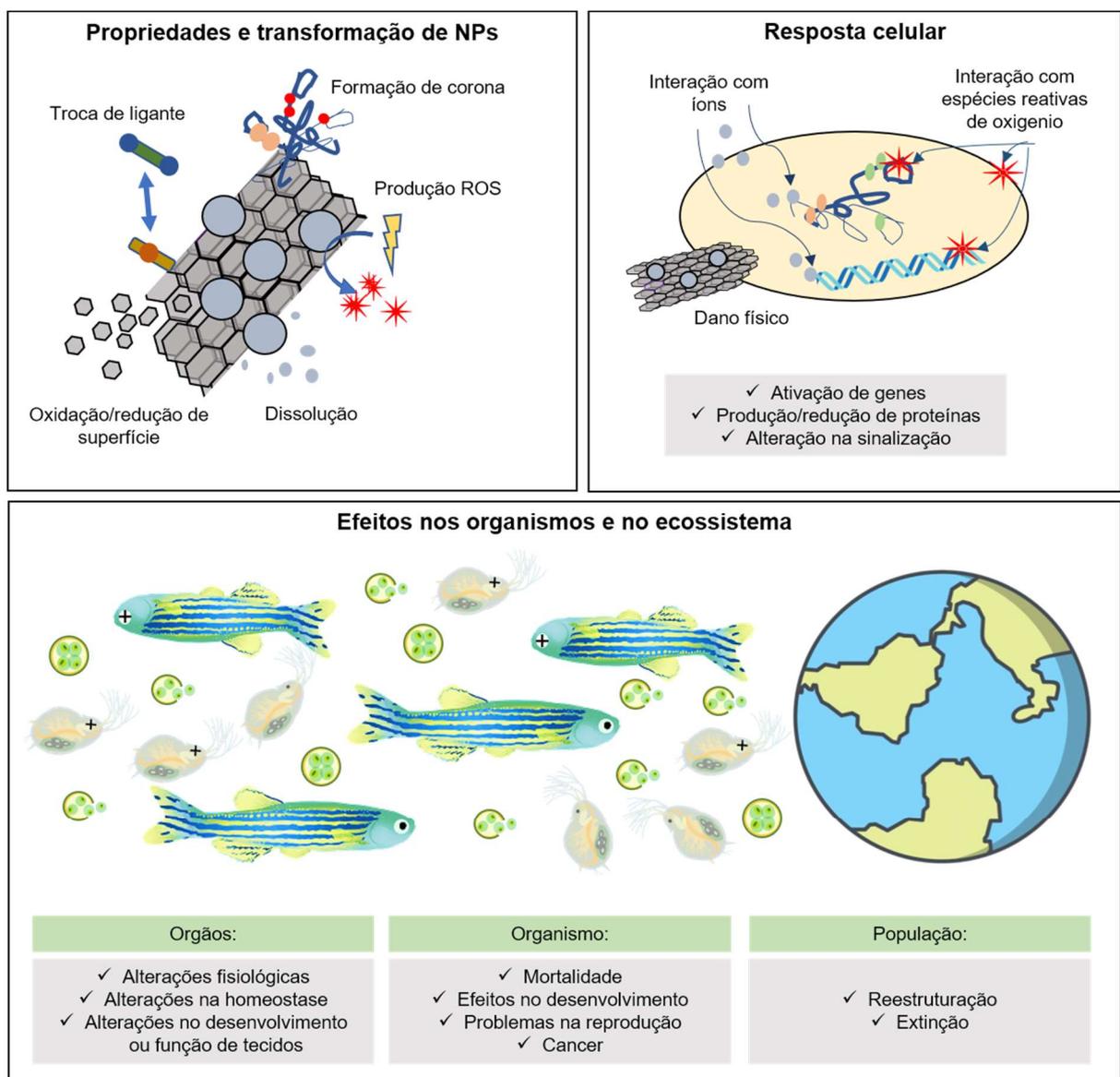
Existem muitas ferramentas estabelecidas para os ensaios de citotoxicidade. No entanto ensaios colorimétricos e ensaios de fluorescência podem sofrer resultados falso-positivos ou negativos devido às propriedades dos NMs (ALKILANY et al., 2016; AZHDARZADEH et al., 2015; CASEY et al., 2007). Há muitas maneiras pelas quais os NMs podem interferir em um ensaio biológico *in vitro*. Por exemplo, as propriedades ópticas intrínsecas das NPs podem interferir em ensaios que dependem da medição de mudanças na absorvância ou fluorescência como indicadores para atividades celulares (KONG et al., 2011; ONG et al., 2014). Também devido à sua alta reatividade superficial, as NPs podem adsorver, reagir com reagentes usados nos ensaios, ou ainda liberar espécies químicas em meios de teste alterando o comportamento de corantes e enzimas nestes ensaios. Em alguns casos, as NPs catalíticas a produção de ROS. (WÖRLE-KNIRSCH; PULSKAMP; KRUG, 2006; BELYANSKAYA et al., 2007; SEMISCH; HARTWIG, 2014; KÄMPFER et al., 2017). Todas estas interferências podem contribuir para as discrepâncias observadas nos resultados dos estudos de nanotoxicidade.

Assim, a avaliação da toxicidade das NPs não deve depender de um único ensaio devido à possibilidade de sofrer interferências, como nas abordagens de medição mencionadas anteriormente. Diversos ensaios no mesmo “endpoint” devem ser realizados para confirmar certo efeito. Contudo, ainda existem desafios a serem superados nesta avaliação. Podem ser citados o estabelecimento de protocolos adaptados aos ensaios nanotoxicológicos e a compreensão da correlação entre as propriedades dos NMs e os efeitos biológicos observados decorrentes de sua exposição (AZHDARZADEH et al., 2015; PETERSEN et al., 2015; STEINHÄUSER R SAYRE, 2017).

Apesar da importância do revestimento de superfície na determinação da nanotoxicidade já estar bem estabelecida, com a consideração da carga superficial, espessura da camada, tipo de ligante, etc (KIM et al., 2013; ALLEN et al., 2017) ; uma lacuna frequente ao correlacionar efeitos biológicos às propriedades das NPs é o estudo detalhado da transformação da superfície dos NMs em diferentes matrizes. Assim, ao entrar em contato com proteínas, a superfície pura da NP pode sofrer alterações, tais como mudanças em ligantes de superfície, estrutura e composição, bem como estados de agregação de NP (LEE et al., 2014; MUDUNKOTUWA; GRASSIAN, 2015; ZHAO et al., 2015). Neste contato

com proteínas do meio, uma capa proteica, chamada *protein corona*, pode ser formado na NP, conferindo uma identidade biológica a este NM, o que influencia a biocompatibilidade e biodistribuição do NM (LYNCH; DAWSON, 2008; CORBO et al., 2016). Visto que, alterações na superfície das NP podem afetar a toxicidade (SUKHANOVA et al., 2018), a caracterização das transformações na superfície das NP, incluindo a formação da *protein corona*, é conseqüentemente importante para a maior compreensão entre as propriedades do NM e os efeitos biológicos observados (WALKEY et al., 2014; ZHAO et al., 2015; NEAGU et al., 2017).

Figura 22 - Relação entre as propriedades das nanopartículas, os processos bioquímicos afetados e os resultados biológicos finais



Fonte: Do autor.

5.2 Objetivo

Este capítulo tem como objetivo verificar os possíveis efeitos nanotoxicológicos do TiO₂-MWCNT em fibroblastos derivados de tecido gonadal de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) (RTG-2). Levando em consideração a estabilidade coloidal e formação da *protein corona*. Verificando quanto a viabilidade celular, ciclo celular e internalização do NM.

5.3 Materiais e Métodos

5.3.1 Caracterização da Dispersão e Estudo de Estabilidade Coloidal

A fim de avaliar se, após a dispersão em meio de cultura de células, o TiO₂-MWCNT manteve suas características morfológicas foi utilizado a criomicroscopia eletrônica (Cryo-TEM). Esta técnica permite a análise *in situ* da dispersão pelo microscópio eletrônico de transmissão, uma vez que a dispersão é congelada, evitando a deformação da amostra devido ao vácuo do equipamento, bem como os efeitos de secagem durante o preparo da amostra. As amostras, contendo 100 µg mL⁻¹ do nanomaterial, em água e meio nutriente modificado de Dulbecco (DMEM), com e sem suplementação com 10% de soro fetal bovino (SFB), foram preparadas utilizando o equipamento Vitrobot Mark IV (Thermo Fischer Scientific, USP). A análise foi feita utilizando o microscópio eletrônico de transmissão TALOS F200C (Thermo Fischer Scientific, USA) operando a 200 kv. As imagens foram adquiridas usando uma câmera CMOS Ceta 16M com pixels de 4k por 4k (Thermo Fisher Scientific, USA).

Estudos de estabilidade coloidal do TiO₂-MWCNT na concentração de 100 µg ml⁻¹ em meio de cultura de células (Dulbecco's Modified Eagle Medium – DMEM), com e sem a adição de 10% de soro fetal bovino (SFB), foram realizados através de um espectrofotômetro com densidade óptica de 350 nm (multiskan GO, Thermo Scientific, UK) no tempo de 0, 1, 4 e 8 e 24 horas. O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersividade (PDI) das partículas em DMEM, com e sem 10% de suplementação com soro fetal bovino (SFB), foram avaliados através do espalhamento de luz dinâmico (DLS) e a carga superficial das partículas (potencial zeta, ZP) foi obtida por espalhamento de luz eletroforético (ELS), ambos usando

um instrumento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments , UK). Para essas análises foi utilizada uma dispersão de 100 µg mL⁻¹. Todas as análises foram feitas em triplicata.

5.3.3 Caracterização da *Protein corona*

O preparo da corona foi feito a partir da incubação de 100 µg mL⁻¹ de TiO₂ e TiO₂-MWCNT em DMEM suplementado com 10% de SFB, por 1 hora a 22 °C. Após a incubação, a dispersão foi centrifugado a 14000 rotações por minuto (rpm) por 1 h a 4 °C, seguido de três lavagens com PBS (centrifugando por 30 min a 4 °C e 14000 rpm, descartando o sobrenadante), para a remoção das proteínas fracamente ligadas e não ligadas. Após as lavagens o pellet obtido, formado pelo nanomaterial e proteínas fortemente ligadas (hard corona) foi ressuspendido em 100 µL de água deionizada e sonicado por 2 min. Para extração das proteínas, foram adicionados 40 µL de tampão de amostra e 10 µL de Ditiotretitol (DTT) 1:10, seguido de mais uma etapa de sonicação (2 min), e após estes passos, as amostras foram incubadas a 99 °C por 3 min. Por fim, 15 µL da amostra foram aplicados em gel de SDS-PAGE 15% (Tabela 2).

Tabela 2: Composição do gel de SDS-PAGE 15%

Solução/Reagente	Gel de empilhamento	Gel de carregamento
H ₂ O deionizada	3,22 mL	4,20 mL
Mix de acrilamida 30%	7,00 mL	1,00 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	3,50 mL	---
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8	---	760 µL
SDS 10%	140 µL	60 µL
APS 10%	140 µL	60 µL
TEMED	5,6 µL	60 µL

*Quantidade suficiente para 2 géis

5.3.4 Condições da cultura da linhagem celular RTG-2

Para este estudo foi utilizada a linhagem celular RTG-2, que são células fibroblásticas provenientes de tecido gonadal de truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). A linhagem foi fornecida pelo Instituto de tecnologia de Dublin, instituto de pesquisa FOCAS. As células foram mantidas em DMEM (ThermoFisher) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, lote:0699, Brasil), 100 IU mL⁻¹ de penicilina, 100 µg mL⁻¹ de estreptomicina e 25 mM de 4-(2-hidroxietil)-1-ácido piperazineetanossulfônico (HEPES). As culturas foram mantidas em incubadora a 22 ± 1 °C sob atmosfera normal.

5.3.5 Análise de Citotoxicidade

5.3.5.1 Ensaio de Viabilidade Celular por Alamar Blue

A viabilidade celular foi analisada pelo ensaio Alamar blue, o qual tem se mostrado promissor como indicador de citotoxicidade de nanomateriais (MITJANS, 2018). O Alamar blue é constituído pela molécula resazurina, a qual é internalizada e metabolizada por células vivas, gerando como metabólito uma molécula fluorescente, a resofurina, sendo a conversão quantificada, em espectrofotômetro. Esta transformação é um indicador acurado de viabilidade celular. Quanto mais tóxica a substância menor será a conversão da resazurina em resofurina, observado a partir de valores de absorbância. Para os ensaios de citotoxicidade, placas de 96 poços foram semeadas com 2x10⁵ células por mL por um período de 24 horas. Após esse período, foi feita a diluição seriada com 100 µL de TiO₂-MWCNT, em DMEM, com e sem a adição de 10% de SFB. As concentrações utilizadas foram de 100 µg mL⁻¹ a 0,78 µg mL⁻¹. Para cada tratamento foram feitas 6 repetições e 3 réplicas independentes. O período de incubação foi de 24 horas e o ensaio foi mantida em câmara de incubação a 22 ± 1 °C, em atmosfera normal. Após a exposição os poços foram lavados com PBS e foram adicionados 100 µL de meio de cultura de células contendo 10% do reagente Alamar blue. A placa foi incubada por 3 horas e a absorbância a 570 nm foi captada em leitor UV-Vis (Multiskan GO, Thermo Scientific, UK).

5.3.5.2 Ensaio de Viabilidade por Neutral Red

Outro ensaio empregado foi o Neutral Red (NR). Este ensaio de citotoxicidade também é um indicativo de sobrevivência baseado na habilidade de células viáveis em incorporar e reter o corante Neutral Red. Substâncias tóxicas causam um decréscimo na absorção e ligação do NR, permitindo a observação de medidas espectrofotométricas indicando a viabilidade celular. Apesar de acumular especificamente em lisossomos, a retenção de NR depende da integridade da membrana celular, do metabolismo energético adequado e do funcionamento dos lisossomos. Portanto, o ensaio de NR avalia o comprometimento destes três parâmetros celulares (BOLS et al., 2005). A exposição foi feita de maneira similar ao Alamar blue, porém após as 24 horas de exposição os poços foram lavados com PBS e adicionados 100 μL de meio contendo 1,25 μL do estoque (4 mg mL^{-1}) do corante NR. Em seguida a placa foi incubada por 3 horas, após esse período os poços foram lavados mais uma vez com PBS e foram adicionados 150 μL da solução de reação, contendo 1% de ácido acético, 50% de etanol e 49% de água destilada. A placa foi mantida em agitação por 10 min a 240 rpm e em seguida foi feita a leitura da absorbância a 240 nm.

5.3.5.3 Ensaio de Viabilidade Celular por Trypan blue

Foi realizada a contagem celular em microscópio ótico com auxílio do corante Trypan blue, a fim de verificar possíveis resultados falso positivos de citotoxicidade pelos NM em testes colorimétricos (CASEY et al., 2007).

O princípio deste ensaio é de que somente as células não viáveis absorvem o corante, células viáveis permanecem não coradas. Foram incubadas, em placas de 96 poços 2×10^5 células por mL por um período de 24 horas. Após este período foi feita a incubação das células com o nanomaterial, as concentrações utilizadas foram de 1, 10 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após o tratamento com os NMs, as células foram lavadas com PBS e foram adicionados 30 μL de tripsina. Após 5 min as células foram ressuspensas em 100 μL DMEM e então centrifugadas por 1 min a 1500 RPM. Então, o sobrenadante foi removido e as células ressuspensas em 10 μL de DMEM e 10 μL de Trypan blue. Em seguida foi feita a contagem em câmara de

Neubauer. O número de células por mL foi calculado utilizando a equação 2, onde C é o número de células por mL, NC é o número de células contadas e NQ o número de quadrantes utilizados na contagem.

$$C = NC * 2 * 10000 / NQ \quad \text{equação (2)}$$

5.3.5.4 Ensaio de Ciclo Celular por Citometria de Fluxo

O equipamento utilizado para essas análises foi o citometro de fluxo BD Accuri C6 (BD, oxford, UK). Células RTG-2 (2×10^6 células por mL) foram semeadas em frasco T-25. Após 24 horas as células foram expostas a 1 mg L^{-1} da amostra TiO_2 -MWCNT por mais 24 horas. Esta concentração foi escolhida porque não causou efeito tóxico sobre as células, como previamente estudado pelos ensaios de viabilidade celular, além disso, não interferiu com a dispersão das células, necessária para a análise. Após a exposição, as células foram lavadas com PBS três vezes e colhidas por remoção enzimática (tripsina). Em seguida, foram fixadas em etanol 70% por 30 min. Após a fixação, as células foram centrifugadas (1400 rpm) por 5 min e lavadas com PBS duas vezes. Então as células foram tratadas com ribonuclease durante 5 min. Por último, as células foram coradas com iodeto de propídio, incubadas por 20 min e analisadas no citometro de fluxo.

5.3.6 Espectroscopia RAMAN

Para avaliar se o TiO_2 -MWCNT teria o potencial de internalização celular, foi utilizada a espectroscopia RAMAN. Para essa análise, células RTG-2 foram semeadas em discos de fluoreto de cálcio (CaF_2), a uma densidade de 2×10^5 células por disco, num volume de 3 mL de meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 h de incubação a $22 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS. O meio foi substituído por uma suspensão de nanopartículas ($1 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$) em DMEM, com e sem suplementação de SFB (10%). Após 24 horas de exposição, o meio foi removido, as células foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com formalina durante 3 min. Ao final foram lavadas e mantidas em água ultrapura até a análise.

O espectrômetro utilizado foi o Horiba Jobin-Yvon LabRAM HR800, equipado com um laser de diodo com linha de excitação em 532 nm, potência de 50mW e uma objetiva de imersão de 100x (LUMPlanF1, Olympus, NA 1,00). O espectro, da região de 300 cm^{-1} a 3200 cm^{-1} , foi obtido com grade de 600 linhas/mm e abertura confocal de $100\text{ }\mu\text{m}$. O mapa no eixo Z (profundidade) foi adquirido da região citoplasmática de 3 células diferentes de cada tratamento, com 20 pontos e com incremento de $0,5\text{ }\mu\text{m}$, na direção Z. O tempo de aquisição foi de 20 segundos.

5.3.7 Microscopia Hiperespectral (CytoViva)

Foi realizada a microscopia hiperespectral (CytoViva) a fim de mapear a localização das NP nas células. Para essa análise, células (RTG-2) foram semeadas em lamínulas de microscopia comum, a uma densidade de 1×10^5 células por lamínula, num volume de 3 mL de DMEM suplementado com 10% de SFB. Após 24 h de incubação a $22 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ o meio foi removido e as células foram lavadas com PBS. O meio foi substituído com suspensão de nanopartículas ($1\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) em DMEM, com e sem suplementação de SFB (10%). Após 24 horas de exposição, o meio foi removido, as células foram lavadas três vezes com PBS e fixadas com gluteraldeído (2%) durante 3 min. Ao final foram lavadas e mantidas em água ultrapura.

Para a análise foi utilizado um microscópio Olympus (BX-53, Japão) acoplado com uma câmera hiperespectral VNIR (CytoViva, Inc., Alabama) e um condensador de campo escuro de alta resolução (abertura numérica; NA 1,2 - 1,4). Este sistema fornece uma resolução de 90 nm, com excelente contraste e relação sinal-ruído. As amostras foram analisadas utilizando uma objetiva de imersão de 100x (Olympus UPlanFLN 100x, 1,3 NA). Imagens convencionais de campo escuro foram coletadas com uma câmera Dagexcel-M (Dage-MTI, Michigan, IN).

Imagens espectrais foram obtidas utilizando o software ENVI 4,8. A fim de evitar falsos positivos, foi utilizada a ferramenta do software “filtrar partícula”, onde todos os espectros do controle foram removidos do tratamento. Desta forma os espectros presentes no mapa corresponderam apenas ao nanomaterial.

5.3.8 Análise estatística

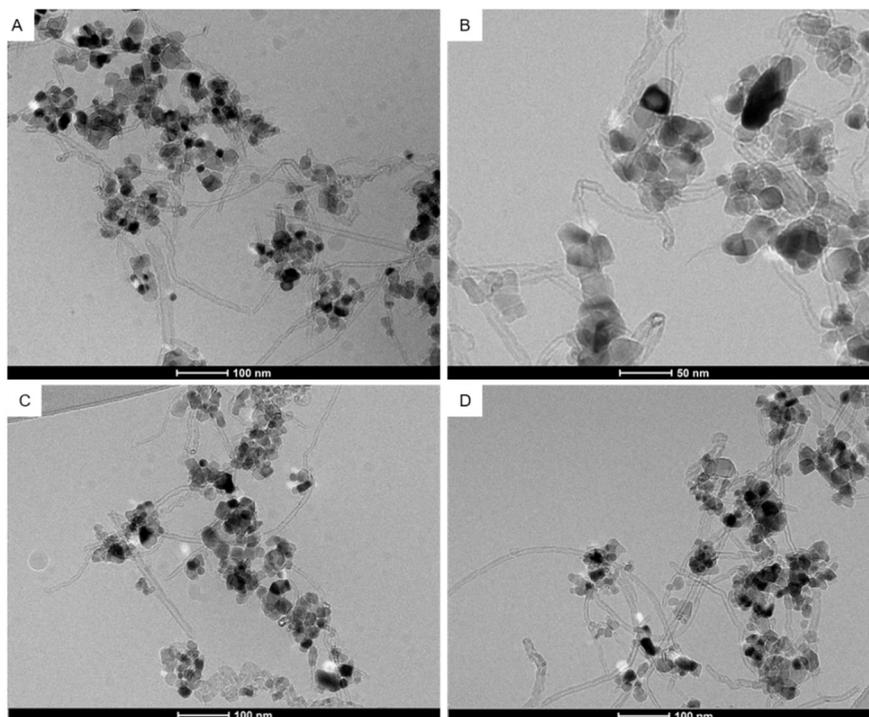
As análises estatísticas foram realizadas com o software Graphpad Prism v.5. Para analisar a interação entre as condições de exposição (com e sem SFB) foi utilizada ANOVA de duas e para a comparação dentro dos tratamentos, empregou-se ANOVA de uma via. Foi utilizado o pós-teste de Bonferroni, com nível de significância de 5%.

5.4 Resultados

5.4.1 Caracterização da Dispersão e Estudo da Estabilidade Coloidal

Através das imagens de criomicroscopia foi possível observar que a morfologia das amostras se manteve, mesmo com a adição de proteína ao meio de cultura (Figura 23). Além da morfologia das amostras, a criomicroscopia também permite a análise de biomoléculas, como proteínas (QUENTIN; RAUNSER, 2018). Porém, não foi possível observar a interação entre as proteínas do meio e o nanomaterial.

Figura 23 - Imagens de microscopia eletrônica de transmissão, modo crio, do TiO_2 -MWCNT (100 mg L^{-1}) em DMEM com SFB (A e B), sem SFB (C) e em água ultra pura (D)



A estabilidade da dispersão de TiO₂ e TiO₂-MWCNT em meio DMEM, com e sem adição de SFB (10%), foi avaliada pelas medidas de DLS (Tabela 3). A diluição das NP em DMEM sem SFB aumentou substancialmente o diâmetro hidrodinâmico de todas as partículas. No entanto, em DMEM com SFB houve uma diminuição do diâmetro hidrodinâmico tanto para a nanopartícula de TiO₂ quanto para o TiO₂-MWCNT. Também é possível notar pela Tabela 3 uma mudança nas cargas das partículas, tanto em meio DMEM com SFB quanto sem SFB. No DMEM a carga foi mais negativa em comparação à água. Este meio é composto por diversos sais, como bicarbonato de sódio, cloreto de cálcio, sulfato de magnésio, entre outros, o que explica a mudança na carga dos NMs.

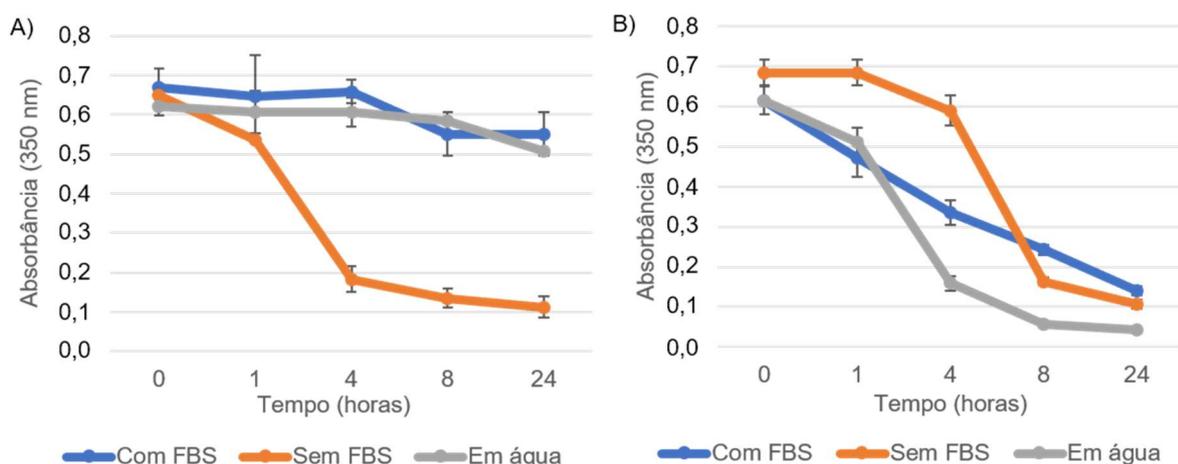
Tabela 3 – Diâmetro hidrodinâmico (\pm desvio padrão, n = 3) das partículas em suspensão (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersividade (Pdl) e potencial zeta (ZP) das suspensões de TiO₂ e TiO₂-MWCNT em água ultrapura, DMEM com e sem SFB, obtida usando DLS e ELS

	Nanopartículas	Diâmetro hidrodinâmico (d.nm)	Pdl	ZP (mV)
Água Ultrapura	TiO ₂	335,000 (\pm 8,286)	0,226 (\pm 0,006)	1.132 (\pm 0,445)
	TiO ₂ -MWCNT	741933 (\pm 91,680)	0,632 (\pm 0,015)	-4,250 (\pm 0,111)
DMEM sem SFB	TiO ₂	845,735 (\pm 59,837)	0,275 (\pm 0,016)	-6,606 (\pm 1,249)
	TiO ₂ -MWCNT	2274,000 (\pm 337,538)	0,683 (\pm 0,185)	-12,900 (\pm 0,700)
DMEM com SFB	TiO ₂	224,433 (\pm 8,405)	0,464 (\pm 0,037)	-8,496 (\pm 1,096)
	TiO ₂ -MWCNT	564,833 (\pm 51,227)	0,646 (\pm 0,514)	-9,040 (\pm 0,345)

Analisando o gráfico da Figura 24, o qual demonstra a estabilidade da dispersão em função do tempo, através de leitura em espectrofotômetro, notamos que a ausência de SFB em DMEM afeta significativamente a estabilidade do TiO₂. No entanto, o TiO₂-MWCNT apresentou alta taxa de sedimentação em todas as condições testadas, destacado na Figura 25. Tendo em vista que os grupos oxigenados são responsáveis por promover a estabilidade coloidal do ox-MWCNT, a baixa estabilidade deste material pode ser consequência a ligação do TiO₂ a estes grupos. O mesmo foi observado por Das et al. (2018) ao estudarem a estabilidade

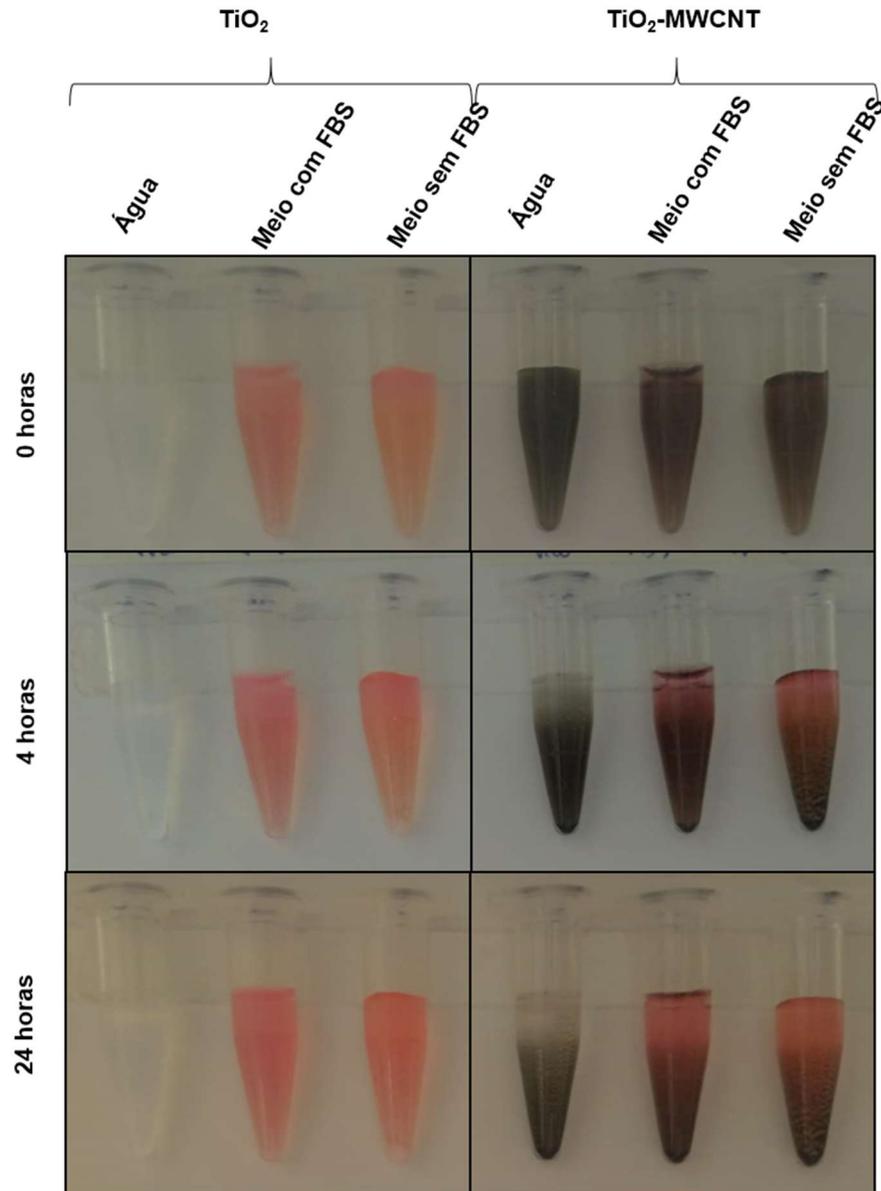
do TiO₂-MWCNT. Eles observaram que a agregação estava relacionada a quantidade de TiO₂ na amostra e conseqüentemente uma menor quantidade de oxigênio.

Figura 24 - Estabilidade da nanopartícula de TiO₂ e do nanomaterial híbrido TiO₂-MWCNT em meio DMEM com e sem adição de soro fetal bovino (SFB) e em água ultrapura por 24 horas. (A) Gráfico de estabilidade por UV-VIS (350 nm) do TiO₂ e (B) do TiO₂-MWCNT



Esses dados contradizem os dados de DLS, que mostrou uma diminuição no tamanho hidrodinâmico para a dispersão em DMEM com SFB. A partir dos resultados de DLS é possível observar a agregação das NP, enquanto que os resultados de UV-Vis estão relacionados com a sedimentação das NPs. Portanto, a presença de soro fetal não evitou a sedimentação, mas interferiu na agregação. Esses resultados já foram reportados na literatura por Allegri et al. (2016), ao estudarem a estabilidade de nanotubos de carbono RAW e oxidados. Eles observaram que em meio de proteína os ox-MWCNT tem a estabilidade coloidal menor que do nanotubos RAW. Além disso, diversos estudos mostram que as proteínas do soro são adsorvidas pelos CNT promovendo a estabilização estérica da dispersão, reduzindo a velocidade de agregação nos meios biológicos (DHAWAN; SHARMA, 2010; HAMILTON et al., 2013; HEISTER et al., 2010).

Figura 25 - Estudo de estabilidade da nanopartícula de TiO_2 e do nanomaterial híbrido TiO_2 -MWCNT em meio DMEM com e sem adição de soro fetal bovino (SFB) e em água ultrapura por 24 horas



5.4.2 Caracterização da *Protein corona*

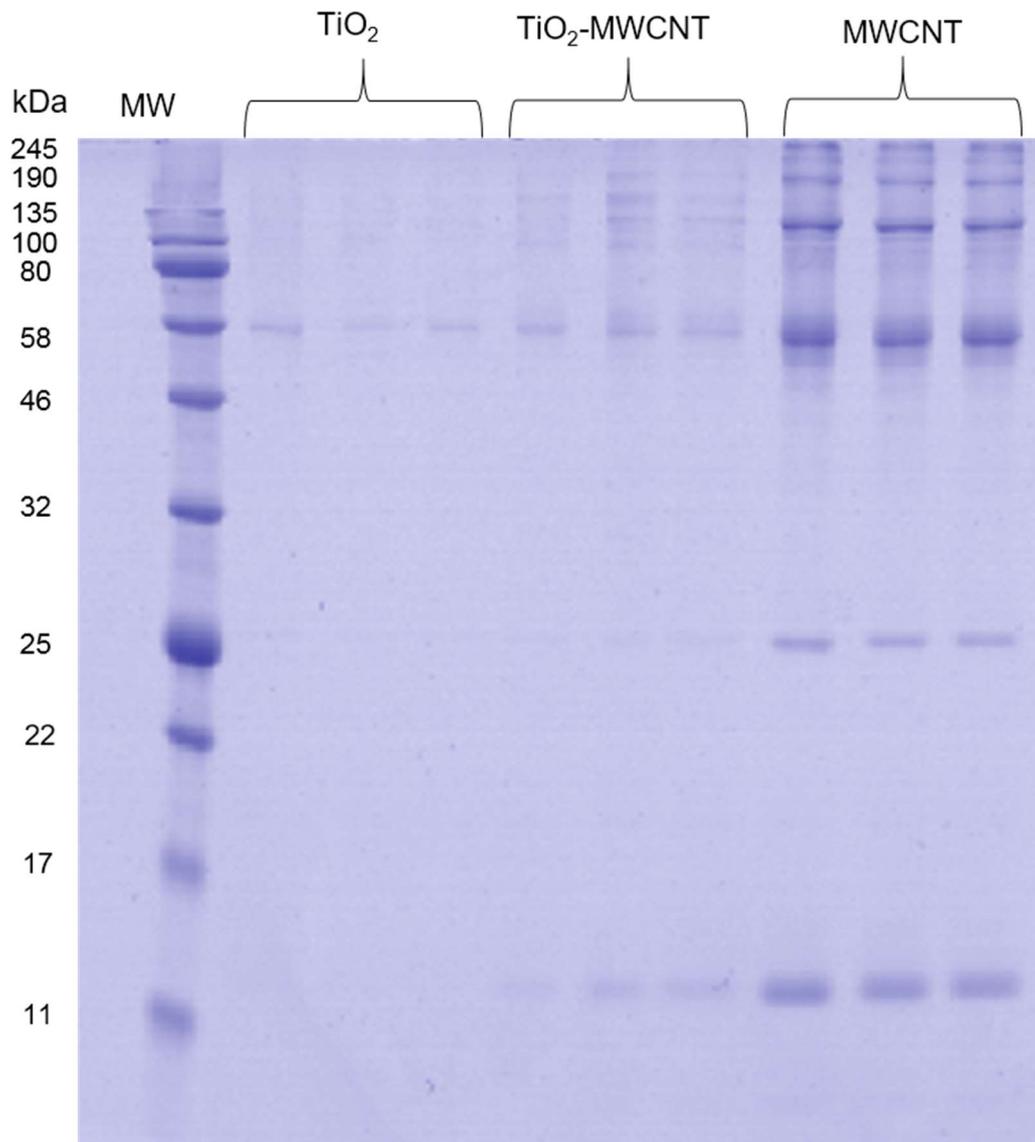
Devido à alta reatividade superficial dos NMs, ao serem introduzidos em ambientes biológicos eles vão interagir com as biomoléculas presente neste meio, como por exemplo, as proteínas do SFB presentes no meio de cultura de células. Essa interação leva a formação de um revestimento de biomoléculas, conhecido inicialmente como *protein corona* (quando as biomoléculas adsorvidas são principalmente proteínas) (LYNCH et al., 2007) ou, mais recentemente, como

biomolecular corona (já que os NMs adsorvem não só proteínas, mas também outras biomoléculas (CASALS et al., 2010) Esse revestimento proteico confere uma identidade biológica para nanopartículas e impacta fortemente na interação dos NMs com os sistemas biológicos, uma vez que altera a superfície química e o estado de agregação da partícula (CORBO et al., 2016; MONOPOLI et al., 2012; MONOPOLI; BOMBELLI e DAWSON, 2011). Assim, a caracterização da *protein corona* se faz essencial para o real entendimento das interações entre NMs e sistemas biológicos.

Para investigar a interação dos NMs com as proteínas presentes no meio de cultura de células, foi empregada a análise de SDS-PAGE. Para tal, as proteínas adsorvidas por cada NM isolado (TiO₂ e MWCNT) bem como pelo híbrido (TiO₂-MWCNT), foram extraídas da superfície dos NMs, separadas em gel de eletroforese SDS-PAGE, e coradas com comassie blue. A Figura 26 representa o gel SDS-PAGE obtido, no qual as bandas em azul representam as diferentes proteínas adsorvidas.

Os nanomateriais de carbono, incluindo MWCNT, são reconhecidos por sua alta capacidade de adsorção (IHSANULLAH et al., 2016), o que tem sido atribuído a sua elevada área superficial e química de superfície, a qual apresenta grupos oxigenados e defeitos de estrutura que servem de sítios de ligação para proteínas. Além disso, os MWCNTs podem adsorver proteínas por interações hidrofóbicas. Podemos observar na Figura 26 que o MWCNT adsorveu uma grande quantidade de proteínas entre 80 e 245 Kda, além de bandas em 32 e 11 kDa. O mesmo foi observado por Allegri et al. (2016) ao estudar a estabilidade do ox-MWCNT em meio com e sem proteínas. Já, para o TiO₂ foi observado uma menor quantidade e variedade de proteínas, apenas uma banda bem marcada em 80 kDa, indicando uma baixa capacidade de adsorção. Os resultados do TiO₂-MWCNT foram similares aos do MWCNT, porem uma concentração mais baixa de proteínas. Por fim, foi obtido que a formação do híbrido TiO₂-MWCNT reduziu significativamente a adsorção de proteínas, o que pode ser atribuído a ligação das partículas de TiO₂ nos sítios de ligação usados pelas proteínas na interação com o MWCNT.

Figura 26 - Gel 1D de SDS-PAGE 15%, corado com Comassie blue, das proteínas do soro fetal bovino (SFB) que foram adsorvidas na superfície do TiO_2 , TiO_2 -MWCNT e MWCNT, após incubação por 1h à 22°C em meio DMEM suplementado com 10% de SFB



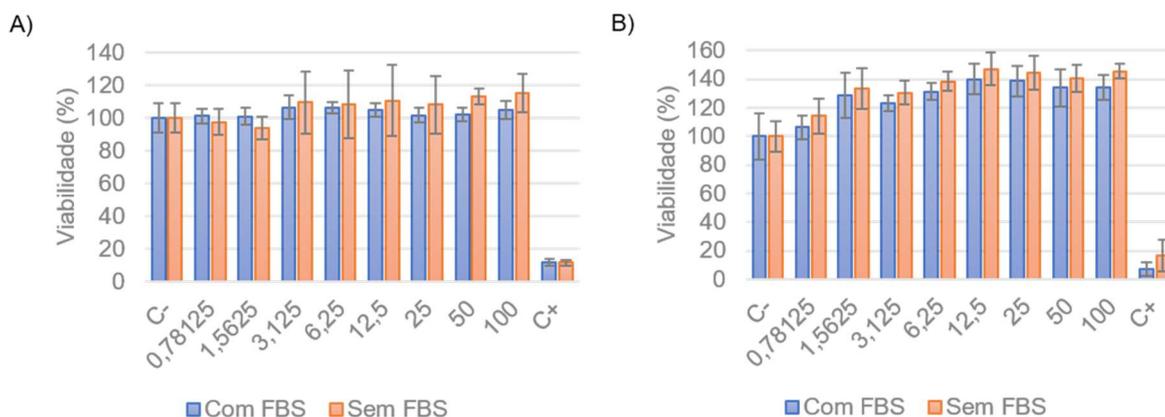
5.4.3 Citotoxicidade

Neste trabalho foi utilizada a linhagem celular RTG-2 para a avaliação *in vitro* da citotoxicidade do TiO_2 -MWCNT após 24 horas de exposição. Existem muitos ensaios para a determinação da viabilidade e/ou citotoxicidade em células. A maior parte dos ensaios consiste em métodos espectrofotométricos, os quais verificam a viabilidade celular através da avaliação da integridade da membrana plasmática, como o ensaio com Tripán blue, ou da atividade metabólica com o (4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) e Alamar blue.

Porém, quando se trata de nanomateriais, alguns ensaios podem não se adequar a este propósito, gerando falsos resultados. Por exemplo, estudos recentes têm demonstrado que CNT interferem em ensaios de viabilidade, reduzindo o MTT, 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XTT) e inativando a enzima lactato desidrogenase (LDH) (CASEY et al., 2007; BREZNAN et al., 2015), culminando em falsos resultados. Portanto, é indicada a utilização de mais de um tipo de ensaio de citotoxicidade a fim de evitar falsas respostas.

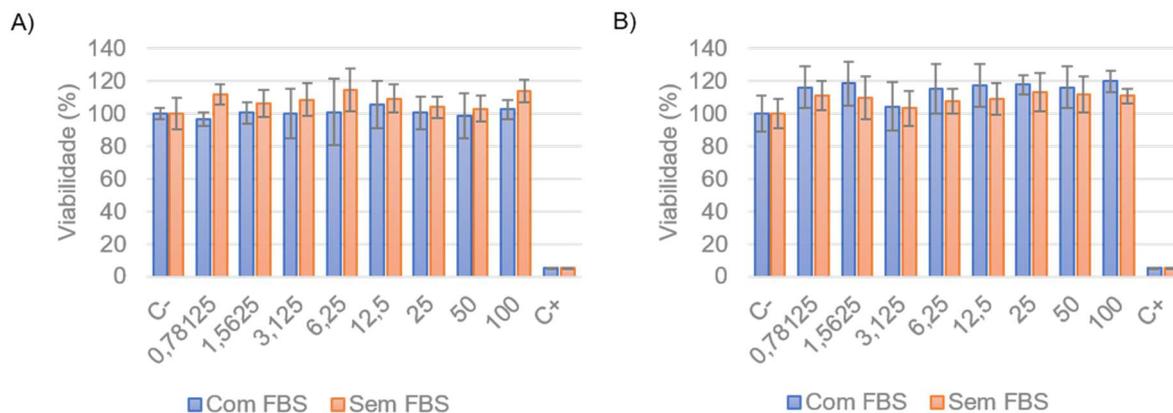
A Figura 27 mostra os resultados do ensaio Alamar blue. Não houve citotoxicidade para o TiO_2 e $\text{TiO}_2\text{-MWCNT}$ e nem resultados significativos para o tratamento com e sem SFB. No entanto, para o $\text{TiO}_2\text{-MWCNT}$ observamos um aumento na proliferação celular. A fim de observar se esse efeito seria consequência da interação do corante com o nanomaterial foi feita uma exposição da nanopartícula com o reagente (sem as células) durante 3 horas, após esse período a solução foi centrifugada e foi feita a leitura da absorbância. Nenhuma interação foi observada.

Figura 27 - Ensaio de viabilidade celular, por Alamar blue, com a linhagem RTG-2. (A) e (B) células tratadas com TiO_2 e $\text{TiO}_2\text{-MWCNT}$, respectivamente



Outro ensaio de viabilidade utilizado foi o Neutral red (Figura 28). Pode-se observar que não houve toxicidade para nenhum dos nanomateriais e também não houve diferenças significativas no tratamento com e sem SFB.

Figura 28 - Ensaio de viabilidade celular, por Neutral red, com a linhagem RTG-2. (A) e (B) células tratadas com TiO₂ e TiO₂-MWCNT, respectivamente



Além dos ensaios de viabilidade celular por Alamar blue e Neutral red também foi feita a contagem das células em microscópio ótico, com o auxílio do tripan blue. Para este ensaio foram selecionadas 3 concentrações do nanomaterial, 100, 10 e 1 mg L⁻¹. Os resultados deste ensaio são mostrados na Figura 28. Podemos observar que não houve toxicidade nas concentrações de 10 e 1 mg L⁻¹. Não foi possível realizar a leitura na concentração de 100 mg L⁻¹, pois o NM adere fortemente na membrana das células, formando grandes agregados de células e influenciando negativamente a contagem. Tedja et al. (2012) estudaram o impacto de NP de TiO₂ após a adsorção de proteínas do soro em células humanas pulmonares. Eles observaram uma baixa toxicidade do TiO₂ (> 150 µg mL⁻¹) mesmo após a interação com soro, assim como houve neste trabalho. Em adição, observaram que a quantidade de NP internalizada pelas células foi substancialmente maior quando havia proteína. Esses resultados mostram a importância da *protein corona* nos ensaios de citotoxicidade.

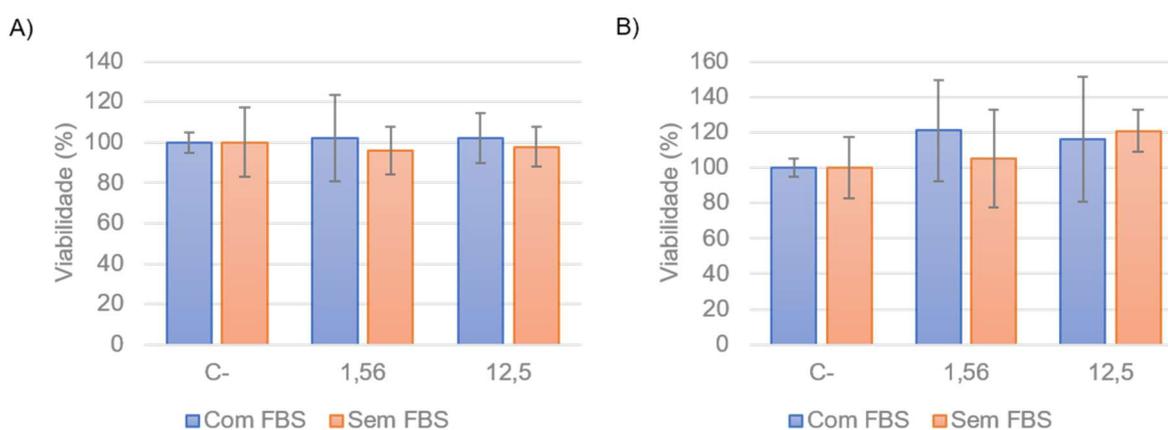
Ainda não existe um consenso quando a toxicidade de NM, uma vez que estudos utilizando o mesmo material geraram resultados contraditórios. Por exemplo, alguns autores observaram que a adição de grupos funcionais ao CNT causa um aumento na citotoxicidade (MAGREZ et al., 2006; URSINI et al., 2012), enquanto outros observaram o oposto (BOTTINI et al., 2006; MULLER et al., 2008). Também existem resultados contraditórios para a nanopartícula de TiO₂ (IAVICOLI, FONTANA; BERGAMASCHI, 2011). Por exemplo, Xia et al. (2006) observaram que o TiO₂ (P25) não induz o estress oxidativo em macrófagos,

enquanto que Singh et al. (2007) e Park et al. (2008) observaram que este material pode sim causar esse efeito para células epiteliais pulmonares.

Tais observações mostram a importância da caracterização para a comparação de resultados entre estudos nanotoxicológicos. Por exemplo, MWCNT finos e com alto grau cristalino causam toxicidade, tendo a capacidade de perfurar a membrana de células mesoteliais, já MWCNT longos e flexíveis causam menor toxicidade para estas células (NAGAI et al., 2011). A toxicidade do TiO_2 pode ser diretamente proporcional ao aumento da sua área superficial (MONTEILLER et al., 2007; HUSSAIN et al., 2009) e diminuição do tamanho (KATSUMITI et al., 2015; SIMON-DECKERS et al., 2008).

No caso do TiO_2 -MWCNT, Cendrowki e colaboradores (CENDROWSKI et al., 2014) estudaram o efeito do TiO_2 -MWCNT em fibroblastos de ratos e células de fígado humano, nas concentrações de 0 a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Eles obtiveram resultados diferentes dos obtidos no presente trabalho, onde concentrações maiores que $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ causaram toxicidade para essas células. No entanto, o material estudado por estes autores, apesar de possuir a mesma composição do material aqui estudado, apresenta diferenças na síntese, na porcentagem de TiO_2 (19%) no TiO_2 -MWCNT, e no tipo cristalino de TiO_2 (anatase).

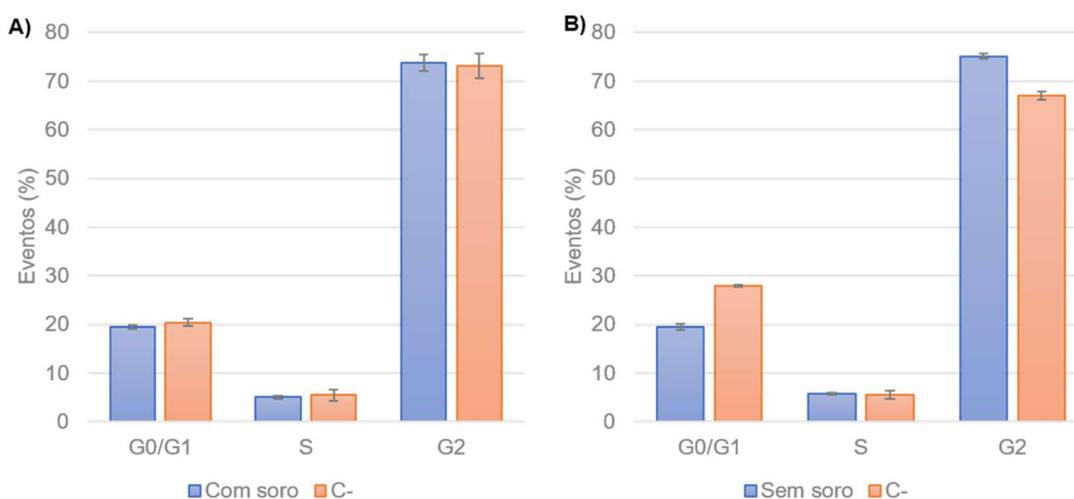
Figura 29 - Ensaio de viabilidade com tripan blue nas concentrações de 0 (C-), 1,56 e $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (A) TiO_2 e (B) com TiO_2 -MWCNT



Uma vez que nos ensaios de viabilidade celular por Alamar blue foi possível observar uma proliferação das células RTG-2, foi utilizando o ensaio de ciclo celular citometria de fluxo para verificar esse efeito. Apenas foi possível analisar a concentração de 1 mg L^{-1} pois nas concentrações maiores o nanotubo de carbono

aderia nas células formando grandes agregados que entupiam o equipamento, impedindo a análise. Os resultados estão descritos na Figura 30. Foi possível observar para todos os tratamentos que a maior parte das células estava na fase G2 do ciclo celular, correspondente à fase de divisão celular. Não foram observados resultados significativos para o tratamento com SFB, quando comparado ao controle. Porém, foi observado um aumento da divisão celular no tratamento sem soro fetal bovino (Figura 22B). Kansara et al. (2014), estudaram o efeito do TiO₂ no ciclo celular de células pulmonares. E observaram que o aumento da concentração do TiO₂ causa um aumento na fase G2 do ciclo celular. Eles associaram este efeito com o aumento da expressão de CdC2, e conseqüentemente um decréscimo na expressão de Cyclin B1, uma proteína reguladora envolvida na mitose.

Figura 30 - Análise de ciclo celular de células RTG-2 expostas a 1 µg ml⁻¹ de TiO₂-MWCNT. (A) exposição com soro fetal bovino e (B) sem soro fetal bovino

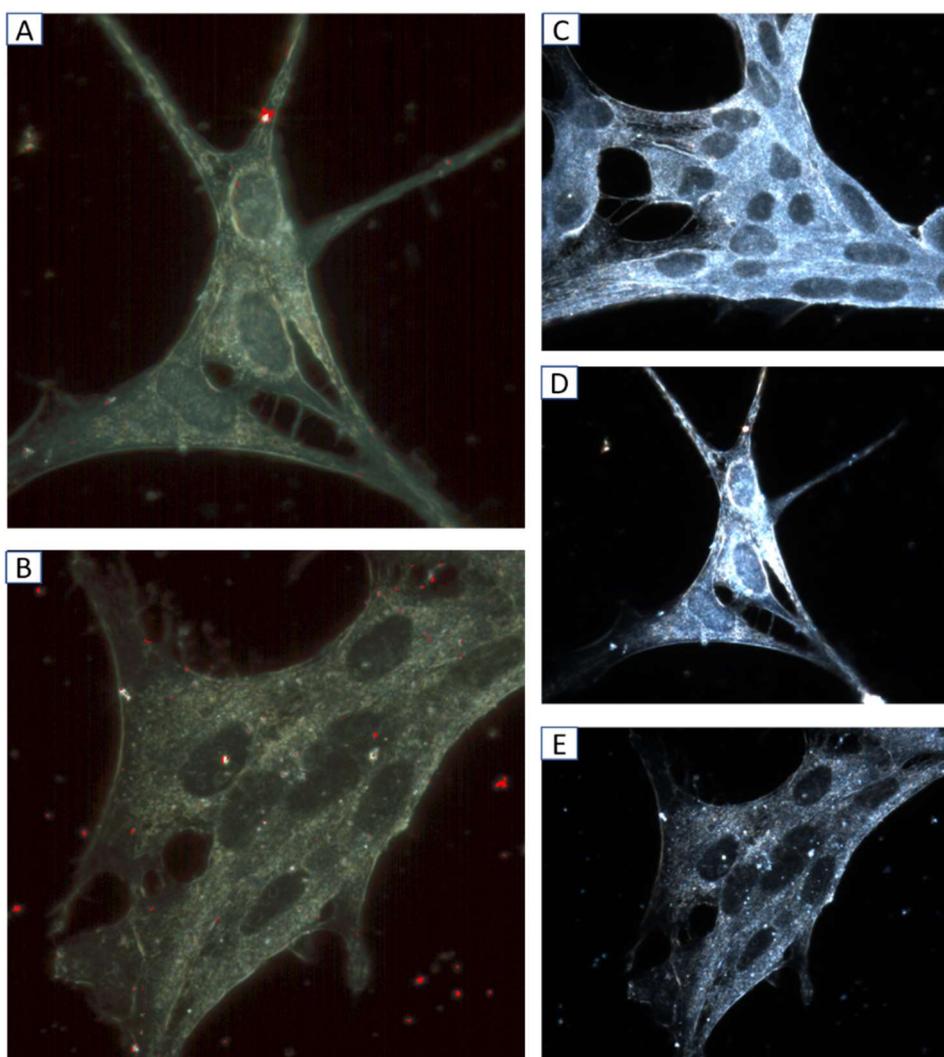


5.4.4 Análise da Distribuição do NM em Células RTG-2 Através da Microscopia CytoViva

A fim de observar a interação dos nanomateriais com as células foi utilizada a microscopia hiperespectral cytoViva. Esta tecnologia foi especificamente projetada para observação ótica e confirmação espectral de NPs, ao interagir com células e tecidos. O microscópio utiliza um sistema de iluminação angular oblíqua para criar imagens otimizadas de campo escuro. Com a capacidade de geração de imagens

hiperespectrais, os espectros de refletância de materiais específicos podem ser capturados e medidos. Através da ferramenta “Spectral Angle Mapping” é determinado se os NMs estão presentes na imagem adquirida e é possível localizar quais pixels contêm o material de interesse. A Figura 31 A e B mostra a imagem hiperspectral da célula RTG-2 mapeada, onde os pontos vermelhos representam os pixels onde os espectros do TiO_2 e TiO_2 -MWCNT foram encontrados.

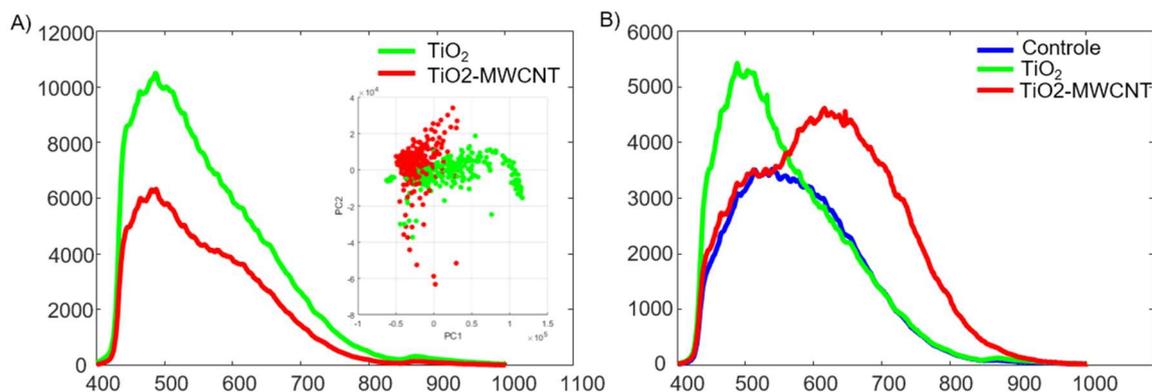
Figura 31 - Imagem hiperspectral de células (RTG-2) tratadas com $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de (A) TiO_2 e (B) TiO_2 -MWCNT. Pontos vermelhos indicam a localização do nanomaterial nas células. (C), (D) e (E) imagens de microscopia de campo escuro de células não expostas, expostas a TiO_2 e TiO_2 -MWCNT, respectivamente. Imagens capturadas com objetiva de 100x



A Figura 32 A ilustra os espectros de refletância do TiO_2 e TiO_2 -MWCNT, também pode-se observar nessa imagem a análise de componentes principais (PCA) dos espectros mostrando que claramente há diferença entre os espectros do

TiO₂ e do TiO₂-MWCNT. Ainda na Figura 32 B podemos ver a média dos 900 espectros encontrados nas células tratadas e controle, claramente há diferença entre os espectros. Mesmo após as diversas etapas de lavagem, tanto TiO₂, quanto TiO₂-MWCNT foram encontrados nas células expostas.

Figura 32 - Perfil espectral das (A) nanopartículas de TiO₂ e TiO₂-MWCNT e análise de componente principal (PCA) dos espectros obtidos. (B) perfil espectral das células (RTG-2) não exposta e exposta às nanopartículas TiO₂ e TiO₂-MWCNT



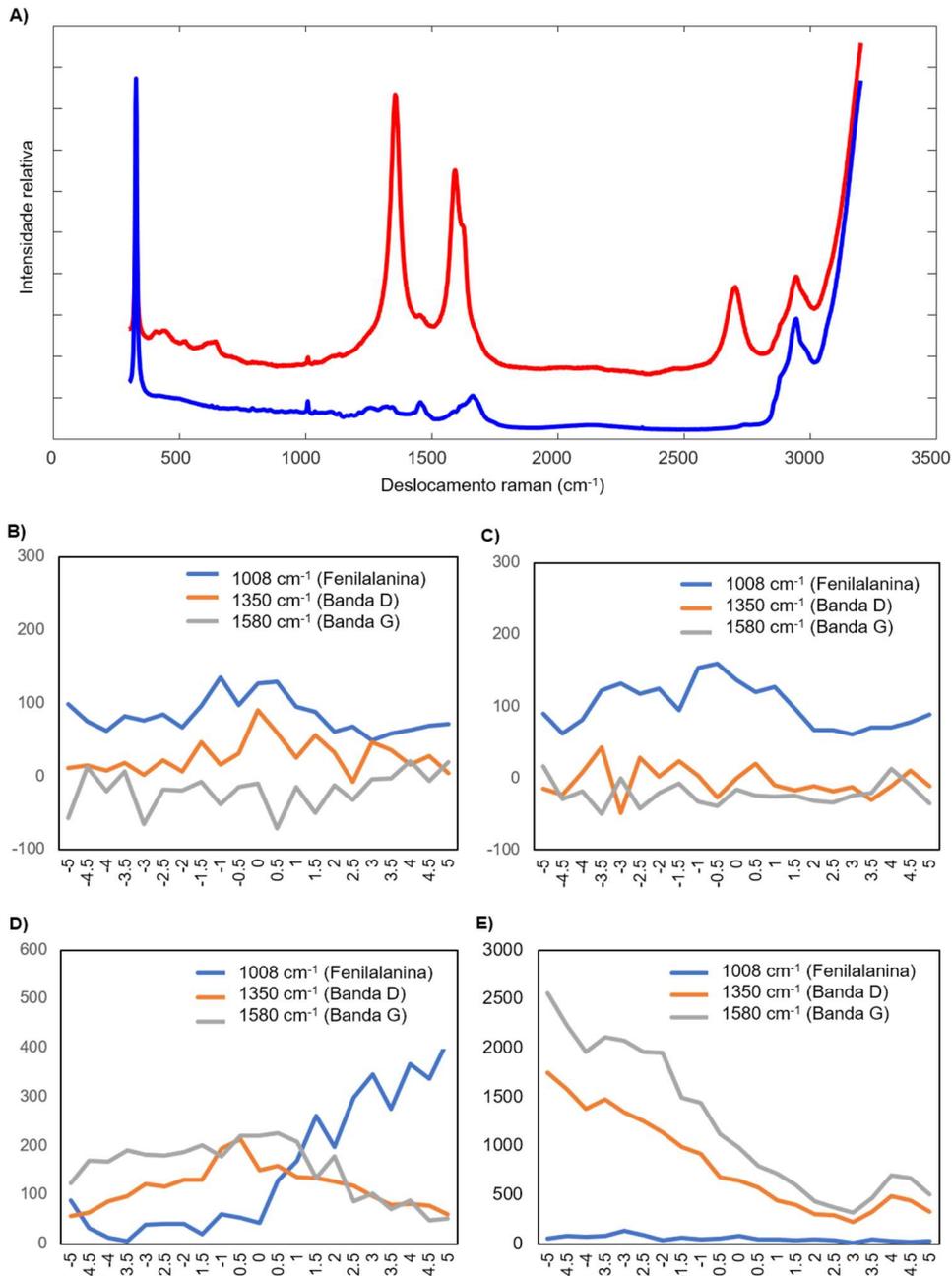
5.4.5 Análise da Internalização de NM por Espectroscopia Raman

Visto que uma das limitações da microscopia hiperespectral é a identificação da internalização dos nanomateriais, foi utilizada a espectroscopia Raman para essa averiguação. Foram utilizadas medidas no eixo Z (profundidade) para detectar a internalização do nanomaterial, através da intensidade das bandas D e G, medidas ao caminhar pelo eixo Z (passos de 0,5 μm). A banda correspondente a fenilalanina foi utilizada como padrão celular. Podemos observar que para o tratamento com SFB (Figura 33 D), observamos que a intensidade das bandas D e G é maior no interior das células, e que essa intensidade diminui conforme seguimos no eixo Z. O mesmo não ocorre para o controle (Figura 33 B e C), comprovando que o nanomaterial estava presente no interior da célula.

No tratamento sem o SFB o TiO₂-MWCNT tende a agregar entre si e na membrana das células, dificultando a análise. Na Figura 33 E, podemos observar uma alta intensidade das bandas D e G, e esta intensidade diminui conforme aumentamos os passos no eixo Z, porém a intensidade do material foi tão grande

que não foi possível relacioná-la com a fenilalanina. Portanto, não foi possível obter dados conclusivos quanto a internalização para este tratamento.

Figura 33 - (A) Espectro Raman de uma célula controle (Azul) e de uma célula exposta a NP de TiO₂-MWCNT (vermelho). Mapa de intensidade no eixo Z de uma célula controle (B e C) e mapa de intensidade no eixo Z de uma célula exposta a TiO₂-MWCNT com SFB(D) sem SFB (E). Bandas utilizadas para o mapa: 1008 cm⁻¹ referente a fenilalanina, 1350 cm⁻¹ referente a banda D e 1580 cm⁻¹ referente a banda G



5.5 Conclusões

Foi observado que o TiO₂-MWCNT adsorve as proteínas presentes no meio de cultura de células, este fato diminuiu a agregação do nanomaterial, porém não influenciou na sedimentação. Nos ensaios *in vitro* com a linhagem celular RTG-2 não foi observado efeitos negativos na viabilidade celular, por nenhuma das técnicas utilizadas. Entretanto, foi possível observar através da microscopia hiperspectral e da espectroscopia Raman que o NM adere a membrana celular em meio com e sem proteína, porém quando revestido com proteína pode ser internalizado.

Referências

ALLEGRI, M.; PERIVOLIOTIS, D. K.; BIANCHI, M. G.; CHIU, M.; PAGLIARO, A.; KOKLIOTI, M.; TROMPETA, A. A.; BERGAMASCHI, E.; BUSSOLATI, O.; CHARITIDIS, C. A. Toxicity determinants of multi-walled carbon nanotubes: the relationship between functionalization and agglomeration. **Toxicology reports**, Dublin, v. 3, p. 230-243, 2016.

ALKILANY, A. M.; MAHMOUD, N. N.; HASHEMI, F.; HAJIPOUR, M. J.; FARVADI, F.; MAHMOUDI, M. Misinterpretation in nanotoxicology: a personal perspective. **Chemical research in toxicology**, Washington, v. 29, n. 6, p. 943-948, 2016.

ALLEN, C.; QIU, T. A.; PRAMANIK, S.; BUCHMAN, J. T.; KRAUSE, M. O. P.; MURPHY, C. J. Research highlights: investigating the role of nanoparticle surface charge in nano–bio interactions. **Environmental Science: Nano**, London, v. 4, n. 4, p. 741–746, abr. 2017.

AZHDARZADEH, M.; SAEI, A. A.; SHARIFI, S.; HAJIPOUR, M. J.; ALKILANY, A. M.; SHARIFZADEH, M.; RAMAZANI, F.; LAURENT, S.; MAHMOUDI, M. Nanotoxicology: advances and pitfalls in research methodology. **Nanomedicine**, London, v. 10, n. 18, p. 2931-2952, 2015.

BELYANSKAYA, L.; MANSER, P.; SPOHN, P.; BRUININK, A.; WICK, P. The reliability and limits of the MTT reduction assay for carbon nanotubes–cell interaction. **Carbon**, New York, v. 45, n. 13, p. 2643–2648, nov. 2007.

BOLS, N. C.; DAYEH, V. R.; LEE, L. E. J.; SCHIRMER, K. Use of fish cell lines in the toxicology and ecotoxicology of fish. Piscine cell lines in. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, Amsterdam, v. 6, p. 43–84, 2005.

BOTTINI, M.; BRUCKNER, S.; NIKA, K.; BOTTINI, N.; BELLUCCI, S.; MAGRINI, A.; BERGAMASCHI, A.; MUSTELIN, T. Multi-walled carbon nanotubes induce T lymphocyte apoptosis. **Toxicology letters**, Amsterdam, v. 160, n. 2, p. 121-126, 2006.

CASALS, E.; PFALLER, T.; DUSCHL, A.; OOSTINGH, G. J.; PUNTES, V. Time evolution of the nanoparticle *protein corona*. **ACS nano**, Washington, v. 4, n. 7, p. 3623-3632, 2010.

CASEY, A.; DAVOREN, M.; HERZOG, E.; LYNG, F. M.; BYRNE, H. J.; CHAMBERS, G. Probing the interaction of single walled carbon nanotubes within cell culture medium as a precursor to toxicity testing. **Carbon**, New York, v. 45, n. 1, p. 34–40, jan. 2007.

CENDROWSKI, K.; JEDRZEJCZAK, M.; PERUZYNSKA, M.; DYBUS, A.; DROZDZIK, M.; MIJOWSKA, E. Preliminary study towards photoactivity enhancement using a biocompatible titanium dioxide/carbon nanotubes composite. **Journal of Alloys and Compounds**, Amsterdam, v. 605, p. 173–178, 2014.

CORBO, C.; MOLINARO, R.; PARODI, A.; TOLEDANO FURMAN, N. E.; SALVATORE, F.; TASCIOTTI, E. The impact of nanoparticle *protein corona* on cytotoxicity, immunotoxicity and target drug delivery. **Nanomedicine**, London, v. 11, n. 1, p. 81–100, jan. 2016.

DAS, D.; SABARAYA, I. V.; ZHU, T.; SABO-ATTWOOD, T.; SALEH, N. B. Aggregation Behavior of Multiwalled Carbon Nanotube-Titanium Dioxide Nanohybrids: Probing the Part-Whole Question. **Environmental science & technology**, Washington, v. 52, n. 15, p. 8233-8241, 2018.

DAYEH, V. R.; BOLS, N. C.; TANNEBERGER, K.; SCHIRMER, K.; LEE, L. E. J. The use of fish-derived cell lines for investigation of environmental contaminants: an update following OECD's fish toxicity testing framework No. 171. In: MAINES, M. D. **Current protocols in toxicology**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2013. DOI: 10.1002/0471140856.tx0105s56.

DHAWAN, A.; SHARMA, V. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Heidelberg, v. 398, n. 2, p. 589-605, 2010.

GALBIS-MARTÍNEZ, L.; FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; ALTE, L.; VALDEHITA, A.; RUCANDIO, I.; NAVAS, J. M. Development of a new tool for the long term in vitro ecotoxicity testing of nanomaterials using a rainbow-trout cell line (RTL-W1). **Toxicology in Vitro**, New York, v. 50, p. 305–317, ago. 2018.

HAMILTON, R. F.; WU, Z.; MITRA, S.; SHAW, P. K.; HOLIAN, A. Effect of MWCNT size, carboxylation, and purification on in vitro and in vivo toxicity, inflammation and lung pathology. **Particle and fibre toxicology**, London, v. 10, n. 1, p. 57, 2013.

HEISTER, Elena et al. Higher dispersion efficacy of functionalized carbon nanotubes in chemical and biological environments. **ACS nano**, Washington, v. 4, n. 5, p. 2615-2626, 2010.

HUSSAIN, S.; BOLAND, S.; BAEZA-SQUIBAN, A.; HAMEL, R.; THOMASSEN, L. C.; MARTENS, J. A.; BILLON-GALLAND, M. A.; FLEURY-FEITH, J.; MOISAN, F.; PAIRON, J.; MARANO, F. Oxidative stress and proinflammatory effects of carbon black and titanium dioxide nanoparticles: role of particle surface area and internalized amount. **Toxicology**, Limerick, v. 260, n. 1-3, p. 142-149, 2009.

IHSANULLAH; ABBAS, A.; AL-AMER, A. M.; LAOUI, T.; AL-MARRI, M. J.; NASSER, M. S.; KHRAISHEH, M.; ATIEH, M. A. Heavy metal removal from aqueous solution by advanced carbon nanotubes: Critical review of adsorption applications. **Separation and Purification Technology**, Amsterdam, v. 157, p. 141–161, jan. 2016.

KÄMPFER, A.; LA SPINA, R.; GILLILAND, D.; VALZACCHI, S.; ASTURIOL, D.; STONE, V.; KINSNER-OVASKAINEN, A. Silver Nanoparticles and Metallic Silver Interfere with the Griess Reaction: Reduction of Azo Dye Formation via a Competing Sandmeyer-Like Reaction. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 30, n. 4, p. 1030–1037, abr. 2017.

KANSARA, K.; PATEL, P.; SHAH, D.; SHUKLA, R. K.; SINGH, S.; KUMAR, A.; DHAWAN, A. TiO₂ nanoparticles induce DNA double strand breaks and cell cycle arrest in human alveolar cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Amsterdam, v. 56, n. 2, p. 204-217, 2015.

KATSUMITI, A.; BERHANU, D.; HOWARD, K. T.; AROSTEGUI, I.; ORON, M.; REIP, P.; VALSAMI-JONES, E.; CAJARAVILLE, M. P. Cytotoxicity of TiO₂ nanoparticles to mussel hemocytes and gill cells in vitro: Influence of synthesis method, crystalline structure, size and additive. **Nanotoxicology**, London, v. 9, n. 5, p. 543-553, 2015.

KHANG, D.; LEE, Y. K.; CHOI, E.-J.; WEBSTER, T. J.; KIM, S.-H. Effect of the *protein corona* on nanoparticles for modulating cytotoxicity and immunotoxicity. **International Journal of Nanomedicine**, Auckland, v. 10, p. 97, dez. 2014.

KIM, S. T.; SAHA, K.; KIM, C.; ROTELLO, V. M. The Role of Surface Functionality in Determining Nanoparticle Cytotoxicity. **Accounts of Chemical Research**, Washington, v. 46, n. 3, p. 681–691, mar. 2013.

KONG, B.; SEOG, J. H.; GRAHAM, L. M.; LEE, S. B. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine**, London, v. 6, n. 5, p. 929–941, jul. 2011.

LOUIS, K. S.; SIEGEL, A.C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods: mammalian cell viability. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 740, p. 7-12, 2011.

LUNGU-MITEA, S.; OSKARSSON, A.; LUNDQVIST, J. Development of an oxidative stress in vitro assay in zebrafish (*Danio rerio*) cell lines. **Scientific Reports**, London, v. 8, n. 1, p. 12380, dez. 2018.

LYNCH, I.; DAWSON, K. A. Protein-nanoparticle interactions. **Nano Today**, Kidlington, v. 3, n. 1, p. 40–47, 2008.

LYNCH, I.; CEDERVALL, T.; LUNDQUIST, M.; CABALEIRO-LAGO, C.; LINSE, S.; DAWSON, K. A. The nanoparticle–protein complex as a biological entity; a complex fluids and surface science challenge for the 21st century. **Advances in colloid and interface science**, Amsterdam, v. 134, p. 167-174, 2007.

MAGREZ, A.; KASAS, S.; SALICIO, V.; PASQUIER, N.; SEO, J. W.; CELIO, M.; CATSICAS, S.; SCHWALLER, B.; FORRÓ, L. Cellular toxicity of carbon-based nanomaterials. **Nano Letters**, Washington, v. 6, n. 6, p. 1121-1125, 2006.

MITJANS, M. Nanotoxicity In Vitro: Limitations of the Main Cytotoxicity Assays. In: **Nanotoxicology**. London, Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2018. p. 171–192.

MONOPOLI, M. P.; ÅBERG, C.; SALVATI, A.; DAWSON, K. A. Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. **Nature Nanotechnology**, London, v. 7, n. 12, p. 779, 2012.

MONOPOLI, M. P.; BOMBELLI, F. B.; DAWSON, K. A. Nanobiotechnology: nanoparticle coronas take shape. **Nature nanotechnology**, London, v. 6, n. 1, p. 11, 2011.

MONTEILLER, C.; TRAN, L.; MACNEE, W.; FAUX, S. P.; JONES, A. D.; MILLER, B. G.; DONALDSON, K. The pro-inflammatory effects of low solubility low toxicity particles, nanoparticles and fine particles, on epithelial cells in vitro: The role of surface area. **Occupational and Environmental Medicine**, London, v. 64, p. 142-149, 2007.

MUDUNKOTUWA, I. A.; GRASSIAN, V. H. Biological and environmental media control oxide nanoparticle surface composition: the roles of biological components (proteins and amino acids), inorganic oxyanions and humic acid. **Environmental Science: Nano**, London, v. 2, n. 5, p. 429–439, out. 2015.

MULLER, J., HUAUX, F., FONSECA, A., NAGY, J. B., MOREAU, N., DELOS, M.; RAYMUNDO-PIÑERO, E.; BÉGUIN, F.; KIRSCH-VOLDERS, M.; FENOGLIO, I.; FUBINI, B.; LISON, D. Structural defects play a major role in the acute lung toxicity of multiwall carbon nanotubes: toxicological aspects. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 21, n. 9, p. 1698-1705, 2008.

NAGAI, H. et al. Diameter and rigidity of multiwalled carbon nanotubes are critical factors in mesothelial injury and carcinogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, New Delhi, v. 108, n. 49, p. E1330-E1338, 2011.

NEAGU, M.; PIPERIGKOU, Z.; KARAMANOU, K.; ENGIN, A. B.; DOCEA, A. O.; CONSTANTIN, C.; NEGREI, C.; NIKITOVIC, D.; TSATSAKIS, A. Protein bio-corona: critical issue in immune nanotoxicology. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 91, n. 3, p. 1031–1048, 2017.

NEL, A. E.; MÄDLER, L.; VELEGOL, D.; XIA, T.; HOEK, E. M.; SOMASUNDARAN, P.; KLAESSIG, F.; CASTRANOVA, V.; THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. **Nature Materials**,

London, v. 8, n. 7, p. 543, 2009.

ONG, K. J.; MACCORMACK, T. J.; CLARK, R. J.; EDE, J. D.; ORTEGA, V. A.; FELIX, L. C.; DANG, M. K. M.; MA, G.; FENNIRI, H.; VEINOT, J. G. C.; GOSS, G. G. Widespread Nanoparticle-Assay Interference: Implications for Nanotoxicity Testing. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 9, n. 3, p. e90650, mar. 2014.

PARK, E. J.; YI, J.; CHUNG, K. H.; RYU, D. Y.; CHOI, J.; PARK, K. Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 180, n. 3, p. 222-229, 2008.

PETERSEN, E. J. et al. Adapting OECD aquatic toxicity tests for use with manufactured nanomaterials: key issues and consensus recommendations. **Environmental Science & Technology**, Washington, v. 49, n. 16, p. 9532-9547, 2015.

PROJECT ON EMERGING NANOTECHNOLOGIES. Pennsylvania, 2013. Consumer Products Inventory. Disponível em: <<http://www.nanotechproject.org/cpi/products/>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

QIU, T. A.; CLEMENT, P. L.; HAYNES, C. L. Linking nanomaterial properties to biological outcomes: analytical chemistry challenges in nanotoxicology for the next decade. **Chemical Communications**, Cambridge, v. 54, n. 91, p. 12787–12803, nov. 2018.

QUENTIN, D.; RAUNSER, S. Electron cryomicroscopy as a powerful tool in biomedical research. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 96, n. 6, p. 483-493, 2018.

SEMISCH, A.; HARTWIG, A. Copper Ions Interfere with the Reduction of the Water-Soluble Tetrazolium Salt-8. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 27, n. 2, p. 169–171, fev. 2014.

SIMON-DECKERS, A.; GOUGET, B.; MAYNE-L'HERMITE, M.; HERLIN-BOIME, N.; REYNAUD, C.; CARRIERE, M. In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. **Toxicology**, Limerick, v. 253, n. 1-3, p. 137-146, 2008.

SINGH, S.; SHI, T.; DUFFIN, R.; ALBRECHT, C.; VAN BERLO, D.; HÖHR, D.; FUBINI, B.; MARTRA, G.; FENOGLIO, I.; BORM, P. J. A.; SCHINS, R. P. Endocytosis, oxidative stress and IL-8 expression in human lung epithelial cells upon treatment with fine and ultrafine TiO₂: role of the specific surface area and of surface methylation of the particles. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 222, n. 2, p. 141-151, 2007.

STEINHÄUSER, KLAUS GÜNTER; SAYRE, PHILIP G. Reliability of methods and data for regulatory assessment of nanomaterial risks. **NanoImpact**, Amsterdam, v. 7, p. 66-74, 2017.

SUKHANOVA, A.; BOZROVA, A.; SOKOLOV, P.; BERESTOVOY, M.; KARAULOV,

A.; NABIEV, I. Dependence of nanoparticle toxicity on their physical and chemical properties. **Nanoscale Research Letters**, New York, v. 13, n. 1, p. 44, 2018.

TEDJA, R.; LIM, M.; AMAL, R.; MARQUIS, C. Effects of serum adsorption on cellular uptake profile and consequent impact of titanium dioxide nanoparticles on human lung cell lines. **ACS Nano**, Washington, v. 6, n. 5, p. 4083–4093, 2012.

THE NANODATABASE. Denmark, 2013. DTU Environment, the Danish Ecological Council and Danish Consumer Council. Disponível em <<http://nanodb.dk/en/>>. Acesso em: 22 jan. 2019.

URSINI, C. L. et al. Comparative cyto-genotoxicity assessment of functionalized and pristine multiwalled carbon nanotubes on human lung epithelial cells. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 6, p. 831-840, 2012.

WALKEY, C. D.; OLSEN, J. B.; SONG, F.; LIU, R.; GUO, H.; OLSEN, D. W. H.; COHEN, Y.; EMILI, A.; CHAN, W. C. W. *Protein corona* fingerprinting predicts the cellular interaction of gold and silver nanoparticles. **ACS Nano**, Washington, v. 8, n. 3, p. 2439–2455, 2014.

WÖRLE-KNIRSCH, J. M.; PULSKAMP, K.; KRUG, H. F. Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays. **Nano Letters**, Washington, v. 6, n. 6, p. 1261–1268, jun. 2006.

XIA, Tian et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm. **Nano Letters**, Washington, v. 6, n. 8, p. 1794-1807, 2006.

YURDAKÖK-DIKMEN, B.; VEJSELOVA, D.; KUTLU, H. M.; FILAZI, A.; ERKOÇ, F. Effects of synthetic pyrethroids on RTG-2 cells. **Toxin Reviews**, London, v. 37, n. 4, p. 304–312, out. 2018.

ZHAO, X.; LU, D.; HAO, F.; LIU, R. Exploring the diameter and surface dependent conformational changes in carbon nanotube-*protein corona* and the related cytotoxicity. **Journal of Hazardous Materials**, Amsterdam, v. 292, p. 98–107, jul. 2015.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os avanços na síntese de nanomateriais vêm cada vez mais se distanciando do uso de uma única nanopartícula, utilizando conjuntos de nanopartículas visando cada vez materiais com multifuncionalidades e características melhoradas (nanohíbridos). De certa forma isso traz vantagens enormes para produção de novas tecnologias, mas ambientalmente vem gerando preocupações. A análise ecotoxicológica de um nanomaterial individual são complexas quando comparada com moléculas. Como consequência desta complexidade surgiu a nanotoxicologia. Esta área vem tentando adaptar a toxicologia clássica para o estudo de nanomateriais, tentando determinar quais propriedades dos nanomateriais levam a efeitos tóxicos. Já está consolidado o fato que as características físico-químicas dos nanomateriais é fundamental para a toxicidade, podendo mudar conforme o tamanho da partícula, o formato, o estado de agregação, etc. Desta forma, a confecção de uma caracterização integrada com as análises toxicológicas é recomendada.

O nanomaterial híbrido TiO_2 -MWCNT já vem sendo muito estudado quanto a sua atividade fotocatalítica, suas potenciais aplicações e os benefícios que ele pode trazer para esta área. No entanto, poucos estudos de fato abordam sua toxicidade. Portanto, este trabalho contribui principalmente para o entendimento dos aspectos nanotoxicológicos deste nanohíbrido. Materiais fotocatalíticos atuam liberando espécies reativas de oxigênio, utilizados na degradação de compostos e essas espécies causam grande toxicidade para organismos e células. Deste modo, o aumento da atividade fotocatalítica geralmente está relacionado ao aumento da toxicidade. No entanto, esta relação não foi observada neste trabalho. Nos ensaios *in vivo* com zebrafish não observamos efeitos agudos, no entanto observamos a ingestão do nanomaterial pelas larvas. Apesar da ingestão não ter causado toxicidade para as larvas durante o ensaio ela pode trazer efeitos futuros para esse organismo, não visualizados durante as 96 horas. Por exemplo, ele pode causar efeitos imunológicos e toxicidade crônica. Neste sentido, os ensaios *in vitro* servem como uma complementação e auxiliam no entendimento dos processos bioquímicos e eventos a níveis celulares. Sobre os estudos com as células RTG-2 foram utilizados diversos ensaios, para analisar os efeitos do nanomaterial na viabilidade celular, e em nenhum destes foram observados efeitos negativos pronunciados

(citotoxicidade). A avaliação da *protein corona* é fundamental nos ensaios *in vitro*. Visto que, os meios de cultura normalmente são suplementados com proteínas e estas podem alterar a superfície dos nanomateriais. O TiO₂-MWCNT adsorveu uma grande quantidade e variedade de proteínas no meio de cultura de células, e isso ocasionou na diminuição da agregação dessas partículas e conseqüentemente na internalização destas nas células RTG-2.

Diante do exposto fica evidente a importância dos ensaios nanotoxicológicos para nanomateriais híbridos emergentes. A suposição que a toxicidade de um híbrido será a soma dos efeitos causados pelos seus constituintes pode trazer resultados errôneos. Apesar de muitos avanços terem sido feitos nesta área ainda existem muitos desafios a serem superados. Por exemplo, o desenvolvimento de ensaios com cenários de exposição mais realísticos, levando em consideração a dosimetria, estabilidade, biotransformação dos nanomateriais, entre outros. Todavia para superar esses desafios é necessária a conexão de diversas áreas do conhecimento, pois a nanotecnologia é uma área extremamente multidisciplinar, sendo este seu maior desafio: integrar conhecimentos para compreensão da nanoescala.