

# Pequenas estruturas, grandes responsabilidades

## Pesquisa inovadora desenvolvida no IQ purifica, caracteriza e investiga a interação dos nanotubos de carbono com diferentes biosistemas

MANUEL ALVES FILHO  
manuel@retoria.unicamp.br

**P**esquisa conduzida no Laboratório de Química do Estado Sólido (LQES) do Instituto de Química (IQ) da Unicamp em parceria com outras instituições propõe uma nova abordagem para as investigações sobre os nanotubos de carbono, um dos mais importantes materiais gerados pela nanotecnologia. Desenvolvido para a tese de doutoramento do biólogo Diego Stéfani, sob orientação do professor Oswaldo Luiz Alves, o trabalho aborda questões fundamentais como a purificação e a caracterização das minúsculas estruturas, bem como a interação entre elas e os diferentes níveis de organização dos biosistemas. Duas consequências do estudo foram o depósito de uma patente internacional relacionada ao desenvolvimento de um processo de tratamento de efluentes contendo resíduos gerados na purificação dos nanotubos e a obtenção do prêmio de melhor trabalho científico no Congresso Brasileiro de Toxicologia, realizado em 2009.

De acordo com o professor Alves, que responde pela coordenação científica do LQES, a tese de Stéfani sintetiza uma preocupação dos integrantes do laboratório, que desde o final da década de 90 estão envolvidos com pesquisas na área da nanotecnologia. "Normalmente, existe uma reflexão científica em torno dos resultados das investigações, que sem dúvida é necessária. Aqui, porém, nós estamos indo para além do laboratório. As implicações da nanotecnologia podem ser de tal monta, que não se pode simplesmente obter o resultado, fazer a publicação e considerar que se chegou ao fim da linha. Temos que enfrentar outros desdobramentos com responsabilidade. Precisamos saber quais os impactos para o ambiente e a sociedade daquilo que estamos fazendo", defende.

O docente lembra que essa "segunda leitura" da atividade científica foi exercitada por ocasião da emergência dos estudos envolvendo a energia nuclear. Os componentes de risco presentes nesse tipo de pesquisa exigiam dos cientistas um compromisso com as implicações dos trabalhos realizados em laboratório. "Isso foi feito por algum tempo, mas depois nós passamos por um longo período sem essa segunda leitura. Agora, a nanotecnologia nos traz de volta à mesma questão, visto que se trata de uma ciência muito recente. A nanotecnologia é uma área de convergência. Não se trata de uma disciplina, mas de uma plataforma de conhecimento que provavelmente terá muitas implicações, inclusive para as ciências humanas e para o comportamento", prevê o docente do IQ.

Atualmente, prossegue ele, os cientistas já são capazes de integrar um sistema eletrônico a células humanas. Por hipótese, propõe o professor Alves, imagine-se que um dispositivo dessa ordem seja implantado numa pessoa para devolver-lhe a visão perdida em um acidente. Muito provavelmente, esse indivíduo passará a enxergar melhor do que todos os que têm olhos convencionais, o que lhe conferirá uma vantagem. "Assim, ainda por hipótese, e se alguém quiser substituir o próprio olho para também ter direito a uma visão melhorada? Como é que vamos tratar essa questão? Ou seja, o trabalho do cientista tem componentes de diversas ordens, como o científico, o ético, o filosófico e o moral. Todas essas dimensões têm que ser cuidadosamente analisadas, e é isso o que procuramos fazer no LQES. Nosso trabalho começa na bancada, mas vai além dela. Nesse sentido, a tese defendida pelo Diego Stéfani é emblemática", considera.

### O trabalho

A pesquisa conduzida pelo pós-graduando foge do convencional, não somente pelas questões elencadas pelo professor Alves, mas também pelos desafios científicos que ela procurou superar. Com frequência, um trabalho de doutorado estabelece um problema de elevada complexidade que será equacionado ao longo do estudo. A tese em questão, porém, equivale a três investigações distintas, mas complementares. A primeira delas partiu da constatação de que os nanotubos de carbono presentes no mercado apresentam uma heterogeneidade muito grande. Numa mesma amostra, conforme Stéfani, é possível encontrar estruturas com forma, diâmetro e impurezas diferentes. "Isso começou a nos incomodar muito, visto que essas estruturas nos oferecem uma boa oportunidade de fazer ciência nova, inclusive com múltiplas possibilidades de aplicação. Ocorre, porém, que essa heterogeneidade dificulta muito o desenvolvimento das pesquisas. Ela atrapalha, por exemplo, a reprodutibilidade e a comparação de resultados, pois um grupo de pesquisa não consegue utilizar o mesmo material de outro. Foi aí que surgiu a ideia de purificarmos e caracterizarmos os nanotubos de carbono, como forma de propor um padrão para eles", detalha o professor Alves.

Tomada a decisão, o LQES encomendou um quilo de nanotubos de carbono de uma fábrica coreana. A quantidade, segundo o docente do IQ, deve ser suficiente para muitos anos de trabalho em laboratório. O passo seguinte foi testar métodos para alcançar o mais alto grau de purificação das minúsculas partículas. "Eu utilizei um sistema de refluxo convencional, que consegue alcançar altas temperaturas mantendo o volume constante durante a reação. Em seguida, empreguei ácido nítrico e ácido clorídrico. A combinação do processo com o uso dos dois ácidos nos proporcionou nanotubos com alto teor de pureza, em torno de 99%", detalha o autor da tese. Na sequência, Stéfani usou hidróxido de sódio para remover os resíduos gerados pelo processo de purificação, que ficam presos à superfície das nanoestruturas. Ele promoveu, por assim dizer, a purificação da purificação.

Encerrada essa etapa, o doutorando fez uma rigorosa caracterização físico-química das nanopartículas, para entender como se apresentava a amostra purificada como um todo. Tal procedimento se fez necessário, de acordo com Stéfani, porque a fase seguinte seria investigar como os



O professor Oswaldo Luiz Alves, orientador da pesquisa: "Estamos indo para além do laboratório"



Diego Stéfani, autor da tese: principal mensagem do estudo é a importância da multidisciplinaridade



A professora Gisela Umbuzeiro: os cuidados tomados durante os testes evitaram distorções

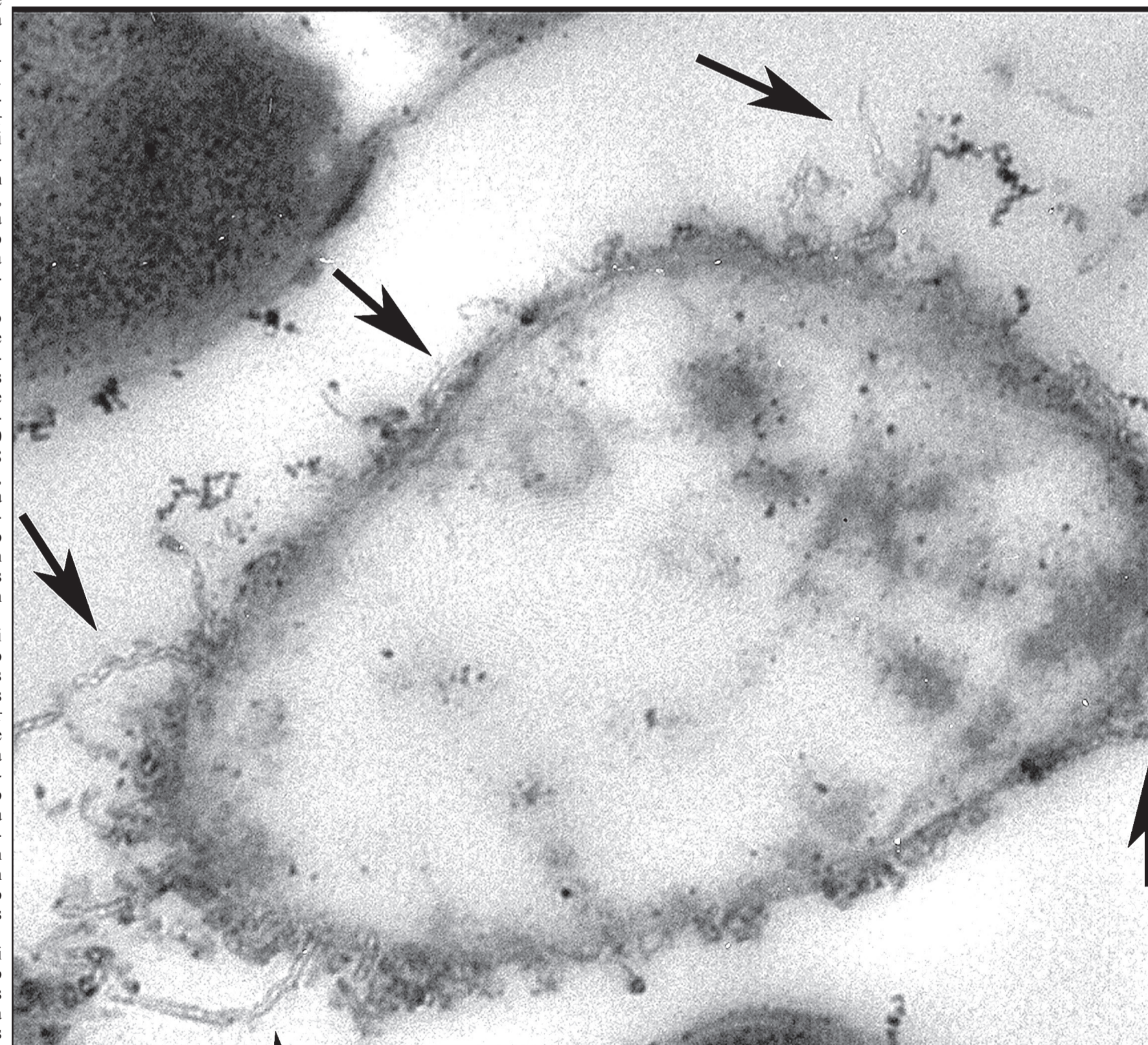
nanotubos de carbono interagiriam com os diferentes níveis de organização dos biosistemas. "Em razão de todo esse trabalho, nós do LQES não vamos mais usar o termo purificação. Penso que estamos evoluindo para algo além desse estágio, que é o estabelecimento da qualidade dos nanotubos. É essa qualidade que deverá determinar a aplicação do nanomaterial", defende o professor Alves.

Superado o primeiro desafio, o da purificação e caracterização, o autor da tese partiu para outro tão ou mais intrincado. Stéfani quis analisar como os minúsculos materiais interagem com diferentes biosistemas. O objetivo era observar que impactos esse produto da nanotecnologia, que constitui um agente químico, poderia causar ao nível ecológico, imunológico e celular-molecular. Nesse trabalho, ele contou com a colaboração da professora Gisela de Aragão Umbuzeiro, da Faculdade de Tecnologia (FT) da Unicamp, instalada na cidade de Limeira (SP). Para poder esclarecer a questão, o pesquisador se valeu primeiramente de um paradigma da Ecotoxicologia, disciplina que utiliza bioindicadores representativos de diferentes ecossistemas.

No caso, Stéfani lançou mão de um microcrustáceo conhecido popularmente como pulga d'água, cujo nome científico é *Daphnia similis*, tido como um importante representante do ecossistema aquático. "O que nós fizemos foi analisar qual o possível efeito tóxico dos nanotubos de carbono para esse organismo. Testamos diferentes concentrações dessas partículas na água mineral, até o limite de 100 miligramas por litro, por um curto período de exposição [48 horas]. O que nós avaliamos, em termos de porcentagem, foi a mobilidade dos microcrustáceos, visto que eles têm a característica de nadar na coluna d'água. Ou seja, se os nanotubos interferissem nessa mobilidade, isso seria considerado um efeito adverso. Assim, colocamos quinze organismos em cada concentração e depois contamos qual a porcentagem dos que estavam imóveis, para ver se os nanomateriais causavam algum tipo de problema", esmiúça Stéfani.

Um obstáculo enfrentado por ele durante os ensaios foi que, decorrido determinado tempo, os nanotubos de carbono se aglomeravam no fundo do recipiente onde estavam os microcrustáceos. "Como a biodisponibilidade das partículas era diferente em função do tempo, não era possível comparar os resultados. Assim, partimos em busca de moléculas que pudessem promover a dispersão estável dos nanotubos na água, mas que não interferissem no comportamento da *Daphnia similis*. Foi quando tivemos contato com o trabalho da professora Lucia Durrant, da Faculdade de Engenharia de Alimentos [FEA] da Unicamp. Ela tinha moléculas interessantes, denominadas biosurfactantes, que se mostraram apropriadas para promover a suspensão dos nanotubos por um tempo mais prolongado, sem exercer qualquer efeito sobre o micro-organismo. Isso finalmente permitiu que fizéssemos os testes", relata o autor da tese.

Conforme Stéfani, nas condições consideradas, foi constatada a ausência de toxicidade aguda para o organismo aquático até a concentração de 30 miligramas por litro, e os ensaios apresentaram boa reprodutibilidade. A professora Gisela observa que os cuidados tomados durante os testes foram importantes, porque evitaram distorções verificadas em experiências assemelhadas. "Há algum tempo, um grupo de pesquisa publicou um trabalho no qual constatou níveis de toxicidade elevados dos nanotubos de carbono. Ocorre, no entanto, que o problema não era das partículas, mas sim dos solventes utilizados para manter a suspensão destas.



A bactéria *Salmonella typhimurium* TA98 vista através de microscopia eletrônica de transmissão, após exposição aos nanotubos. As setas indicam as minúsculas estruturas interagindo com a superfície externa da parede celular do micro-organismo

Isso causou certo tumulto no meio científico", conta. Graças ao estudo feito no LQES, foi determinado um protocolo para avaliar a toxicidade aguda de nanotubos de carbono. A importância do trabalho foi reconhecida pelo Congresso Brasileiro de Toxicologia, que o elegeu como o melhor da reunião de 2009.

Stéfani assinala que, em Toxicologia, o recomendável é que as checagens sejam feitas em diversos organismos vivos. Assim, depois de verificar como se dava a interação dos nanotubos de carbono com um microcrustáceo, o autor da tese decidiu investigar se as partículas poderiam causar alguma alteração no DNA. Para isso, ele utilizou diferentes linhagens da bactéria *Salmonella typhimurium*, com distintas capacidades metabólicas. "Foi possível constatar a ausência de efeito mutagênico sobre os micro-organismos, mesmo diante de altas concentrações de nanotubos. Entretanto, nós também verificamos que as nanopartículas não têm capacidade de penetrar na *Salmonella*. Elas permanecem na superfície. Para que ocorra mutação, o material precisaria penetrar no organismo, atingir o DNA e então causar a mutação. Em outras palavras, nós demonstramos que um teste amplamente difundido na ciência toxicológica não foi apropriado no caso dos nanotubos", afirma o biólogo.

O pesquisador também investigou as implicações dos nanotubos de carbono para o sistema imunológico. O entendimento desse aspecto, destaca Stéfani, é relevante tanto para os pesquisadores quanto para os trabalhadores das fábricas desses nanomateriais, visto que os dois grupos estão em contato direto com tais partículas. "Também serve para nos fornecer elementos para o uso dos nanotubos pela área médica, como no desenvolvimento de próteses ou no transporte de antígenos para as vacinas, para ficar em dois exemplos", diz. Para concretizar essa etapa do estudo, o LQES estabeleceu uma parceria com o Instituto Butantã, o que permitiu os testes *in vivo* com duas linhagens de camundongos geneticamente selecionados. Estes animais, explica Stéfani, são estudados pela instituição há cerca de 30 anos, e representam modelos valiosos para área de imunogenética, sendo uma linhagem mais sensível do que a outra em termos de resposta imunológica. Em outros termos, o que o autor da tese queria examinar é se os nanotubos poderiam provocar casos de imunostimulação ou imunossupressão nos roedores.

### Antígeno

Para responder a essa pergunta, o pesquisador tomou uma precaução. Como já é sabido que os nanotubos de carbono por si só não induzem uma resposta imunológica específica do tipo antígeno-anticorpo, ele administrou nos camundongos, via subcutânea, as nanopartículas e também uma proteína, denominada BSA, como antígeno modelo. Como já mencionado, Stéfani usou duas linhagens diferentes de animais, uma que apresenta alta resposta imunológica e outra que oferece baixa resposta, sendo que o acompanhamento foi feito em períodos de tempos variáveis, para registrar as respostas primárias e secundárias na produção de anticorpos contra o antígeno BSA. "Com esse procedimento, seria possível apurar se os nanotubos estariam ou não modulando a resposta imunológica", esclarece.

Outro cuidado tomado pelo autor da tese foi administrar os nanotubos em conjunto com a proteína e, depois, em separado. "Na resposta primária, as partículas tiveram efeito imunostimulatório, equivalente ao do hidróxido de alumínio, substância que tem reconhecida essa capacidade. O grupo

de animais que recebeu separadamente os nanomateriais e a proteína não apresentou qualquer resposta. Ou seja, é muito importante a forma como o antígeno é apresentado. O mesmo comportamento foi observado na resposta secundária, mas claro que nesse caso surgiu a questão da reincidência e do efeito memória das aplicações", complementa Stéfani. Estes experimentos com camundongos foram realizados no Laboratório de Imunoquímica do Instituto Butantã, em parceria com o professor Oswaldo Augusto Sant'Anna.

No entender do professor Alves, os resultados dos testes foram significativos porque podem contribuir para os estudos relacionados aos aspectos genéticos da resposta imune frente à exposição aos nanotubos. "Compreender o polimorfismo das populações é fundamental. No futuro, os médicos não vão prescrever medicamentos ou terapias sem conhecer a genética dos pacientes. Quando avançarmos nesse entendimento, as possibilidades de praticarmos uma medicina personalizada serão imensas", emenda a professora Gisela. Como seqüência da sua tese, Stéfani também averiguou a interação dos nanotubos de carbono com o sistema celular, o nível mais basal dos biosistemas. A meta era verificar como os materiais interagem com sistemas vivos que apresentam as mesmas dimensões deles, o que abre chances de aplicação em áreas como a medicina e agricultura, entre outras.

Dessa forma, o pesquisador testou, *in vitro*, a capacidade de internalização celular e o efeito citotóxico das nanopartículas em astrócitos, células que cumprem, entre outras, duas importantes funções: carregam os nutrientes da corrente sanguínea para os neurônios e dão proteção e sustentação física a estes. "Através dos ensaios, pudemos demonstrar que os nanotubos podem ser internalizados. Com técnicas específicas, foi possível ver nanotubos aglomerados no citoplasma bem como individualizados dentro das células. Resta compreender melhor, agora, como as partículas entram nas células. De posse desse dado, um dia talvez possamos usar enxertos contendo nanotubos em sua composição em caso de perda de massa encefálica após acidentes, bem como sistemas para transporte de medicamentos em neuroterapias", projeta o autor da tese, com a anuência do seu orientador.

Retornando ao assunto da purificação dos nanomateriais, Stéfani desenvolveu, ainda, um método para o tratamento dos efluentes gerados pelo processo. A partir das informações geradas pelo estudo, ele e o professor Alves perceberam que os resíduos carbonáceos produzidos ao longo do tratamento químico poderiam ser removidos quase totalmente da água de processo (índice de 99%) com a aplicação da hidrotalca, tipo de argila que pode ser natural ou sintética, cujas propriedades já eram de amplo conhecimento dos integrantes do LQES. O processo de remediação foi objeto do depósito de uma patente internacional, por meio da Agência de Inovação Inova Unicamp. Ao comentar sobre a amplitude e importância dos resultados gerados pelo seu trabalho de doutorado, Stéfani afirma que a principal mensagem do estudo é a importância de se promover uma abordagem multidisciplinar de temas fundamentais ao desenvolvimento do conhecimento, em torno dos nanotubos de carbono, de maneira integrada e proativa.

Na mesma linha, o professor Alves pondera que a criatividade e as exigências do mundo contemporâneo impulsionam cada vez mais a ciência a produzir novos materiais, para as mais diversas aplicações. "Por outro lado, temos que nos preocupar com a segurança em torno desses mesmos materiais. Precisamos investigar exaustivamente os graus de toxicidade deles, para verificar seus possíveis impactos, como prega a OCDE [Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Econômico]. Na OCDE há o seguinte princípio 'no data, no marketing'" - ["sem informação, sem mercado", em tradução livre], pontua o docente do IQ. Ainda segundo ele, os resultados da pesquisa de Stéfani, que contou com bolsa de estudo concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), somente foram possíveis porque foram desenvolvidos na Unicamp, que conta com pessoal e ferramental de alto nível. "Interessante é que tudo foi feito com pouco dinheiro oficial. Fizemos o que fizemos graças ao envolvimento e crença de nossos pesquisadores e colaboradores", dentre eles, os professores Israel Felzenszwalb (IBRAG-UERJ) e Alexandre Oliveira (IB-Unicamp).

### Publicações

Stéfani, D.; Paula, A. J.; Vaz, B. G.; Silva, R. A.; Andrade, N. F.; Justo, G. Z.; Ferreira, C. V.; Filho, A. G.; Souza, Eberlin, M. N.; Alves, O. L. Structural and proactive safety aspects of oxidation debris from multilayered carbon nanotubes. *Journal of Hazardous Materials*, 391-446, 2011.  
Alves, O. L.; Stéfani, D.; Parizotto, N. V.; Souza Filho, A. G. Hydrothermal: a highly efficient eco-material for effluent treatment originated from carbon nanotubes chemical processing. *Journal of Physics: Conference Series*, 304, 2011.  
Umbuzeiro, G. A.; Colugi, V. R.; Homório, J. G.; Giro, R.; Moraes, D. A.; Lage, A. S. G.; Mazzei, J. L.; Felzenszwalb, I.; Souza Filho, A. G.; Stéfani, D.; Alves, O. L. Understanding the interaction of multilayered carbon nanotubes with mutagenic organic pollutants using computational modeling and biological experiments. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 30, 437-446, 2011.  
Patente  
Stéfani, D.; Alves, O. L.; Souza Filho, A. G.; Parizotto, N. V. Processos de tratamento de efluentes contendo fragmentos de carbono carbonizados provenientes de nanotubos de carbono (Pedido Internacional de Patente, PCT/BR2010/00372), 2010.  
Resumos em Congressos  
Stéfani, D.; Faria, A. F.; Souza Filho, A. G.; Almeida, G.; Vaz, B. G.; Eberlin, M. N.; Durrant, L. R.; Umbuzeiro, G. A.; Alves, O. L. Biosurfactant from *Bacillus subtilis* microorganism as a stabilizing agent for carbon nanotubes ecotoxicity studies. In: *Nanotoxicology 2010*, Edinburgh, Escócia, 2010.  
Lage, A. S. G.; Stéfani, D.; Mazzei, J. L.; Alves, O. L.; Felzenszwalb, I. Absence of cytotoxicity and mutagenicity of acid-treated multilayered carbon nanotubes. *Nanotoxicology 2010*, Edinburgh, Escócia, 2010.  
Stéfani, D.; Carvalho, L. V.; Souza Filho, A. G.; Sant'Anna, O. A.; Alves, O. L. Carbon nanotubes enhanced antibody response in genetically selected mice. 11th International Conference on the Science and Application of Nanotubes - NT10. In: 3rd Carbon Nanotubes in biology, medicine and toxicology satellite symposium, Montreal, Canadá, 2010.  
Faria, A. F.; Stéfani, D.; Souza Filho, A. G.; Zanon, R. G.; Mendes Filho, J.; Oliveira, A. L. R.; Alves, O. L. Influence of cell-penetrating carbon nanotubes on siRNA transfection in primary astrocyte cultures. 11th International Conference on the Science and Application of Nanotubes - NT10. In: 3rd Carbon nanotubes in biology, medicine and toxicology satellite symposium, Montreal, Canadá, 2010.  
Stéfani, D.; Alves, O. L. Tratamento ácido de nanotubos de carbono (MvNT): análises termogravimétricas, avaliação do resíduo metálico e biodisponibilidade do fito *in vitro*. In: III Workshop da Rede Nacional de Pesquisa em Nanotubos de Carbono, Curitiba, 2008.