

REDUÇÃO DA TOXICIDADE AQUÁTICA DE EXTRATOS LIXIVIADOS DE MISTURAS ASFÁLTICAS ATRAVÉS DA NANOTECNOLOGIA: AVALIAÇÃO EM MICRO CRUSTÁCEO PLANCTÔNICO DE ÁGUA DOCE

Fernanda Facin

João Victor Staub de Melo

Universidade Federal de Santa Catarina — UFSC
Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil — PPGEC

Cristina Moreira Lalau

Diego José Nogueira

Rodrigo Costa Puerari

William Gerson Matias

Universidade Federal de Santa Catarina — UFSC
Programa de Pós-graduação em Engenharia Ambiental — PPGEA

Resumo: A incorporação de nanomateriais em misturas asfálticas tem sido estudada com o objetivo de melhorar o comportamento mecânico destes materiais. Contudo, as misturas asfálticas, em serviço, estão susceptíveis a liberação e lixiviação de particulados, por meio do desgaste superficial da camada de rolamento. Neste contexto, pouco se sabe sobre o potencial risco de lixiviados de misturas asfálticas nanomodificadas atuarem como contaminantes ambientais ao entorno do pavimento. O objetivo desta pesquisa foi investigar a toxicidade de três extratos lixiviados de misturas asfálticas: uma convencional, uma modificada com 2% de nanotubo de carbono e outra com 3% de nanoargila. Foram realizados ensaios de toxicidade com *Daphnia magna*. Os resultados demonstraram, que para este organismos-teste, não há indícios de impactos negativos associados diretamente à utilização de 2% de nanotubo de carbono e 3% de nanoargila em misturas asfálticas, podendo ainda, a incorporação destes nanos, nestas porcentagens, reduzir a toxicidade aguda do material.

Palavras-chave: Misturas asfálticas. Nanotubo de carbono. Nanoargila. Lixiviados. Toxicidade aquática.

REDUCTION OF AQUATIC TOXICITY OF EXTRACTS LEACHED FROM ASPHALT MIXTURES THROUGH NANOTECHNOLOGY: EVALUATION IN FRESH WATER PLANKTONIC MICROCRUSTACEAN

Abstract: The incorporation of nanomaterials into asphalt mixtures has been studied with the aim of improving the mechanical of materials. However, asphalt mixtures in use are susceptible to the release and leaching of particulates through the superficial wear of the surface course. In this context, little is known about the potential risk of leachates from nanomodified asphalt mixtures acting as environmental contaminants around the pavement. The objective of this research was to investigate the toxicity of three leachate extracts from asphalt mixtures: one conventional, one modified with 2% carbon nanotube and another with 3% nanoclay. Toxicity tests were carried out with *Daphnia magna*. The results showed that for these test organisms, there is no evidence of negative impacts directly associated with the use of 2% carbon nanotube and 3% nanoclay in asphalt mixtures, and the incorporation of these nanos, in these percentages, may also reduce the acute toxicity of the material.

Keywords: Asphalt mixtures. Carbon nanotube. Nanoclay. Leached. Aquatic toxicity.

1. Introdução

Atualmente, a nanotecnologia tem sido amplamente aplicada em pesquisas na área da pavimentação com o intuito de melhorar ou adicionar propriedades aos materiais usualmente empregados nestas estruturas (CHEN *et al.*, 2021; ROCHISHNU *et al.*, 2020; MELO & TRICHÊS, 2017). Neste sentido, diversos pesquisadores (DAS & SINGH, 2021; BABAGOLI, 2021) comprovaram que a incorporação de nanopartículas em misturas asfálticas apresenta resultados positivos quanto ao desempenho mecânico, reológico e a durabilidade do material. Como por exemplo, a adição de nanotubos de carbono em ligantes asfálticos, e consequentemente, na mistura, tem proporcionado aumento na resistência à deformação permanente e vida à fadiga (BABAGOLI, 2021; MELO *et al.*, 2018; SANTAGATA *et al.*, 2012). Assim como, a incorporação de nanoargila organofílica, tem demonstrado aumento da resistência ao dano por umidade induzida, à deformação permanente, à fadiga e ao envelhecimento das misturas asfálticas (FAKHRI & RAHIMZADEH MOTTAHED, 2021; SEDAGHAT *et al.*, 2020; MELO & TRICHÊS, 2016).

Contudo, apesar dos benefícios da adição de nanomateriais em ligantes e misturas asfálticas, pouco se sabe sobre o potencial risco destes materiais nanomodificados atuarem como contaminantes ambientais (FACIN, 2020). Os pavimentos estão expostos a condições climáticas adversas como vento, chuva, gelo, sol intenso, além da solicitação do tráfego de veículos e pedestres, sofrendo desta forma, desgaste e deterioração superficial da camada de rolamento (ALVES *et al.*, 2020). Como consequência, durante sua vida em serviço, a camada asfáltica está extremamente susceptível à liberação e lixiviação de materiais particulados, inclusive nanomateriais. Estes particulados, por sua vez, através do vento e do escoamento superficial da água da chuva sobre o pavimento, estão sujeitos ao transporte e deposição no solo e em águas superficiais, podendo alterar as características do habitat natural da região atingida, assim como, propiciar efeitos toxicológicos aos organismos vivos (BAALOUSHA *et al.*, 2016).

Devido ao seu tamanho, particulados nanométricos, quando em contato com organismos dos mais diversos grupos, tem facilidade em se depositar no trato respiratório, penetrar nas células e deslocar-se para outras partes do corpo (MCQUEEN, 2017). Recentemente, estudos (LI *et al.*, 2021; SOBAŃSKA *et al.*, 2020) têm relatado efeitos toxicológicos da exposição de organismos à diferentes nanomateriais em estado puro. Onde por exemplo, em relação ao nanotubo de carbono, são relatados efeitos na membrana celular, no DNA mitocondrial, inflamação pulmonar e estresse oxidativo. Quanto à nanoargila, são descritos, danos na membrana celular, inflamação pulmonar, citotoxicidade e toxicidade em protozoários. Em outras palavras, a ação de substâncias tóxicas nos organismos pode causar efeitos letais e subletais, como a mudança na taxa de crescimento, na reprodução e no desenvolvimento, provocadas por alterações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais (BORRELY, 2001). Portanto, em relação à materiais novos e, principalmente, nanomodificados, é extremamente importante que sejam realizados testes toxicológicos para assegurar o uso seguro (LI *et al.*, 2017; MAUTER *et al.*, 2018).

Neste contexto, apesar dos relatos de que diversos tipos de nanomaterias puros apresentam certo nível de efeito toxicológicos em alguns organismos, no caso das misturas asfálticas nanomodificadas, não se pode fazer uma simples correlação de toxicidade por apresentarem adições de nanopartículas em sua formulação. Uma vez que quando incorporados na matriz, os nanos sofrem alterações de propriedades e podem ficar aderidos a estes substratos. Adicionalmente, as substâncias liberadas e lixiviadas a partir destes materiais para o meio ambiente, são misturas extremamente complexas, contendo compostos provenientes do material como um todo (ligante asfáltico, agregados minerais, aditivos e nanomateriais). Complementa-se também, que os nanomateriais são adicionados aos ligantes asfálticos em pequena porcentagem, normalmente abaixo de 5% em peso de ligante, o que corresponde a

uma pequena porcentagem em relação ao material como um todo, tendo em vista que grande parte das misturas asfálticas apresentam teor de ligante asfáltico abaixo de 6%.

Este artigo apresenta os resultados de uma pesquisa sobre a toxicidade de extratos lixiviados de misturas asfálticas nanomodificados com nanotubo de carbono e nanoargila organofílica no organismo-teste *Daphnia magna*.

2. Materiais

Para o desenvolvimento do estudo, e conseqüentemente, para a produção das misturas asfálticas, foram utilizados os seguintes materiais: agregados minerais, ligante asfáltico convencional, nanoargila organofílica e nanotubos de carbono.

O agregado mineral é de origem mineralógica granítica e apresenta as seguintes propriedades: angularidade do agregado graúdo de 100% (ASTM D5821, 2017); angularidade do agregado miúdo de 52,36% (ASTM C1252, 2017); abrasão Los Angeles de 18,64% (ASTM C131, 2020); sanidade de 1,59% (ASTM C88, 2018); equivalente de areia de 71,95% (AASHTO T176, 2017); materiais deletérios de 0% (AASHTO T112, 2017); absorção do agregado graúdo de 1,43% (ASTM C127, 2015).

O ligante asfáltico utilizado é convencional e apresenta as seguintes propriedades: ponto de amolecimento de 48,2 °C (ASTM D36, 2020); penetração de 58×10^{-1} mm (ASTM D5, 2020); Índice de Suscetibilidade Térmica de -1,3 (PFEIFFER E VAN DOORMAAL); viscosidade aparente de 293 cP (135 °C), 151 cP (150 °C) e 59 cP (177 °C) (ASTM D4402, 2015); classificação Performance Grade (PG) 58-22 (ASTM D6373, 2016; ASTM D7643, 2016).

O nanotubo de carbono e a nanoargila organofílica (montmorilonita modificada com sais quaternários de amônio - dimetil amônio com duas cadeias alquilas) utilizados neste estudo, foram adquiridos na *Nanostructured & Amorphous Materials, Inc* – Houston (USA) e na *Laviosa Chimica Mineraria S.p.A.* (Dellite 67G), respectivamente. Os nanomateriais apresentam as seguintes características físico-químicas segundo o fabricante: a) nanotubo de carbono: pureza > 95%; área superficial específica de 60-80 m²/g; estrutura cristalina de grafeno hexagonal com hibridização sp²; densidade de 2,1; pH em água ultra pura entre 6,5-7,5; forma tubular com diâmetro externo entre 50-80 nm, diâmetro interno entre 5-15 nm e comprimento entre 10-20 µm. b) nanoargila: pureza > 95%; estrutura cristalina de tetraedros de sílica e octaedros de alumínio (montmorilonita); densidade de 1,7; pH em água ultra pura entre 7,0-8,0; tamanho das partículas entre 7-9 µm (após dispersão: 1x500 nm).

Quanto às misturas asfálticas, para esta pesquisa foram produzidas três matrizes: uma de referência com ligante asfáltico convencional, uma com ligante modificado com 3% de nanoargila organofílica e outra com ligante modificado com 2% de nanotubo de carbono, com os nanomateriais incorporados em relação ao peso do ligante. Ressalta-se, que o percentual de incorporação foi definido a partir de pesquisas que investigaram porcentagens entorno destes valores e obtiveram melhora no desempenho mecânico e reológico da matriz asfáltica. Portanto, para o nanotubo de carbono pode-se citar os seguintes estudos: Ashish & Singh (2019), Melo *et al.* (2018), Santagata *et al.* (2012). Para a nanoargila organofílica, menciona-se as seguintes investigações: Ashish *et al.* (2016), Iskender (2016), Melo & Trichês (2017), Yao *et al.* (2012), Melo & Trichês (2016), Zare-Shahabadi *et al.* (2010).

Os ligantes asfálticos nanomodificados foram preparados com um misturador de alto cisalhamento, Modelo L5M-A Silverson, equipado com controle de temperatura, cuba térmica e hélice cisalhante. A temperatura de incorporação dos nanomateriais no ligante foi de 150 °C, sob nível de cisalhamento de 5.000 rpm com período de compatibilização de 1h40min.

As misturas asfálticas foram formuladas em consonância com a especificação Superpave, com curva granulométrica para um tamanho nominal máximo de 19 mm. A dosagem da mistura asfáltica foi realizada com a utilização do ligante asfáltico convencional, através de compactação giratória para elevado volume de tráfego, seguindo as recomendações das normas

AASHTO M323 (2017) e AASHTO R35 (2017). O estudo de dosagem conduziu a uma mistura asfáltica com teor de ligante de 4,35%, com as seguintes propriedades volumétricas: Gmm ($N_{\text{inicial}} = 9$) de 86,5%; Gmm ($N_{\text{projeto}} = 125$) de 95,9%; Gmm ($N_{\text{máximo}} = 205$) de 97,2%; Gmb ($N_{\text{projeto}} = 125$) de 2,577 g/cm³; Gmm de 2,685 g/cm³; volume de vazios de 4,01%; vazios do agregado mineral de 14,12%; relação betume-vazios de 71,57%; relação pó-betume efetivo de 1,37.

Após a dosagem, amostras de aproximadamente 1500 g de misturas asfálticas foram preparadas para serem utilizadas no procedimento de lixiviação, e conseqüentemente, nos testes toxicológicos. Este preparo foi realizado com base nas prescrições da norma ASTM D2041 (2019), método Rice, ou seja, após a produção da mistura asfáltica, esta não foi compactada, mais sim desagregada ainda quente, de modo a obter seu estado solto. O objetivo de não compactar foi simular de maneira eficiente a superfície da camada de rolamento nos primeiros anos em serviço, na qual os agregados encontram-se completamente envolvidos em ligante asfáltico e expostos às intempéries e ações do tráfego (desgaste). Em nenhuma das misturas foi utilizado aditivo melhorador de adesividade ligante-agregado com o intuito de emular um cenário crítico.

3. Método

O escopo geral do programa de investigação pode ser resumido em duas partes: (i) processo de lixiviação e obtenção dos extratos lixiviados das misturas asfálticas estudadas (uma de referência com ligante asfáltico convencional, outra com ligante asfáltico modificado com 2% de nanotubos de carbono e outra com ligante asfáltico modificado com 3% de nanoargila organofílica) e (ii) avaliação toxicológica dos extratos lixiviados com o micro crustáceo *Daphnia magna*.

Processo de lixiviação das misturas asfálticas

A metodologia utilizada para o processo de lixiviação das amostras de misturas asfálticas foi a norma ABNT NBR 10005 (2004) que tem como base o método "*Toxicity Characteristic Leaching Procedure*" (TCLP) (SW-846 METHOD 1311; USEPA, 1994). O processo foi realizado em equipamento agitador rotatório de frascos, com 100 gramas de cada amostra em frascos contendo 2 litros de solução de extração, na velocidade de 30 ± 2 rpm durante 18 ± 2 horas a temperatura de 25 °C. Ao final do período de agitação, as amostras foram filtradas em filtro com porosidade de 0,45 µm com auxílio de um aparelho de filtração a vácuo. Após este processo, as amostras foram evaporadas em estufa a 60 °C por 24 horas com o objetivo de concentrar o extrato lixiviado. Depois de resfriadas, as amostras foram armazenadas em recipientes na geladeira para então serem utilizadas nos testes toxicológicos. A Figura 1 mostra o aspecto de uma das amostras de mistura asfáltica após o processo.



Figura 1 – Comparação entre as amostras de mistura asfáltica antes (a) e depois (b) do processo de lixiviação.

Avaliação toxicológica dos extratos lixiviados com *Daphnia magna*

Para os testes de toxicidade foi utilizado o organismo *Daphnia magna* STRAUS, 1820 (Cladocera, Crustacea), que é um micro crustáceo planctônico de água doce, o qual atua na cadeia alimentar aquática como consumidor primário, alimentando-se por filtração de material orgânico particulado presente no meio (LEAD *et al.*, 2018; KNIE *et al.*, 2004). A motivação da escolha deste organismo para a realização dos testes toxicológicos foi pela sua localização em níveis tróficos mais baixos. Esta característica é importante para a avaliação da amplificação da contaminação em toda cadeia alimentar. Além disso, este micro crustáceo é amplamente utilizado em pesquisas científicas (NOGUEIRA *et al.*, 2020; COSTA PUERARI *et al.*, 2020), favorecendo o comparativo entre futuras pesquisas.

Nesta etapa foram utilizados os extratos lixiviados (referência, com 2% de nanotubo de carbono e com 3% de nanoargila organofílica), para as análises toxicológicas. Os organismos neonatos (< 24 horas de vida) de *Daphnia magna*, utilizados nos ensaios de toxicidade aguda e crônica foram provenientes de cultivo que seguiu as prescrições da ABNT NBR 12713 (2016) e da ISO 6341 (2012).

Inicialmente, foram conduzidos os testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* (ABNT NBR 12713, 2016), com o objetivo de determinar a $CE_{50,48h}$ (concentração efetiva que causa imobilidade e/ou mortalidade a 50% dos organismos-teste após um período de 48 horas) para cada um dos extratos lixiviados. A análise estatística foi realizada no programa GraphPad Prism®, usando ANOVA unidirecional, possibilitando a determinação das concentrações correspondentes a $CE_{50,48h}$ de cada ensaio. Por fim, os resultados foram classificados de acordo com a diretiva UE 93/67/EEC (1993), onde $CE_{50} < 1$ mg/L classifica o material como muito tóxico para os organismos aquáticos; 1–10 mg/L como tóxico; 10–100 mg/L como nocivo; > 100 mg/L como não classificado.

Uma vez encontrada a $CE_{50,48h}$, foi conduzido os testes de toxicidade crônica com *Daphnia magna*, os quais tiveram como maior concentração do teste a décima parte da respectiva $CE_{50,48h}$ (teste agudo). O teste de toxicidade crônica foi realizado com base na ISO 10706 (2000) e no protocolo da Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Guideline 211 (2012), com o objetivo de avaliar os efeitos subletais nos organismos. Neste ensaio, os neonatos foram expostos durante 21 dias aos agentes tóxicos (lixiviados de misturas asfálticas), período que compreende parte significativa do ciclo de vida do organismo, sendo ao final do período, verificados os efeitos nos seguintes parâmetros: longevidade, tamanho, reprodução e idade da primeira postura. Alguns exemplos de manifestações da toxicidade nos parâmetros citados acima são: morte precoce, redução do tamanho médio, redução ou aumento anormal na reprodução, nascimento de filhotes mortos, idade de postura muito precoce ou ausência de reprodução. Após a finalização dos testes, os resultados foram inseridos no programa estatístico GraphPad Prism® e a análise de variância (ANOVA) foi realizada para definir as diferenças significativas entre os grupos através da variabilidade entre eles. Esta análise baseia-se no princípio da comparação entre os resultados obtidos e controle do teste ($p < 0,05$). A menor concentração em que a diferença significativa exceda este valor é considerada como CEO (Concentração de Efeito Observado). Determinada a CEO, foi originada a CENO (Concentração de Efeito Não Observado) como sendo a concentração inferior a CEO.

4. Apresentação e discussão de resultados

Teste de toxicidade aguda com *Daphnia magna*

Os resultados obtidos nos testes de toxicidade aguda com os 3 diferentes lixiviados asfálticos são apresentados na Tabela 1 juntamente com a classificação da diretiva UE 93/67/EEC (1993), de acordo com sua toxicidade. Vale ressaltar que a unidade de medida

utilizada para as amostras de lixiviado foi mL/L, uma vez que todas elas foram utilizadas em seu estado líquido para a realização dos testes.

Tabela 1 - Resultados dos testes de toxicidade aguda com *Daphnia magna* em ordem de toxicidade.

Lixiviados de Misturas Asfálticas	CE _{50,48h}	Classificação UE 93/67/EEC
Convencional (Referência)	83,5 mL/L	Nocivo
Com 3% de Nanoargila Organofílica	306,0 mL/L	Não classificado
Com 2% de Nanotubo de Carbono	464,8 mL/L	Não classificado

Conforme a Tabela 1, o menor valor de CE_{50,48h} foi de 83,5 mL/L para o extrato lixiviado convencional, seguido pelo extrato nanomodificado com nanoargila com 306,0 mL/L e, por último, do extrato nanomodificado com nanotubo de carbono com 464,8 mL/L. Os resultados mostram que a adição dos nanomateriais na matriz asfáltica de referência aumenta o valor de CE_{50,48h} do extrato lixiviado convencional (referência), a incorporação de 3% de nanoargila propiciou a elevação do CE_{50,48h} em 366% e a incorporação de 2% de nanotubo de carbono em 556%, tornando a mistura convencional menos tóxica, considerando a exposição à substância por um curto período de tempo (agudo). Adicionalmente, os resultados também indicam uma excelente adesão dos nanomateriais à matriz asfáltica.

Quanto à classificação da diretiva da UE 93/67/EEC (1993), a amostra de lixiviado convencional pode ser classificada como “nociva”, evoluindo para “não classificada” quando este é modificado com as nanopartículas em estudo. Conclui-se, que os nanoprodutos adicionados ao ligante, dificultaram durante o processo de lixiviação a liberação de substâncias tóxicas provenientes da matriz asfáltica. Deste modo, a mistura asfáltica convencional apresentou-se potencialmente mais tóxica que as nanomodificadas.

A redução da toxicidade pode ser explicada pelo tamanho nanométrico das adições e sua boa compatibilidade (interação química) com a matriz asfáltica. O tamanho, a elevada área superficial específica e energia superficial dos nanomateriais, garantem elevado grau de adsorção no interior do ligante asfáltico, onde, ambos nanomateriais são capazes de preencher a nanoporosidade, aumentando a impermeabilidade do ligante, deixando-o menos susceptível a oxidação e volatilização (YAO *et al.*, 2013; XIN *et al.*, 2020) e, por consequência, menos propenso a liberação de substâncias tóxicas. Todos estes efeitos benéficos são potencializados devido a adequada interação da matriz asfáltica como estas nanopartículas. Neste sentido, a nanoargila possui excelente afinidade química com o ligante em função dos híbridos presentes nela (sais quaternários de amônio). Estes sais são tensoativos, ou seja, possuem em uma extremidade cadeias alquilas de características hidrofóbica (apolar) que interagem com o ligante asfáltico e na outra extremidade, característica hidrofílica (polar) que se ligam quimicamente às formas cristalinas de sílica presentes no nanomaterial. Já o nanotubo de carbono, apresenta características hidrofóbicas (apolar) por ser um alótropo do carbono, ou seja, com afinidade ao ligante asfáltico.

Estes resultados podem ser correlacionados com diversos estudos (BABAGOLI, 2021; WANG *et al.*, 2021; AMINI *et al.*, 2021), muito bem documentados, que comprovam o aumento da resistência ao envelhecimento do ligante asfáltico (resistência à perda e oxidação de compostos químicos) através da incorporação de nanomateriais na matriz.

Apesar dos resultados de toxicidade aguda, ainda foi necessário realizar a verificação do seu efeito crônico sobre a *Daphnia magna*, uma vez que os efeitos resultantes dos dois testes (agudo e crônico) não são excludentes. Deste modo, ainda que a CE_{50,48h} tenha sido elevada (e classificada como não tóxica), é necessário verificar se a longa exposição dos organismos aos extratos lixiviados pode ocasionar efeitos significativos.

Teste de toxicidade crônica com *Daphnia magna*

Os resultados obtidos dos ensaios de toxicidade crônica com os 3 lixiviados, são apresentados na Tabela 2. Nestas análises de toxicidade foram verificados os efeitos nos parâmetros de longevidade, tamanho, reprodução e idade da primeira postura de filhotes. As concentrações que apresentaram efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$), em cada um destes parâmetros, foram classificadas como CEO (Concentração de Efeito Observado), e as concentrações testadas imediatamente abaixo, como a CENO (Concentração de Efeito Não Observado). Para os testes nos quais não foi verificado efeito significativo ($p < 0,05$) nos parâmetros avaliados, com 95% de confiança, anotou-se NE (Não Encontrado), indicando que o valor da concentração que causa toxicidade não foi encontrado.

Tabela 2 - Resultados dos testes de toxicidade crônica com *Daphnia magna*.

Lixiviados de Misturas Asfálticas	Concentração (mL/L)	Longevidade (%)	Tamanho (mm)	Reprodução (Nº de Filhotes)	Idade da Primeira Postura (Dias)
Convencional (Referência)	C0 = Controle	100	2,919 ± 0,07	8,940 ± 2,42	11,90 ± 1,59
	C1 = 0,5	90	2,846 ± 0,07	9,256 ± 2,05	13,33 ± 2,97
	C2 = 2,5	70	2,893 ± 0,09	7,414 ± 2,14	11,86 ± 1,57
	C3 = 4,5	90	2,868 ± 0,09	7,422 ± 2,14	11,22 ± 1,09
	C4 = 6,5	80	2,822 ± 0,06	7,488 ± 1,04	11,25 ± 1,58
	C5 = 8,5	70	2,792 ± 0,04	8,271 ± 1,82	11,29 ± 1,49
	CEO (mL/L)	> 8,5 (NE)	> 8,5 (NE)	> 8,5 (NE)	> 8,5 (NE)
	CENO (mL/L)	> 8,5 (NE)	> 8,5 (NE)	> 8,5 (NE)	> 8,5 (NE)
Com 3% de Nanoargila Organofílica	C0 = Controle	100	2,834 ± 0,06	7,855 ± 0,94	11,80 ± 2,74
	C1 = 5,0	80	2,889 ± 0,07	7,404 ± 1,86	11,38 ± 1,68
	C2 = 10	70	2,887 ± 0,07	8,214 ± 0,84	11,00 ± 1,15
	C3 = 15	100	2,901 ± 0,09	6,585 ± 1,56	11,70 ± 1,76
	C4 = 20	90	2,869 ± 0,08	6,172 ± 1,11	11,67 ± 1,66
	C5 = 30	90	2,860 ± 0,06	7,256 ± 2,27	11,56 ± 2,51
	CEO (mL/L)	> 30 (NE)	> 30 (NE)	> 30 (NE)	> 30 (NE)
	CENO (mL/L)	> 30 (NE)	> 30 (NE)	> 30 (NE)	> 30 (NE)
Com 2% de Nanotubo de Carbono	C0 = Controle	100	2,210 ± 0,05	9,850 ± 1,12	12,20 ± 1,47
	C1 = 10	90	2,231 ± 0,04	7,900 ± 1,85	11,33 ± 2,17
	C2 = 20	90	2,208 ± 0,07	8,756 ± 1,55	11,44 ± 1,13
	C3 = 30	80	2,193 ± 0,06	9,413 ± 1,06	12,38 ± 1,68
	C4 = 40	100	2,115 ± 0,07	9,360 ± 1,44	12,00 ± 2,16
	C5 = 50	80	2,126 ± 0,03	8,925 ± 2,89	11,38 ± 1,88
	CEO (mL/L)	> 50 (NE)	> 50 (NE)	> 50 (NE)	> 50 (NE)
	CENO (mL/L)	> 50 (NE)	> 50 (NE)	> 50 (NE)	> 50 (NE)

Em relação aos parâmetros analisados nos testes de toxicidade crônica, pode-se verificar que:

- Parâmetro longevidade: para todas as misturas asfálticas, com o aumento da concentração do lixiviado no meio, não houve uma tendência bem definida quanto à longevidade dos organismos, ou seja, não há uma correlação entre aumento da concentração e aumento da morte dos organismos. Como exemplo: para o lixiviado com 2% de nanotubo de carbono, na concentração C1 e C2 a longevidade foi de 90%, na C3 foi de 80%, na C4 aumentou para 100% e na C5 retornou para 80%. Contudo, em termos médios, considerando todas as concentrações (C1 a C5), ocorreu uma ligeira redução da sobrevivência dos organismos-teste, sendo mais expressiva para o lixiviado de mistura asfáltica convencional. Neste sentido, a longevidade foi de $80 \pm 10\%$ para o convencional, $86 \pm 11,4\%$ para o nanomodificado com

nanoargila e $88 \pm 8,4\%$ para o nanomodificado com nanotubo de carbono. Por fim, avaliando os efeitos em uma mesma região de concentração (0 a 10 mL/L) para todos lixiviados, constata-se uma maior oscilação na longevidade (100% a 70%) para os lixiviados convencional e com nanoargila, comparativamente ao lixiviado com nanotubo de carbono que oscilou de 100% a 90%.

- Parâmetro tamanho: com a exposição dos organismos aos extratos lixiviados, ao final dos 21 dias, houve propensão a ligeira redução no comprimento do crustáceo para o caso do lixiviado convencional e com nanotubo de carbono e, predisposição de ligeiro aumento para o lixiviado com nanoargila. Contudo, para todas as misturas, constata-se, que com o aumento das concentrações de lixiviado no meio (C1→C5), não houve uma correspondência de comportamento bem definida para o parâmetro tamanho, de forma geral, as variações são bastante pequenas, com oscilação dentro do desvio padrão ao longo das concentrações. Como por exemplo, para a mistura com 3% de nanoargila, entre as concentrações C1 e C5, respectivamente, o aumento de tamanho foi de 1,9% (C1), 1,9% (C2), 2,4% (C3), 1,2% (C4) e 0,9% (C5). Todavia, considerando a média de todas as concentrações (C1 a C5) de cada mistura asfáltica, houve uma redução no comprimento dos organismos-teste de $0,075 \pm 0,04$ mm (2,56%) para a mistura convencional e $0,035 \pm 0,05$ mm (1,60%) para a mistura com nanotubo de carbono e, um aumento de $0,047 \pm 0,02$ mm (1,66%) no comprimento dos organismos para a mistura com nanoargila. Adicionalmente, investigando uma mesma região de concentração (0 a 10 mL/L) para todos os lixiviados e, considerando o desvio padrão, não é possível evidenciar diferença de efeitos em função do tipo de extrato, ou seja, as variações no parâmetro tamanho são de mesma magnitude, independentemente do tipo de mistura asfáltica.

- Parâmetro reprodução: de forma geral, independentemente do tipo de mistura asfáltica, com a exposição dos organismos-teste aos extratos lixiviados, houve redução na reprodução (média). Contudo, não é possível verificar que o aumento da concentração de lixiviado no meio ocasiona uma maior redução na reprodução. Como por exemplo, para o caso da mistura convencional, a reprodução foi de +3,5% em C1, -17,1% em C2, -17% em C3, -16,2% em C4 e de -7,5% em C5. Além disso, as variações neste parâmetro oscilam dentro do desvio padrão ao longo do aumento da concentração. O número médio de filhotes, com base em todas as concentrações (C1 a C5), foi reduzido em 10,85% para o lixiviado convencional, 9,94% para o com nanotubo de carbono e 9,28% para o com nanoargila. Comparando uma mesma região de concentração (0 a 10 mL/L) para todos os lixiviados e, considerando o desvio padrão, não há diferença de efeitos em função do tipo de mistura asfáltica.

- Idade da primeira postura: de forma geral, para todas as misturas asfálticas, a adição das substâncias lixiviadas no meio, ocasionaram a redução no dia da primeira postura (média). Contudo, não é possível identificar que o aumento das concentrações dos lixiviados no meio, resultam diretamente em maior redução no dia da primeira postura. Para todas as substâncias testadas, as variações neste parâmetro com o aumento da concentração no meio, flutuam dentro do desvio padrão. Em termos médios, levando em conta todas as concentrações (C1 a C5), a diminuição de idade foi de 4,05% para o lixiviado com nanotubo de carbono, de 2,86% para o com nanoargila e de 0,92% para o convencional. Na região de mesma concentração (0 a 10 mL/L), comparando os diferentes extratos lixiviados e, considerando o desvio padrão, não há diferença de efeitos em função do tipo de mistura asfáltica.

Por fim, com base em todos os dados obtidos, a análise de variância (ANOVA) foi realizada para definir as diferenças significativas através da variabilidade entre os grupos. Neste sentido, apesar das alterações observadas nos parâmetros investigados (longevidade, tamanho, reprodução e idade de primeira postura), estatisticamente, com 95% de confiança, não foi confirmada nenhuma diferença significativa, indicando que as concentrações que causam toxicidade não foram encontradas (NE). Portanto, infere-se, para todos os parâmetros, que CEO e CENO são maiores que 8,5 mL/L para a mistura asfáltica convencional, 30 mL/L para a nanomodificada com nanoargila e 50 mL/L para a nanomodificada com nanotubo de carbono. Conclui-se, que nenhuma das amostras de lixiviado apresentou efeito toxicológico crônico

significativo ($p < 0,05$) para o organismo-teste (*Daphnia magna*). O que significa que houve uma boa estabilização e adesão da nanoargila e do nanotubo de carbono na matriz. Quanto à mistura convencional, apesar de apresentar-se nociva para eventos agudos, nas condições de exposição prolongada em concentrações subletais, ou seja, concentrações que permitem a sobrevivência dos organismos, mas que afetam suas funções biológicas, o extrato lixiviado não se apresentou tóxico.

Complementa-se ainda, para todas as misturas asfálticas, que as ligeiras alterações nos parâmetros avaliados, podem ter sido ocasionadas pela menor quantidade de nutrientes que ficam disponíveis no meio em função da adição das amostras de lixiviados e não propriamente pela composição dos extratos lixiviados.

5. Conclusões

O presente artigo apresentou os resultados de uma pesquisa sobre a avaliação da toxicidade de lixiviados de misturas asfálticas nanomodificadas em relação ao organismo *Daphnia magna*. Para tanto, foi realizada a lixiviação de uma mistura convencional, de uma com 2% de nanotubo de carbono e outra com 3% de nanoargila organofílica. A partir das substâncias obtidas no procedimento de lixiviação foram conduzidos os testes toxicológicos. Com base na discussão dos resultados apresentadas anteriormente, pode-se concluir:

- Quanto à toxicidade aguda (*Daphnia magna*), a mistura asfáltica convencional apresenta-se como material nocivo de acordo com a diretiva UE 93/67/EEC (1993) e as misturas com adição de 2% de nanotubo de carbono e 3% de nanoargila não apresentam classificação de toxicidade aguda.
- Há um indicativo que os nanomateriais, nos teores incorporados no ligante asfáltico, reduziram a toxicidade aguda do material asfáltico, atuando como uma barreira na liberação de substâncias prejudiciais ao organismo-teste (*Daphnia magna*).
- No que se refere à toxicidade crônica (*Daphnia magna*), apesar de ligeiras alterações nos parâmetros analisados (longevidade, tamanho, reprodução e idade da primeira postura), nenhum dos lixiviados das misturas causaram efeitos significativos ($p < 0,05$) no organismo-teste, podendo-se afirmar, como 95% de confiança, que não apresentam toxicidade crônica.
- Para o organismos-teste utilizado, não há indícios de impactos negativos associados diretamente à utilização de 2% de nanotubo de carbono e 3% de nanoargila em misturas asfálticas. Contudo, futuras pesquisas em diferentes cenários, como em organismos que vivem no solo ou em sedimentos, devem ser desenvolvidas para complementar o perfil toxicológico dos lixiviados nanomodificados, auxiliando na tomada de decisão quanto ao uso destes materiais em superfícies de pavimentos.

6. Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento dos Programas de Pós-graduação no País e aos seguintes laboratórios da Universidade Federal de Santa Catarina: Laboratório de Toxicologia Ambiental (LABTOX/ENS), Laboratório de Materiais de Construção Civil (LMCC/ECV), Laboratório de Pavimentação (LabPav/ECV), Laboratório de Nanotecnologia (Nanotec/ECV) e Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME).

7. Referências

AASHTO (2017) M323 – Standard specification for Superpave volumetric mix design.

American Association Of State Highway And Transportation, USA.

AASHTO (2017) R35 – Standard practice for Superpave volumetric design for hot-mix asphalt (HMA). American Association Of State Highway And Transportation, USA.

AASHTO (2017) T176 – Standard method of test for plastic fines in graded aggregates and soils by use of the sand equivalent test. American Association Of State Highway And Transportation, USA.

ABNT (2004) NBR 10005 – Procedimento para obtenção de extrato lixiviado de resíduos sólido. Associação Brasileira de Normas Técnicas, Brasil.

ABNT (2016) NBR 12713 – Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com *Daphnia spp* (Crustacea, Cladocera). Associação Brasileira de Normas Técnicas, Brasil.

Alves, C.A. Vicente, A.M.P. Calvo, A.I. Baumgardner, D. Amato, F. Querol, X. Pio, C. Gustafsson, M. (2020) Physical and chemical properties of non-exhaust particles generated from wear between pavements and tyres. **Atmospheric Environment** 224, 117252. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2019.117252>

Amini, A., Ziari, H., Saadatjoo, S.A., Hashemifar, N.S., Goli, A. (2021) Rutting resistance, fatigue properties and temperature susceptibility of nano clay modified asphalt rubber binder. **Construction and Building Materials** 267, 120946. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.120946>

Ashish, P.K., Singh, D. (2019) Effect of Carbon Nano Tube on performance of asphalt binder under creep-recovery and sustained loading conditions. **Construction and Building Materials** 215, 523–543. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2019.04.199>

Ashish, P.K., Singh, D., Bohm, S. (2016) Evaluation of rutting, fatigue and moisture damage performance of nanoclay modified asphalt binder. **Construction and Building Materials** 113, 341–350. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2016.03.057>

ASTM (2015) C127 – Standard test method for density, relative density (specific gravity), and absorption of coarse aggregate. American Society for Testing and Materials, Pensilvânia, EUA.

ASTM (2016) D6373 – Standard specification for performance graded asphalt binder. American Society for Testing and Materials, Pensilvânia, EUA.

ASTM (2016) D7643 – Standard practice for determining the continuous grading temperatures and continuous grades for PG graded asphalt binders. American Society for Testing and Materials, Pensilvânia, EUA.

ASTM (2019) D2041 – Standard test method for theoretical maximum specific gravity and density of asphalt mixtures. American Society for Testing and Materials, Pensilvânia, EUA.

ASTM (2020) C131 – Standard test method for resistance to degradation of small-size coarse aggregate by abrasion and impact in the Los Angeles machine. American Society for Testing and Materials, Pensilvânia, EUA.

ASTM (2020) D5 – Standard test method for penetration of bituminous materials. American Society for Testing and Materials, Pensilvânia, EUA.

Baalousha, M., Yang, Y., Vance, M.E., Colman, B.P., McNeal, S., Xu, J., Blaszcak, J., Steele, M., Bernhardt, E., Hochella, M.F., Jr. (2016) Outdoor urban nanomaterials: The emergence of a new, integrated, and critical field of study. **Science of The Total Environment** 557–558, 740–753. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.03.132>

Babagoli, R. (2021) Laboratory investigation of the performance of binders and asphalt mixtures modified by carbon nano tube, poly phosphoric acid, and styrene butadiene rubber. **Construction and Building Materials** 275, 122178. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.122178>

Borrely, S. I. (2001) Redução da toxicidade aguda de efluentes industriais e domésticos tratados por irradiação com feixe de elétrons, avaliada com as espécies *V. fischeri*, *D. similis* e *P. reticulata*. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, Brazil.

Chen, C., Tang, B., Cao, X., Gu, F., Huang, W. (2021) Enhanced photocatalytic decomposition of NO on portland cement concrete pavement using nano-TiO₂ suspension. **Construction and Building Materials** 275, 122135. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.122135>

Costa Puerari, R., Gonçalves, R.A., Mottim Justino, N., Schulz Vicentini, D., Gerson Matias, W. (2020) The influence of amine-functionalized SiO₂ nanostructures upon nanofiltration membranes. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management** 13, 100287. <https://doi.org/10.1016/j.enmm.2020.100287>

Das, A.K., Singh, D. (2021) Evaluation of fatigue performance of asphalt mastics composed of nano hydrated lime filler. **Construction and Building Materials** 269, 121322. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.121322>

de Melo, J.V.S., Trichês, G. (2016) Effects of Organophilic Nanoclay on the Rheological Behavior and Performance Leading to Permanent Deformation of Asphalt Mixtures. **J. Mater. Civ. Eng.** 28, 04016142. [https://doi.org/10.1061/\(asce\)mt.1943-5533.0001650](https://doi.org/10.1061/(asce)mt.1943-5533.0001650)

de Melo, J.V.S., Trichês, G. (2017) Evaluation of properties and fatigue life estimation of asphalt mixture modified by organophilic nanoclay. **Construction and Building Materials** 140, 364–373. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.02.143>

de Melo, J.V.S., Trichês, G., de Rosso, L.T. (2018) Experimental evaluation of the influence of reinforcement with Multi-Walled Carbon Nanotubes (MWCNTs) on the properties and fatigue life of hot mix asphalt. **Construction and Building Materials** 162, 369–382. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.12.033>

European Commission (1993) **UE 93/67/EEC**: Technical guidance document in support of commission directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and commission regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances.

Facin, F. (2020) Avaliação da toxicidade sob *Landoltia Punctata* e *Daphnia Magna* de lixiviados de revestimentos asfálticos e de concreto de cimento Portland nanomodificados. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-graduação em Engenharia Civil, Florianópolis, Brazil.

Fakhri, M., Rahimzadeh Mottahed, A. (2021) Improving moisture and fracture resistance of warm mix asphalt containing RAP and nanoclay additive. **Construction and Building Materials** 272, 121900. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.121900>

Iskender, E. (2016) Evaluation of mechanical properties of nano-clay modified asphalt mixtures. **Measurement** 93, 359–371. <https://doi.org/10.1016/j.measurement.2016.07.045>

ISO (2000) 10706 – Water quality -- Determination of long term toxicity of substances to *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea). International Organization for Standardization.

ISO (2012) 6341 – Water quality -- Determination of the inhibition of the mobility of *Daphnia magna* Straus (Cladocera, Crustacea) -- Acute toxicity test. International Organization for Standardization.

Knie, J. L. et al. (2004) Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações. **FATMA: GTZ**, ISBN 85-87391-05-4.

Lead, J.R., Batley, G.E., Alvarez, P.J.J., Croteau, M.-N., Handy, R.D., McLaughlin, M.J., Judy, J.D., Schirmer, K. (2018) Nanomaterials in the environment: Behavior, fate, bioavailability, and effects-An updated review. **Environ Toxicol Chem** 37, 2029–2063. <https://doi.org/10.1002/etc.4147>

Li, R., Xiao, F., Amirkhanian, S., You, Z., Huang, J. (2017) Developments of nano materials and technologies on asphalt materials – A review. **Construction and Building Materials** 143, 633–648. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2017.03.158>

Li, Z., Hu, M., Song, H., Lin, D., Wang, Y. (2021) Toxic effects of nano-TiO₂ in bivalves—A synthesis of meta-analysis and bibliometric analysis. **Journal of Environmental Sciences** 104, 188–203. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.11.013>

Mauter, M.S., Zucker, I., Perreault, F., Werber, J.R., Kim, J.-H., Elimelech, M. (2018) The role of nanotechnology in tackling global water challenges. **Nat Sustain** 1, 166–175. <https://doi.org/10.1038/s41893-018-0046-8>

McQueen, C. (2017) **Comprehensive toxicology**. Elsevier Science, 3rd Edition, ISBN 9780081006122.

Nogueira, D.J., Vaz, V.P., Neto, O.S., Silva, M.L.N. da, Simioni, C., Ouriques, L.C., Vicentini, D.S., Matias, W.G. (2020) Crystalline phase-dependent toxicity of aluminum oxide nanoparticles toward *Daphnia magna* and ecological risk assessment. **Environmental Research** 182, 108987. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108987>

OECD (2006) 211 – Test No. 211: *Daphnia magna* Reproduction Test. Organisation for Economic Co-operation and Development.

Rochishnu, E., Ramesh, A., Venkat Ramayya, V. (2020) Sustainable pavement technologies - performance of high RAP in WMA surface mixture containing nano glass fibers. **Materials Today: Proceedings**. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.07.643>

Santagata, E., Baglieri, O., Tsantilis, L., Dalmazzo, D. (2012) Rheological Characterization of Bituminous Binders Modified with Carbon Nanotubes. **Procedia - Social and Behavioral Sciences** 53, 546–555. <https://doi.org/10.1016/j.sbspro.2012.09.905>

Sedaghat, B., Taherian, R., Hosseini, S.A., Mojtaba Mousavi, S. (2020) Rheological properties of bitumen containing nanoclay and organic warm-mix asphalt additives. **Construction and Building Materials** 243, 118092. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.118092>

Sobańska, Z., Sitarek, K., Gromadzińska, J., Świercz, R., Szparaga, M., Domeradzka-Gajda, K., Kowalczyk, K., Zapór, L., Wąsowicz, W., Grobelny, J., Ranoszek-Soliwoda, K., Tomaszewska, E., Celichowski, G., Roszak, J., Stępnik, M. (2020) Assessment of acute toxicological effects of molybdenum (IV) disulfide nano- and microparticles after single intratracheal administration in rats. **Science of The Total Environment** 742, 140545. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140545>

Wang, R., Yue, M., Xiong, Y., Yue, J. (2021) Experimental study on mechanism, aging, rheology and fatigue performance of carbon nanomaterial/SBS-modified asphalt binders. **Construction and Building Materials** 268, 121189. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.121189>

Xin, X., Yao, Z., Shi, J., Liang, M., Jiang, H., Zhang, J., Zhang, X., Yao, K. (2020) Rheological properties, microstructure and aging resistance of asphalt modified with CNTs/PE composites. **Construction and Building Materials** 262, 120100. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2020.120100>

Yao, H., You, Z., Li, L., Goh, S.W., Lee, C.H., Yap, Y.K., Shi, X. (2013) Rheological properties and chemical analysis of nanoclay and carbon microfiber modified asphalt with Fourier transform infrared spectroscopy. **Construction and Building Materials** 38, 327–337. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2012.08.004>

Yao, H., You, Z., Li, L., Shi, X., Goh, S.W., Mills-Beale, J., Wingard, D. (2012) Performance of asphalt binder blended with non-modified and polymer-modified nanoclay. **Construction and Building Materials** 35, 159–170. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2012.02.056>

Zare-Shahabadi, A., Shokuhfar, A., Ebrahimi-Nejad, S. (2010) Preparation and rheological characterization of asphalt binders reinforced with layered silicate nanoparticles. **Construction and Building Materials** 24, 1239–1244. <https://doi.org/10.1016/j.conbuildmat.2009.12.013>