

## AVALIAÇÃO DO EFEITO DA EXPOSIÇÃO À NANOFIBRA DE CELULOSE EM INVERTEBRADOS AQUÁTICOS

Paula, V. J. de<sup>1,2</sup>; Castro, V. L. S.<sup>2</sup>; Corrêa, A.C.<sup>3</sup>; Clemente, Z.<sup>2,4</sup> e Jonsson, C. M.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Bolsista de Treinamento Técnico (TT-3) Fapesp – Embrapa Meio Ambiente

<sup>2</sup>Laboratório de Ecotoxicologia e Biossegurança, Embrapa Meio Ambiente (CNPMA), Jaguariúna, SP

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência dos Materiais – UFScar, São Carlos, SP

<sup>4</sup>Programa de Pós-graduação em Biologia Funcional e Molecular – UNICAMP, Campinas, SP

e-mail de contato: claudio.jonsson@embrapa.br

**Projeto Componente:** PC6 **Plano de Ação:** PA6

### Resumo

As nanofibras de celulose mostram uso promissor na indústria de alimentos. Apesar da esperada inocuidade, é necessário avaliar seus possíveis efeitos adversos decorrentes do seu despejo em corpos de água. Avaliaram-se parâmetros toxicológicos decorrentes da exposição às nanofibras de celulose nos microcrustáceos *Daphnia similis* e *Artemia salina*. A nanofibra de celulose não ocasionaria um risco apreciável para organismos zooplancônicos já que a concentração de efeito não observado (CENO), segundo os parâmetros avaliados, é superior a 100 mg L<sup>-1</sup>.

**Palavras-chave:** nanofibra, toxicidade, celulose, microcrustáceo, *Daphnia*, *Artemia*

### Introdução

As nanofibras são materiais tecnológicos novos e de relevância emergente. Um dos seus usos mostra-se promissor em filmes antimicrobianos para conservação de alimentos [GE et al., 2012]. As nanofibras de celulose são polímeros biodegradáveis cuja estrutura mostra alta resistência, baixa adsorção de umidade, alta estabilidade térmica, adequadas propriedades de barreira e alta transparência óptica. Apesar da esperada inocuidade destes materiais, é necessário avaliar seus possíveis efeitos adversos na biota aquática por consequência de sua introdução em corpos de água através de despejos de fontes de origem doméstica, industrial ou rural. Assim, avaliaram-se parâmetros toxicológicos decorrentes da exposição às nanofibras de celulose em duas espécies de microcrustáceos comumente usados como bioindicadoras de poluição de sistemas aquáticos [ZAGATTO; BERTOLETTI, 2006].

### Materiais e métodos

Material-teste: Foram utilizadas nanofibras de celulose extraídas de algodão branco comercial com HCl e mistura HCl:H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, as quais

apresentam características adequadas para serem empregadas como reforço a matrizes poliméricas que requerem uma maior temperatura de processamento (>200 °C). As dimensões das nanofibras avaliadas foram: L = 135 ± 50 nm e D = 14 ± 4 nm. Imediatamente após o processo de sonicação, as suspensões apresentaram-se homogêneas e bem dispersas.

Avaliação da toxicidade aguda para *Daphnia similis* - Como organismo-teste utilizou-se o microcrustáceo de água doce *D. similis* com idade inferior a 24 horas. O invertebrado foi previamente cultivado em água de cloração, com dureza total = 53,58 mg L<sup>-1</sup> CaCO<sub>3</sub>; pH = 7,5 e condutividade = 111,4 µS cm<sup>-1</sup>. Os organismos foram mantidos em sala climatizada sob temperatura controlada a 20±2°C, luminosidade de aproximadamente 1.000 lux e alimentados com a alga clorofícea *Pseudokirchneriella subcapitata*.

Os organismos foram expostos por 48 horas às concentrações de 0,0 (controle), 0,1; 1,0; 10,0 e 100,0 mg L<sup>-1</sup> do material-teste.

Avaliação da toxicidade aguda para *Artemia salina* - Foram utilizados, como organismos-teste, indivíduos jovens do crustáceo *Artemia salina*. Aproximadamente 48 horas antes do início do teste, 300 ml de água de mar sintética (Sera Premium, Sera GmbH, Heinsberg) foram

colocados em um erlenmayer de 500 ml. Neste recipiente foram adicionados cerca de 50 mg de cistos de *Artemia* (INVE Aquaculture Inc, Ogden). A suspensão de cistos foi mantida sob intensa aeração através de uma pedra porosa à temperatura de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  e luminosidade de  $\sim 1500$  lux. Os náuplios obtidos foram expostos por 48 horas às concentrações de 0,0 (controle), 0,1; 1,0; 10,0 e 100,0  $\text{mg L}^{-1}$  do material-teste. Os resultados de imobilidade dos organismos face às diferentes concentrações dos agentes químicos foram submetidos à análise numérica utilizando-se o programa Statgraphics Plus Version 5.1.

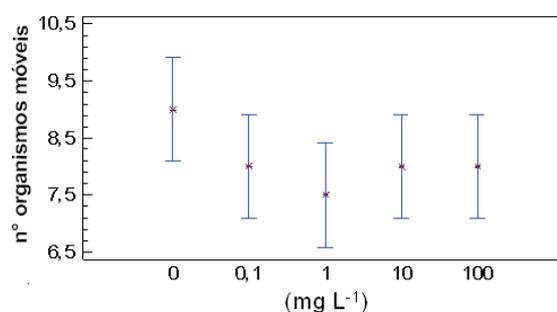
Avaliação do efeito da nanofibra de celulose em *D. similis* durante 7 dias de exposição: crescimento e imobilidade - Um neonato de *D. similis* foi colocado num becker de 50 mL num volume total de 30 mL. Foram usadas 10 réplicas para cada concentração-teste: 0,0 (controle); 0,1; 1,0; 10,0; e 100,0  $\text{mg L}^{-1}$ . As suspensões-teste foram renovadas em períodos aproximados de 48 horas durante 7 dias, sendo que os organismos de cada recipiente eram retirados periodicamente para avaliar a medida do comprimento total do indivíduo. Neste caso considerou-se o comprimento da cabeça até o final da carapaça, desconsiderando o espinho apical. A medida foi realizada utilizando-se um estereomicroscópio ao que foi acoplada uma câmera digital, sendo que a análise da imagem foi feita utilizando-se o programa MB-Ruler [JOHNSON; DELANEY, 1998]. Calcularam-se as taxas de crescimento (unidades MB-Ruler.  $\text{d}^{-1}$ ) para cada concentração testada, através da obtenção do coeficiente angular das curvas de regressão (comprimento do organismo vs. tempo). As taxas de crescimento em função de cada tratamento foram comparadas pelo módulo One Way Anova do programa Statgraphic Plus Version 5.1. Também se registrou o número de indivíduos móveis em cada tempo de exposição.

## Resultados e discussão

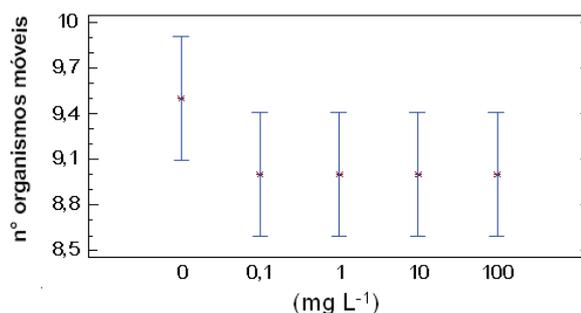
Nas Fig. 1 e 2 estão apresentados os resultados referentes à exposição dos dois microcrustáceos a diferentes concentrações do material-teste.

Observou-se mobilidade de 90 e 95% em relação ao controle, respectivamente para *D. similis* e *A. salina*, mesmo para a maior concentração testada (100,0  $\text{mg L}^{-1}$ ). As concentrações testadas não permitiram estabelecer uma relação dose-resposta, necessária para calcular a concentração que afeta 50% dos

organismos durante o período de exposição (CE50-48h). Para o material-teste avaliado não se constatou diferença significativa no nível de 95% de certeza ( $P > 0,05$ ), quanto à mobilidade dos organismos expostos material-teste, comparativamente aos não expostos. Os dados foram avaliados pelo módulo "One Way ANOVA"; já que a não obtenção de imobilidades parciais impossibilitaram utilizar o módulo "Probit Analysis" para o cálculo da CE50-48h. Assim, foram atribuídos valores de CE50-48h superiores a 100  $\text{mg L}^{-1}$ . Segundo a classificação da EPA, materiais-teste com valores de CE50  $\geq 100$   $\text{mg L}^{-1}$  são considerados como "praticamente não tóxicos" [USEPA, 1985].



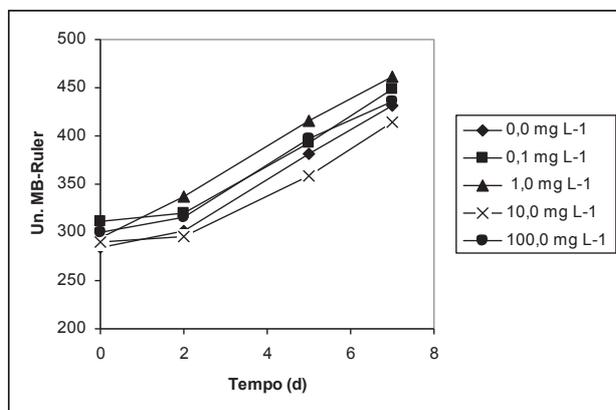
**Fig. 1:** Efeito da nanofibra de celulose sobre a mobilidade de *D. similis* após 48 h de exposição. Os pontos representam as médias de duas réplicas contendo 10 organismos cada, e as barras verticais o intervalo de confiança 95%.



**Fig. 2:** Efeito da nanofibra de celulose sobre a mobilidade de *A. salina* após 48 h de exposição. Os pontos representam as médias de duas réplicas contendo 10 organismos cada, e as barras verticais o intervalo de confiança 95%.

Na Fig. 3 são apresentados os resultados referentes ao efeito do material-teste sobre o crescimento do microcrustáceo. No 7º dia constatou-se um aumento de aproximadamente

52% de tamanho nos organismos não expostos. Na maior concentração testada este aumento foi semelhante (45%). As curvas de crescimento nas diversas concentrações testadas apresentaram padrão semelhante comparativamente ao controle. Para cada tratamento, não se observou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) nas taxas de crescimento em relação ao controle.



**Fig. 3:** Variação do tamanho (unidades MB-Ruler) de *D. similis* em função do tempo de exposição à nanofibra de celulose sob diferentes concentrações. Cada ponto é a média de 10 observações para cada tratamento.

**Tab. 1:** Porcentagem de mobilidade de *D. similis* exposta à diferentes concentrações de nanofibra de celulose durante 7 dias.

Tempo (d)	Concentração (mg L <sup>-1</sup> )				
	0,0	0,1	1,0	10,0	100,0
0	100	100	100	100	100
2	100	100	100	100	90
5	100	100	90	100	90
7	100	90	90	100	80

Na Tab. 1 são apresentados os resultados de mobilidade de *D. similis* em função da concentração do material-teste e de 7 dias de exposição. No último dia de exposição, a mobilidade nos recipientes-controle e nas concentrações 0,1 – 10 mg L<sup>-1</sup> variou entre 90 a 100%. Apesar de ter-se constatado imobilidade de 20% na maior concentração testada, tal efeito não foi considerado significativo já que está dentro da porcentagem de imobilidade permitida para os organismos que servem como controle (0,0 mg L<sup>-1</sup>), conforme protocolos para avaliação da toxicidade crônica [OECD, 1984].

## Conclusões

Conforme os dados apresentados no presente trabalho, a nanofibra de celulose não ocasionaria um risco apreciável para organismos zooplancônicos já que a concentração de efeito não observado (CENO), segundo os parâmetros avaliados, é superior a 100 mg L<sup>-1</sup>. Para atingir tal concentração seria necessária uma aplicação direta superior a 150 Kg do material-teste numa área equivalente a 1 ha, tendo uma coluna de água de 15 cm. Tal procedimento tem sido utilizado para efeito de avaliação de risco de agentes químicos [GE et al., 2012] e biológicos [BROWN et al., 2002].

## Agradecimentos

Os autores agradecem ao CNPq, Finep, Capes e Projeto MP1 Rede Agronano – Embrapa.

## Referências

- BROWN, M. D.; CARTER, J.; THOMAS, D.; PURDIE, D. M.; KAY, B. H. Pulse-exposure effects of selected insecticides to juvenile Australian crimson-spotted rainbowfish (*Melanotaenia duboulayi*). *Journal of Economic Entomology*, v.95, p. 294-298, 2002.
- GE, L.; ZHAO, Y. S.; MO, T.; LI, J. R.; LI, P. Immobilization of glucose oxidase in electrospun nanofibrous membranes for food preservation. *Food Control*, v. 26, p. 188 – 193, 2012.
- JOHNSON, I.; DELANEY, P. Development of a 7-Day *Daphnia magna* Growth Test Using Image Analysis. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, v. 61, p. 355-362, 1998.
- OECD. GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS: *Daphnia* sp., Acute Immobilisation Test and Reproduction Test, 202. OECD, Paris, 1984. 16 p.
- USEPA. United States Environmental Protection Agency.. Hazard Evaluation Division. Standard evaluation procedure: acute toxicity test for freshwater invertebrates. Washington, D.C., 1985. 12 p.
- ZAGATTO, P. A.; BERTOLETTI, E. *Ecotoxicologia Aquática – Princípios e Aplicações*. São Carlos: Editora Rima, 478 p.6, , 2006.