

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DO NANOMATERIAL HÍBRIDO TiO₂@MWCNT EM EMBRI

Gabriela H. Silva^{a,b,c*}, Zaira Clemente^{b,c}, Francine Coa^{a,c}, Lais L. R. Neto^c, Hudson W. P. Carvalho^a, Latif U. Khan^c, Vera L. Castro^b, Diego S. T. Martinez^{a,c}, Regina T. R. Monteiro^a

a. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, USP, Piracicaba, SP, Brazil

b. Laboratório de Ecotoxicologia e Segurança, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariuna, SP, Brazil

c. Laboratório Nacional de Nanotecnologia, CNPEM, Campinas, SP, Brazil

*ghsilva@cena.sp.br

Classificação: classifique em relação ao tema de maior aderência.

Resumo

A aplicação do nanomaterial híbrido de TiO₂ e CNT vem crescendo consideravelmente, isso principalmente devido a sua alta eficiência fotocatalítica, no entanto, ainda não existem estudos que abordem a toxicidade deste material. Portanto, esse estudo tem o objetivo de comparar e avaliar a toxicidade no nano-híbrido TiO₂@MWCNT e das nanopartículas de TiO₂ em diferentes condições de exposição (com e sem luz UV). A síntese do nanomaterial híbrido foi feita através da moagem de TiO₂ e MWCNT comercial. A caracterização foi feita através de TEM, MEV e DLS. Para a avaliação toxicológica foram utilizados ensaios de toxicidade com embrião de *Danio rerio*, os parâmetros analisados foram, mortalidade, taxa de eclosão, tamanho da larva, tamanho do saco vitelínico e tamanho do sarcômero. Adicionalmente, foi avaliado a internalização do nanomaterial nas larvas através da espectroscopia de micro fluorescência de raios-x. Não foi observado toxicidade aguda e efeitos subletais para a exposição de 100 mg L⁻¹ de TiO₂@MWCNT. No entanto, para as nanopartículas de TiO₂ foram observados efeitos subletais significativos para a taxa de eclosão, tamanho das larvas e tamanho do saco vitelínico. Também foi observada a ingestão das partículas de TiO₂ e TiO₂@MWCNT pelas larvas.

Palavras-chave: TiO₂, nanotubos de carbono, nanomaterial híbrido, toxicidade, zebrafish.

TOXICITY EVALUATION OF TiO₂@MWCNT HYBRID NANOMATERIAL IN ZEBRAFISH EMBRYOS

Abstract

The applications of TiO₂ and carbon nanotubes (CNT) hybrids have been grown considerably, due to their enhanced photocatalytic efficiency, however, to our knowledge, there are no reports available in literature to the scientific community about their toxicity. Therefore, this study aims to compare the toxicity of TiO₂ nanoparticles and TiO₂-MWCNT composites under different exposure conditions (with and without UV light exposure). The hybrid nanomaterial was synthesized by milling commercial TiO₂ and MWCNT. The Characterization were performed by TEM, MEV, TGA and DLS. The toxicity assay was performed with *Danio rerio* embryos, the parameters assessed were acute toxicity, hatching rate, growth, yolk sac size, and sarcomere length. In addition, μ -probe X-ray fluorescence spectroscopy was employed to observe if nanoparticles are being uptaken by zebrafish larvae. Neither TiO₂ nanoparticles nor TiO₂-MWCNT composites present acute toxicity to the embryos and larvae of zebrafish until 100 mg L⁻¹. Moreover, only TiO₂ nanoparticles present sublethal effects (with and without UV light exposure) on *D. rerio* embryos. Nevertheless, μ -XRF showed that the larvae were ingesting the TiO₂ nanoparticles and the composites.

Keywords: TiO₂, carbon nanotubes, hybrid nanomaterials, toxicity, zebrafish.

1 INTRODUÇÃO

Hoje, uma das áreas da ciência que mais vem se desenvolvendo é a nanotecnologia. Esta tecnologia está trazendo benefícios para vários setores, como alimentos, eletrônicos, farmacêuticos, biotecnológicos, cosméticos, agrícolas, etc. (LIN; WANG; YU, 2017). Dentro da nanotecnologia os

estudos e a síntese de nanomateriais híbridos vem crescendo. Isso pois a junção de dois nanomateriais pode aumentar a funcionalidade e inclusive gerar multifuncionalidades. Estudos nesta área indicam que a combinação de TiO_2 com nanotubos de carbono (CNT) permite uma maior foto-sensibilidade e melhora a eficiência fotocatalítica, podendo inclusive estender a absorção para faixa de luz visível, aumentando significativamente a eficiência fotocatalítica do material. Além disso, espera-se que, com o aumento da área de superfície, haja um aumento na quantidade de poluentes adsorvidos e, portanto, na atividade fotocatalítica (LING et al., 2016).

De fato, a associação entre MWCNT e TiO_2 tem se mostrado promissor na degradação de vários poluentes, como corante de corante de laranja (DA DALT; ALVES; BERGMANN, 2013), anilina (SILVA; FARIA, 2010), azul de metileno (CHEN; ZHANG; OH, 2008), rodamina B (KRISANASAEERANEE et al., 2010). Esses estudos indicam a importância do desenvolvimento dessa tecnologia na descontaminação ambiental.

Devido à importância destas novas tecnologias, a produção deste nanohíbrido tem sido cada vez mais encorajada, mas preocupações quanto a sua toxicidade e segurança quando liberadas no meio ambiente vem crescendo. Embora existam vários estudos que destacam os benefícios do uso de TiO_2 @MWCNT, ainda não há publicações que abordem sua toxicidade. Uma vez que a toxicidade pode aumentar em proporção direta com o aumento da fotoreatividade (LI et al., 2014), é importante estudar a toxicidade e os efeitos das partículas reativas e foto-reativas para controle e proteção da saúde humana e do meio ambiente. Portanto, este estudo tem como objetivo investigar a fotoreatividade e toxicidade das nanopartículas TiO_2 @MWCNT em embriões de zebrafish.

2 MATERIAL E MÉTODOS

As nanopartículas de TiO_2 (Aeroxide - P25) foram adquiridas da Degussa Evonik e são constituídas de 20% de rutilo e 80% de anatase. Os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNT) foram adquiridos da CNT Co. Ltd.

Inicialmente foi feita a oxidação do MWCNT de acordo com CÔA et al (2017). O MWCNT foi revestido com TiO_2 através de moagem manual por 15 min, duas amostras de TiO_2 @MWCNT com diferentes proporções foram obtidas (10:3, 10:1). A caracterização foi feita através de microscopia eletrônica de varredura (SEM-FEG FEI Inspect F50) e transmissão (JEOL JEM 2100F TEM-FEG). O tamanho hidrodinâmico, a carga superficial (potencial zeta, ZP) e o índice de polidispersividade (PdI) das partículas nas suspensões foram avaliados através de espalhamento dinâmico de luz (DLS) usando um instrumento Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido).

A eficiência fotocatalítica foi estudada através da degradação do corante índigo blue em duas condições de iluminação, luz normal e luz ultravioleta (UV). A luz normal foi fornecida a partir de lâmpadas fluorescentes padrão (Phillips, 40 W) e a irradiação UV foi fornecida usando lâmpadas QW-Panel® de 40W UVA340, ambos posicionados a 80 cm acima da superfície da exposição à água. A dose de exposição UV no ensaio foi de 1,45 J/cm²/h (97% de UVA e 0,06% de UVB), o mesmo usado por (CLEMENTE et al., 2014).

Para os ensaios de toxicidade embriões *D. rerio* foram obtidos no laboratório nacional de Biociências (LNBio). Embriões com 1 hora pós-fertilização (24 organismos por grupo) foram expostos por 96 h a 100, 130 e 110 mgL⁻¹ de TiO_2 , TiO_2 @MWCNT 10:3 e 10:1, respectivamente. Os embriões foram mantidos individualmente em volumes de 2 mL da suspensão por 96 h, em ciclo leve de 16/8 h (luz / escuro), 28 ± 1 °C. Foram utilizadas duas condições de iluminação (Luz normal e UV). Os parâmetros analisados foram mortalidade, taxa de eclosão, tamanho da larva e tamanho do saco vitelínico. Adicionalmente, foi avaliado a internalização do nanomaterial nas larvas. Neste sentido a distribuição espacial 2D do Ti foi investigada por microscopia de fluorescência de raios X empregando um equipamento de bancada Orbis PC, EDAX.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As imagens MEV e TEM mostram morfologias similares entre as duas amostras de TiO_2 @MWCNT (10:1 e 10:3) e é possível observar a interação do TiO_2 com o MWCNT. A distribuição homogênea de TiO_2 no MWCNT tem um papel importante na atividade fotocatalítica, embora a distribuição de TiO_2 não seja homogênea, foi possível observar que o TiO_2 foi carregado na superfície do MWCNT (Figura 1).

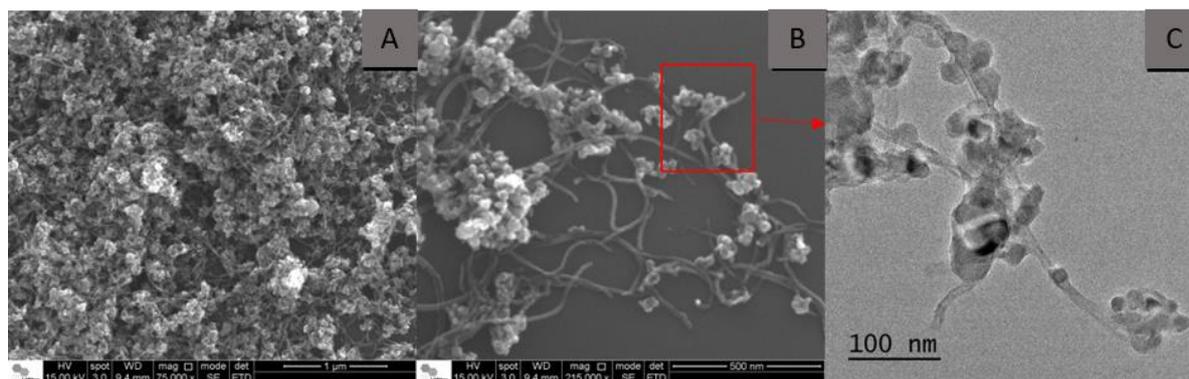


Figura 1. Imagens de MEV: (A) TiO₂@MWCNT (10:1), (B) TiO₂@MWCNT (10:3). Imagens de TEM: (C) TiO₂:MWCNT (10:1).

Os resultados de estabilidade coloidal mostram que as amostras tendem a agregar e precipitar ao longo do tempo, este comportamento foi demonstrado pelas medidas DLS. A diluição das partículas na água reconstituída aumentou substancialmente o diâmetro hidrodinâmico de todas as partículas para um intervalo de 2-3 μm .

A toxicidade dos materiais fotorreativos foi claramente demonstrada em vários estudos. MA et al. (2012) estudou a toxicidade de nanopartículas de TiO₂ após a fotoativação e observou um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e conseqüentemente um aumento na toxicidade, o mesmo foi encontrado por (LI et al., 2014). Portanto, a atividade fotocatalítica dos nanomateriais é um parâmetro importante para a toxicidade dos nanomateriais fotoativos. Em nosso estudo o composto TiO₂@MWCNT foi mais eficiente para a degradação do corante que o TiO₂, para ambas condições de luz ($p < 0,001$). Além disso, a exposição UV foi mais eficiente na degradação do corante para todas as partículas estudadas ($p < 0,001$).

Através dos resultados de toxicidade foi observado que não houve mortalidade em nenhum grupo e no final das 96 horas, todos os embriões eclodiram. No entanto, a taxa de eclosão das larvas variou entre os grupos ($p = 0,0134$) no segundo dia de exposição. Adicionalmente, o comprimento total das larvas foi significativamente menor para a exposição a TiO₂ em comparação ao grupo controle ($p < 0,001$), com redução de 7,8% em seu comprimento. Após 5 dias de exposição, também observamos diferença significativa no tamanho do saco vitelino para TiO₂ quando comparado com o controle ($p = 0,0002$ para exposição à luz UV e $p = 0,0001$ para exposição normal à luz).

Para observar se as nanopartículas estavam sendo ingeridas/absorvidas pelas larvas foi utilizado a espectroscopia de fluorescência de raios X. A absorção de Ti foi encontrada em todos os três tratamentos (TiO₂, 10:1 e 10:3). É importante ressaltar que o Ti foi observado na região do trato digestivo das larvas assim parece que nenhuma quantidade apreciável de Ti foi absorvida pelo intestino e transportada para outros tecidos (Figura 2).

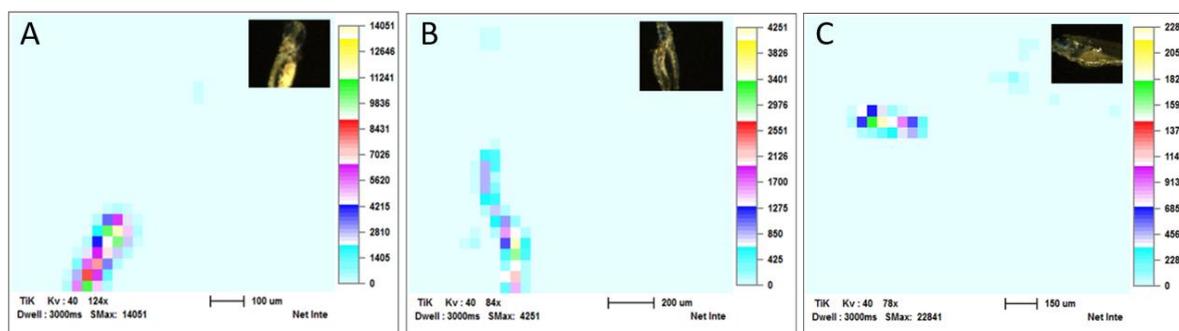


Figura 2. Distribuição de Ti nas larvas de zebrafish expostas por 96 horas a 100, 130 e 110 mg L^{-1} de TiO₂, TiO₂@MWCNT (10:3), TiO₂@MWCNT (10:1), respectivamente. (A) TiO₂; (B) TiO₂@MWCNT (10: 3); (D) TiO₂@MWCNT (10:1).

4 CONCLUSÃO

Tanto as nanopartículas de TiO₂ quanto o híbrido TiO₂@MWNTC apresentam toxicidade aguda para os embriões e as larvas de zebrafish. Apenas o TiO₂ apresentou efeitos subletais (com e sem exposição à luz UV). Portanto, assumir que a alta fotoatividade das partículas pode causar um maior efeito de toxicidade pode levar a falsas previsões sobre a toxicidade. No entanto, foi possível observar através de μ XRF, que as larvas estavam ingerindo o TiO₂ e TiO₂@MWCNT, portanto, é possível que mesmo o híbrido apresentando baixa toxicidade possa bioacumular, resultando em impactos negativos a longo prazo no ecossistema e, eventualmente, a saúde humana.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pelo apoio financeiro, a FAPESP 2015 / 19121-8, ao Instituto Nacional de Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC), a Rede Brasileira de Nanotoxicologia (Cigenanotox) e INCT-Inomat. Os autores também agradecem as instalações abertas do CNPEM (LME, LMG, LAM e LMN) pelo o apoio à pesquisa.

REFERÊNCIAS

- 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**, v. 45, n. 11, p. 651–657, 30 nov. 2008. Disponível em: <<http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=SRMHB8&py=2008&vnc=v45n11&sp=651>>. Acesso em: 23 nov. 2016.
- 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**, v. 16, n. 8, p. 2559, 25 ago. 2014. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11051-014-2559-z>>.
- 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**, v. 607–608, p. 1479–1486, dez. 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969717317485>>.
- 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**, v. 48, n. 5, p. 1845–1850, maio 2013. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S002554081300041X>>.
- KRISSANASAEERANEE, M.; WONGKASEMJIT, S.; CHEETHAM, A. K.; EDER, D. Complex carbon nanotube-inorganic hybrid materials as next-generation photocatalysts. **Chemical Physics Letters**, 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**, v. 466–467, p. 800–808, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.059>>.
- LIN, S.; WANG, H.; YU, T. A promising trend for nano-EHS research — Integrating fate and transport analysis with safety assessment using model organisms. **NanoImpact**, v. 7, p. 1–6, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.impact.2016.09.007>>.
- LING, L.; WANG, C.; NI, M.; SHANG, C. Enhanced photocatalytic activity of TiO₂/single-walled carbon nanotube (SWCNT) composites under UV-A irradiation. **Separation and Purification Technology**, v. 169, p. 273–278, 2016.
- 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**, v. 31, n. 7, p. 1621–1629, jul. 2012. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/etc.1858>>. Acesso em: 20 out. 2016.
- SILVA, C. G.; FARIA, J. L. Photocatalytic oxidation of phenolic compounds by using a carbon nanotube-titanium dioxide composite catalyst. **ChemSusChem**, v. 3, n. 5, p. 609–618, 2010.