

**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**  
**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO**  
**AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS**  
**INSTITUTO DE PESCA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA**

**NANOTUBOS DE CARBONO E ÁCIDO HÚMICO:  
MODIFICAÇÃO MECANOQUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO E ECOTOXICIDADE  
AQUÁTICA**

**Francine Côa**

**Orientador: Prof. Dr. Edison Barbieri**

**Coorientador: Prof. Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA – SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

**São Paulo**

**Maior – 2017**

**GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO**  
**SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO**  
**AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS**  
**INSTITUTO DE PESCA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA**

**NANOTUBOS DE CARBONO E ÁCIDO HÚMICO:  
MODIFICAÇÃO MECANOQUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO E ECOTOXICIDADE  
AQUÁTICA**

**Francine Côa**

**Orientador: Prof. Dr. Edison Barbieri**

**Coorientador: Prof. Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA – SAA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Aquicultura e Pesca.

**São Paulo**  
**Mai – 2017**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Elaborada pelo Núcleo de Informação e Documentação. Instituto de Pesca, São Paulo

C652n

Côa, Francine

Nanotubos de carbono e ácido húmico: modificação mecanoquímica, caracterização e ecotoxicidade aquática / Francine Côa. – São Paulo, 2017  
v, 55f. ; il. ; gráf. ; tab.

Dissertação (mestrado) apresentada ao Programa de Pós-graduação em Aquicultura e Pesca do Instituto de Pesca – APTA - Secretaria de Agricultura e Abastecimento.

Orientador: Edison Barbieri

1. Moagem. 2. Funcionalização. 3. Nanomateriais. 4. Remediação.  
5. Nanotoxicologia. I. Barbieri, Edison. II. Título.

CDD 574.5

Permitida a cópia parcial, desde que citada a fonte – O autor

GOVERNO DO ESTADO DE SÃO PAULO  
SECRETARIA DE AGRICULTURA E ABASTECIMENTO  
AGÊNCIA PAULISTA DE TECNOLOGIA DOS AGRONEGÓCIOS  
**INSTITUTO DE PESCA**  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AQUICULTURA E PESCA

## CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**“Nanotubos de Carbono e ácido húmico: modificação  
mecanoquímica, caracterização e ecotoxicidade aquática”**

**AUTOR:** Francine Côa

**ORIENTADOR:** Edison Barbieri

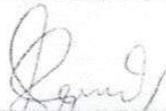
**COORIENTADOR:** Diego Stefani Teodoro Martinez

Aprovada como parte das exigências para obtenção do título de  
MESTRE EM AQUICULTURA E PESCA, Área de Concentração em  
Aquicultura, pela Comissão Examinadora:



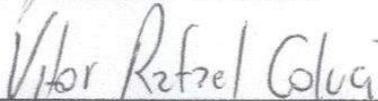
---

Prof. Dr. Edison Barbieri



---

Dra. Suely Patrícia Costa Gonçalves



---

Dr Vitor Rafael Coluci

Data da realização: 29 de maio de 2017



---

Presidente da Comissão Examinadora  
Profª. Drª

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente aos meus pais e à Deus por todas as oportunidades concedidas à mim nesta vida, e também por todo amor e carinho. Bem como à toda a minha família e amigos por compreenderem meus momentos de ausência.

Ao Prof. Edison Barbieri, meu orientador. Por toda ajuda, ensinamentos e pela recepção no Instituto de Pesca e em Cananéia.

Ao Prof. Diego Martinez, meu coorientador. Pela oportunidade de realizar este trabalho em um centro de pesquisa de alto nível, por transmitir seus conhecimentos e sempre nos inspirar a buscar trabalhos de qualidade.

Aos meus companheiros de trabalho do Laboratório Nacional de Nanotecnologia onde fiz amigos incríveis. Em especial à Laís, Lidiane, Fabrício, Suely, Josias, Gabriela, Zaíra, Ariane e Bruna.

Aos profissionais do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, especialmente ao Evandro e Carlos (LCS), Letícia e Roberto (LAM), Maria Helena (LMF), Arline (DA) e Mathias (LMN).

Aos profissionais da Embrapa Meio Ambiente de Jaguariúna, pela receptividade e ajuda, especialmente à Vera, Rodrigo, Neuza e Henrique.

Aos alunos do Instituto de Pesca pela convivência nas disciplinas. Em especial à Ednara, Thais, Victor, Camila, Danilo, Francisco, Ana Paula, Karen e a querida Aline, que me recepcionou no programa do IP, em Cananéia e em sua casa.

Ao querido Ocimar, por toda ajuda durante esta jornada.

Ao Alexandre e à Ana, meus queridos professores do curso de inglês.

As amigas Suely e Amanda companheiras e amigas de moradia durante estes anos.

Por fim, a todos aqueles que direta ou indiretamente me auxiliaram durante essa etapa, o meu agradecimento, muito obrigada.

## Sumário

<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	<b>i</b>
<b>Resumo geral</b> .....	<b>iv</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>v</b>
<b>1. Introdução geral</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. Fluxograma</b> .....	<b>3</b>
1.1.1. Objetivos.....	4
1.2. Apresentação da Dissertação.....	4
<b>2. Referências Bibliográficas</b> .....	<b>5</b>
<b>CAPÍTULO 01</b> .....	<b>7</b>
<b>Nanotubos de carbono e ácido húmico:</b> .....	<b>7</b>
<b>modificação mecanoquímica, caracterização e ecotoxicidade aquática</b> .....	<b>7</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>9</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>10</b>
<b>1. Introdução</b> .....	<b>11</b>
<b>2. Seção experimental</b> .....	<b>13</b>
2.1. Materiais .....	13
2.2. Preparação dos materiais .....	13
2.2.1. Modificação mecanoquímica dos NTCPM.....	13
2.2.1.1. Obtenção do híbrido AH-NTCPM .....	14
2.2.2. Oxidação química dos NTCPM com ácido nítrico.....	14
2.3. Caracterização dos materiais .....	15
2.4. Preparação e caracterização das dispersões de AH-NTCPM .....	16
2.5. Aplicação do AH-NTCPM para a adsorção de íons metálicos.....	17
2.6. Avaliação da ecotoxicidade aquática .....	18
2.6.1. <i>Hydra attenuata</i> .....	18
2.6.2. <i>Daphnia magna</i> .....	18
2.6.3. Embriões de <i>Danio rerio</i> .....	19
<b>3. Resultados e discussão</b> .....	<b>20</b>
3.1. Caracterização dos materiais .....	20
3.2. Estabilidade coloidal do AH-NTCPM .....	26

3.3.	Aplicação do AH-NTCPM para a adsorção de íons metálicos.....	28
3.4.	Avaliação da ecotoxicidade aguda do AH-NTCPM.....	31
<b>4.</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>32</b>
<b>5.</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>33</b>
	<b>Considerações finais.....</b>	<b>38</b>
	<b>Anexo 1- Material Suplementar .....</b>	<b>39</b>
<b>1.</b>	<b>Seção Materiais e métodos.....</b>	<b>39</b>
1.1.	Obtenção do híbrido AH-NTCPM .....	39
1.2.	Caracterização dos materiais .....	40
1.3.	Preparação e caracterização das dispersões.....	41
1.3.1.	Informações quanto a composição dos meios de cultivo.....	41
1.3.1.1.	Meio de cultivo da <i>H. attenuata</i> .....	41
1.3.1.2.	Meio de cultivo da <i>D. magna</i> .....	42
1.3.1.3.	Meio de cultivo do <i>D. rerio</i> .....	43
1.4.	Aplicação do AH-NTCPM para a adsorção de íons metálicos.....	43
1.5.	Avaliação da ecotoxicidade aquática.....	44
1.5.1.	Ensaio com <i>Hydra attenuata</i> .....	44
<b>2.</b>	<b>Seção de Resultados e discussão .....</b>	<b>44</b>
2.1.	Caracterização dos materiais .....	44
<b>3.</b>	<b>Referências Bibliográficas.....</b>	<b>44</b>

## Resumo geral

Nanomateriais de carbono são materiais promissores para diversas aplicações industriais, médicas e ambientais, visto que apresentam inéditas propriedades físico-químicas. Todavia, a superfície hidrofóbica destes materiais impede sua dispersão em meios aquosos e interação com sistemas biológicos, dificultando sua aplicação. Neste sentido, procedimentos de oxidação química são comumente aplicados a estes materiais a fim de reduzir sua hidrofobicidade. Todavia, nestes processos são utilizados reagentes químicos oxidantes fortes e altas temperaturas, potencializando a ocorrência de acidentes ocupacionais e ambientais. Neste trabalho, um método mecanoquímico ecologicamente amigável foi proposto para modificar nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) com ácido húmico (AH), com o intuito de produzir um material híbrido promissor (AH-NTCPM) para aplicações ambientais. As propriedades físico-químicas do AH-NTCPM foram estudadas e seu potencial de aplicação para remediação ambiental foi testado em experimentos de adsorção de íons Cu(II). Ademais, uma vez que a toxicidade dos nanomateriais é um aspecto crítico, ensaios ecotoxicológicos foram realizados com organismos aquáticos (*Hydra attenuata*, *Daphnia magna* e embriões de *Danio rerio*). A partir dos resultados obtidos, destaca-se que o método aplicado foi eficiente em produzir modificações estruturais, morfológicas e químicas nos NTCPM, as quais resultaram em um revestimento de ácido húmico estável sobre estes. Este revestimento foi crucial para diminuir a hidrofobicidade dos NTCPM, proporcionando-lhes estabilidade coloidal em água deionizada e alta capacidade de adsorção de metais a partir de soluções aquosas. Ademais, até a máxima concentração testada ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), nenhum efeito de ecotoxicidade aguda foi observado. Desta forma, nossos resultados sugerem que o híbrido produzido é um sistema funcional e promissor para tecnologias ambientais.

**Keywords:** moagem; funcionalização; nanomateriais; remediação; nanotoxicologia.

## Abstract

Carbon nanomaterials are promising materials for industrial, medical and environmental applications, since they present unreleased physicochemical properties. However, the hydrophobic surface of these materials hinders their dispersion in aqueous media and compatibility with biological systems. In this sense, chemical oxidation procedures are commonly applied to those materials in order to reduce their hydrophobicity. Nonetheless, in these procedures are used corrosive chemical reagents (e.g. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and HNO<sub>3</sub>) and high temperatures, potentiating the occurrence of environmental and occupational accidents. In this work, an eco-friendly mechanochemical process was proposed to modify multi-walled carbon nanotubes (MWCNT) with humic acid (HA), in order to produce a promising hybrid material (HA-MWCNT) for environmental applications. The physicochemical properties of HA-MWCNT was studied and their potential for environmental remediation was tested in Cu(II) adsorption experiments. Finally, since nanomaterials toxicity to biological organisms is a critical aspect, ecotoxicological assays were performed with aquatic organisms (*Hydra attenuata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio* embryos). Regarding the obtained results, we highlight that the method applied was efficient to create structural, morphological and chemical modifications on the MWCNT, which resulting in a humic acid coating on the MWCNTs. This coating was crucial to decrease the CNTs hydrophobicity, providing to them colloidal stability in deionized water and high adsorption capacity of metal from aqueous solution. Besides that, until the highest tested concentration (10 mg L<sup>-1</sup>) no effect of acute ecotoxicity was observed. Therefore, our results suggest that the hybrid produced is a functional and promising system for environmental technologies.

**Keywords:** milling; functionalization; nanomaterials; remediation; nanotoxicology.

## 1. Introdução geral

A nanotecnologia é uma plataforma científica e tecnológica que está em constante desenvolvimento devido seu potencial para inovação, e por conta disto, existem atualmente mais de 2300 produtos no mercado provenientes de inovações nanotecnológicas. Dentre as possíveis aplicações dos nanomateriais (NMs), pode-se citar seu uso em eletrônica, fármacos, protetores solares, cosméticos, agentes antimicrobianos e em tecnologias para remediação de águas contaminadas (RAJ *et al.*, 2012; GUPTA *et al.*, 2016). Na aquicultura, NMs são empregados para melhorar a biodisponibilidade de compostos funcionais, na proteção dos alimentos contra agentes microbianos, no desenvolvimento de vacinas e como sensores para detecção de patógenos e de água contaminada (RATHER *et al.*, 2011).

Segundo a ORGANIZAÇÃO INTERNACIONAL DE NORMALIZAÇÃO (ISO), são considerados nanomateriais todos os materiais que possuem, em ao menos uma dimensão, tamanho na escala nanométrica ( $10^{-9}$  m) (ISO TS 80004-2, 2015). Em decorrência do tamanho, os NMs apresentam elevada área superficial e reatividade química, características que além de lhes proporcionarem novas propriedades físico-químicas, estão também relacionadas com seu comportamento abrangente frente a sistemas ambientais e biológicos. Por conta disto, têm-se relatado na literatura potenciais efeitos tóxicos dos NMs a diversos organismos, como algas (WANG *et al.*, 2011), microcrustáceos (QIN *et al.*, 2014), bactérias e fungos (PRADHAN *et al.*, 2016), organismos do solo (COLLIN *et al.*, 2016; XIE *et al.*, 2016) e peixes (MARTINEZ *et al.*, 2013; CAMPOS-GARCIA *et al.*, 2015).

Enquanto testes de toxicidade com substâncias químicas clássicas (ex. metais pesados, pesticidas, fármacos) são padronizados e bem estabelecidos na literatura, a nanotoxicologia é ainda uma área emergente da ciência. Devido ao fato de que NMs são partículas e não moléculas, as quais a toxicologia clássica costuma estudar, mapear os efeitos tóxicos dos NMs tem sido uma tarefa árdua nos trabalhos científicos (MARTINEZ e ALVES, 2013; PETERSEN *et al.*, 2014).

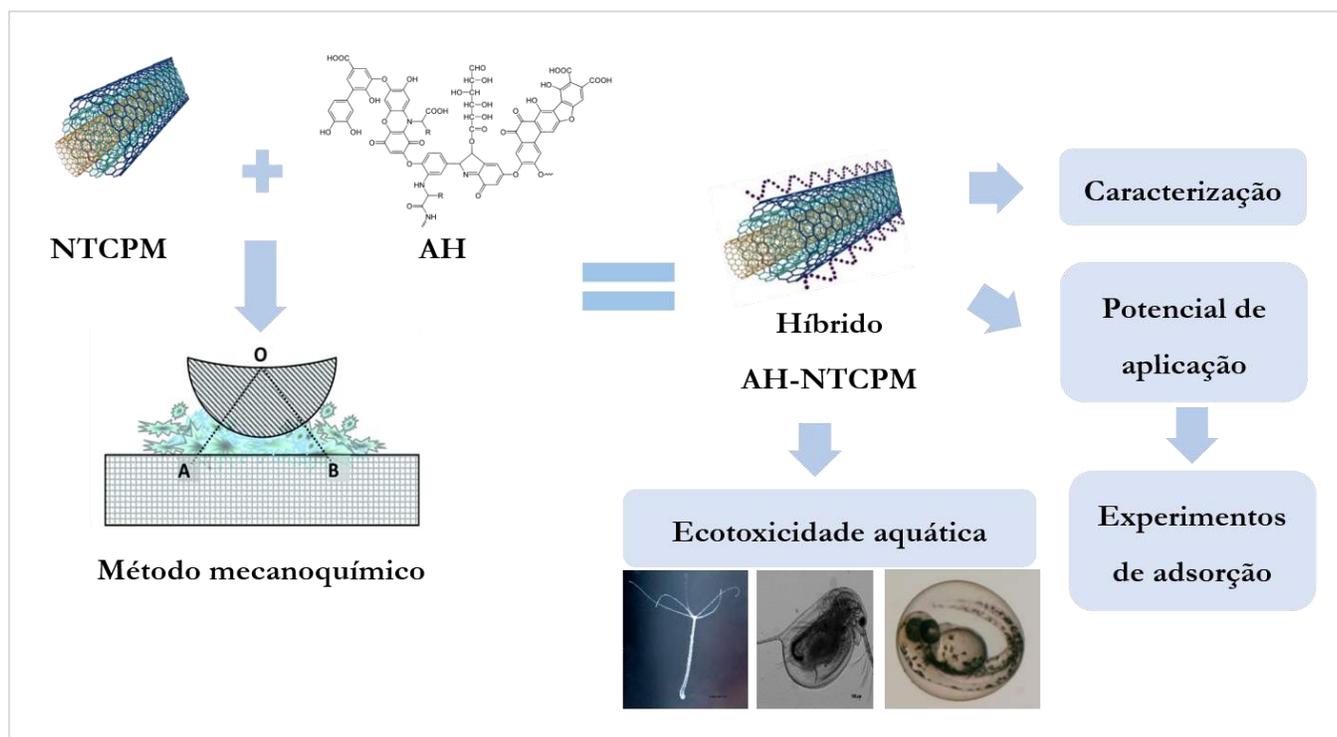
Para avaliar adequadamente a ecotoxicidade de um nanomaterial, além de preocupações quanto as concentrações e tempo de exposição a serem utilizados nos ensaios, uma série de outras informações devem ser correlacionadas com os efeitos tóxicos observados. Primeiramente, os NMs devem ser devidamente caracterizados a fim de conhecer suas propriedades físico-químicas, uma vez que a forma, estrutura e a composição superficial destes podem influenciar nos resultados de toxicidade. Adicionalmente, o comportamento coloidal dos NMs deve ser estudado, pois muitos destes materiais possuem tendência a agregar/aglomerar nos meios e fluidos biológicos. Recomenda-se também que mais de um organismo, preferencialmente de diferentes níveis tróficos, seja utilizado, pois nem todo teste ou espécie é sensível para todos os compostos avaliados. Por fim, os testes de nanotoxicidade devem buscar compreender os mecanismos envolvidos na geração dos efeitos tóxicos, pois têm-se constatado que os NMs podem induzir a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), danos ao DNA e serem acumulativos (DUBOURGUIER, 2010). Desta maneira, apesar do excelente potencial de inovação que os nanomateriais apresentam, a realização de ensaios nanotoxicológicos previamente a sua aplicação pode ser considerada como imprescindível frente a segurança de seu uso.

Os nanotubos de carbono (material de estudo deste trabalho) têm sido objeto de intensa pesquisa nas duas últimas décadas. Por conta disto, este NM é um dos seis mais produzidos no mundo, sendo utilizados em sensores, compósitos, fármacos e na agricultura. Todavia, para que eles sejam efetivamente aplicados faz-se necessário reduzir sua superfície hidrofóbica, a fim de favorecer sua dispersão em meios aquosos e interação com fluidos biológicos. Diversos métodos de funcionalização covalente e não covalente tem sido sugeridos na literatura para modificar nanotubos de carbono, porém poucos trabalhos têm-se concentrado em desenvolver metodologias alternativas à oxidação química, procedimento majoritariamente empregado. Neste sentido, propôs-se neste trabalho a utilização de um método mecanoquímico (moagem no estado sólido) como alternativa ambientalmente amigável para modificar nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM). O ácido húmico (AH) foi utilizado durante o

processo visto que ele tem sido apontado como um composto promissor para a produção de materiais funcionais e sustentáveis (DE MELO *et al.*, 2016). Visando a segurança de aplicação do produto nanotecnológico obtido, priorizou-se a realização de ensaios de ecotoxicidade aguda com organismos aquáticos considerados modelo para a ecotoxicologia. Como resultado deste trabalho um artigo científico foi submetido para publicação em uma revista classificada como A1 pela avaliação Qualis da CAPES (2015).

### 1.1. Fluxograma

A Figura 1 apresenta o fluxograma de execução deste estudo, o qual contempla a etapa de produção do híbrido; a caracterização físico-química deste material; os estudos quanto ao seu potencial de aplicação e quanto aos ensaios ecotoxicológicos realizados.



**Fig. 1.** Fluxograma de execução do projeto. Fonte: próprio autor.

## **1.1. Objetivos**

Este trabalho teve como objetivo modificar nanotubos de carbono de paredes múltiplas com ácido húmico, por um método mecanoquímico, a fim de produzir um material funcional e promissor para aplicações ambientais. Como objetivos específicos, pretendeu-se estudar o potencial do híbrido obtido como um novo material para remediação de íons metálicos e determinar sua ecotoxicidade aguda sobre os organismos aquáticos *Hydra attenuata*, *Daphnia magna* e embriões de *Danio rerio*.

## **1.2. Apresentação da Dissertação**

Esta dissertação será apresentada em formato de artigo científico, seguindo as regras da revista *Science of The Total Environment* (STOTEN), classificada como A1 pelo Periódico CAPES 2015.

## 2. Referências Bibliográficas

CAMPOS-GARCIA, J.; MARTINEZ, D.S.T.; ALVES, O.L.; LEONARDO, A.F.G.; BARBIERI, E. 2015. Ecotoxicological effects of carbofuran and oxidised multiwalled carbon nanotubes on the freshwater fish Nile tilapia: Nanotubes enhance pesticide ecotoxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 111: 131–137.

DUBOURGUIER, H.C. 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. *Toxicology*, 269(2-3): 105–119.

COLLIN, B.; TSYUSKO, O.V.; STARNES, D.L.; UNRINE, J.M. 2016. Effect of natural organic matter on dissolution and toxicity of sulfidized silver nanoparticles to *Caenorhabditis elegans*. *Environmental Science Nano*, 3: 728–736.

GUPTA, V.K.; MORADI, O.; TYAGI, I.; AGARWAL, S.; SADEGH, H.; SHAHRYARI-GHOSHEKANDI, R.; MAKHLOUF, A.S.H.; GOODARZI, M.; GARSHASBI, A. 2016. Study on the removal of heavy metal ions from industry waste by carbon nanotubes: Effect of the surface modification: a review. *Critical Reviews Environmental Science and Technology*, 46(2): 93–118.

ISO – International Organization for Standardization. 2015. Nanotechnologies -- Vocabulary -- Part 2: Nano-objects. ISO/TS 80004-2, *International Organization for Standardization*, Geneva.

MARTINEZ, D.S.T.; ALVES, O.L.; BARBIERI, E. 2013. Carbon nanotubes enhanced the lead toxicity on the freshwater fish. *Journal of Physics*, 429:1-8.

MARTINEZ, D.S.T. e ALVES, O.L. 2013. Interação de nanomateriais com biosistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação. *Ciência e Cultura*, 65(3): 32-36.

PETERSEN, E.J.; HENRY, T.B.; ZHAO, J.; MACCUSPIE, R.I.; KIRSCHLING, T.L.; DOBROVOLSKAIA, M.A.; HACKLEY, V.; XING, B.; WHITE, J.C. 2014. Identification and Avoidance of Potential Artifacts and Misinterpretations in Nanomaterial Ecotoxicity Measurements. *Environmental Science and Technology*, 48(8): 4226–4246.

PRADHAN, A.; GERALDES, P.; SEENA, S.; PASCOAL, C.; CÁSSIO, F. 2016. Humic acid can mitigate the toxicity of small copper oxide nanoparticles to microbial decomposers and leaf decomposition in streams. *Freshwater Biology*, 61(12): 2197–2210.

QIN, L.; HUANG, Q.; WEI, Z.; WANG, L.; WANG, Z. 2014. The influence of hydroxyl-functionalized multi-walled carbon nanotubes and pH levels on the toxicity of lead to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 38(1):

199–204.

RAJ, S.; JOSE, S.; SUMOD, U.S.; SABITHA, M. 2012. Nanotechnology in cosmetics: Opportunities and challenges. *Journal of Pharmacy and Bioallied Science*, 4(3): 186–93.

RATHER, M.; SHARMA, R.; AKLAKUR, M.; AHMAD, S.; KUMAR, N.; KHAN, M.; RAMYA, V. 2011. Nanotechnology: A Novel Tool for Aquaculture and Fisheries Development. A Prospective Mini-Review. *Fisheries and Aquaculture Journal*, 2011.

XIE, J.; MING, Z.; LI, H.; YANG, H.; YU, B.; WU, R.; LIU, X.; BAI, Y.; YANG, S.-T. 2016. Toxicity of graphene oxide to white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Chemosphere*, 151: 324–331.

WANG, Z.; LI, J.; ZHAO, J.; XING, B. 2011. Toxicity and Internalization of CuO Nanoparticles to Prokaryotic Alga *Microcystis aeruginosa* as Affected by Dissolved Organic Matter. *Environmental Science and Technology*, 45(14): 6032–6040.

## **CAPÍTULO 01**

### **Nanotubos de carbono e ácido húmico: modificação mecanoquímica, caracterização e ecotoxicidade aquática**

(Artigo redigido nas normas da Revista "*Science of the Total Environment*",  
classificação A1 Qualis 2015)

**Nanotubos de carbono e ácido húmico:  
modificação mecanoquímica, caracterização e ecotoxicidade aquática**

Francine Côa<sup>a</sup>, Diego Stéfani T. Martinez<sup>b</sup>, Edison Barbieri<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Instituto de Pesca – APTA-SAA/SP, Zip Code 11990-000, CP157 Cananéia, São Paulo, Brasil.

<sup>b</sup> Brazilian Nanotechnology National Laboratory (LNNano), Brazilian Center for Research in Energy and Materials (CNPEM), Zip Code 13083-970, Campinas, São Paulo, Brazil.

## Resumo

Nanotubos de carbono (NTCs) são materiais promissores uma vez que apresentam potencial de aplicação para diferentes setores industriais. Todavia, seu carácter hidrofóbico apresenta-se como um obstáculo para sua compatibilidade em meios aquosos e biosistemas. Procedimentos de oxidação química com agentes oxidantes fortes (e.g.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  e  $\text{HNO}_3$ ) têm sido aplicados sobre NTCs com o interesse de modificar sua superfície química com grupamentos oxigenados (e.g.  $-\text{COOH}$ ,  $-\text{OH}$ ). Todavia, estes métodos apresentam riscos ambientais e ocupacionais. Neste trabalho, a aplicação de um método mecanoquímico ambientalmente amigável (moagem no estado sólido) foi proposta, pela primeira vez, para modificar nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) com ácido húmico (AH). O híbrido obtido (AH-NTCPM) foi estudado por microscopia de força atômica (AFM), microscopia eletrônica de varredura (MEV), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios-X (XPS), espectroscopia Raman, análise termogravimétrica (TGA) e espalhamento de luz dinâmico (DLS) e eletroforético (ELS). Seu potencial de aplicação foi avaliado em experimentos de adsorção de  $\text{Cu(II)}$ . Visto que a toxicidade dos nanomateriais é um fator crítico para sua aplicação, ensaios de ecotoxicidade aguda foram realizados com organismos aquáticos modelo (*Hydra attenuata*, *Daphnia magna* e embriões de *Danio rerio*). Nós concluímos que o método mecanoquímico aplicado foi eficiente em modificar os NTCPM, resultando em um revestimento de ácido húmico sobre estes. Este revestimento foi crucial para favorecer a dispersão coloidal do NTCPM em água deionizada e potencializar sua capacidade de adsorver íons metálicos. Todavia, nenhum efeito de ecotoxicidade foi observado frente aos organismos aquáticos estudados até a máxima concentração testada ( $10.0 \text{ mg L}^{-1}$ ). Desta forma, o híbrido AH-NTCPM pode ser considerado um material promissor para remediação ambiental.

**Palavras-chave:** nanomateriais, moagem, ecotoxicidade, remediação.

## **Abstract**

Carbon nanotubes (CNTs) are promising materials, since they present potential to application for different industrial sectors. However, their hydrophobic characteristic can be an obstacle for their compatibility in aqueous media and biosystems. Chemical oxidation procedures with strong oxidizing reagents (e.g. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and HNO<sub>3</sub>) have been applied to CNTs in order to modify their chemical surface with oxygenated groups. However, these methods present environmental and occupational potential risks. In this study, the application of an eco-friendly mechanochemical method (solid state milling) was proposed, for the first time, to modify multiwalled carbon nanotubes (MWCNT) with humic acid (HA). The obtained hybrid (HA-MWCNT) was studied by atomic force microscopy (AFM), scanning electron microscopy (SEM), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), Raman spectroscopy, thermogravimetric analysis (TGA) and electrophoretic (ELS) and dynamic light scattering (DLS). Its application potential was evaluated in Cu(II) adsorption experiments. Since the toxicity of nanomaterials is a critical aspect to their application, acute ecotoxicity assays were performed with model aquatic organisms (*Hydra attenuata*, *Daphnia magna* and *Danio rerio* embryos). We conclude that the mechanochemical method applied was efficient to modify the MWCNT, resulting in a humic acid coating on them. The coating was crucial to favor the MWCNT colloidal dispersion in deionized water and to potentiate their adsorption capacity of metal ions. However, no acute ecotoxicity effect was observed against the studied aquatic organisms up to up to the highest concentration evaluated up to the highest concentration evaluated. Therefore, HA-MWCNT hybrid can be considered a promising material for environmental remediation.

**Keywords:** nanomaterials, milling, toxicity, remediation.

## 1. Introdução

Nanotubos de carbono (NTCs) apresentam uma estrutura cilíndrica oca, cujas paredes são formadas por uma (nanotubos de carbono de paredes simples) ou mais (nanotubos de carbono de paredes múltiplas) folhas de átomos de carbono  $sp^2$  dispostos hexagonalmente. Os NTCs são um dos cinco nanomateriais mais aplicados no mundo, sendo utilizados como sensores, transistores e materiais adsorventes de contaminantes (BAUGHMAN, 2002; DE VOLDER *et al.*, 2013).

Tendo em vista a superfície hidrofóbica que os NTCs apresentam, procedimentos de funcionalizações covalentes e não covalentes têm sido sugeridos na literatura com o objetivo de modificar a superfície química destes materiais, favorecendo sua aplicação e interação com matrizes biológicas e sistemas aquosos (TASIS *et al.*, 2006; VAISMAN *et al.*, 2006; BACKES, 2012; BILALIS *et al.*, 2014). A oxidação química com agentes oxidantes fortes (e.g.  $H_2SO_4$ ,  $H_2O_2$  e  $HNO_3$ ) é um dos métodos classicamente empregados, pela qual NTCs podem ser purificados, encurtados e funcionalizados com grupamentos funcionais (e.g.  $-COOH$ ,  $=O$  e  $-OH$ ) (HIRSCH e VOSTROWSKY, 2005; ANDRADE *et al.*, 2013). Como resultado, além de reduzir a hidrofobicidade dos NTCs, estes grupos podem funcionar como sítios ativos, propiciando interações estratégicas destes NMs com substâncias de interesse (HU *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009; GUPTA *et al.*, 2016). Em contrapartida, apesar destes métodos serem eficazes para a modificação de NTCs, estes se utilizam de reagentes oxidantes fortes, como o ácido sulfúrico e nítrico, refluxo e altas temperaturas, potencializando a ocorrência de acidentes ocupacionais e ambientais. Como alternativa, procedimentos de modificação mecanoquímica têm sido propostos para transformar, encurtar e funcionalizar nanotubos de carbono com grupamentos químicos (LI *et al.*, 1999; MA *et al.*, 2009; RUBIO *et al.*, 2011). Devido a energia aplicada durante a moagem, reações químicas são favorecidas e propriedades específicas podem ser alcançadas. Desta forma os métodos mecanoquímicos são considerados vantajosos por apresentarem baixo custo,

simplicidade de execução e por reduzirem a geração de resíduos químicos (SOPICKA-LIZER, 2010).

Propôs-se neste trabalho, pela primeira vez na literatura, a aplicação de um método mecanoquímico (reação de estado sólido) como alternativa para modificar nanotubos de carbono de paredes múltiplas (NTCPM) com ácido húmico (AH). O ácido húmico foi selecionado pois este tem sido descrito como um composto natural promissor para produção de materiais funcionais e sustentáveis (DE MELO *et al.*, 2016). Devido aos grupos funcionais presentes em sua composição (e.g. carboxílicos, fenóis, hidroxílicos, amina e quinina) e a carga negativa que o AH apresenta (em pH entre 3,0-10,0), ele tem sido utilizado para melhorar a eficiência de materiais adsorventes para remoção de contaminantes a partir de soluções aquosas (LIU *et al.*, 2008; SHENG *et al.*, 2010). Adicionalmente, o AH tem sido descrito como agente estabilizante de NMs (HYUNG *et al.*, 2007; MOHD OMAR *et al.*, 2014; GUNSOLUS *et al.*, 2015) e atenuador de seus efeitos tóxicos (KIM *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2015).

Portanto, neste trabalho a moagem foi utilizada com o intuito de promover a interação entre nanotubos de carbono e ácido húmico, visando a produção de um material híbrido funcional. Como forma de avaliar o potencial de aplicação do AH-NTCPM, este foi testado como adsorvente de íons metálicos em água reconstituída. O íon Cu(II) foi escolhido como modelo devido a sua ampla utilização e por ser altamente tóxico, acumulativo nos organismos e não biodegradável (FLEMMING e TREVORS, 1989). Além disto, uma vez que a avaliação nanoecotoxicológica é um aspecto crítico para a aplicação dos NMs, uma abordagem integrada foi proposta, baseada na perspectiva de estudar as características físico-químicas do material produzido e sua natureza coloidal. Não obstante, ensaios de ecotoxicidade aquática do AH-NTCPM foram realizados com organismos modelo (*Hydra attenuata*, *Daphnia magna* e embriões de *Danio rerio*).

## **2. Seção experimental**

### **2.1. Materiais**

Nanotubos de carbono de paredes múltiplas na forma bruta (*raw*) (r-NTCPM) foram obtidos da empresa CNT Co. Ltd (Incheon, Coréia do Sul). Segundo as informações do fabricante, estes foram sintetizados por deposição química em fase vapor (CVD) e possuem diâmetro e comprimento de 10-40 nm e 1-25  $\mu\text{m}$ , respectivamente.

O nitrato de cobre trihidratado (Lote nº BCBJ5707V, código do produto 61197), a solução de hidróxido de amônio (Lote nº SZBB1600V, código do produto 221228,) e o ácido húmico na forma de sal sódico (Lote nº STBC5468V, código do produto H16752) foram adquiridos da Sigma Aldrich, sendo o AH utilizado sem purificação prévia. Todas as soluções, com exceção da de nitrato de cobre, foram preparadas em água deionizada produzida por um sistema de filtração Milli-Q (18,2 M $\Omega$ , Millipore).

### **2.2. Preparação dos materiais**

#### **2.2.1. Modificação mecanoquímica dos NTCPM**

A modificação mecanoquímica dos NTCPM foi realizada em um moinho de bolas vibratório vertical (TE-350, Tecnal) com capacidade de 235 mL. Para modifica-los com AH, 0,1 g de r-NTCPM e 1,0 g de AH, ambos em pó, foram introduzidos em uma cuba de aço inox juntamente com uma bola de alumínio (de diâmetro de 30 mm e 112 g de massa) e a moagem foi realizada a ~617 golpes por minuto, durante diferentes períodos, sendo estes de 5, 10 e 15 minutos.

A amostra r-NTCPM também foi moída, na ausência de AH, sob as mesmas condições utilizadas para preparar a amostra do híbrido (15 minutos), sendo esta denominada de NTCPM moído (m-NTCPM).

### **2.2.1.1. Obtenção do híbrido AH-NTCPM**

O híbrido AH-NTCPM foi preparado por meio de procedimentos de lavagem e centrifugação da amostra de NTCPM moído com AH. Basicamente, 0,01 g da mistura foi manualmente dispersa em 10 mL de água deionizada. O volume de 1 mL desta solução foi transferido para microtubos de 1,5 mL, que foram centrifugados a 20.800 g por 30 minutos, a 4 °C. Após a primeira centrifugação, os sobrenadantes foram imediatamente coletados e analisados em um espectrofotômetro UV-visível (Libra S70, Biochrom). A lavagem foi realizada até que o AH livre fosse completamente removido, ou seja, até que a absorbância do sobrenadante estivesse abaixo de 0,2 no comprimento de onda de 220 nm. Após a realização de 3 lavagens, o *pellet* (precipitado obtido após a centrifugação) foi reservado em geladeira e denominado de híbrido AH-NTCPM.

É importante destacar que o procedimento de lavagem e centrifugação para obtenção do híbrido foi realizado também para as amostras moídas em tempos inferiores a 15 minutos. Todavia, a amostra moída por 15 minutos foi escolhida para preparação do híbrido, considerando o excelente comportamento coloidal apresentado por esta amostra em água deionizada (Tabela S1).

Excepcionalmente, para realização das análises de termogravimetria e XPS, o híbrido AH-NTCPM foi seco com auxílio do equipamento *Speed Vacc* (Savant SPD1010, Thermo Scientific), por três horas.

### **2.2.2. Oxidação química dos NTCPM com ácido nítrico**

A oxidação química do NTCPM foi realizada de acordo com a metodologia proposta por MARTINEZ *et al.* (2013). Brevemente, 1,0 g de r-NTCPM foi tratado sob refluxo com 200 mL de HNO<sub>3</sub> (9,0 mol L<sup>-1</sup>) por 12 horas a 150 °C. Em seguida, estes foram filtrados a vácuo através de uma membrana de politetrafluoretileno (PTFE) de 0,2 µm de poro, lavados com água deionizada até obtenção de pH neutro e submetidos a secagem por liofilização durante 24 horas. O material obtido foi estocado em dessecadores para posterior uso e denominado de NTCPM oxidado (o-NTCPM).

### 2.3. Caracterização dos materiais

Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) dos materiais foram obtidas no equipamento Inspect F50 (FEI, Estados Unidos) operado a 15 kV. O híbrido AH-NTCPM também foi estudado por microscopia eletrônica de transmissão por varredura (STEM) nos modos de aquisição campo claro e escuro.

A topografia dos materiais foi estudada por microscopia de força atômica (AFM), no equipamento Nanoscope IIIa (Digital Instruments). Para tanto, utilizou-se do modo dinâmico para obtenção das imagens e da ponteira PPP-NCHR (frequência de ressonância de 320 kHz e constante de força de 42 N m<sup>-1</sup>).

Para realizar as análises de microscopia as amostras foram dispersas em álcool isopropílico com auxílio de banho ultrassom (Cole Parmer, 08895, CPXH) operando em potência máxima. Maiores detalhes relacionados ao preparo das amostras podem ser consultados no material suplementar (Item 1.2.).

A composição elementar superficial dos materiais foi analisada pela técnica de espectroscopia de fotoelétrons excitados por Raios-X (XPS), no equipamento K-Alpha (Thermo Fisher Scientific). Através de uma fonte K $\alpha$  de alumínio, espectros exploratórios foram obtidos em 3 áreas diferentes por amostra com 400  $\mu$ m de resolução espacial, aplicando-se uma energia de 200 eV.

Análises termogravimétricas foram realizadas em um analisador térmico simultâneo (449 F3 Jupiter, NETZSCH), em atmosfera de ar sintético com fluxo de 100 mL min<sup>-1</sup>. Cerca de 3-5 mg de amostra foi inserida em painéis de alumina e o equipamento foi operado de 25 °C até 900 °C sob uma taxa de aquecimento de 5 °C min<sup>-1</sup>.

Estudos com relação a desordem estrutural dos NTCs foram também realizados por espectroscopia Raman, de acordo com o proposto por ANDRADE *et al.* (2013). Brevemente, um espectrofotômetro Raman confocal equipado com um microscópio confocal óptico (Alpha 300, Witech) foram utilizados para obter 1444 espectros Raman, utilizando-se de uma energia de excitação de 2,33 eV (532 nm) com potência média de saída de ~30  $\mu$ W. Após a obtenção dos espectros, a relação I<sub>D</sub>/I<sub>G</sub> foi calculada a partir das áreas D e G mensuradas a

partir de mapas 2D Raman com 10 x 10  $\mu\text{m}$  de tamanho, contendo 38 pontos por linha e 38 linhas por mapa.

#### **2.4. Preparação e caracterização das dispersões de AH-NTCPM**

Devido a heterogeneidade do processo de moagem entre o AH e os NCPTM e ao fato de que os procedimentos de lavagem para obtenção do híbrido poderiam ter resultado na perda de NTCPM, a concentração deste nanomaterial no híbrido foi determinada por correlação com uma curva de calibração (Figura S1). Esta curva foi elaborada a partir de soluções preparadas em água deionizada nas concentrações de 0,1; 0,25; 0,5; 2,0; 2,5; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0 e 30,0  $\text{mg L}^{-1}$  de NTCPM. O comprimento de onda de 535 nm foi escolhido considerando o ponto no qual a absorvância do AH não interferiria na dos NTCPM, conforme sugerido por CERRILLO *et al.* (2015).

Para caracterizar a estabilidade coloidal do AH-NTCPM nas dispersões o equipamento ZetaSizer Nano ZS (Modelo ZEN3600, Malvern) foi utilizado. O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersividade foram obtidos por espalhamento de luz dinâmico (DLS), e o potencial zeta por espalhamento de luz eletroforético (ELS). Os experimentos foram realizados em água deionizada e nos meios de cultivo utilizados nos ensaios ecotoxicológicos. A concentração do AH-NTCPM e o tempo estabelecidos para as medidas foram selecionados de acordo com os ensaios de toxicidade (*D. rerio* e *H. attenuata* = 96 h e *D. magna* = 49 h). O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersividade foram obtidos em cubetas de poliestireno (ZEN0112) contendo as dispersões. Com a finalidade de garantir a homogeneidade e reprodutibilidade dos dados, três medidas independentes e três medidas consecutivas foram obtidas, considerando critérios de qualidade da análise (i.e. atenuador, taxa de contagem, correlograma e variação entre as medidas). As medidas de potencial zeta (PZ) foram realizadas apenas no tempo inicial do experimento, utilizando-se da célula capilar (DTS1070, Malvern Instruments). Informações quanto a composição química dos meios de cultivo podem ser consultadas no material suplementar (Item 1.3.1., nas Tabelas S2, S3 e S4).

## 2.5. Aplicação do AH-NTCPM para a adsorção de íons metálicos

O potencial de aplicação do AH-NTCPM como material adsorvente foi testado em experimentos de adsorção de íons Cu(II) em comparação aos materiais m-NTCPM e o-NTCPM.

Previamente aos experimentos, uma solução de nitrato de cobre foi preparada em meio de cultivo de *D. magna*, resultando em uma concentração final de 500 mg L<sup>-1</sup> de íons Cu(II). O meio de cultivo foi utilizado com o intuito de simular uma condição realística e também por este possuir pH 7, o qual foi anteriormente relatado como ideal para a adsorção de íons Cu(II) na presença de matéria orgânica (Sheng et al., 2010).

Os materiais m-NTCPM e o-NTCPM foram inseridos na forma de pó em tubos eppendorf e o híbrido AH-NTCPM na forma coloidal, ambos nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>. Em seguida, adicionou-se nos tubos o volume de 1 mL de solução de nitrato de cobre. Estes foram agitados em homogeneizador de soluções (modelo AP-22, Luferto Phoenix) por 3 horas. Posteriormente, foram centrifugados a 24 °C, por 60 minutos e a 20.800 g. O volume de 100 µL do sobrenadante foi coletado e depositado em uma placa de poliestireno de 96 poços. Em cada poço, adicionou-se 3 µL de solução de hidróxido de amônio (28-30%), para formar um complexo azulado com os íons Cu(II) presentes. A absorbância foi medida no comprimento de onda de 605 nm e o resultado correlacionado com uma curva padrão previamente elaborada (Figura S2). Por subtração entre a concentração de Cu(II) inicial e a final, obteve-se a porcentagem de íons adsorvidos pelo material.

Todos os experimentos de adsorção foram realizados em triplicata.

## **2.6. Avaliação da ecotoxicidade aquática**

Para avaliar a ecotoxicidade aguda decorrente da exposição ao AH-NTCPM, três organismos aquáticos foram selecionados, *Hydra attenuata*, *Daphnia magna* e embriões de *Danio rerio*. Imediatamente após a obtenção do híbrido, uma dispersão estoque foi preparada em água deionizada, na concentração de 62,12 mg L<sup>-1</sup>. Esta dispersão foi diluída nos meios de cultivo apropriados para realizar os ensaios. As concentrações estudadas foram de 0,1; 1,0; 5,0 e 10,0 mg L<sup>-1</sup>. Ensaios com as amostras r-NTCPM e m-NTCPM, na ausência de AH, não foram realizados devido a estes materiais não se dispersarem adequadamente e nem se manterem em suspensão. Todos os ensaios foram realizados no Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança (Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna) com os organismos cultivados neste local.

### **2.6.1. *Hydra attenuata***

O ensaio com *H. attenuata* foi realizado durante 96 horas, sob as condições de 20±1 °C e ciclo de iluminação de 12 de luz e 12 horas de escuro. Os testes foram executados em placas de poliestireno de 12 poços, sendo que cada poço foi preenchido com 4 mL de solução teste. A exposição foi realizada em quadruplicada, utilizando 3 organismos em cada poço (n = 12) e estes não foram alimentados durante o período. De acordo com o procedimento adotado por WILBY (1988), os efeitos adversos progressivos decorrentes da exposição foram mensurados diariamente por observação dos indivíduos em estereomicroscópio (modelo SMZ 2 LED, Optika). A cada organismo foi atribuído uma pontuação, sendo 10 para os organismos normais e 0 para os desintegrados, conforme ilustrado no material suplementar (Figura S3).

### **2.6.2. *Daphnia magna***

Para realização do ensaio com *D. magna* utilizou-se das recomendações disponíveis no protocolo nº 202 da ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO (OECD) (OECD, 2004).

Indivíduos neonatos de *D. magna* foram separados da colônia por meio de um pipetador com orifício de 0,5 mm. Estes foram expostos ao material testado por 48 horas, a  $20\pm 1$  °C, em placas de poliestireno com 12 poços. Cada poço foi preenchido com 5 mL da solução teste, onde 2 organismos foram inseridos, totalizando 24 organismos por grupo. Os indivíduos de *D. magna* foram observados diariamente por estereomicroscópio (Modelo SMZ 2 LED, Optika), sendo a imobilização o parâmetro indicativo da ocorrência de efeitos adversos.

### **2.6.3. Embriões de *Danio rerio***

Embriões de *D. rerio* (1 h após fertilização) foram individualmente expostos ao AH-NTCPM durante 96 horas, sob ciclo de iluminação de 14/10 h escuro/claro e a  $28\pm 1$  °C, de acordo com as recomendações do protocolo nº 236 da OECD (OECD, 2013). Placas de 24 poços foram utilizadas, nas quais um embrião por poço foi adicionado, totalizando  $n = 24$  para cada concentração.

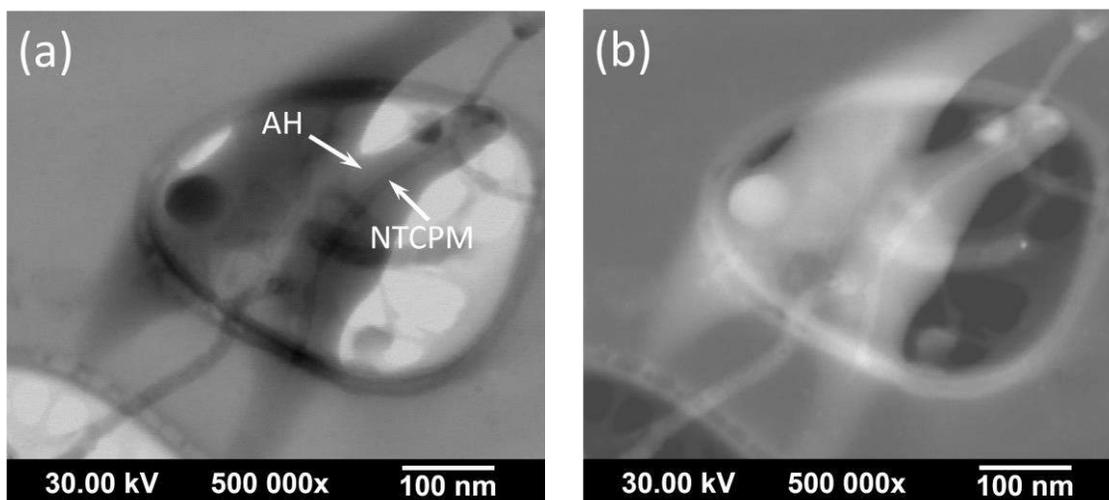
Os embriões foram observados diariamente em estereomicroscópio (modelo SMZ 2 LED, Optika) quanto ao seu desenvolvimento, sendo avaliados os critérios: mortalidade, taxa de eclosão, tamanho do saco vitelínico, formação de edemas, deformação da cauda e pigmentação.

### 3. Resultados e discussão

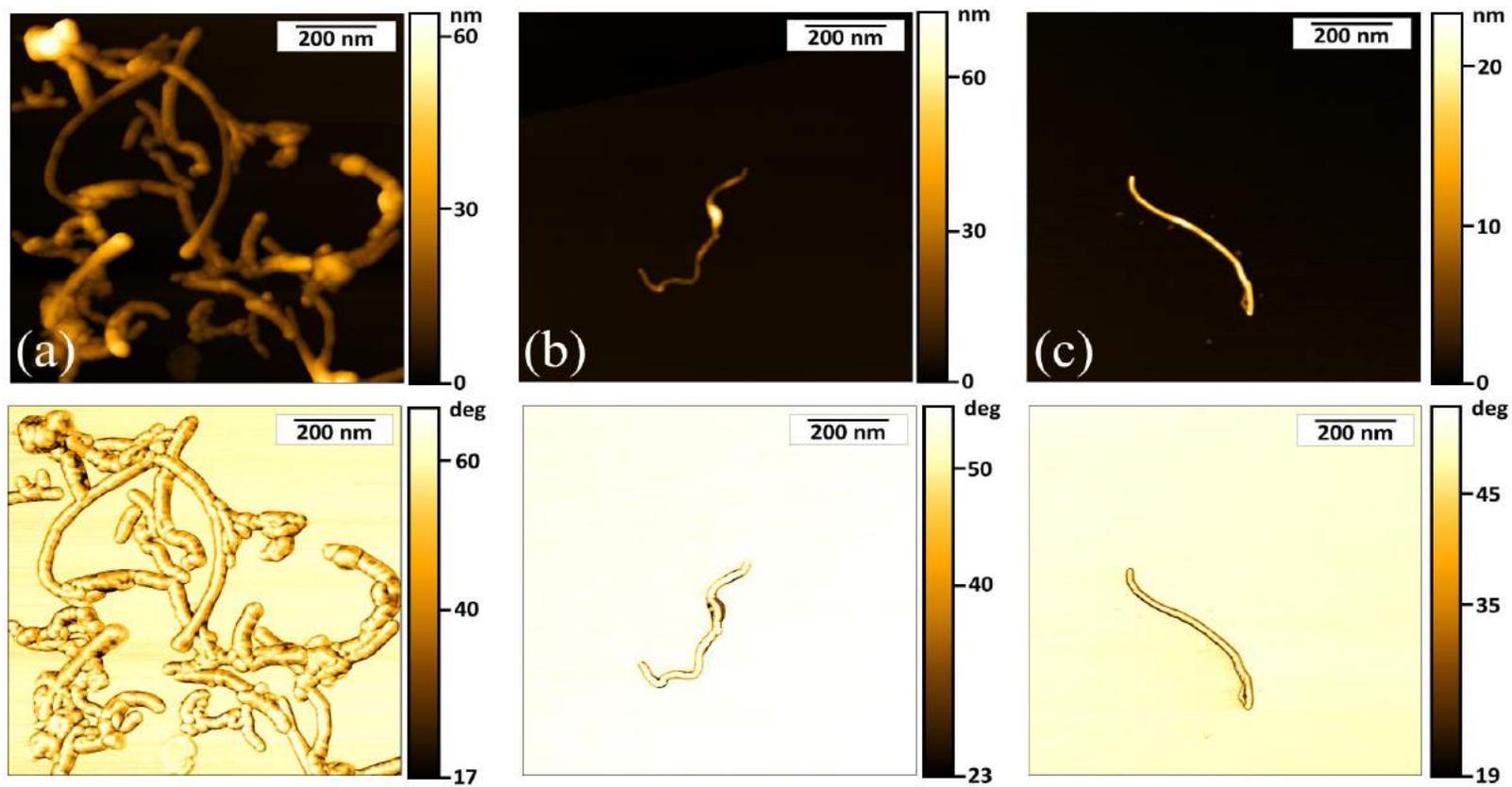
#### 3.1. Caracterização dos materiais

As características estruturais, morfológicas e químicas dos materiais foram estudadas pelas técnicas AFM, MEV, XPS, DLS e espectroscopia Raman, com o objetivo de correlacionar as propriedades físico-químicas dos materiais com a capacidade destes de adsorver íons Cu(II).

Foi possível constatar pela imagem de campo claro obtida em modo STEM (Figura 1a) que os NTCPM foram revestidos com ácido húmico. Adicionalmente, a imagem de campo escuro (Figura 1b) confirma que o material revestido trata-se de um NTCPM, uma vez que seu contraste na imagem é superior ao do revestimento, devido à sua alta cristalinidade. Evidências adicionais do revestimento foram também observadas por AFM, pois pelas imagens de topografia e de contraste de fase dos materiais (Figura 2) foi possível observar que as amostras não tratadas com AH (m-NTCPM e r-NTCPM) apresentam uma superfície plana e homogênea. Em contrapartida, o híbrido AH-NTCPM possui irregularidade superficiais e diâmetros mais amplos do que os observados nas demais amostras, sugerindo o revestimento de AH sobre os NTCPM.

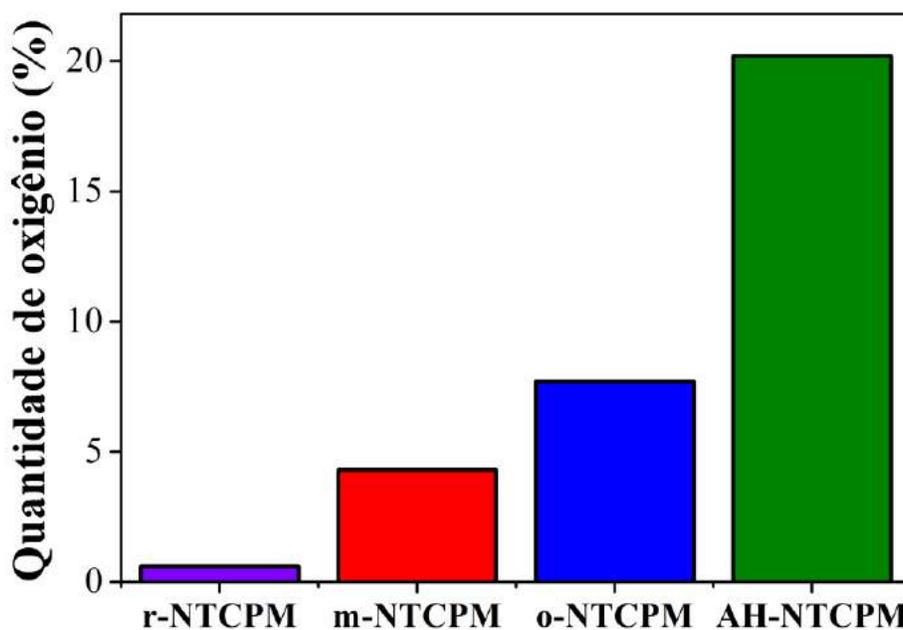


**Fig. 1.** Imagens de STEM do AH-NTCPM obtidas nos modos de aquisição a) campo claro e b) campo escuro.



**Fig. 2.** Imagens de topografia (acima) e de contraste de fase (abaixo) obtidas por AFM das amostras: a) AH-NTCPM, b) m-NTCPM e c) r-NTCPM.

Pelos espectros exploratórios XPS verificou-se que, embora todas as amostras de NTCs apresentem oxigênio em sua superfície (Figura 3 e Tabela S5), como comumente observado para amostras de NTCs bruto (OKPALUGO *et al.*, 2005; DATSYUK *et al.*, 2008) e NTCs moídos (ZAPATA-MASSOT e LE BOLAY, 2008), o híbrido AH-NTCPM possui quantidade superior deste elemento em sua superfície. Visto que o ácido húmico é composto por grupamentos oxigenados (i.e. carboxilas, hidroxilas e fenóis), pode-se sugerir que estes grupos teriam sido introduzidos nos NTCPM, justificando a alta quantidade de oxigênio nesta amostra. Dados semelhantes foram obtidos para nanopartículas (NPs) de CeO<sub>2</sub> e TiO<sub>2</sub> (WANG *et al.*, 2015) e também para NTCPM por LIN *et al.* (2012), os quais identificaram a introdução de grupos hidroxilas e carboxilas neste NM. Deve-se ressaltar também que a modificação dos NTCPM com AH por moagem resultou na introdução de oxigênio neste NM de forma 2,6 superior a modificação por oxidação química.



**Fig. 3.** Abundância relativa de oxigênio nos materiais quantificada por meio de espectros exploratórios obtidos por XPS.

Os resultados de DLS (Tabela 1) sugerem que o revestimento com AH foi fundamental para favorecer a dispersão e estabilização dos NTCPM em água

deionizada, uma vez que, neste meio, esta amostra apresentou o menor diâmetro hidrodinâmico ( $174,5 \pm 3,5$  nm) e índice de polidispersividade ( $0,302 \pm 0,030$ ) observados, bem como o maior valor de potencial zeta ( $-42,5 \pm 1,0$  mV). De fato, não foi observada agregação/aglomeração do AH-NTCPM nas dispersões preparadas em água deionizada (solução estoque) e os resultados obtidos no DLS foram classificados como “bons” de acordo com o software e pelos parâmetros de qualidade observados (i.e. atenuador, correlograma, diferença entre medidas).

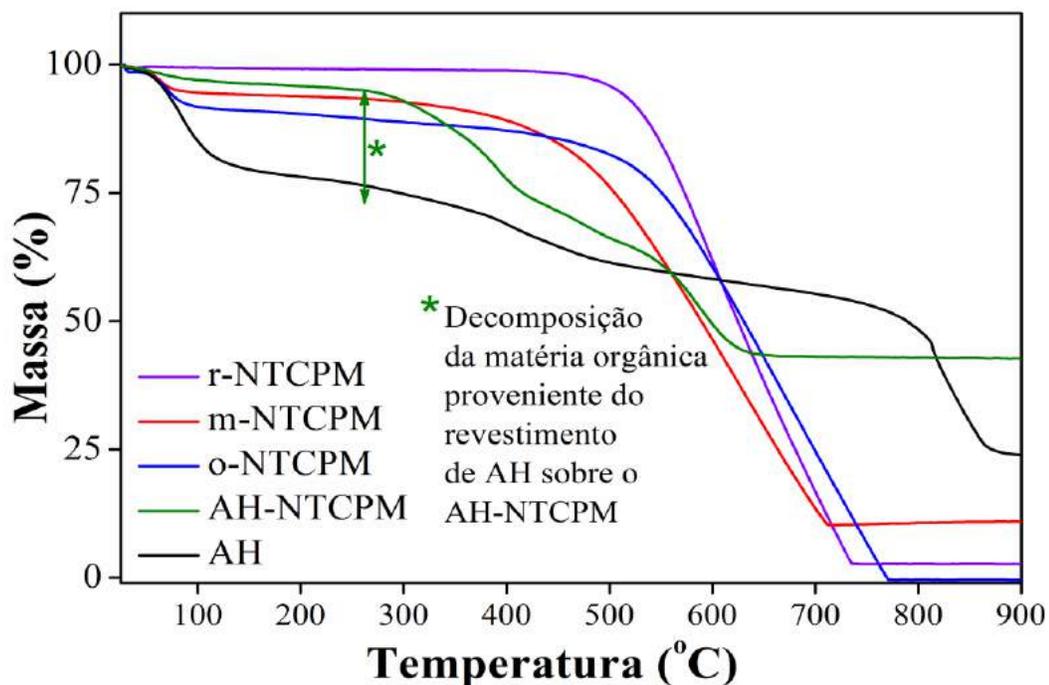
**Tabela 1.**

Diâmetro hidrodinâmico (DH) e índice de polidispersividade (Pdl) obtidos por DLS e valores de potencial zeta obtidos por ELS, dos materiais ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ), em água deionizada.

Material	DH (nm $\pm$ DP)	Pdl	Potencial Zeta (mV $\pm$ DP)
r-NTCPM	$393,2 \pm 27,3$	$0,548 \pm 0,070$	$-25,4 \pm 0,2$
m-NTCPM	$525,3 \pm 62,1$	$0,553 \pm 0,051$	$-25,5 \pm 0,2$
AH-NTCPM	$174,5 \pm 3,5$	$0,302 \pm 0,032$	$-42,5 \pm 1,0$
o-NTCPM	$179,6 \pm 2,1$	$0,385 \pm 0,010$	$-40,1 \pm 0,9$

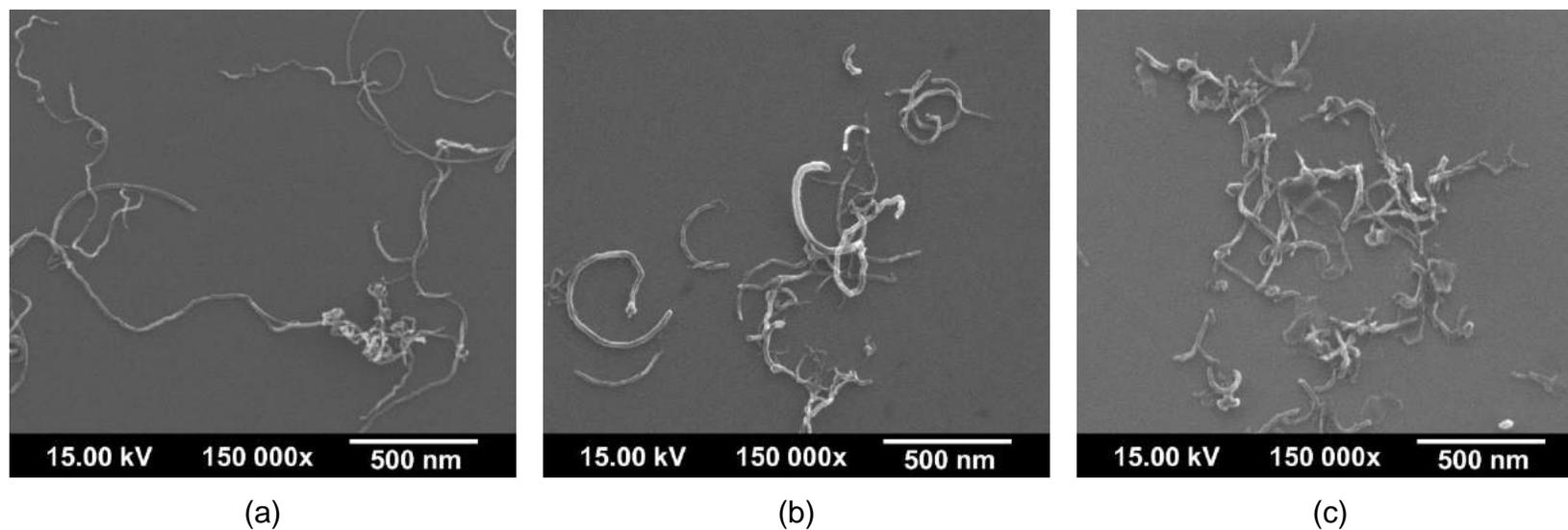
DP= Desvio padrão correspondentes a três medidas de três réplicas independentes.

Constatou-se pelas curvas termogravimétricas (Figura 4) que o revestimento de AH sobre os NTCPM resultou em alterações no perfil de decomposição térmica deste material (r-NTCPM). Por estes dados, foi calculada a quantidade de matéria orgânica proveniente do revestimento no híbrido, sendo esta de aproximadamente 25%. Ainda por TGA, foi verificado que os processos de moagem (na ausência de AH) e oxidação também promoveram alterações no perfil de decomposição térmica do r-NTCPM, as quais possivelmente estão relacionadas com a introdução de oxigênio na superfície destes materiais.

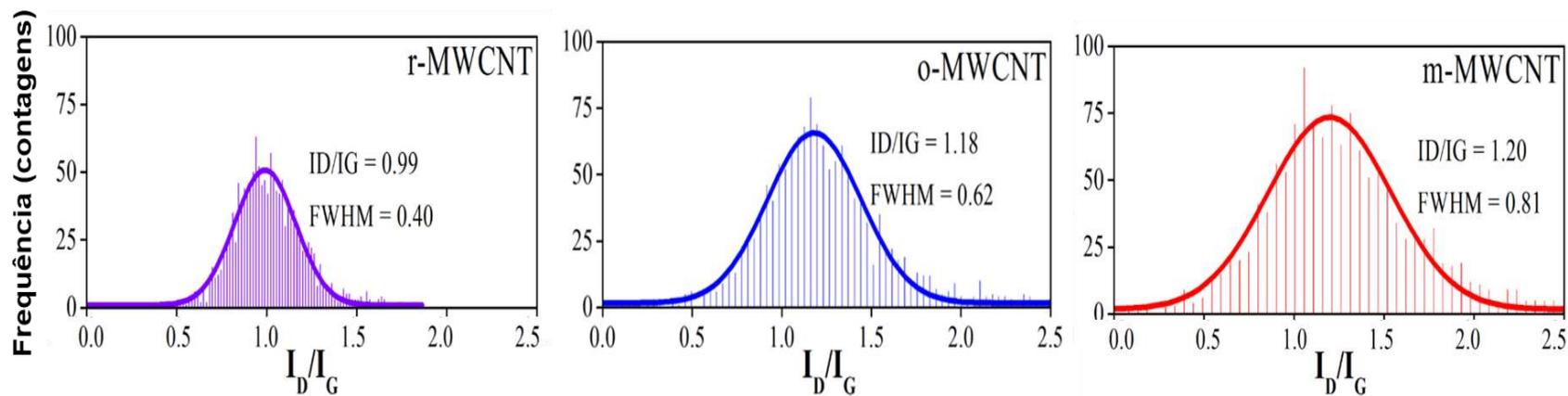


**Fig. 4.** Curvas termogravimétricas dos materiais obtidas em atmosfera de ar sintético ( $100 \text{ mL min}^{-1}$ ), aplicando-se uma taxa de aquecimento de  $5 \text{ }^\circ\text{C min}^{-1}$ , de 25 até  $900 \text{ }^\circ\text{C}$ ,

Destaca-se ainda que ambos os métodos (i.e. moagem e oxidação) promoveram o encurtamento dos NTCPM, como pode ser observado na Figura 5. Adicionalmente, pôde-se constatar que estes procedimentos também promoveram a inserção de defeitos na estrutura gráfica dos NTCPM, pois ao analisar a intensidade da razão  $I_D/I_G$  (Figura 6), que é comumente utilizada para monitorar o grau de desordem estrutural em materiais de carbono  $\text{sp}^2$  (OSSWALD *et al.*, 2007; GONG *et al.*, 2017; JIANG *et al.*, 2017), verificou-se que esta aumentou após os procedimentos mencionados. Do mesmo modo, o aumento das curvas de distribuição gaussianas do m-NTCPM e do o-NTCPM indicam que ambos materiais são mais heterogêneos com respeito a desordem estrutural gráfica do que o r-NTCPM.



**Fig. 5.** Imagens obtidas por MEV das amostras a) r-NTCPM, b) o-NTCPM e c) AH-NTCPM.



**Fig. 6.** Histogramas  $I_D/I_G$  (obtidos a partir de 1444 espectros coletados em diferentes pontos por amostra).

Desta forma, a partir dos resultados apresentados é possível inferir que a moagem dos NTCPM com o AH resultou em modificações químicas, estruturais e morfológicas, que foram acompanhadas e responsáveis pelo revestimento deste NM com o ácido húmico.

### 3.2. Estabilidade coloidal do AH-NTCPM

A tabela 2 apresenta os valores de diâmetro hidrodinâmico do AH-NTCPM e de potencial zeta mensurados em água deionizada (AD) e nos meios de cultivo da *Daphnia magna* (MDM), *Hydra attenuata* (MHA) e *Danio rerio* (MDR).

**Tabela 2.**

Potencial zeta (PZ), diâmetro hidrodinâmico inicial (DH<sub>i</sub>) e final (DH<sub>f</sub>) do AH-NTCPM (10 mg L<sup>-1</sup>) nos meios de cultivo e em água deionizada.

Meio	PZ (mV±DP)	DH <sub>i</sub> (nm±DP)	DH <sub>f</sub> (nm±DP)
AD	-42,5±1,0	174,5±3,5	159,1±2,6
MDM	-20,4±0,7	1059,1±149,8	2354,0±474,4
MHA	-19,9±0,4	1024,7±112,8	1082,7±300,8
MDR	-25,3±1,6	893,1±68,9	1618,9±638,3

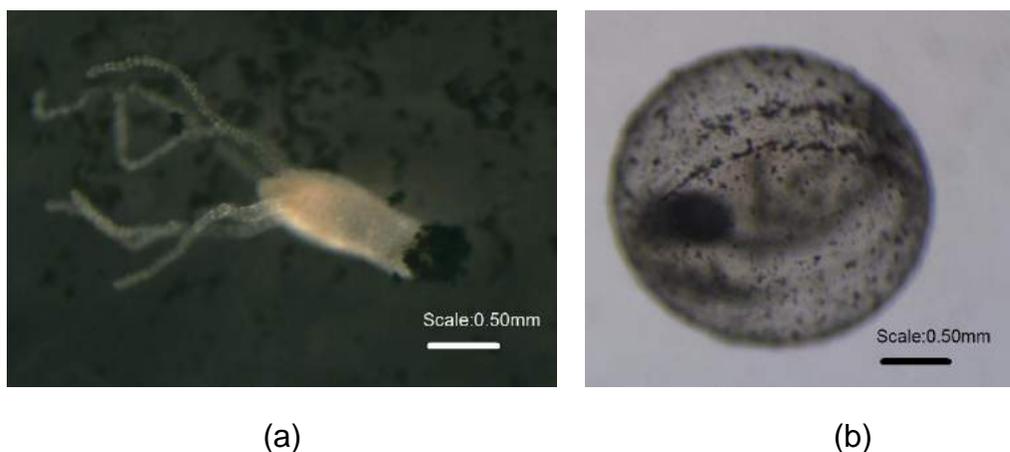
DP= Desvio padrão correspondente ao valor médio obtido a partir de três medidas de três réplicas independentes.

A partir do resultados de DLS, é possível observar que em água deionizada os valores de DH<sub>i</sub> e o DH<sub>f</sub> não variaram significativamente, sugerindo que a estabilidade coloidal do AH-NTCPM foi mantida durante as 96 horas. Confirmou-se por ELS que o híbrido apresenta excelente estabilidade coloidal em água deionizada, uma vez que o potencial zeta obtido neste meio é superior a 30 mV (em modulo). Em contrapartida, nos meios de cultivo, os valores de DH<sub>i</sub> foram todos superiores ao obtido em água deionizada, alcançando níveis micrométricos ao final do experimento, indicando a ocorrência de agregação/aglomeração do

híbrido nestes meios. A instabilidade coloidal do híbrido nos meios de cultivo foi confirmada também por ELS, devido aos resultados de potencial zeta encontrados serem todos inferiores a 30 mV (em módulo).

Pode-se inferir pelos resultados encontrados que, de fato, a interação entre o ácido húmico e os nanotubos de carbono promoveu o aumento da estabilidade coloidal deste nanomaterial (HYUNG *et al.*, 2007; GUNSOLUS *et al.*, 2015). Todavia, assim como relatado em outros estudos (CERRILLO *et al.*, 2015; CUPI *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2016), possivelmente a composição dos meios de cultivo afetou criticamente a estabilidade do híbrido. Isto se deve a elevada força iônica que os meios de cultivo apresentam, a qual possivelmente está relacionada a presença de íons divalentes, como o Ca(II) e Mg(II) (AKAIGHE *et al.*, 2012; BAALOUSHA *et al.*, 2013), provenientes dos sais utilizados para a preparação destes meios.

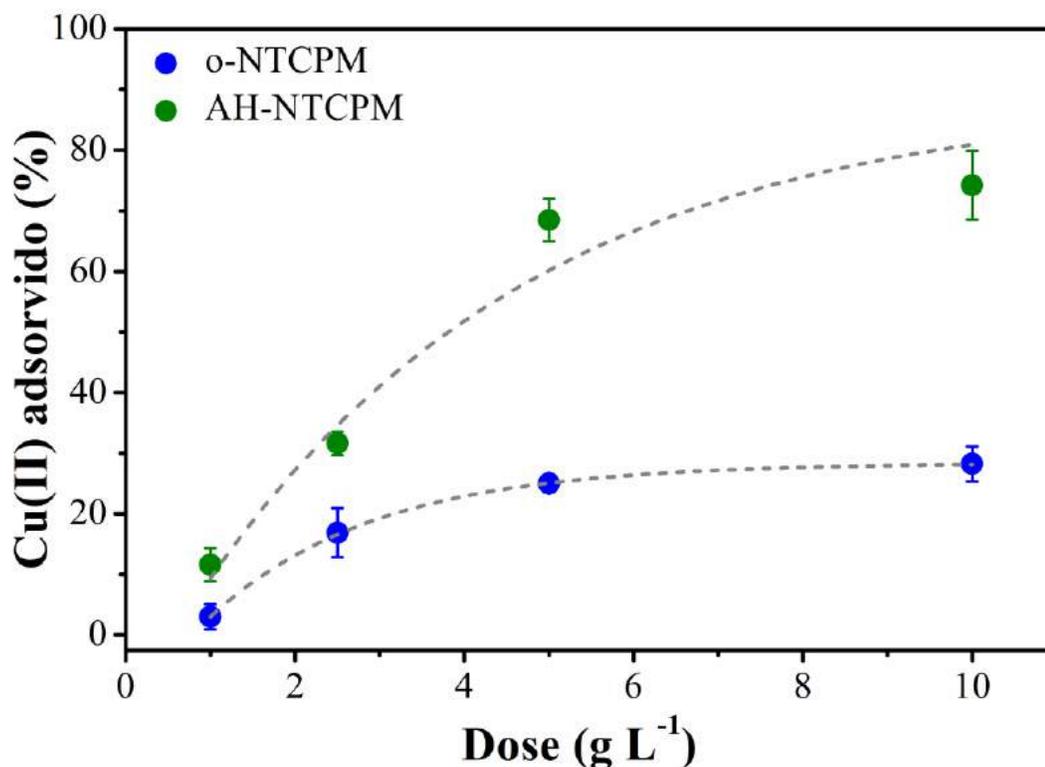
Portanto, é possível sugerir que o híbrido AH-NTCPM não se manteve em suspensão durante todo o período do teste de toxicidade e desta forma, houve contato físico entre os organismos e o material avaliado, como demonstrado na Figura 7. Diante disto, pode-se ressaltar que este contato poderia ter implicado em efeitos tóxicos, conforme constatado anteriormente por Liu et al (2009).



**Fig. 7.** Imagens obtidas no estereomicroscópio após a exposição dos organismos a) *Hydra attenuata* e b) Embrião de *Danio rerio* ao híbrido AH-NTCPM.

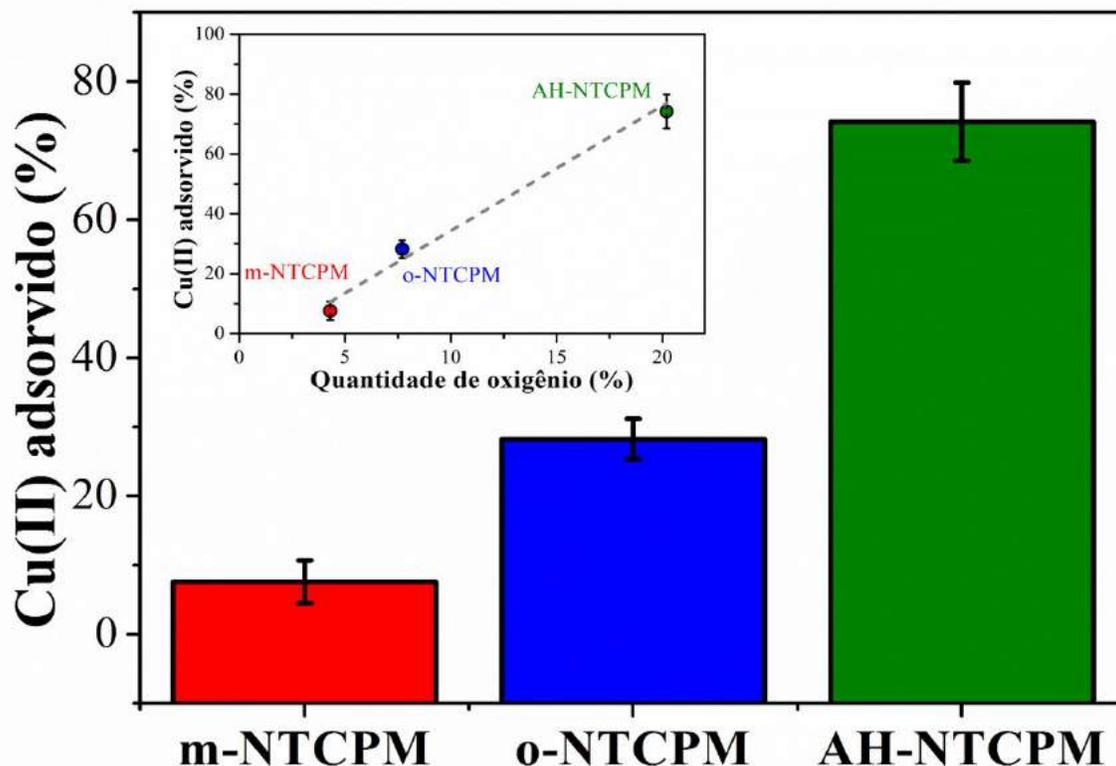
### 3.3. Aplicação do AH-NTCPM para a adsorção de íons metálicos

A partir dos dados obtidos nos experimentos de adsorção de íons Cu(II) com diferentes doses dos materiais adsorventes o-NTCPM e AH-NTCPM (1,0 a 10,0 g L<sup>-1</sup>) (Figura 8), foi possível verificar que o híbrido AH-NTCPM é 2,6 vezes mais eficiente que os NTCPM oxidados (o-NTCPM) (na dose de 10 g L<sup>-1</sup>).



**Fig. 8.** Isoterma de adsorção de íons Cu(II) com doses variadas (1,0 a 10,0 g L<sup>-1</sup>) dos adsorventes AH-NTCPM e o-NTCPM.

Ao comparar a capacidade de adsorção do híbrido AH-NTCPM com a do m-NTCPM (Figura 9), verificou-se que o revestimento de AH sobre os NTCPM desempenhou um papel chave na remoção de íons Cu(II), uma vez que o híbrido adsorveu dez vezes mais este metal que o m-NTCPM.



**Fig. 9.** Capacidade de remoção de íons Cu(II) (%) em água reconstituída apresentada pelos materiais m-NTCPM, o-NTCPM e AH-NTCPM na dose de 10 g L<sup>-1</sup>. As colunas representam os valores médios (n = 3) e as barras os respectivos desvios padrões. O gráfico inserido apresenta a curva de correlação entre a quantidade de oxigênio (%) e a quantidade de Cu(II) adsorvida.

O papel significativo que substâncias húmicas desempenham em potencializar a adsorção de contaminantes metálicos nos nanomateriais foi observado também em estudos anteriores (LIANG *et al.*, 2011; LIN *et al.*, 2012b; SUN *et al.*, 2012). No estudo de TIAN *et al.* (2012), por exemplo, foi observado que o revestimento com AH promoveu a introdução de grupos funcionais e cargas negativas em NTCPM, favorecendo a complexação química e atração eletrostática entre este NM e íons Cd(II). A relação entre grupos oxigenados e adsorção de contaminantes metálicos foi mencionada também por SUN *et al.* (2012), os quais constataram que os íons Cu(II) teriam se ligado especificamente a grupos carboxílicos (-COOH) provenientes da interação com a matéria orgânica.

Alguns autores têm relatado que a força iônica e o pH são fatores que podem influenciar na capacidade de adsorção apresentada pelos NMs. No estudo de SHENG *et al.* (2010) observou-se que a adsorção de Cu(II) foi fortemente dependente do pH, sendo considerada ideal em pH inferior a 7,5. Uma vez que, em nosso estudo, os ensaios de adsorção foram realizados em água reconstituída da *D. magna* (pH = 7,0), pode-se dizer que, de forma similar ao trabalho citado, a adsorção de íons Cu(II) durante os experimentos ocorreu em condições próximas a ideal.

Sugere-se ainda que existe uma relação entre o conteúdo de oxigênio dos materiais e a capacidade de adsorção apresentada por estes, conforme demonstrado no gráfico inserido na Figura 9. Desta forma, deve-se destacar que o híbrido AH-NTCPM pode ser considerado um material promissor para aplicação em remediação ambiental, pois sua capacidade de adsorção foi aproximadamente três vezes superior à apresentada pelo o-NTCPM, obtido pelo método de clássico de oxidação química. Além disso, apesar de ser difícil comparar os nossos resultados com a literatura, devido aos materiais e as condições experimentais serem distintos (Tang *et al.*, 2014; Gupta *et al.*, 2016), propomos também uma análise comparativa entre a máxima capacidade de adsorção ( $Q_{max}$ ) do híbrido AH-NTCPM e os resultados reportados na literatura. A tabela 3 apresenta, portanto, estes dados e a partir desta pode-se inferir que o híbrido AH-NTCPM é o material mais eficiente para remoção de íons metálicos a partir de soluções aquosas, quando comparado a outros nanotubos interagidos com substâncias húmicas. Além disso, embora o AH-NTCPM apresente excelente estabilidade coloidal em água deionizada, sua remoção durante processos de tratamento de água pode ser facilitada por simples mudanças no pH ou força iônica do meio, pois estas comumente afetam a estabilidade de nanomateriais.

**Tabela 3.** Comparação entre as capacidades de adsorção máxima (mg g<sup>-1</sup>) entre nanotubos de carbono interagidos com substâncias húmicas.

<b>Materiais</b>	<b>Tipos de interação entre AH e NTCPM</b>	<b>Adsorbato</b>	<b>Q<sub>max</sub> (mg g<sup>-1</sup>)</b>	<b>Referências</b>
NTCPM oxidado	Sem AH	Cu(II)	33,7±8,1	Nosso estudo
NTCPM raw	Revestidos de AH por método mecanoquímico	Cu(II)	<b>68,5±3,5</b>	<b>Nosso estudo</b> (AH-NTCPM)
NTCPM oxidado	Revestido por 50% AH	Pb(II)	40,2±1,8	(Lin et al., 2012)
NTCPM raw	≤20 mg L <sup>-1</sup> MON em solução	Cu(II)	<25,0	(Sun et al., 2012)
NTCPM raw	Revestido com AH	Cd(II)	18,4±0,5	(Tian et al., 2012)
NTCPM oxidado	20 mg L <sup>-1</sup> AH em solução	Cu(II)	7,7±0,5	(Sheng et al., 2010)

\*MON – matéria orgânica natural.

### 3.4. Avaliação da ecotoxicidade aguda do AH-NTCPM

Durante os testes de ecotoxicidade, a taxa de sobrevivência dos indivíduos dos grupos controle foi superior a 95%. Quando expostos ao AH-NTCPM, os indivíduos de *H. attenuata* apresentaram corpo estendido e conformações normais de seus tentáculos em todas as concentrações, e assim, todos foram pontuados com score 10. Com relação aos experimentos com *D. magna*, a taxa de imobilização dos organismos foi inferior a 5% em todos os grupos expostos. Nos embriões de *D. rerio*, não foram observadas malformações e a taxa de mortalidade nos grupos expostos foi inferior a 5%. Sendo assim, testes estatísticos não foram realizados, visto que, de acordo com os protocolos ecotoxicológicos, taxas de mortalidade inferiores a 10% são aceitáveis.

Substâncias húmicas (SH) tem sido reportadas como atenuadoras dos efeitos tóxicos dos nanomateriais (KIM *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2012a; CHEN *et al.*, 2015; PRADHAN *et al.*, 2016), entretanto os mecanismos envolvidos nestes casos são ainda pouco discutidos. Alguns estudos têm associado a diminuição da toxicidade dos NMs com o aumento na estabilidade coloidal proporcionado por sua interação com as SH. KIM *et al.* (2012), por exemplo, relataram que o revestimento de AH sobre NTCPM aumentou a estabilidade coloidal deste MN,

protegendo embriões de *Oryzias latipes* dos efeitos tóxicos deste. Similarmente, CHEN *et al.* (2015) constataram que a redução da toxicidade de óxido de grafeno a embriões de zebrafish poderia estar associada ao aumento da estabilidade promovido pelo AH. No entanto, esta relação pode não ser tão evidente, visto que, para NPs de TiO<sub>2</sub>, o aumento da estabilidade não foi acompanhado pela redução na mortalidade de embriões de zebrafish e na taxa de imobilização da *D. magna*, conforme observado por CUPI *et al.* (2016) e YANG *et al.* (2013), respectivamente. De fato, a influência das SH sobre a toxicidade de NMs deve ser avaliada caso por caso, pois nem todos os NMs avaliados na literatura tiveram seus efeitos tóxicos mitigados após a interação com SH (CUPI *et al.*, 2015; CERRILLO *et al.*, 2016).

Esta divergência foi confirmada também em nosso estudo, uma vez que foi observada agregação do híbrido AH-NTCPM nos meios de cultivo utilizados nos ensaios ecotoxicológicos e como consequência, seu contato direto com os organismos estudados. Todavia, uma vez que nenhum efeito adverso foi observado até a máxima concentração testada (10 mg L<sup>-1</sup>), pode-se afirmar que o híbrido AH-NTCPM pode ser considerado um material promissor para ser aplicado em remediações ambientais.

#### **4. Conclusões**

Neste trabalho um método mecanoquímico (moagem no estado sólido) foi utilizado, pela primeira vez na literatura, como uma alternativa ambientalmente amigável para modificar nanotubos de carbono de paredes múltiplas com ácido húmico. Com respeito aos resultados de caracterização físico-química do material obtido, pode-se observar que as modificações proporcionadas por este método ocasionaram em um revestimento estável de ácido húmico sobre os NTCs, o qual foi crucial para favorecer sua dispersão e estabilidade coloidal em água deionizada. Ademais, o revestimento de AH sobre os NTCPM propiciou sua aplicação como material adsorvente de íons metálicos, tornando-o um material promissor para ser utilizado para remediação ambiental. Até a máxima concentração testada (10 mg L<sup>-1</sup>), o AH-NTCPM não apresentou nenhum efeito

adverso (ecotoxicidade aguda) sobre os organismos aquáticos bioindicadores avaliados (*H. attenuata*, *D. magna* e embriões de *D. rerio*). Pode-se concluir portanto, que o híbrido AH-NTCPM pode ser considerado um sistema promissor e funcional para aplicações ambientais e que o método mecanoquímico apresenta-se como uma alternativa eficiente para modificar nanotubos de carbono e outros nanomateriais, frente aos métodos classicamente utilizados.

## 5. Referências Bibliográficas

AKAIGHE, N.; DEPNER, S.W.; BANERJEE, S.; SHARMA, V.K.; SOHN, M. 2012. The effects of monovalent and divalent cations on the stability of silver nanoparticles formed from direct reduction of silver ions by Suwannee River humic acid/natural organic matter. *Science of the Total Environment*, 441: 277–289.

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

BAALOUSHA, M.; NUR, Y.; RÖMER, I.; TEJAMAYA, M.; LEAD, J.R. 2013. Effect of monovalent and divalent cations, anions and fulvic acid on aggregation of citrate-coated silver nanoparticles. *Science of the Total Environment*, 454-455: 119–131.

BACKES, C. 2012. *Noncovalent Functionalization of Carbon Nanotubes*. Springer, Berlin. 203p.

BAUGHMAN, R.H. 2002. Carbon Nanotubes- the Route Toward Applications. *Science*, 80(297): 787–792.

BILALIS, P.; KATSIKIANNPOULOS, D.; AVGEROPOULOS, A.; SAKELLARIOU, G.; ZHANG, J.; MAO, L.; WANG, R.; JIN, C.; CHEN, Y.; ZHU, X.; CHEN, E.; TANG, B.Z.; GALLI, G.; GYGI, F.; WONG, P.H.-S.; TOK, J.B.-H.; KIM, J.M.; BAO, Z. 2014. Non-covalent functionalization of carbon nanotubes with polymers. *RSC Advances*, 4: 2911–2934.

CERRILLO, C.; BARANDIKA, G.; IGARTUA, A.; AREITIOAURTENA, O.; MARCAIDE, A.; MENDOZA, G. 2015. Ecotoxicity of multiwalled carbon nanotubes: Standardization of the dispersion methods and concentration measurements. *Environmental Toxicology Chemistry*, 34(8): 1854–1862.

CERRILLO, C.; BARANDIKA, G.; IGARTUA, A.; AREITIOAURTENA, O.; MENDOZA, G. 2016. Towards the standardization of nanoecotoxicity testing:

Natural organic matter “camouflages” the adverse effects of TiO<sub>2</sub> and CeO<sub>2</sub> nanoparticles on green microalgae. *Science of the Total Environment*, 543: 95–104.

CHEN, Y.; REN, C.; OUYANG, S.; HU, X.; ZHOU, Q. 2015. Mitigation in Multiple Effects of Graphene Oxide Toxicity in Zebrafish Embryogenesis Driven by Humic Acid. *Environmental Science and Technology*, 49:10147–10154.

CUPI, D.; HARTMANN, N.B.; BAUN, A. 2015. The influence of natural organic matter and aging on suspension stability in guideline toxicity testing of silver, zinc oxide, and titanium dioxide nanoparticles with *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology Chemistry*, 34: 497–506.

CUPI, D.; HARTMANN, N.B.; BAUN, A. 2016. Influence of pH and media composition on suspension stability of silver, zinc oxide, and titanium dioxide nanoparticles and immobilization of *Daphnia magna* under guideline testing conditions. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 127: 144–152.

DATSYUK, V.; KALYVA, M.; PAPAGELIS, K.; PARTHENIOS, J.; TISIS, D.; SIOKOU, A.; KALLITSIS, I.; GALIOTIS, C. 2008. Chemical oxidation of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon*, 46(6): 833–840.

DE MELO, B.A.G.; MOTTA, F.L.; SANTANA, M.H.A. 2016. Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *Materials Science and Engineering*, 62, 967–974.

DE VOLDER, M.F.L.; TAWFICK, S.H.; BAUGHMAN, R.H.; HART, A.J. 2013. Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications. *Science*, 80: 535–539.

FLEMMING, C.A.; TREVORS, J.T. 1989. Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. *Water, Air, Soil and Pollution*, 44: 143–158.

GONG, B.; IKEMATSU, A.; WAKI, K. 2017. Impacts of structure defects and carboxyl and carbonyl functional groups on the work function of multiwalled carbon nanotubes. *Carbon*, 114: 526–532.

GUNSOLUS, I.L.; MOUSAVI, M.P.S.; HUSSEIN, K.; BÜHLMANN, P.; HAYNES, C.L. 2015. Effects of Humic and Fulvic Acids on Silver Nanoparticle Stability, Dissolution, and Toxicity. *Environmental Science and Technology*, 49: 8078–8086.

GUPTA, V.K.; MORADI, O.; TYAGI, I.; AGARWAL, S.; SADEGH, H.; SHAHRYARI-GHOSHEKANDI, R.; MAKHLOUF, A.S.H.; GOODARZI, M.; GARSHASBI, A. 2016. Study on the removal of heavy metal ions from industry waste by carbon nanotubes: Effect of the surface modification: a review. *Critical Reviews Environmental Science and Technology*, 46: 93–118.

- HIRSCH, A.; VOSTROWSKY, O. 2005. Functionalization of Carbon Nanotubes. *Topics in Current Chemistry*, 245: 193-237.
- HU, J.; CHEN, C.; ZHU, X.; WANG, X. 2009. Removal of chromium from aqueous solution by using oxidized multiwalled carbon nanotubes. *Journal of Hazardous Materials*, 162(2-3): 1542–1550.
- HYUNG, H.; FORTNER, J.D.; HUGHES, J.B.; KIM, J.-H. 2007. Natural Organic Matter Stabilizes Carbon Nanotubes in the Aqueous Phase. *Environmental Science and Technology*, 41(1): 179–184.
- JIANG, W.; WANG, Q.; QU, X.; WANG, L.; WEI, X.; ZHU, D.; YANG, K. 2017. Effects of charge and surface defects of multi-walled carbon nanotubes on the disruption of model cell membranes. *Science of Total Environment*, 574: 771–780.
- KIM, K.-T.; JANG, M.-H.; KIM, J.-Y.; XING, B.; TANGUAY, R.L.; LEE, B.-G.; KIM, S.D. 2012. Embryonic toxicity changes of organic nanomaterials in the presence of natural organic matter. *Science of the Total Environment*, 426: 423–429.
- LI, Y.B.; WEI, B.Q.; LIANG, J.; YU, Q.; WU, D.H. 1999. Transformation of carbon nanotubes to nanoparticles by ball milling process. *Carbon*, 37: 493–497.
- LI, L.; SILLANPÄÄ, M.; RISTO, M. 2016. Influences of water properties on the aggregation and deposition of engineered titanium dioxide nanoparticles in natural waters. *Environmental Pollution*, 219: 132–138.
- LIANG, L.; LV, J.; LUO, L.; ZHANG, J.; ZHANG, S. 2011. Influences of surface-coated fulvic and humic acids on the adsorption of metal cations to SiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 389: 27–32.
- LIN, D.; JI, J.; LONG, Z.; YANG, K.; WU, F. 2012a. The influence of dissolved and surface-bound humic acid on the toxicity of TiO<sub>2</sub> nanoparticles to *Chlorella* sp. *Water Research*, 46: 4477–4487.
- LIN, D.; TIAN, X.; LI, T.; ZHANG, Z.; HE, X.; XING, B. 2012b. Surface-bound humic acid increased Pb<sup>2+</sup> sorption on carbon nanotubes. *Environmental Pollution*, 167: 138–147.
- LIU, J.; ZHAO, Z.; JIANG, G. 2008. Coating Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Magnetic Nanoparticles with Humic Acid for High Efficient Removal of Heavy Metals in Water. *Environmental Science and Technology*, 42: 6949–6954.
- LIU, X.; VINSON, D.; ABT, D.; HURT, R.H.; RAND, D.M. 2009. Differential toxicity of carbon nanomaterials in *Drosophila*: larval dietary uptake is benign, but adult exposure causes locomotor impairment and mortality. *Environmental Science and*

*Technology*, 43(16): 6357-6363.

MA, P.C.; WANG, S.Q.; KIM, J.-K.; TANG, B.Z. 2009. In-Situ Amino Functionalization of Carbon Nanotubes Using Ball Milling. *Journal Nanoscience and Nanotechnology*, 9: 749–753.

MARTINEZ, D.S.T.; ALVES, O.L.; BARBIERI, E. 2013. Carbon nanotubes enhanced the lead toxicity on the freshwater fish. *Journal of Physics*, 419:1-8.

MOHD OMAR, F.; ABDUL AZIZ, H.; STOLL, S. 2014. Aggregation and disaggregation of ZnO nanoparticles: Influence of pH and adsorption of Suwannee River humic acid. *Science of the Total Environment*, 468-469: 195–201.

OECD, 2004. Test No. 202: *Daphnia* sp. Acute Immobilisation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing.

OECD, 2013. Test No. 236: Fish Embryo Acute Toxicity (FET) Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. OECD Publishing.

OKPALUGO, T.I.T.; PAPAKONSTANTINOU, P.; MURPHY, H.; MCLAUGHLIN, J.; BROWN, N.M.D. 2005. High resolution XPS characterization of chemical functionalised MWCNTs and SWCNTs. *Carbon*, 43: 153–161.

OSSWALD, S.; HAVEL, M.; GOGOTSI, Y. 2007. Monitoring oxidation of multiwalled carbon nanotubes by Raman spectroscopy. *Journal of Raman Spectroscopy*, 38: 728–736.

PRADHAN, A.; GERALDES, P.; SEENA, S.; PASCOAL, C.; CÁSSIO, F. 2016. Humic acid can mitigate the toxicity of small copper oxide nanoparticles to microbial decomposers and leaf decomposition in streams. *Freshwater Biology*, 61: 2197–2210.

RUBIO, N.; FABBRO, C.; HERRERO, M.A.; DE LA HOZ, A.; MENEGHETTI, M.; FIERRO, J.L.G.; PRATO, M.; VÁZQUEZ, E. 2011. Ball-Milling Modification of Single-Walled Carbon Nanotubes: Purification, Cutting, and Functionalization. *Small*, 7: 665–674.

SHENG, G.; LI, J.; SHAO, D.; HU, J.; CHEN, C.; CHEN, Y.; WANG, X. 2010. Adsorption of copper(II) on multiwalled carbon nanotubes in the absence and presence of humic or fulvic acids. *Journal of Hazardous Materials*, 178: 333–340.

SOPICKA-LIZER, M. 2010. Introduction to mechanochemical processing, in: High-Energy Ball Milling, Elsevier, pp. 1–5.

SUN, W.-L.; XIA, J.; LI, S.; SUN, F. 2012. Effect of natural organic matter (NOM) on Cu(II) adsorption by multi-walled carbon nanotubes: Relationship with NOM properties. *Chemical Engineering Journal*, 200-202: 627–636.

TASIS, D.; TAGMATARCHIS, N.; BIANCO, A.; PRATO, M. 2006. Chemistry of Carbon Nanotubes. *Chemical Reviews*, 106: 1105–1136.

TIAN, X.; LI, T.; YANG, K.; XU, Y.; LU, H.; LIN, D. 2012. Effect of humic acids on physicochemical property and Cd(II) sorption of multiwalled carbon nanotubes. *Chemosphere*, 89: 1316–1322.

VAISMAN, L.; WAGNER, H.D.; MAROM, G. 2006. The role of surfactants in dispersion of carbon nanotubes. *Advances in Colloid and Interface Science*, 128-130: 37–46.

WANG, Y.; PENG, C.; FANG, H.; SUN, L.; ZHANG, H.; FENG, J.; DUAN, D.; LIU, T.; SHI, J. 2015. Mitigation of Cu(II) phytotoxicity to rice (*Oryza sativa*) in the presence of TiO<sub>2</sub> and CeO<sub>2</sub> nanoparticles combined with humic acid. *Environmental Toxicology Chemistry*, 34: 1588–1596.

WILBY, O.K. 2006. The hydra regeneration assay. In: Pachura-Bouchet, S., Blaise, C., Vasseur, P. (Eds), Proceedings of Workshop Organized by Association Francaise de Teratologie, Royaumont, France, June 3, 1988, pp. 108-124.

YANG, S.; LI, J.; SHAO, D.; HU, J.; WANG, X. 2009. Adsorption of Ni(II) on oxidized multi-walled carbon nanotubes: Effect of contact time, pH, foreign ions and PAA. *Journal of Hazardous Materials*, 166, 109–116.

YANG, S.P.; BAR-ILAN, O.; PETERSON, R.E.; HEIDEMAN, W.; HAMERS, R.J.; PEDERSEN, J.A. 2013. Influence of Humic Acid on Titanium Dioxide Nanoparticle Toxicity to Developing Zebrafish. *Environmental Science and Technology*, 47: 4718–4725.

ZAPATA-MASSOT, C.; LE BOLAY, N. 2008. Effect of ball milling in a tumbling ball mill on the properties of multi-wall carbon nanotubes. *Chemical Engineering and Processing*, 47: 1356–1362.

## **Considerações finais**

Neste trabalho um método mecanoquímico (moagem no estado sólido) foi proposto para modificar nanotubos de carbono de paredes múltiplas com ácido húmico, a fim de produzir um material híbrido funcional. De acordo com os resultados apresentados, concluiu-se que este método foi eficiente em promover modificações físico-químicas nos nanotubos de carbono, produzindo um revestimento de ácido húmico sobre estes. Este revestimento favoreceu a dispersão dos nanotubos em água deionizada e potencializou sua aplicação como material adsorvente para remediação ambiental. Para trabalhos futuros, destaca-se a importância de explorar as condições de aplicação e produção do material híbrido, a fim de reduzir a quantidade de ácido húmico utilizada e facilitar sua produção em larga escala. Por fim, considerável destaque deve ser dado aos métodos mecanoquímicos como alternativa estratégica e ecologicamente amigável para desenvolver nanomateriais funcionais sustentáveis. Ressalta-se ainda que a realização de ensaios nanoecotoxicológicos de forma proativa a aplicação dos NMs é imprescindível, dada as propriedades físico-químicas específicas que estes apresentam.

## Anexo 1- Material Suplementar

### 1. Seção Materiais e métodos

#### 1.1. Obtenção do híbrido AH-NTCPM

Para padronizar o tempo de moagem adequado, utilizou-se como critério a estabilidade coloidal em água deionizada. Desta forma, as misturas obtidas após a moagem em moinho vertical durante 5, 10 e 15 minutos foram lavadas em água deionizada e centrifugadas por três vezes. Os complexos obtidos foram ressuspensos em água deionizada na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ , a fim de mensurar o diâmetro hidrodinâmico e o potencial zeta destes materiais, que são dois parâmetros indicativos da estabilidade coloidal. Os resultados da Tabela S1 apresentam portanto, que a amostra moída por 15 minutos favoreceu de forma mais eficiente a dispersão do r-NTCPM, visto que esta amostra apresenta o maior potencial zeta encontrado ( $-42,5 \pm 1,0 \text{ mV}$ ) e o menor diâmetro hidrodinâmico ( $174,5 \pm 3,5 \text{ nm}$ ).

#### Tabela S1.

Diâmetro hidrodinâmico (DH) e potencial zeta das misturas de AH e NTCPM moídas por diferentes tempos (5, 10 e 15 minutos), dispersas em água deionizada na concentração de  $10 \text{ mg L}^{-1}$ .

Material	DH (nm $\pm$ DP)	Zeta potential (mV $\pm$ DP)
AH-NTCPM 5'	477,4 $\pm$ 35,8	-25,4 $\pm$ 0,4
AH-NTCPM 10'	397,3 $\pm$ 15,5	-25,1 $\pm$ 0,6
AH- NTCPM 15'	174,5 $\pm$ 3,5	-42,5 $\pm$ 1,0

DP= Desvio padrão correspondentes a três medidas de três réplicas independentes.

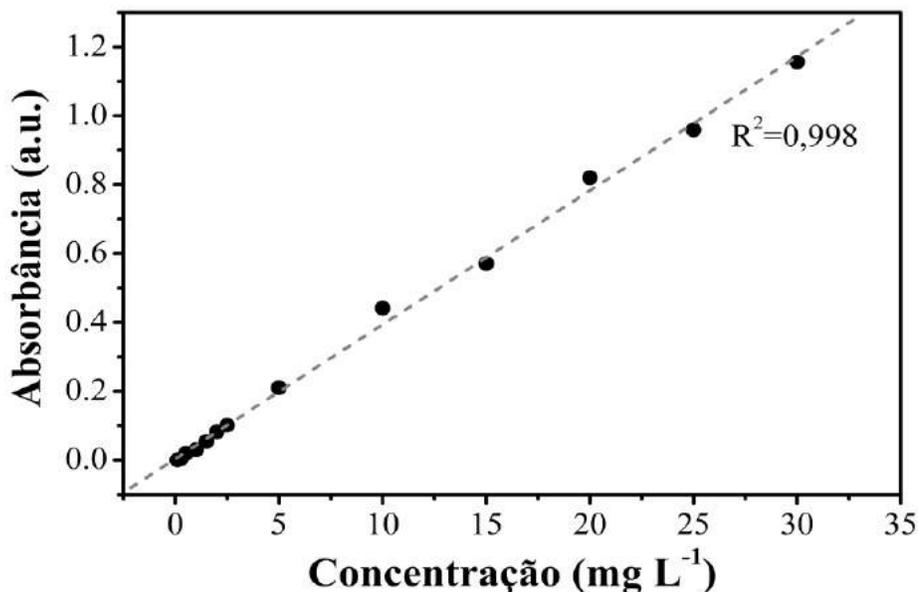
## 1.2. Caracterização dos materiais

A preparação das dispersões de r-NTCPM e m-NTCPM para as análises de microscopia foi realizada com auxílio de banho ultrassom (Cole Parmer, 08895, CPXH) operando em potência máxima. Primeiramente uma suspensão de 1000 mg L<sup>-1</sup> foi preparada em álcool isopropílico e sonicada por 25 minutos. Em seguida, esta foi diluída para 10 mg L<sup>-1</sup> e sonicada por mais 3 minutos.

No caso do híbrido AH-NTCPM, para as análises em MEV e STEM, este foi disperso em água deionizada e em seguida, diluído em álcool isopropílico na concentração de 1 mg L<sup>-1</sup>, sendo posteriormente sonicado por 3 minutos. No caso do AFM, a diluição procedeu-se apenas em água deionizada, na concentração de 20 mg L<sup>-1</sup>, cuja solução foi sonicada durante 3 minutos.

Após a preparação das dispersões, estas foram gotejadas nos porta amostras específicos para cada análise. Para o AFM, o volume de 3 µL foi gotejado sobre o substrato de mica, a qual foi previamente clivada para garantir descontaminação. A secagem das amostras foi auxiliada por *Spin coat*, operando à 2.500 rpm por 15 segundos, conforme proposto por ZDROJEK *et al.* (2004). Para o MEV, o volume de 5 µL das dispersões foi gotejado na placa de silício (substrato), previamente colada sobre o porta amostra de alumínio. As placas permaneceram no dessecador por, no mínimo, 24 horas, para secagem. Para visualização por STEM coletou-se 7 µL da solução de AH-NTCPM que, em seguida, foi gotejado sobre uma grade de carbono revestida com ouro (300 mesh, Ted pella).

### 1.3. Preparação e caracterização das dispersões



**Fig. S1.** Curva de calibração proveniente da absorbância ( $\lambda= 535$  nm) de dispersões do AH-NTCPM em água deionizada em diferentes concentrações (de  $0,1 \text{ mg L}^{-1}$  a  $30,0 \text{ mg L}^{-1}$ ). A linha reta representa o ajuste linear dos dados.

#### 1.3.1. Informações quanto a composição dos meios de cultivo

##### 1.3.1.1. Meio de cultivo da *H. attenuata*

A água reconstituída utilizada para cultivar a *H. attenuata* foi preparada conforme descrito por TROTTIER *et al.* (1997), adicionando-se os constituintes da Tabela S2. Este meio apresenta pH 7 e condutividade  $345 \mu\text{S cm}^{-1}$ .

**Tabela S2.** Composição do meio de cultivo da *Hydra attenuata*.

Constituinte	Concentração (mmol L <sup>-1</sup> )
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,95
EDTA	0,013
TES (tampão)	0,47

### 1.3.1.2. Meio de cultivo da *D. magna*

O meio utilizado para cultivar a *Daphnia magna* foi preparado conforme descrito por HOSOKAWA *et al.* (1991) e enriquecido com nutrientes ELENDET e BIAS (1990). Esta possui pH 7 e condutividade de 560  $\mu\text{S cm}^{-1}$ , sendo que seus constituintes são apresentados na Tabela S3.

**Tabela S3.** Composição do meio de cultivo da *Daphnia magna*.

Constituinte	Concentração (mmol L <sup>-1</sup> )
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1,13
KCl	0,04
(H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0,04
MnCl <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	0,002
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,003
SrCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,0005
KBr	0,0001
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,000004
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,00009
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,00009
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,00004
KI	0,000001
Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub>	0,009

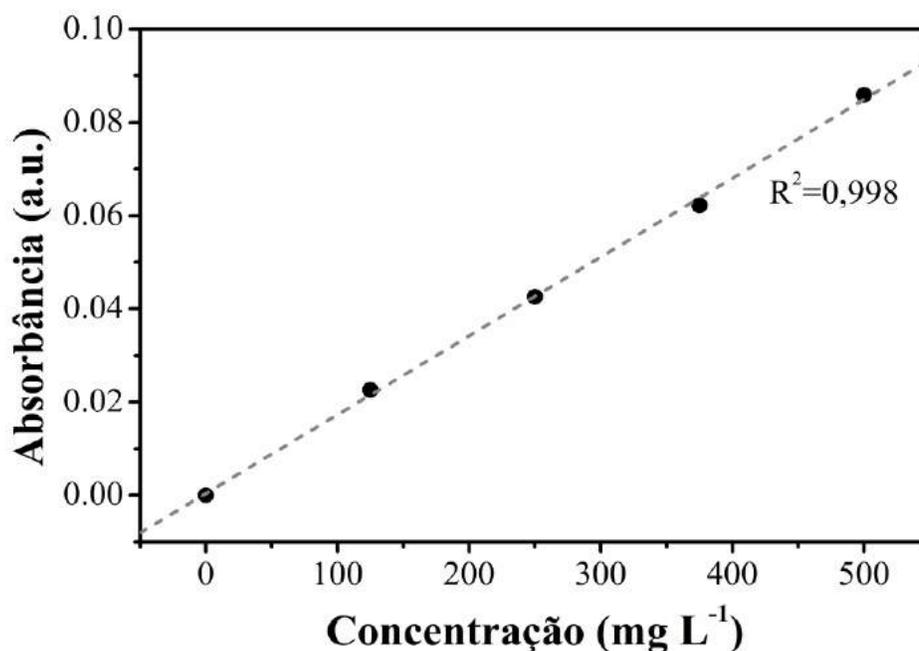
### 1.3.1.3. Meio de cultivo do *D. rerio*

O meio do zebrafish foi preparado de acordo com a metodologia proposta por WESTERFIELD (2007). Este possui pH 7 e condutividade de  $3000 \mu\text{S cm}^{-1}$ , sendo constituído pelas substâncias descritas na Tabela S4.

**Tabela S4.** Composição do meio do *Danio rerio*.

Constituinte	Concentração ( $\text{mol L}^{-1}$ )
MgSO <sub>4</sub>	2,0
NaHCO <sub>3</sub>	4,0
KCl	0,5
CaCl <sub>2</sub>	1,27
NaCl	0,07
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	47,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,04

### 1.4. Aplicação do AH-NTCPM para a adsorção de íons metálicos



**Fig. S2.** Curva de calibração referente ao teste de adsorção de Cu(II),  $\lambda = 605 \text{ nm}$ .

## 1.5. Avaliação da ecotoxicidade aquática

### 1.5.1. Ensaio com *Hydra attenuata*

										
Normal	Increasing Degree of Toxicity						Osmoregulation loss		Terminal States	
Extended tentacles and body, reactive.	Partially contracted slow reactions.	Clubbed tentacles. Body slightly contracted.	Shortened tentacles.	Tentacles and body shortened	Totally contracted tentacles visible.	Totally contracted no visible tentacles.	Expanded, tentacles visible.	Expanded, no visible tentacles.	Dead but intact.	Disintegrated
Score 10	Score 9	Score 8	Score 7	Score 6	Score 5	Score 4	Score 3	Score 2	Score 1	Score 0

**Fig. S3.** Metodologia para classificação das alterações morfológicas no teste de toxicidade com *Hydra attenuata*. Fonte: WILBY (1988).

## 2. Seção de Resultados e discussão

### 2.1. Caracterização dos materiais

#### Tabela S5.

Análise da composição elementar superficial das amostras obtida por Espectroscopia XPS.

NTCPM	Composição elementar (% m/m)			
	C	O	Si	Al
r-NTCPM	99,4	0,6	-	-
m-NTCPM	95,5	4,3	-	0,2
o-NTCPM	92,3	7,7	-	-
AH-NTCPM	74,2	20,2	3,1	2,5

## 3. Referências Bibliográficas

ELENDT, B.-P.; BIAS, W.-R. 1990. Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Research*, 24:1157–1167.

HOSOKAWA, M.; ENDO, G.; KURODA, K.; HORIGUCHI, S. 1991. Influence of sulfate, Ca, and Mg on the acute toxicity of potassium dichromate to *Daphnia*

*similis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 46(3): 461–465.

TROTTIER, S.; BLAISE, C.; KUSUI, T.; JOHNSON, E.M. 1997. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate-based *Hydra attenuata* assay. *Environmental Toxicology and Water Quality*, 12: 265–271.

ZDROJEK, M.; GEBICKI, W.; JASTRZEBSKI, C.; MELIN, T.; HUCZKO, A. 2004. Studies of Multiwall Carbon Nanotubes Using Raman Spectroscopy and Atomic Force Microscopy. *Solid State Phenomena*, 99-100: 265–268.

WILBY, O.K. 1988. The hydra regeneration assay. In: Pachura-Bouchet, S., Blaise, C., Vasseur, P. (Eds), *Proceedings of Workshop Organized by Association Francaise de Teratologie*, Royaumont, France, June 3, 1988, pp. 108-124.