

TOXICIDADE AGUDA DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PAREDE MÚLTIPLA

Arlinda de Jesus Rodrigues Resende ¹

Davi de Souza Alves ²

Arthur Arnoni Occhiutto ³

Lucilaine Valéria de Souza Santos ⁴

Antonio Rodrigues da Cunha Neto ⁵

Breno Régis Santos ⁶

Sistema de produção sustentável (agricultura orgânica, permacultura, biodinâmica, agroecologia)

Resumo

A utilização de nanotubos de carbono vem sendo muito empregada na agricultura devido à sua eficiência em fornecer nutrientes às plantas, promovendo assim seu crescimento e desenvolvimento de forma eficaz, além de diminuir os impactos ambientais gerados por insumos químicos. No entanto, estudos e pesquisas aferindo seus efeitos toxicológicos para o meio ambiente ainda se encontram em fase de desenvolvimento. Neste sentido, o presente trabalho buscou aferir os efeitos toxicológicos das nanopartículas sobre populações da bactéria luminescente *Allivibrio fischeri*, usada como bioindicadora do teste Microtox, que busca medir a toxicidade de determinada amostra analisando a inibição dos níveis de fluorescência após a exposição. O teste Microtox revelou, através do valor CE50, que os nanotubos de carbono apresentam toxicidade considerável para *Allivibrio fischeri*. Os resultados obtidos sugerem que tais nanopartículas podem potencialmente prejudicar microbiotas, desequilibrando cadeias tróficas e ciclos biogeoquímicos por consequência, apesar de efeitos benéficos para as plantas terem sido evidenciados quando em baixas concentrações.

Palavras-chave: *Aliivibrio fischeri*; Microtox; Nanotecnologia

¹Mestranda em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Alfenas – Instituto de Ciências da Natureza, arlinda.resende@sou.unifal-mg.edu.br

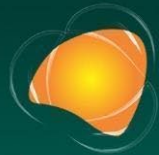
²Graduando em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Alfenas – Instituto de Ciências da Natureza, davi.alves@sou.unifal-mg.edu.br

³ Mestrando em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Alfenas – Instituto de Ciências da Natureza, arthur.aocc@gmail.com

⁴ Pesquisadora de pós-doutorado em Tecnologia de Produtos e Processos do CEFET/MG, lucilainevaleria@yahoo.com.br

⁵ Pesquisador de pós-doutorado em Ciências Ambientais, Universidade Federal de Alfenas – Instituto de Ciências da Natureza, antoniorodrigues.biologia@gmail.com

⁶ Professor Universidade Federal de Alfenas – Instituto de Ciências da Natureza, breno.santos@unifal-mg.edu.br



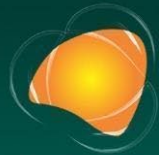
INTRODUÇÃO

Com o objetivo de minimizar os impactos da poluição ambiental causados pelo uso excessivo de agroquímicos, além de aumentar a produtividade e a qualidade das culturas, a nanotecnologia surge como uma solução promissora para superar as barreiras na implementação de uma agricultura mais sustentável e resiliente (Rabiee et al., 2019).

Dentre esses nanomateriais, os nanotubos de carbono (CNTs) destacam-se como folhas cilíndricas de grafeno que podem ser classificadas em nanotubos de parede simples (SWCNTs) ou parede múltipla (MWCNTs) (Peng et al., 2020). Os CNTs têm mostrado grande potencial na agricultura moderna, principalmente por promover o crescimento das plantas, fornecendo nutrientes de maneira mais eficiente, sem perdas significativas por lixiviação ou volatilização, graças à sua capacidade de penetrar nas paredes celulares (Kwak et al., 2019).

No entanto, o uso crescente de nanomateriais na indústria global tem gerado preocupações sobre seus possíveis efeitos toxicológicos no meio ambiente, com impactos diretos nos ecossistemas. No Brasil, a regulamentação do uso de nanomateriais ainda está em fase de discussão, e não há normativas específicas estabelecidas (Lazzaretti & Hupffer, 2019). Da mesma forma, a ausência de uma padronização para a avaliação da toxicidade das nanopartículas dificulta a comparação dos resultados obtidos em diferentes estudos. Contudo, ensaios *in vitro* e *in vivo* têm sido amplamente utilizados para avaliar a toxicidade dessas substâncias (Zielińska et al., 2020).

Um dos métodos de avaliação toxicológica mais utilizados é o teste microtox, um bioensaio que mede a luminescência da bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*, uma bactéria gram-negativa em formato de bastonete (Mutalib & Ghanem, 2017). Esse ensaio é rápido, com duração entre 5 e 30 minutos, e permite estimar a toxicidade aguda de amostras de água, lodo de esgoto, solo, compostos puros e suas misturas. A *A. fischeri* é extremamente sensível a uma ampla variedade de substâncias tóxicas, e, quando exposta a ambientes contaminados, sua bioluminescência é reduzida. Essa diminuição é medida em termos percentuais e correlacionada com o nível de toxicidade. O resultado do teste gera um valor de EC50, que representa a concentração da substância capaz de inibir 50% da bioluminescência

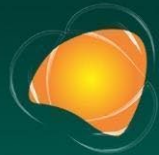


bacteriana. Devido à sua eficácia, o bioensaio microtox é amplamente aceito em estudos de ecotoxicidade (Turek et al., 2020). Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar o potencial toxicológico dos nanotubos de carbono utilizando o bioensaio com *Allivibrio fischeri*, buscando uma compreensão mais ampla de como esses nanomateriais podem impactar o ambiente e os ecossistemas.

METODOLOGIA

Para realização dos bioensaios utilizando as bactérias marinhas luminescente, *Allivibrio fischeri*, foi utilizado o equipamento MICROTOX®, modelo 500 Analyzer (SDI), presente no Laboratório de Ensaio biológicos do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG. Os testes foram realizados de acordo com a norma ABNT NBR 15411-3: Ecotoxicologia Aquática – Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio Fischeri* e seguindo procedimento recomendado pelo fabricante do próprio equipamento MICROTOX®. Previamente ao teste, o pH e a salinidade das amostras foram aferidos, não necessitando de ajuste de acordo com os requisitos do teste. As bactérias utilizadas nestes ensaios são armazenadas na forma liofilizada e ativadas antes do uso por meio de uma solução de reconstituição, a qual compreende as bactérias luminescentes liofilizadas. Previamente, faz-se teste de sensibilidade com solução de sulfato de zinco heptahidratado, utilizado como substância de referência (100 mg L⁻¹) para controle de qualidade da bactéria.

A concentração de efeito (CE50) foi determinada a partir do Teste Básico MICROTOX® 81,9% para amostras, usando 9 concentrações (81,9%, 40,95%, 20,48%, 10,24%, 5,12%, 2,56%, 1,28%, 0,64% e 0,32% v/v). A toxicidade aguda foi determinada a partir das diluições das amostras e, as medições da bioluminescência das bactérias foi lida após 30 minutos. O controle para esses ensaios é a solução diluente de cloreto de sódio (NaCl) 2%, por se tratar de bactérias marinhas, não apresentando toxicidade. Os resultados obtidos do controle são usados para validar a luminescência, portanto não é apresentado, mas utilizado para determinar o efeito tóxico dos tratamentos. O software MicrotoxOmni® faz a comparação, em função da luz emitida, entre as amostras e a solução controle. Quanto mais luz emitida, menor a toxicidade da amostra. A toxicidade da amostra é representada em porcentagem de Concentração Efetiva capaz de gerar efeito sobre metade da população (CE50), sendo



que o efeito se dá pela inibição em relação medição da luminescência da amostra controle (GÁMEZ et al., 2019; HALMI et al., 2014; SANTOS, CAROLINA RODRIGUES et al., 2023). Para este teste os resultados foram expressos em CE50 sem testes de médias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Ao expor a bactéria *Allivibrio fischeri* ao nanotubo de carbono foi obtido a curva de luminescência das bactérias em relação às diluições e calculado o valor de CE50 o qual resultou em 45,44% (Figura 1).

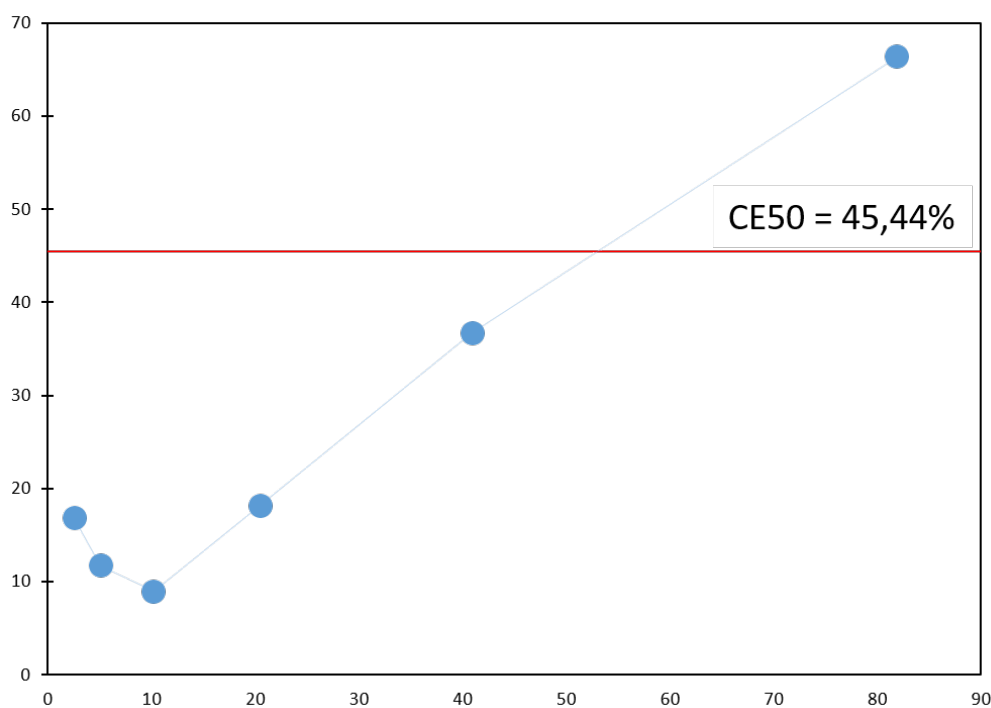
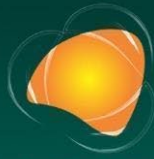


Figura 1. Valor de CE50 dos nanotubos de carbono.

Esta porcentagem indica a toxicidade dos nanotubos de carbono para a microbiota, uma vez que este resultado se encontra nessa faixa de classificação. A exposição da bactéria *Allivibrio fischeri* aos nanotubos de carbono revela uma toxicidade significativa, conforme indicado pelo valor de CE50 de



EXTREMOS CLIMÁTICOS: IMPACTOS ATUAIS E RISCOS FUTUROS

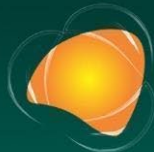
45,44%. O CE50, ou Concentração Efetiva 50%, é uma medida utilizada para determinar a concentração de uma substância que causa um efeito em 50% da população testada, no caso, a diminuição da luminescência bacteriana (Turek et al., 2020). Esse resultado indica que, em uma concentração de aproximadamente 45,44% dos nanotubos de carbono, ocorre uma redução considerável da atividade luminescente da *A. fischeri*. A luminescência reduzida sugere um comprometimento da viabilidade ou função metabólica da bactéria, evidenciando a toxicidade dos nanotubos para organismos dessa microbiota (Mutalib & Ghanem, 2017).

Esse valor de CE50 coloca os nanotubos de carbono em uma faixa de classificação que merece atenção em estudos ecotoxicológicos, uma vez que essa concentração representa um nível de toxicidade relevante para a microbiota aquática. A *A. fischeri* é uma espécie sensível e amplamente utilizada como bioindicadora de toxicidade em ambientes aquáticos (Mutalib & Ghanem, 2017), e os resultados sugerem que a presença de nanotubos de carbono no meio ambiente pode impactar a saúde de comunidades microbianas essenciais. Esses impactos podem levar à perturbação das cadeias tróficas e da biogeoquímica local, comprometendo a qualidade dos ecossistemas em que esses materiais são dispersos.

CONCLUSÕES

O presente trabalho demonstrou que nanotubos de carbono de parede múltipla apresentaram efeitos tóxicos à bactéria *Allivibrio fischeri*. Os MWCNTs reduziram a bioluminescência de *A. fischeri* e comprometeram a viabilidade da bactéria. Os resultados indicam que os MWCNTs podem impactar negativamente a comunidade microbiana, sugerindo possível toxicidade em plantas superiores e, conseqüentemente, ao ecossistema. No entanto, estudos mais aprofundados são necessários, pois há evidências de que, em concentrações reduzidas CNTs podem promover benefícios fisiológicos em diversas plantas, além de serem potenciais biorremediadores de solos contaminados.

AGRADECIMENTOS



The authors would like to thank Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [Funding Code 001], CAPES/BRASIL PDPG No. 1026/2022, CAPES/BRASIL PDPG-POSDOC No. 2930/2022, CAPES/BRASIL MEC/SESu/FNDE/PET. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) [BPD-00571-22] for their financial support and research scholarships.

REFERÊNCIAS

LAZZARETTI, L. L.; HUPFFER, H. M. **NANOTECHNOLOGIES AND ITS REGULATIONS IN BRAZIL**. REVISTA GESTÃO E DESENVOLVIMENTO, v. 16, n. 3, p. 153–177, 2019.

MUTALIB, M. I. A.; GHANEM, O. B. **ECOTOXICITY OF IONIC LIQUIDS TOWARDS VIBRIO FISCHERI: EXPERIMENTAL AND QSAR STUDIES**. PROGRESS AND DEVELOPMENTS IN IONIC LIQUIDS, v. 1, p. 429–449, 2017.

SAVAGE, D. T.; HILT, J. Z.; DZIUBLA, T. D. **IN VITRO METHODS FOR ASSESSING NANOPARTICLE TOXICITY**. METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, 1894, p. 1–29, 2019.

TUREK, M.; ROZYCKA-SOKOLOWSKA, E.; OWSIANIK, K.; MARCINIAK, B.; BALCZEWSKI, P. **MODIFICATION OF THE MICROTOX® BASIC SOLID PHASE TEST: A NEW APPLICATION FOR THE ECOTOXICOLOGICAL STUDIES ON POORLY SOLUBLE ANTIHYPERTENSIVE DRUGS**. JOURNAL OF HAZARDOUS MATERIALS, 399, P. 122839–122866, 2020.

VERMA, S. K.; NANDI, A.; SINHA, A.; PATEL, P.; JHA, E.; MOHANTY, S., PANDA, P. K.; AHUJA, R.; MISHRA, Y. K., SUAR, M. **ZEBRAFISH (*Danio rerio*) AS AN ECOTOXICOLOGICAL MODEL FOR NANOMATERIAL INDUCED TOXICITY PROFILING**. PRECISION NANOMEDICINE, v. 4, n. 1, p. 750–781, 2021.

ZIELINSKA, A.; COSTA, B.; FERREIRA, M. V.; MIGUÉIS, D.; LOUROS, J. M. S.; DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; EDER, P.; CHAUD, M. V.; MORSINK, M.; WILLEMEN, N.; SEVERINO, P.; SANTINI, A.; SOUTO, E. B. **NANOTOXICOLOGY AND NANOSAFETY: SAFETY-BY-DESIGN AND TESTING AT A GLANCE**. INTERNATIONAL JOURNAL OF ENVIRONMENTAL RESEARCH AND PUBLIC HEALTH, v. 17, n. 13, p. 1–22, 2020.