

Iolanda Helena de Oliveira

RISCOS OCUPACIONAIS E TOXICIDADE PULMONAR ASSOCIADA A NANOTUBOS DE CARBONO: UMA REVISÃO DE LITERATURA (*)

Iolanda Helena de Oliveira^(**), Fernando Rocha Villalon^(***),
Kleber José do Prado Campos^(****)

APRESENTAÇÃO

Nanotubos de carbono (*Carbon nanotubes* ou CNT) constituem as nanopartículas mais estudadas na atualidade. São encontrados em produtos eletrônicos, têxteis, cosméticos, farmacêuticos, agricultura, saneamento e muitos outros. Estudos demonstram que os CNT podem induzir estresse oxidativo, depósito de colágeno, resposta inflamatória persistente, granulomas e fibrose.

Devido ao aumento da produção de materiais como os CNT, torna-se necessária a determinação dos riscos ocupacionais envolvidos, dado o significativo contingente de trabalhadores expostos. Esta pesquisa objetiva estudar quais os riscos de toxicidade pulmonar existentes devido à exposição aos CNTs. Delineados como revisão de literatura, selecionaram-se artigos publicados entre 2004 e 2014 com descritores “nanotubos de carbono”, “nanotoxicologia” e “toxicidade pulmonar” e os respectivos correspondentes em inglês. Apesar de ainda não existirem evidências de danos em humanos, os dados disponíveis permitem inferir que a exposição descontrolada aos CNT pode causar danos graves e irreversíveis no trato respiratório dos trabalhadores.

INTRODUÇÃO

The Royal Society and The Royal Academy of Engineering (Sociedade Real e Academia Real de

Engenharia) (2004) definem nanociência como: “estudo do fenômeno e manipulação de materiais em escala atômica, molecular e macromolecular, cujas propriedades sejam muito diferentes daquelas encontradas em seus componentes de maior escala”. Os mesmos protocolos de tais instituições também definem nanotecnologia como “projeto, caracterização, produção e aplicação de estruturas, dispositivos e sistemas através do controle de forma e tamanho em escala nanométrica”. De acordo com a *National Nanotechnology Initiative* (NNI), órgão governamental norte-americano que envolve pesquisa e desenvolvimento no campo da nanotecnologia, esta pode ser caracterizada como a “ciência, engenharia e tecnologia conduzida em nanoescala, cujas dimensões estão entre 1 a 100 nanômetros”. Para o *National Institute for Occupational Safety and Health* (NIOSH, 2013) tal ciência se definiria como a “manipulação de objetos em escala atômica para a criação de materiais, dispositivos ou sistemas com novas propriedades e/ou funções”. O material de estudo da nanotecnologia se dá pela existência de nano-objetos que, de acordo com a norma ISO/TC 27687, são objetos que possuem de uma a três dimensões externas em nanoescala (10⁻⁹), além de poderem apresentar várias configurações alotrópicas, i.e., mesma substância química com diferentes apresentações estruturais (Tabela 1).

(*) Extraído da monografia apresentada ao 35º Curso de Especialização de Medicina do Trabalho no Instituto Oscar Freire da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, sob orientação do profº Kleber José do Prado Campos.

(**) Pós graduanda em Medicina do Trabalho (FCM/USP)

(***) Pós graduando em Medicina do Trabalho (FCM/USP)

(****) Pós graduado em Medicina do Trabalho (FCM/USP) e Higiene Ocupacional (Escola Politécnica/USP)

**Tabela 1 - Principais termos relacionados aos nano-objetos**

<i>Nanoparticle</i>	Nano-objetos que possuem todas as dimensões em nanoescala
<i>Nanofiber</i>	Nano-objeto que tem duas dimensões externas em nanoescala e uma terceira significativamente maior
<i>Nanoplate</i>	Nano-objeto com uma dimensão em nanoescala e outras duas significativamente maiores
<i>Nanotube</i>	Nanofibra oca
<i>Nanorode</i>	Nanofibra sólida
<i>Nanowire</i>	Nanofibra com propriedades condutoras ou semicondutoras
<i>Quantum dot</i>	Nanocristal semicondutor cujos elétrons são confinados em todas as três dimensões espaciais
<i>Nano-onion</i>	Nanopartícula esférica com múltiplas camadas concêntricas
<i>Nanocone</i>	Nano-objeto em forma de cone com duas camadas em nanoescala
<i>Nanoribbon</i>	Nanofibra cuja menor dimensão é muito menor do que as outras

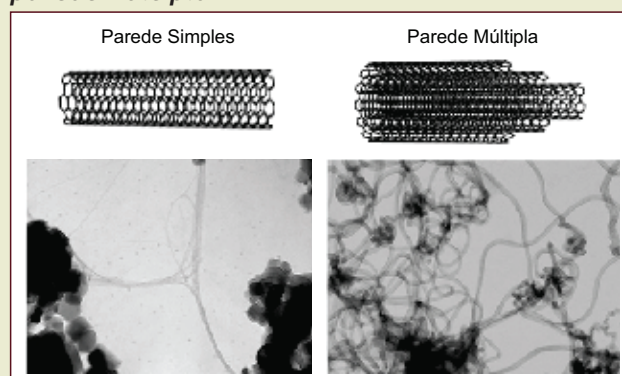
Fonte: ISO/TS 27687.

Nanotubos de carbono são folhas de grafeno dispostas de forma hexagonal, em nanoescala, formando cilindros perfeitos (Shvedova et al., 2009). Suas características estruturais, térmicas e eletrônicas são definidas a partir do diâmetro, comprimento, quiralidade (termo utilizado para definir a angulação terminal dessas nanoestruturas decorrentes de sua estrutura cilíndrica), grau de pureza e funcionalização dessas nanopartículas.

Diversos autores os descrevem como dotados de uma força tênsil 10 vezes superior à do aço e dureza 1,2 vezes maior do que a do diamante (Donaldson et al., 2006; Ferreira et al., 2013). Os nanotubos de carbono são classicamente categorizados em dois tipos: nanotubos de carbono de camada simples (SWCNT) e nanotubos de carbono de múltiplas camadas (MWCNT). Os nanotubos de carbono de camada simples são formados por uma camada de grafeno, em forma cilíndrica, com diâmetros entre 0,4 a 2nm (Ma-Hock et al., 2009). Já os nanotubos de carbono

de múltiplas camadas são constituídos por várias camadas de grafeno, disposta de forma cilíndrica, com diâmetro variável entre 2 a 100nm, na dependência do número de camadas (Ma-Hock et al., 2009). A Figura 1 mostra um desenho esquemático de cada tipo básico de nanotubo de carbono e correspondente visualização por meio de método analítico por transmissão de elétrons.

Figura 1 - Tipos básicos de nanotubos de carbono: Nanotubos de parede simples e nanotubos de parede múltipla



Fonte: extraído de Donaldson et al. (2006).



Outras formas de categorizar tais partículas podem ser propostas, levando em conta a funcionalização, o grau de pureza, a capacidade de aglomeração e a origem dos nanotubos de carbono. Com relação à origem, podemos classificar os nanotubos de carbono em naturais (originários de processos de combustão de diesel, incêndios florestais e atividades vulcânicas) ou projetados e produzidos artificialmente pelo homem. Nanotubos de carbono podem se encontrar funcionalizados ou não. A funcionalização consiste em utilizar técnicas de inserção de moléculas de superfície, em ligações covalentes ou não covalentes, com o intuito de modificar as propriedades originais dos nanotubos, pela interação com átomos, moléculas ou grupos funcionais (Donaldson et al., 2006). O grau de pureza dos CNT é medido pela concentração de resíduos metálicos ou materiais de suporte catalítico incorporados à sua estrutura. Nesse contexto, poderíamos categorizar os nanotubos em puros (com baixo índice de resíduos), impuros (com índice de resíduos elevados) e purificados (submetidos a algum processo de remoção de resíduos). Os principais metais contaminantes são o Cobalto (Co), Ferro (Fe), Níquel (Ni) e Molibdênio (Mo), todos associados a efeitos tóxicos conhecidos (Donaldson et al., 2006). Considerando a capacidade de aglomeração dos nanotubos de carbono, é possível dividi-los em estruturas com tendência à aglomeração ou à dispersibilidade. Essa diferença tem importância médica, pois os aglomerados de CNT tendem a se depositar em bronquíolos terminais e alvéolos proximais, induzindo a formação de granulomas. Já os CNT mais dispersíveis tendem a se depositar em alvéolos distais, causando fibrose intersticial (Wang et al., 2010; NIOSH, 2013; Warheit et al., 2004). A indústria da nanotecnologia tem se expandido de forma significativa nas últimas duas décadas. Nanopartículas sintéticas já estão presentes em diversos produtos de uso cotidiano como protetores solares, tecidos, artigos esportivos, cosméticos, automóveis e medicamentos. O uso militar da nanotecnologia já é realidade desde 2001, sendo considerado uma vantagem significativa na capacidade de defesa e no tocante a ameaças externas (detecção precoce de ameaças químicas e

biológicas e aumento da capacidade de vigilância).

Além do citado acima, outros equipamentos militares incluem vestuário, artilharia e comunicação (*The Royal Society and The Royal Academy of Engineering*, 2004). Estimam-se investimentos próximos a um trilhão de dólares já para o ano de 2015 nos Estados Unidos (Ferreira et al., 2013), perfazendo cerca de 170% de crescimento em relação ao ano de 2006 (Donaldson et al., 2006). A multifuncionalidade dos nanotubos de carbono não se aplica somente às suas propriedades mecânicas, mas também a suas características ópticas e eletromagnéticas, por exemplo. Suas propriedades de condução elétrica os elegem como matéria-prima de embalagens antiestáticas (*Royal Society*, 2004; Mercer et al., 2011). Trabalhando características como a porosidade e aspereza de nanotubos de carbono e utilizando-os como “ingredientes” de compósitos em nanoescala, pode-se chegar a tecidos com qualidades como a impermeabilidade, respirabilidade, resistência a manchas, proteção térmica, etc. A curto prazo, já se pensa na utilização dos nanotubos de carbono em telas de baixa voltagem para televisores, monitores de computador e dispositivos portáteis com potencial aumento na durabilidade destes. Também há uma demanda crescente por equipamentos eletrônicos portáteis com baterias mais leves e duráveis.

Compósitos com nanotubos de carbono associados a níquel ou cádmio poderiam suprir essa exigência do mercado, produzindo celulares ou *notebooks* menores, mais leves e resistentes. Evidencia-se, portanto, um contingente cada vez maior de trabalhadores que trabalham direta e indiretamente com essas nanopartículas. Tal fato traz à tona a necessidade de identificar que riscos ocupacionais podem ser associados à exposição dessas substâncias e como podem ser mitigados.

SÍNTESE DOS NANOTUBOS DE CARBONO

A literatura descreve três métodos de produção dos nanotubos de carbono: descarga de arco elétrico, deposição de vapor químico e ablação a laser. Todos os métodos possuem em comum o fato de utilizar



energia na fonte de carbono de forma a produzir fragmentos capazes de gerar os CNTs (Shvedova et al., 2009; Kayat et al., 2011; Donaldson et al., 2006; Chiu-Wing et al., 2004). A descarga de arco elétrico tende a produzir nanotubos de qualidade superior em maior volume. Utilizam-se eletrodos grafitados em uma atmosfera de Hélio na presença de Cobalto ou Níquel (Shvedova et al., 2009). Eletrodos “puros” compostos somente por átomos de carbono são utilizados na produção de nanotubos de parede múltiplas; já os eletrodos com dopagem metálica (Co ou Ni) são usados na formação dos nanotubos de paredes simples (Donaldson et al., 2006). O método de deposição de vapor químico utiliza como fonte de energia o calor de um forno a cerca de 900°C. A formação dos nanotubos se dá por decomposição de um gás, contendo monóxido de carbono, acetileno ou metano e nanopartículas metalizadas (ferro, cobalto, lítio ou níquel) em atmosfera inerte (Shvedova et al., 2009; Donaldson et al., 2006). O terceiro método - ablação por laser - utiliza um laser ou uma luz de alta intensidade como fonte de energia em atmosfera inerte, a cerca de 1.200°C (Donaldson et al., 2006).

FORMAS DE EXPOSIÇÃO OCUPACIONAL AOS CNTS

A exposição aos nanotubos de carbono pode ocorrer

em equipamentos enclausurados ou reatores operados sob pressão positiva. Portanto, toda e qualquer atividade relacionada à manipulação direta dessas nanopartículas pode incorrer em risco ocupacional aumentado, caso não sejam tomadas as devidas precauções (NIOSH, 2013). As atividades de maior risco envolvem os processos de operação, manutenção e limpeza de reatores e máquinas, além da mistura, secagem, embalagem, transferência manual e tratamento térmico dessas nanopartículas. Todas essas tarefas acarretam exposição do trabalhador a um alto risco ocupacional se o ambiente de trabalho não for projetado de forma segura e adequada ou se não for efetuada a manutenção periódica do equipamento utilizado (NIOSH, 2013). As atividades relacionadas à exposição ocupacional devem ser listadas e priorizadas de acordo com o risco, levando em conta a pulverulência (tendência das nanopartículas de permanecerem dispersas no ar), os processos utilizados, a quantidade de material manipulado, a duração e frequência da exposição (NIOSH, 2012). Para cada tipo de exposição, será implementada medida de segurança compatível com o grau de exposição, de forma a minimizar os respectivos riscos (Tabela 2).

Tabela 2 - Descrição das fontes de exposição potencial em relação à forma de apresentação e à atividade laboral

Fonte de exposição potencial	Forma de apresentação	Atividades
Pulverização mecânica, produção de ligas metálicas, litografia, abrasão mecânica, jateamento, moagem, aquecimento e resfriamento	Matriz polimérica (nanoestruturas fixas ou coligadas)	Moagem, trituração e jateamento. Aquecimento/resfriamento podem danificar a matriz, permitindo a liberação de nanomateriais
Aerosolização de nanopartículas durante sonicação ou pulverização, limpeza e manutenção, extravasamento ou recuperação de produtos (pós secos)	Líquidos de suspensão ou dispersão	Métodos de síntese (precipitação e deposição química, eletrodeposição, cristalização, ablação a laser, derramamento e mistura de líquidos contendo nanomateriais, sonicação, pulverização, secagem
Qualquer atividade que exija manipulação de pós secos ou recuperação de produtos	Nanomateriais em forma de pós (dispersíveis e aglomerados)	Coleta de material (após sua síntese), transferência, pesagem e mistura de pós secos
Vazamento direto (reator), recuperação de produtos, processamento e embalagem de pós secos, limpeza e manutenção de equipamentos	Nanoaerossóis e síntese (fase gasosa)	Condensação e deposição de vapor, técnicas de solidificação rápidas (aerossóis), aglomeração (fase gasosa), condensação de gás inerte (pirólise ou evaporação) ou pulverização

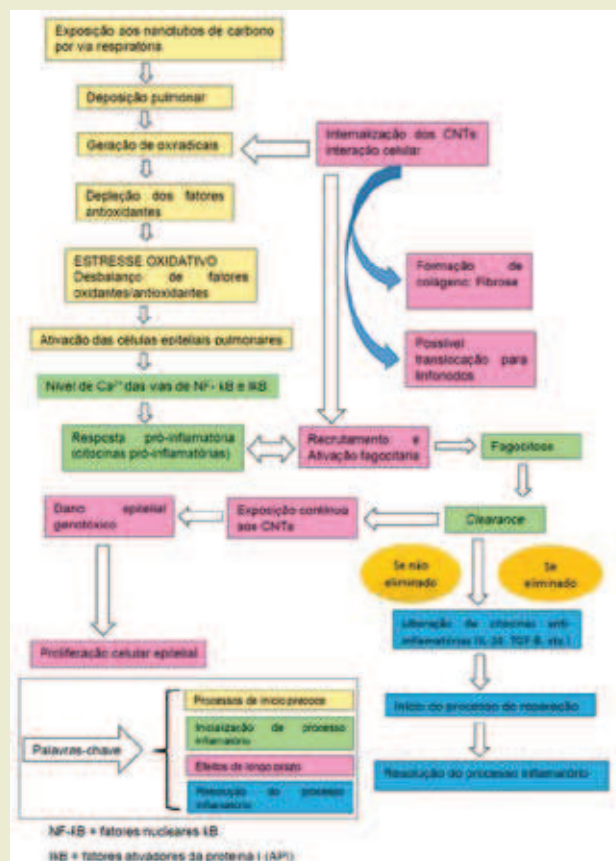
Fonte: adaptado de NIOSH, 2012



TOXICIDADE PULMONAR

As rotas de exposição aos nanotubos de carbono são compostas pelas vias cutânea, gastrointestinal e respiratória, com maior risco para a última (Wang et al., 2010; Clift et al., 2014). A deposição dessas nanopartículas no trato respiratório é proporcional ao tamanho das partículas, respeitando os movimentos Brownianos (Ferreira et al., 2013), nos quais partículas menores tendem a ser mais reativas do que as maiores. Outros fatores podem ser implicados na gênese dos danos causados por essas nanopartículas, como forma, superfície de contato, biopersistência, método de síntese utilizado e presença de resíduos (metais de transição/materiais de suporte), capacidade de ligação a grupos funcionais, grau de agregação e a capacidade de gerar Espécies Reativas de Oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) (Kayat et al., 2011; Ferreira et al., 2013). Há relato de similaridade na patogenicidade no trato respiratório entre as técnicas utilizadas nos estudos atuais (inalação, aspiração ou instilação traqueal) em relação ao dano pulmonar (aspectos inflamatórios, formação de granulomas e alterações fibrogênicas de início precoce) (Shvedova et al., 2009; Kayat et al., 2011; Chiu-Wing et al., 2004). À deposição dos nanotubos de carbono no tecido pulmonar segue-se uma cascata de eventos, iniciada pela ativação dos macrófagos alveolares, primeira linha de defesa local. A partir dessa captação, há a ativação de vários fatores de transcrição, levando a estresse oxidativo, liberação de citocinas pró-inflamatórias, recrutamento de leucócitos e ativação de linfócitos T (Kayat et al., 2011). A interação dos nanotubos de carbono, após sua internalização já desencadeia dois mecanismos simultâneos diversos, a formação de colágeno e a ativação e recrutamento de fagócitos. Os nanotubos são fagocitados e podem ser eliminados, por meio de reações que envolvem a liberação de citocinas anti-inflamatórias, com resolução do processo inflamatório ao fim do ciclo. Caso a exposição ao nanotubos seja continuada, após a fagocitose, essas nanopartículas não serão eliminadas e causam dano ao epitélio respiratório, com proliferação deste (Figura 2).

Figura 2 Mecanismos potenciais de lesão pulmonar associados à exposição por via inalatória aos CNTs



Fonte: Kayat et al., 2011.

Estudos atuais (*in vitro* e *in vivo*) demonstram que os nanotubos de carbono nas formas puras, impuras ou funcionalizadas podem induzir a reações de estresse oxidativo e depósito de colágeno, inflamação pulmonar e peribrônquica, resposta inflamatória persistente, formação de granulomas, fibrose intersticial progressiva. Recentemente foram descritos para os nanotubos de carbono de parede múltipla mecanismos patogênicos de lesão similares aos atribuídos ao asbesto (Shvedova et al., 2009; Ferreira et al., 2013). Os nanotubos de carbono parecem apresentar propriedades toxicológicas incomuns, como a capacidade de estimular o crescimento de células mesenquimais, formação de granuloma e fibrogênese. Estudos demonstraram maior índice de efeitos adversos com nanotubos de carbono do que com o quartzo, considerando a mesma massa (Donaldson et al.,



2006). Ainda não se sabe ao certo a carcinogenicidade dessas nanopartículas; porém, alguns estudos citam a ocorrência de mesotelioma a partir de uma resposta inflamatória persistente desencadeada por nanotubos de carbono de paredes múltiplas (Shvedova et al., 2009). A insuficiência de dados para delimitar o nível de exposição recomendado em humanos torna imprescindível a implementação de medidas adequadas de proteção ao ambiente de trabalho e aos trabalhadores, até que haja conhecimento técnico e domínio da toxicidade dessas nanopartículas.

METODOLOGIA

O desenho de estudo escolhido foi o de revisão da literatura. O levantamento de dados bibliográficos foi realizado por meio da pesquisa de artigos publicados entre os anos de 2004 e 2014 disponíveis nas bases de dados SciElo, Web of Science e Pubmed/Medline. Os artigos foram selecionados com base nos descritores “nanotoxicologia”, “nanotubos de carbono”, “toxicidade pulmonar” e seus equivalentes em inglês. Foram incluídos somente os artigos que contivessem informações referentes aos riscos/toxicidade pulmonares associados aos nanotubos de carbono, decorrentes de exposição por via respiratória (inalação, aspiração ou instilação traqueal).

RESULTADOS

Ma-Hock et al. (2009) descreveram a ocorrência de alterações em trato respiratório dos roedores, que variavam de sintomas irritativos leves em vias aéreas superiores a processos inflamatórios e granulomatosos em parênquima pulmonar, com acometimento de linfonodos mediastinais. Os autores observaram efeitos dose-dependentes, estando o grupo de ratos Wistar exposto as maiores doses mais propensas a desenvolver os quadros de maior gravidade. Os dados de necropsia dos ratos eutanasiados demonstraram alteração de coloração do parênquima pulmonar difusa nos grupos expostos a concentrações altas ($2,5 \text{ mg/m}^3$) e focais na maioria dos expostos a médias concentrações ($0,5 \text{ mg/m}^3$), provavelmente associadas ao acúmulo da

substância no parênquima (nos casos de descoloração difusa) ou lipoproteinólise e/ou acúmulo de macrófagos contendo nanotubos em seu interior para as alterações focais. A lipoproteinólise foi observada na maioria dos animais expostos a doses de $0,5 \text{ mg/m}^3$ e $2,5 \text{ mg/m}^3$, variando de mínima a leve em médias concentrações ($0,5 \text{ mg/m}^3$) a moderada a grave em exposições a altas concentrações ($2,5 \text{ mg/m}^3$). Entre os efeitos pulmonares, destacaram-se os infiltrados inflamatórios (com predominância de macrófagos, na junção bronquioalveolar, em região centrolobular) e os granulomas intraseptais (compostos por macrófagos e/ou células gigantes multinucleadas com conteúdo particulado compatível com a substância utilizada - MWCNT). Com relação ao processo inflamatório granulomatoso, todos os ratos machos e 90% das fêmeas apresentaram alteração classificada como grave (grau 4) pelos autores. Aumento de peso visceral foi observado em todos os grupos expostos ao nanotubos quando comparados ao grupo controle.

Foi observada também alteração de coloração nos linfonodos mediastinais, predominantemente em fêmeas dos grupos expostos às maiores concentrações. A maioria dos animais estudados apresentou alterações em volume e número dos linfonodos mediastinais, associados à hiperplasia linfo-reticular de graus variados, dose-dependentes. No grupo exposto a baixas concentrações ($0,1 \text{ mg/m}^3$), observaram-se alterações mínimas tanto em macrófagos alveolares quanto no processo de formação de granulomas.

Kayat et al. (2011) destacaram a importância da via respiratória como porta de entrada das nanopartículas e a maior toxicidade relacionada à inalação dessas partículas, quando comparadas à instilação traqueal ou faríngea. Nanotubos de carbono são nanopartículas peculiares em decorrência de suas propriedades físico-químicas, capacidade de aglomeração e método de produção. Os nanotubos de carbono de paredes simples são responsáveis por quadros inflamatórios significativos e fibrose intersticial de início precoce, tendo como



base reações de estresse oxidativo. Já CNTs de parede múltipla apresentam desfecho diverso, levando a quadros de alveolite e fibrose pulmonar. Nanotubos de carbono classificados como “impuros” (contendo grande quantidade de níquel e ferro) potencializam reações de estresse oxidativo, levando à morte celular e acúmulos de radicais livres e metabólitos finais de processos peroxidativos. Estima-se que SWCNTs possuam maior toxicidade em relação ao MWCNTs e tal fato talvez se deva às diferenças de tamanho e área de superfície de contato.

Donaldson et al. (2006) atribuem aos CNTs a capacidade de estimular a proliferação celular mesenquimal, além de processos granulomatosos e fibrogênicos, efeitos possivelmente relacionados a mecanismos de estresse oxidativo e inflamação. Os autores comparam os efeitos deletérios associados aos nanotubos de carbono a outros que ocorrem após a exposição ao asbesto e ao quartzo, efeitos esses relacionados à forma e biopersistência dos CNTs. Há a descrição de maior acúmulo de nanotubos com fibras longas (acima de 20 nm) quando comparados aos de cadeia curta (abaixo de 10nm). Este estudo considera os nanotubos de cadeia longa mais ativos biologicamente e relacionados a quadros inflamatórios mais exacerbados. Nanotubos de carbono com maior quantidade de metais tendem a desencadear reações oxidativas mais proeminentes, com formação de peróxido de hidrogênio e de radicais livres, além da liberação de citocinas pró-inflamatórias. Quando comparados aos cristais de quartzo e ao carbono negro, SWCNTs apresentaram maior toxicidade celular, evidenciada nos achados anatomopatológicos (lesões granulomatosas e fibrosantes).

Warheit et al. (2004) avaliaram a toxicidade pulmonar aguda consequente à instilação intratraqueal de nanotubos de carbono de parede simples. Foi observada a ocorrência de 15% de óbitos, todos relacionados à obstrução traqueal mecânica, e não aos efeitos tóxicos intrínsecos dos nanotubos de carbono. Os SWCNTs apresentam grande tendência à formação de aglomerados em

decorrência de suas características eletrostáticas e de dispersão, gerando aglomerados de nanotubos com cerca de 10 a 100 nanotubos. Os autores descrevem que a exposição a nanotubos de carbono de parede simples é responsável por dano pulmonar e reação inflamatória transitória. Com relação aos processos fibrosantes, os autores descrevem inconsistências, pois a ocorrência de processos granulomatosos multifocais em ratos expostos não demonstrou relação entre a dose de exposição e o desfecho.

Shvedova et al. (2009) em sua revisão de literatura compara os resultados de diversos estudos *in vitro* e *in vivo* relacionados ao nanotubos de carbono, em suas duas formas de apresentação (SWCNT e MWCNT). Os estudos *in vitro* demonstraram que CNTs de parede simples não aglomerados não são endofagocitados por macrófagos alveolares, pois estes parecem escapar dos mecanismos de reconhecimento celular receptor mediado por tais grupos celulares e a maioria desses nanotubos parece migrar para a região intraseptal do interstício alveolar. A funcionalização dos SWCNT com albumina permite reconhecimento destes por macrófagos alveolares e tal fato possibilita inferir o papel da albumina no processo de endofagocitose macrófagica receptor-mediado. A citotoxicidade induzida por CNTs parece estar mais relacionada à funcionalização, contaminação e grau de aglomeração dessas nanopartículas do que sua composição química. Além disso, observou-se que nanotubos de carbono com tendência a formar grandes aglomerados, funcionalizados com albumina ou com alto grau de contaminação apresentam reações inflamatórias e oxidativas mais proeminentes. A exposição aos CNTs pode induzir a fibrose intersticial pulmonar difusa de início precoce, a partir da produção intensa de colágeno e estimulação dos fibroblastos e tanto os nanotubos de carbono de paredes simples quanto os de múltiplas paredes estão relacionados à ocorrência de perda de viabilidade celular com proliferação de células mesoteliais, o que pode relacionar tais substâncias a um risco aumentado de adoecimento do trabalhador exposto por mesotelioma. Já estudos *in vivo*



demonstraram que grandes aglomerados de SWCNTs tendem a produzir respostas inflamatórias e lesões granulomatosas. Já os nanotubos de carbono não aglomerados incorporam-se ao interstício alveolar, levando à proliferação fibroblástica e ao acúmulo de colágeno no local, mesmo na ausência de inflamação, assim como nos descritos em estudos *in vitro*. Nanotubos de carbono de múltiplas paredes tratados com ácido para descontaminação metálica aparentemente não induzem resposta oxidativas, implicando um papel significativo dos contaminantes metálicos na gênese do dano ao parênquima pulmonar. Além disso, a presença de defeitos estruturais nos CNTs parece interferir de forma incisiva, sendo considerada o principal fator de risco. Aventa-se a possibilidade de ocorrência de mesotelioma e tal fato se deve à capacidade de migração dessas nanopartículas para o mesotélio e à possibilidade de gerar resposta inflamatória crônica e persistente, comparável à provocada pelo asbesto.

Clift et al. (2014) utilizaram culturas celulares contendo macrófagos humanos em uma delas, com o objetivo de determinar o risco à exposição aos nanotubos de carbono, considerando a via inalatória, a mais importante rota de entrada das nanopartículas em aerossóis. Os macrófagos foram implicados como as células de defesa primária, a primeira barreira de proteção do trato respiratório com relação aos CNTs. Os nanotubos de carbono, tanto os de parede simples quanto os de parede múltipla, estão associados a reações inflamatórias, via mediada por estresse oxidativo, com liberação de IL-8 e α -TNF. Tais partículas foram comparadas a DEPs (partículas de diesel) e de CAFs (fibras de asbesto crocidolita), apresentando alterações bioquímicas semelhantes. Tal fato reforça a necessidade de mais pesquisas sobre o potencial carcinogênico dos CNTs, visto que foram comparados a duas substâncias classificadas como classe I da IARC.

Chiu-Wing et al. (2004) descrevem maior potencial tóxico associado à exposição aos nanotubos de carbono, desde que estes alcancem os pulmões, quando comparados ao quartzo e ao negro de fumo.

Os autores descreveram falha do sistema de *clearence* mucocilar para os CNT, em decorrência de suas características de solubilidade e biodegradabilidade, levando a persistência dessas partículas no parênquima e permitindo sua permanência no interstício. Potencialmente, todos os nanotubos de carbono estão relacionados à ocorrência de granulomas do tipo epitelióide, dose-dependente, e, em menor frequência, de quadros inflamatórios intersticiais.

Mercer et al. (2011) consideram similares os efeitos adversos dos nanotubos de carbono de múltiplas camadas purificados, quando comparados qualitativamente aos efeitos provocados por SWCNTs. As discrepâncias estão relacionadas às áreas de distribuição de cada classe de CNT: nanotubos de paredes simples parecem migrar para regiões alveolares, e tal fato parece ser crítico no processo de formação dos granulomas, induzindo proliferação de fibroblastos e deposição de colágeno no local. Nanotubos de paredes múltiplas se distribuem por todo o parênquima pulmonar, podendo se estender para a pleura e tendem a produzir lesões granulomatosas de menor volume e em menor número, sendo localizados principalmente em regiões adjacentes a bronquíolos terminais. Com relação à ativação dos macrófagos alveolares, SWCNT aparentemente não desencadeiam mecanismos de endofagocitose macrófagica na mesma proporção que os MWCNTs. Quase 68% dos nanotubos de paredes múltiplas são encontrados no interior dos macrófagos alveolares (Gráficos 1 e 2).

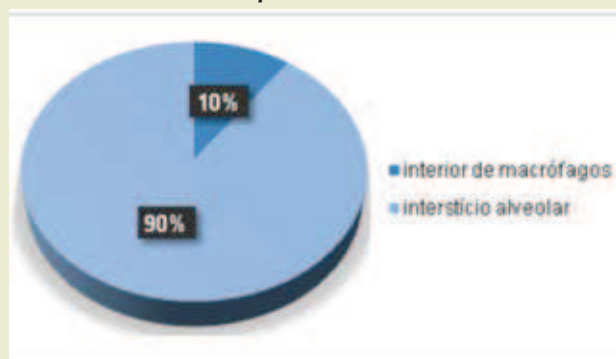
Gráfico 1 - Frequência de distribuição dos MWCNT no trato respiratório



Fonte: adaptado de Mercer et al., 2011.



Gráfico 2 - Frequência de distribuição dos SWCNTs no trato respiratório



Fonte: adaptado de Mercer et al., 2011.

Os autores concluíram que os nanotubos de carbono (tanto os de parede simples quanto os de múltiplas paredes), mostraram efeitos adversos qualitativamente similares (processos inflamatórios transitórios, lesões granulomatosas e fibrogênicas), a despeito de suas diferenças quantitativas (maior resposta fibrogênica relacionada aos SWCNTs e a maior avidéz dos macrófagos alveolares por nanotubos de paredes múltiplas).

Wang et al. (2010), buscando uma melhor compreensão da dispersão dos CNTs no tecido pulmonar, utilizaram Survanta®: um produto composto por fosfolipídios e proteínas que simula o surfactante produzido fisiologicamente e usado no tratamento de recém-nascidos prematuros. Foi demonstrada a importância do grau de dispersão dos nanotubos de carbono de parede simples na gênese de lesões pulmonares citotóxicas e fibrosantes *in vitro* e *in vivo*. Estima-se que grandes depósitos de nanotubos se depositem em regiões alveolares proximais e estejam relacionados à ocorrência de formação de granulomas; já os SWCNTs presentes em estruturas mais dispersas se depositam predominantemente em alvéolos terminais,

apresentam capacidade de migração para espaço intra-alveolar e induzem a processos fibrosantes. Os autores observaram o contraste entre os ambientes com os nanotubos de parede simples não dispersos (ND-SWCNT) e os nanotubos de parede simples dispersos com o Survanta® (SD-SWCNT). A maior dispersão apresentada nas nanopartículas em ambiente tratado com o surfactante foi demonstrada pelo menor volume dos nanotubos desse grupo (Tabela 3).

Em relação aos efeitos dos SWCNT dispersos nos processos de fibrogênese e produção de colágeno, os autores observaram que AD-SWCNT e ND-SWCNTs induziram a ocorrência de fibrose intersticial pulmonar e incremento na produção de colágeno. Os mesmos efeitos adversos foram associados aos SD-SWCNT, mostrando que o fato de os nanotubos estarem dispersos em surfactante não interfere com a ocorrência de atividades colágeno-indutoras inerentes aos SWCNTs, em comparação aos nanotubos de carbono de parede simples dispersos por acetona-sonicação.

Ferreira et al. (2013) descrevem diversos efeitos pulmonares adversos associados à exposição potencial a nanotubos de carbono, tais como mecanismos de produção de colágeno e reações de estresse oxidativo, processos inflamatórios, formação de granulomas e fibrose intersticial progressiva. Os autores atribuem tais efeitos a características peculiares dos nanotubos, principalmente relacionada à redução do tamanho das partículas e ao aumento da área de superfície em relação à massa. Os autores comparam os MWCNT ao asbesto, levando em conta a similaridade das estruturas e da composição química, gerando lesões semelhantes por se comportar como material fibroso

Tabela 3 - Comparação entre SWCNT dispersos em Survanta e SWCNT não dispersos

Partícula	Média de largura (μm)	Média de comprimento (μm)
SD-SWCNT	0,38 (\pm 0,02)	1,42 (\pm 0,08)
ND-SWCNT	12,35 (\pm 0,76)	27,72 (\pm 1,86) 1,42 (\pm 0,08)

Fonte: adaptado de Wang et al. Dispersion of single-walled carbon nanotubes by a natural lung surfactante for pulmonay *in vitro* and *in vivo* toxicities studies, 2010.



ocupacional tradicional. Já os SWCNTs estão predominantemente relacionados a quadros inflamatórios mais proeminentes quando comparados ao asbesto e ao negro-de-fumo, levando à ocorrência de formação de granulomas multifocais em estudos com roedores.

DISCUSSÃO

Existem pouquíssimos dados sobre o efeito toxicológico (pulmonar e geral) que os nanotubos de carbono podem causar no organismo humano. Ainda não existem queixas de lesões em trabalhadores expostos e também não foi publicado nenhum estudo de acompanhamento desses trabalhadores ao longo de qualquer período. Todavia, como mostra esta revisão de literatura, já foram produzidos alguns estudos mostrando importante toxicidade pulmonar em modelos animais. Na Tabela 4 podemos ver a compilação dos dados dos quatro estudos em modelos animais (ratos e camundongos) expostos a SWCNT e MWCNT.

Os resultados dos trabalhos analisados convergem ao mostrar efeitos que vão desde inflamação local até a formação de granulomas e fibrose pulmonar. A comparação da toxicidade pulmonar de nanotubos de carbono com amianto e quartzo mostrou que os produtos de nanotecnologia podem ser até mais tóxicos do que tais fibras. Há diferenças

significativas na distribuição tecidual e nos danos causados por diferentes tipos de CNTs, sejam eles de parede simples ou de parede múltipla. Além disso, todos os métodos de produção de CNTs disponíveis atualmente utilizam metais como catalisadores, gerando sempre algum grau de contaminação por impurezas metálicas no produto final. Demonstrou-se que o tipo de metal contido em cada CNT também pode afetar seu grau de toxicidade. Níquel e Ferro parecem ser os de maior potencial patogênico. Os variados tipos de CNTs também podem se dispersar e contaminar o ambiente de diferentes formas. A atração eletrostática de alguns desses materiais faz com que se aglomerem e se comportem mais como nanopartículas do que como fibras. Essa mudança na característica aerodinâmica do material altera a forma como ele vai interagir com a árvore respiratória do indivíduo e altera o seu sítio de ação e potencial tóxico. A aglomeração dos SWCNT muda inclusive a forma como eles interagem com os macrófagos, aumentando ou diminuindo a estimulação dessas células. Também se evidenciou que os efeitos tóxicos são dose-dependentes, com maiores concentrações de exposição resultando em maiores danos teciduais. À luz desses resultados em modelos animais o NIOSH, em seu *Intelligence Bulletin* 65, publicou um primeiro “limite de exposição recomendado” para os CNT.

Tabela 4 - Resultados dos estudos em modelos animais

Tipo do estudo e via de exposição				Efeitos Pulmonares Observados		
Autor/Ano	Espécies	Via de Exposição	Tipo de CNT	Granuloma	Inflamação	Fibrose
Warheit et al. [2004]	Ratos	Instilação Traqueal	SWCNT	+ independente da dose >	transitória	-
Chiu-Wing et al. [2004]	Camundongos	Instilação Traqueal	SWCNT	+	+	Não reportado
Ma-Hock et al. [2009]	Ratos	Inalação	MWCNT	+	+	-
Mercer et al. [2011]	Camundongos	Aspiração faríngea	MWCNT	+	+	+

Fonte: os autores



A base de evidência usada pelo NIOSH foi aparentemente maior do que a selecionada para este estudo. Mas trata-se, na verdade, de um mesmo conjunto de dados, já que a grande maioria dos artigos selecionados pelo NIOSH integrou os artigos de revisão que selecionamos para nosso estudo. Utilizando porcos, ratos e camundongos que foram expostos a SWCNT e MWCNT de quatro formas distintas, a saber: instilação traqueal (18 estudos), aspiração faríngea (14 estudos), inalação (12 estudos) e injeção/implantação direta em peritônio, pleura, escroto e sistema circulatório (09 estudos). Apesar da variabilidade nos métodos, impressiona o fato de todos convergirem para os mesmos resultados: lesões inflamatórias, granulomatosas e fibróticas, podendo formar mesoteliomas. Utilizando modelos matemáticos validados que permitem, com razoável acurácia, extrapolar o resultado de estudos de modelos animais para o homem, o NIOSH chegou ao limite de exposição recomendado (REL) de $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ para jornadas de 8 h de trabalho.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A nanotecnologia é uma realidade e os nanotubos de carbono se mostram um produto cada vez mais versátil e presente na nossa vida cotidiana. O crescimento na produção e utilização dos CNT aumenta também a exposição humana a esses materiais, sendo, portanto, fundamental determinar a toxicidade que causam para que esses efeitos maléficos possam ser controlados e evitados. Nanotubos de carbono são a vanguarda de uma nova geração de materiais que está nascendo, trazendo desenvolvimentos em várias áreas da ciência. É necessário que a Higiene Ocupacional caminhe com mais essa evolução tecnológica resguardando a saúde do trabalhador e evitando processos de adoecimento. Embora não seja possível extrapolar o resultado de pesquisas feitas em animais com exposições concentradas e de curta duração para os efeitos que os trabalhadores podem vir a desenvolver enquanto convivem com CNT ao longo de anos e décadas, os modelos animais nos permitem prever que a exposição descontrolada aos CNT

causará danos teciduais potencialmente graves e irreversíveis no trato respiratório dos seres humanos. Novos métodos de avaliação precisam ser desenvolvidos para que tenhamos uma leitura confiável da presença dos CNTs no ambiente de trabalho. Carecemos ainda de estudos que acompanhem os trabalhadores expostos aos CNTs para termos uma noção mais clara do efeito que essa nova geração de materiais terá nos seres humanos, portanto, ações de educação e de informação aos trabalhadores precisam ser instituídas, no sentido de que o empregado tenha acesso a informações essenciais de fisiopatologia, vias de exposição, treinamento para uso de EPIs (quando necessários) e protocolos de urgência/emergência em caso de algum acidente ou incidente.

REFERÊNCIAS

Brasil. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. ABDI. Nanotecnologias: subsídios para a problemática dos riscos e regulação. 2011. Disponível em: http://www.abdi.com.br/Estudo/Relat%C3%B3rio%20Nano-Riscos_FINALreduzido.pdf.

Brasil. Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. ABDI. Relatório de Acompanhamento Setorial. Nanotecnologia na área de saúde: mercado, segurança e regulação. 2013. Disponível em: <http://www.abdi.com.br/Estudo/relatorio-nanotecnologia.pdf>.

Chiu-Wing L, James JT, McCluskey R, Hunter RL. *Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation*. Toxicol Sci. 2004;(77):126-34.

Clift MJD, Endes C, Vanhecke D, Wick P, Gehr RPF, Schins RPF, Petri-Fink A, Rothen-Rutishauser B. *A comparative study of different in vitro lung cell culture systems to assess the most beneficial tool for screening the potential adverse effects of carbon nanotubes*. Toxicol. Sci. 2013;137(1):55-64.



Donaldson K, Aitken R, Tran L, Stone V, Duffin R, Forrest G, Alexandre A. *Carbon nanotubes: A review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety*. *Toxicol. Sci.* 2006;92(1):5-22.

Ferreira AJ, Cemilyn-Jones J, Cordeiro CR. *Nanoparticles, nanotechnology and pulmonary nanotoxicology*. *Rev. Port. Pneumol.* 2013;19(1):28-37.

Feynmann RP. *Plenty of room at the bottom*. 1959. Available from: <http://calteches.library.caltech.edu/47/2/1960Bottom.pdf>.

International Organization for Standardization (ISO). ISO/TS 27687:2008 229. Technical Committee 27687 - Nanotechnologies - Terminology and Definitions for nano-objects - nanoparticle, nanofiber and nanoplate. Available from: http://www.iso.org/iso/catalogue_detail?csnumber=44278.

Kayat J, Gajbhive V, Tekade RK, Jain NK. *Pulmonary toxicity of carbon nanotubes: a systematic report*. *Nanomedicine: Nanotechnol, Biol, Med.* 2011; 7:40-9.

Ma-Hock L, Treumann S, Strauss V, Brill S, Luiz F, Mertler M, Wiench K, Gamer AO, Ravenzwaay B, Landsiedel R. *Inhalation toxicity of multiwall carbon nanotubes in rats exposed for 3 months*. *Toxicol Sci.* 2009;112(2):468-81.

Mercer RR, Hubbs AF, Scabilloni JF, Wang L, Batelli LA, Friend S, Castranova V, Porter DW. *Pulmonary fibrotic responses to aspiration of multi-walled carbon nanotubes*. *Part Fibre Toxicol.* 2011; 8:21.

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). *Current intelligence bulletin 65. Occupational Exposure to carbon nanotubes and fibers*. 2013. Available from: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2013-145/>, cited in 2014, July 19th.

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). *General safe practices for working with engineered nanomaterials in research laboratories*. 2012. Available from:

<http://www.cdc.gov/niosh/docs/2012-147>, cited in 2014, July 19th.

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). *Nanomaterial production and downstream handling processes*. 2013. Available from: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2014-102>, cited in 2014, July 19th.

National Nanotechnology Initiative (NNI). Disponível em: <http://www.nano.gov/nanotech-101/what/definition>, cited in 2014, August 6th.

Shvedova AA, Kisin ER, Porter D, Schulte P, Kagan B, Fadeel B, Castranova V. *Mechanisms of pulmonary toxicity and medical applications of carbon nanotubes: two faces of Janus?* *Pharmacol Therap.* 2009;121:192-204.

The Royal Society and the Royal Academy of Engineering. *Nanoscience and nanotechnologies: opportunities and uncertainties*. 2004. Available from: <http://www.nanotec.org.uk/finalReport.html>.

Wang L, Castranova V, Mishra A, Chen B, Mercer RR, Schwegler-Berry D, Rojanasakul Y. *Dispersion of single-walled carbon nanotubes by a natural lung surfactant for pulmonary in vitro and in vivo toxicities studies*. *Part Fibre Toxicol.* 2010; 7:31.

Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, Roach DH, Reynolds GAM, Webb TR. *Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats*. *Toxicol Sci.* 2004; 77:117-25.