

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS – UNIFAL – MG

ARLINDA DE JESUS RODRIGUES RESENDE

**APLICAÇÃO DE NANOMATERIAIS DE CARBONO: EFEITOS
ECOTOXICOLÓGICOS E INFLUÊNCIA NO CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS**

Alfenas/MG

2025

ARLINDA DE JESUS RODRIGUES RESENDE

**APLICAÇÃO DE NANOMATERIAIS DE CARBONO: EFEITOS
ECOTOXICOLÓGICOS E INFLUÊNCIA NO CRESCIMENTO INICIAL DE PLANTAS**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG. Área de concentração: Tecnologias Ambientais Aplicadas.
Orientador: Dr. Breno Régis Santos.
Coorientador: Dra. Michele Valquíria dos Reis.

Alfenas/MG

2025

SISTEMA DE BIBLIOTECAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS BIBLIOTECA CENTRAL

Resende, Arlinda de Jesus Rodrigues.

Aplicação de nanomateriais de carbono: Efeitos ecotoxicológicos e influência no crescimento inicial de plantas / Arlinda de Jesus Rodrigues Resende. - Alfenas, MG, 2025.

71 f. : il. -

Orientador(a): Breno Régis Santos.

Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2025.

Bibliografia.

1. Nanotecnologia. 2. MWCNTs. 3. Óxido de grafeno. 4. Toxicidade. 5. Agricultura sustentável . I. Santos, Breno Régis, orient. II. Título.

ARLINDA DE JESUS RODRIGUES RESENDE

**APLICAÇÃO DE NANOMATERIAIS DE CARBONO: EFEITOS
ECOTOXICOLÓGICOS E INFLUÊNCIA NO CRESCIMENTO INICIAL DE
PLANTAS**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Tecnologias Ambientais Aplicadas.

Aprovada em: 07 de março de 2025

Prof. Dr. Breno Régis Santos
Universidade Federal de Alfenas

Prof. Dr. Thiago Corrêa de Souza
Universidade Federal de Alfenas

Prof.a Dr.a Giovana Esteves
Universidade Federal de Lavras



Documento assinado eletronicamente por **Breno Régis Santos, Professor do Magistério Superior**, em 07/03/2025, às 16:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_exter no=0, informando o código verificador **1460604** e o código CRC **4E663D88**.

*À minha família, especialmente à minha mãe,
meu maior exemplo de força e determinação.*

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Alfenas, especialmente ao Instituto de Ciências da Natureza.

Ao professor Breno Régis Santos, pela orientação e por me acompanhar durante anos, sempre confiando no meu potencial e me incentivando.

À professora Michele Valquíria dos Reis, pela coorientação e pela disposição em ajudar.

Ao pós-doutorando Antonio Rodrigues da Cunha Neto, por todos os conselhos, direcionamentos, por me auxiliar em todos os momentos.

A todos servidores do Instituto da Natureza, especialmente, aos membros do Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade (BIOGEN), pela amizade, companheirismo, desabafos, por cada risada em momentos exaustivos de bancada, serei eternamente grata e levarei cada momento comigo.

A todos que convivi durante esses anos e que de alguma forma, contribuíram para execução deste trabalho.

Às minhas queridas amigas que compartilharam comigo a moradia durante este período da pós-graduação, agradeço imensamente por todo o apoio, incentivo, desabafos e pelas preciosas alegrias encontradas nos mais simples instantes.

Aos meus amados familiares, em especial aos meus pais e ao meu irmão, minha eterna gratidão pelo apoio incondicional e por terem se dedicado incansavelmente para que eu alcançasse esta etapa. Reconheço todo o sacrifício e o árduo trabalho que realizaram para impulsionar meus sonhos.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

À CNPQ e FAPEMIG.

Gratidão!

RESUMO GERAL

A nanotecnologia na agricultura tem se destacado como uma ferramenta promissora para aumentar a produtividade, melhorar a resistência das culturas frente às adversidades, além de promover práticas agrícolas mais sustentáveis. Dentre os nanomateriais, os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs) e óxido de grafeno (GO) se destacam por sua capacidade de fornecer nutrientes sem perdas por lixiviação, melhorando o desempenho das plantas e reduzindo o uso de agrotóxicos. No entanto, a toxicidade de nanomateriais, especialmente o acúmulo em organismos e seus efeitos adversos na microbiota do solo, requer mais investigações, uma vez que há relatos de apoptose, geração de espécies reativas de oxigênio e impactos deletérios. A falta de regulamentações específicas para o uso desses materiais são barreiras à aplicação segura em larga escala, visando a agricultura sustentável. Objetivou-se avaliar o potencial dos MWCNTs em *Lactuca sativa* L., além de investigar a toxicidade residual de MWCNTs e GO utilizando a bactéria *Aliivibrio fischeri* e o vegetal superior *Lactuca sativa*. Para validar o efeito promotor de crescimento dos MWCNTs, as sementes de *L. sativa* foram embebidas em solução com diferentes concentrações, avaliando-se parâmetros germinativos e bioquímicos. Os resultados indicaram que, em baixas concentrações, os MWCNTs atuaram como promotores de crescimento inicial. No entanto, em concentrações mais altas, foram observados sinais de estresse oxidativo e danos à membrana celular, sem comprometimento significativo da germinação. Em um segundo estudo, foram utilizados bioensaios com *Aliivibrio fischeri* e *Lactuca sativa* para avaliar a toxicidade de MWCNTs e GO. O teste com *A. fischeri* revelou toxicidade para ambos nanomateriais doadores de carbono, com o GO sendo considerado muito tóxico e os MWCNTs apresentando toxicidade moderada. Os MWCNTs favoreceram o crescimento radicular de *Lactuca sativa*, enquanto o GO teve efeitos positivos nas menores concentrações, entretanto, gerou toxicidade em concentrações mais elevadas.

Palavras chave: Nanotecnologia, MWCNTs, óxido de grafeno, toxicidade, agricultura sustentável.

ABSTRACT

Nanotechnology in agriculture has emerged as a promising tool to increase productivity, enhance crop resilience to adversities, and promote more sustainable agricultural practices. Among nanomaterials, multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) and graphene oxide (GO) stand out for their ability to supply nutrients without leaching losses, improving plant performance and reducing the use of pesticides. However, the toxicity of nanomaterials, particularly their accumulation in organisms and adverse effects on soil microbiota, requires further investigation, as reports indicate apoptosis, generation of reactive oxygen species, and deleterious impacts. The lack of specific regulations for the use of these materials poses barriers to their safe large-scale application in pursuit of sustainable agriculture. The study aimed to evaluate the agronomic potential of MWCNTs in *Lactuca sativa* L., as well as investigate the residual toxicity of MWCNTs and GO using the bacterium *Aliivibrio fischeri* and the higher plant *Lactuca sativa*. To validate the growth-promoting effect of MWCNTs, *L. sativa* seeds were soaked in solutions with different concentrations, and germination and biochemical parameters were evaluated. The results indicated that MWCNTs acted as initial growth promoters at low concentrations. However, at higher concentrations, signs of oxidative stress and cell membrane damage were observed, though germination was not significantly compromised. In a second study, bioassays with *Aliivibrio fischeri* and *Lactuca sativa* were conducted to evaluate the toxicity of MWCNTs and GO. The *A. fischeri* test revealed toxicity for both carbon-donor nanomaterials, with GO being classified as highly toxic and MWCNTs exhibiting moderate toxicity. MWCNTs promoted root growth, while GO showed positive effects at lower concentrations but caused toxicity at higher concentrations.

Keywords: Nanotechnology, MWCNTs, graphene oxide, toxicity, sustainable agriculture.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	DESENVOLVIMENTO	13
2.1	NANOTECNOLOGIA.....	13
2.2	NANOMATERIAIS SINTÉTICOS.....	15
2.3	NANOMATERIAIS DE CARBONO NA AGRICULTURA.....	17
2.4	NANOTUBOS DE CARBONO.....	20
2.5	ÓXIDO DE GRAFENO.....	21
2.6	IMPACTO RESIDUÁRIO DO USO.....	23
2.7	BIOENSAIOS DE TOXICIDADE.....	25
3	JUSTIFICATIVA	27
4	OBJETIVOS	28
4.1	OBJETIVOS GERAIS.....	28
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	28
5	ARTIGO I - Germinação de sementes e crescimento inicial de alface com nanotubos de carbono de paredes múltiplas	29
6	ARTIGO II - Toxicidade aguda em <i>Aliivibrio fischeri</i> e <i>Lactuca sativa</i> L. de nanomateriais doadores de carbono	43
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

Com o objetivo de minimizar os impactos da poluição ambiental causados pelo uso excessivo de agroquímicos no campo, 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. Essa tecnologia promissora oferece respostas para diversos desafios relacionados às mudanças climáticas, como salinidade, seca e variações extremas de temperatura (Abdel-Aziz; Hasaneen; Omer, 2019). Diante do desequilíbrio climático, estresses abióticos como estresse osmótico, oxidativo e iônico estão se tornando cada vez mais comuns, afetando a qualidade das colheitas e gerando prejuízos para a agricultura (Vogel *et al.*, 2019).

Com a crescente expansão populacional e as dificuldades em atender suas demandas devido à insuficiência das práticas agrícolas convencionais, há uma necessidade urgente de encontrar soluções para os desafios globais. A Organização das Nações Unidas estima que cerca de 800 milhões de pessoas enfrentam escassez de alimentos, com agravamento deste número com o passar dos anos (Nações Unidas, 2021). Até 2050 a população mundial poderá chegar a 9 bilhões de pessoas conforme Wang (2022), o que resultará em um aumento de até 50% na demanda por alimentos, exigindo soluções inovadoras para as práticas agrícolas (Shukla *et al.*, 2019). Nesse contexto, a nanotecnologia é vista como uma ferramenta essencial para impulsionar a agricultura, uma vez que tem o potencial de aumentar o rendimento das culturas, preservar o equilíbrio ecológico e promover a sustentabilidade ambiental e a estabilidade econômica (Acharya; Pal, 2020). Isso pode contribuir para o cumprimento da meta de "Fome Zero", um dos 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável estabelecidos pelas Nações Unidas (Usman *et al.*, 2020).

A nanotecnologia envolve a manipulação de átomos, moléculas ou compostos em estruturas para produzir materiais e dispositivos com propriedades únicas. O termo "nano" refere-se à escala de 10^{-9} metros, ou um bilionésimo de metro, e sua aplicação envolve a produção de nanomateriais com tamanhos variando entre 1 e 100 nm. Esse tamanho reduzido confere à nanotecnologia características físicas e químicas distintas, como condutividade elétrica, reatividade química, magnetismo, propriedades ópticas e resistência física (Ansari *et al.*, 2019). Entre suas principais aplicações na agricultura estão os nanofertilizantes, nanocomplexos de liberação controlada, nanopesticidas, nanoherbicidas, nanobiossensores, nanobiofarming e manipulação nanogenética (Gupta *et al.*, 2020). Assim, a

nanotecnologia pode aumentar a produtividade agrícola por meio do desenvolvimento de fertilizantes sustentáveis de liberação lenta, melhorando o fornecimento de nutrientes e reduzindo as perdas desses nutrientes (Lowry; Avellan; Gilbertson, 2019).

Com o avanço dos nanomateriais projetados, muitas aplicações na agricultura foram exploradas em estudos recentes (Babu *et al.*, 2022). Entre os nanomateriais mais promissores estão os nanotubos de carbono (CNTs) e o óxido de grafeno (GO). O GO é uma folha de grafite de camada única, com grupos de oxigênio nas bordas e no plano basal, formando uma estrutura em forma de favo de mel (2D) (Ismail *et al.*, 2019). Os CNTs são folhas cilíndricas de grafeno, conforme sua estrutura são definidos como parede simples (SWCNTs) e parede múltipla (MWCNTs) (Peng *et al.*, 2020).

Esses nanomateriais de carbono têm grande potencial na agricultura moderna, favorecendo o crescimento das plantas ao entregar nutrientes de maneira eficiente, sem perdas significativas por lixiviação ou volatilização, graças à sua capacidade de penetrar nas paredes celulares (Kwak *et al.*, 2019). No entanto, estudos relatam efeitos contraditórios da aplicação de CNTs e GO em plantas (Chen *et al.*, 2019). Foi observado que tanto os CNTs quanto o GO podem estimular o crescimento vegetal, aumentando a biomassa, o comprimento das raízes e da parte aérea (Joshi *et al.*, 2020; Park *et al.*, 2020). Por outro lado, também foram reportados efeitos prejudiciais, como a geração de espécies reativas de oxigênio, aberrações cromossômicas, apoptose e impactos negativos na microbiota do solo (Hao *et al.*, 2018; Lin *et al.*, 2017; Sasaki *et al.*, 2016).

Com o uso extensivo de nanomateriais à base de carbono em diversas áreas, como biomedicina conforme Mohajeri; Behnam; Sahebkar (2018), eletrônica conforme Luo *et al.* (2018), fotoeletricidade conforme Yi *et al.* (2018) e agricultura (Zaytseva; Neumann, 2016), surgem preocupações sobre seus efeitos nocivos em organismos vivos. Devido à capacidade desses nanomateriais de atravessar as paredes celulares, interagir com estruturas intracelulares, seu tamanho reduzido e sua alta área superficial conforme Mathew; Tiwari; Tripathi (2021), acredita-se que elas possam se acumular em diferentes níveis tróficos, com as plantas sendo um dos principais organismos afetados (Pacheco; Buzea, 2018).

A falta de diretrizes padronizadas para a avaliação da toxicidade de nanomateriais segundo Zielińska *et al.* (2020) e a ausência de regulamentação específica sobre o uso de nanomateriais no Brasil conforme Lazzaretti e Hupffer (2019), tornam difícil uma análise precisa de seus impactos no ambiente. Apesar disso, testes *in vitro* e *in vivo* vêm sendo utilizados para avaliar a toxicidade desses materiais (Zielińska *et al.*, 2020). O bioensaio microtox é amplamente aceito como um teste ecotoxicológico, devido à alta sensibilidade da

bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*, que serve como bioindicadora de diversas substâncias tóxicas por meio da medição de sua bioluminescência (Turek *et al.*, 2020). Além disso, o bioensaio com sementes de *Lactuca sativa* L. é amplamente utilizado para avaliar efeitos fitotóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de amostras potencialmente tóxicas. Esse método se destaca por ser de baixo custo, rápido e altamente sensível (Aguilar-Ascón; Marrufo-Saldaña; Barra-Hinojosa, 2024).

Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar o potencial agrônomo de dois nanomateriais à base de carbono amplamente utilizados, os nanotubos de carbono de parede múltipla e o óxido de grafeno, em *Lactuca sativa*. Além disso, será avaliada a toxicidade residual desses nanomateriais em bactéria *Aliivibrio fischeri* e o vegetal superior (*L. sativa*), buscando fornecer uma visão mais ampla sobre o impacto desses nanomateriais em diferentes organismos e, assim, apoiar a aplicação segura desses nanomateriais na agricultura, promovendo uma agricultura mais sustentável e resiliente.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia ganhou destaque pela primeira vez em 1959, em uma palestra proferida por Richard Feynman durante o evento da American Physical Society. Embora ainda não fosse conhecida pelo nome "nanotecnologia", a palestra abordou a possibilidade de manipulação de átomos e moléculas em escala nanométrica. Na sua palestra intitulada "There's Plenty of Room at the Bottom" ("Há muito espaço lá embaixo"), Feynman argumentava sobre a possibilidade de fabricar dispositivos manipulando átomos e encorajava seus colegas a explorar os níveis nanoscópicos, vislumbrando a manufatura que essa abordagem poderia oferecer na revolução de novos dispositivos úteis para a sociedade (GUTERRES; POHLMANN, 2013).

A nanotecnologia só foi formalmente reconhecida por esse nome em 1974, por Norio Taniguchi. Taniguchi, um pesquisador da Universidade de Tóquio, diferenciou a nanotecnologia da escala micrométrica e descreveu a habilidade de criar materiais em nanoescala (Taniguchi, 1974). Apesar do reconhecimento instantâneo dos benefícios da nanoescala para a indústria, a manipulação em nanoescala, bem como as ferramentas para medição e geração de imagens, só se tornaram viáveis após os avanços na microscopia na década de 1980 (Binnig; Quate; Gerber, 1986).

O termo "nanotecnologia" deriva do prefixo grego "nano", que significa "anão". O nanômetro é uma unidade de medida equivalente a um bilionésimo de metro ($1 \text{ nm} = 1 \times 10^{-9}$ metros), e é representado pela escala nanométrica ou nanoescala (Róz *et al.*, 2015). Para comparação, um milhão de nanômetros equivale ao diâmetro de uma cabeça de alfinete; um fio de cabelo tem aproximadamente 100.000 nanômetros de espessura; o tamanho das bactérias varia de 1.000 a 5.000 nanômetros, enquanto os vírus têm entre 100 e 500 nanômetros. O ácido desoxirribonucleico (DNA), por sua vez, possui de 1 a 2 nanômetros, assim como outras biomoléculas, como lipídios e carboidratos, evidenciando a pequenez da escala nanométrica (Shatkin, 2017).

Segundo Roco; Williams; Alivisatos (2000), em seu livro *Nanotechnology Research Directions*, definiram a nanotecnologia como a ciência que lida com a capacidade de controlar e reestruturar a matéria em níveis atômicos e moleculares, variando de 1 nm a 100 nm. Os autores citam que a nanotecnologia envolve a manipulação de propriedades e

fenômenos com o objetivo de obter novos materiais, dispositivos e sistemas aprimorados com funções e propriedades em escala reduzida, contribuindo para diversas áreas, como biomedicina, engenharia e meio ambiente.

Conforme a National Nanotechnology Initiative (NNI), a nanotecnologia visa pesquisar, entender e desenvolver materiais com tamanhos entre 1 e 100 nanômetros, para possibilitar sua aplicação em produtos existentes ou em novas tecnologias (NNI, 2023). Por outro lado, a National Science Foundation (NSF) adota uma definição mais ampla, considerando que a manipulação atômica pode ocorrer em níveis abaixo ou acima de 100 nanômetros, como no caso das partículas poliméricas que possuem dimensões variando de 200 a 300 nanômetros e alta interação intermolecular (GUTERRES; POHLMANN, 2013).

A Comissão Europeia classifica como nanomateriais aqueles de origem natural, acidental ou manufaturada, definidos como substâncias contendo agregados, partículas não ligadas ou aglomerados de nanopartículas, com tamanho de 1 a 100 nanômetros em 50% ou mais das partículas na distribuição. Existe flexibilidade nessa faixa de 1 a 50% em casos específicos relacionados à saúde, segurança e meio ambiente. Além disso, fulerenos, flocos de grafeno e nanotubos de carbono devem ter pelo menos uma dimensão externa inferior a 1 nanômetro para serem classificados como nanomateriais (Stuttgen *et al.*, 2019).

A nanotecnologia é uma ciência multidisciplinar com alto potencial, abrangendo engenharia química e de materiais, biotecnologia e tecnologia de processamento industrial (Francisco; García-Esteba, 2018). Por ser uma área ampla, ainda há dificuldades em definir a nanotecnologia, e não existe um conceito consensual para o termo internacionalmente (Silva; Lopes, 2020). Essa falta de consenso reflete a incerteza em torno dos nanomateriais e a necessidade de mais estudos para uma investigação mais aprofundada sobre materiais em escala nanométrica (Martins, 2016).

Apesar disso, o estudo da nanoescala é fundamental, pois as propriedades físico-químicas dos materiais tendem a modificar-se com base no efeito quântico do tamanho e no fenômeno de superfície. Quando reduzido, o material pode apresentar propriedades eletrônicas, mecânicas, térmicas e ópticas distintas (Saleh, 2020). O aumento da área superficial proporciona benefícios como maior reatividade química e funcionalidade dos elementos, devido à maior quantidade de átomos superficiais disponíveis em comparação com o volume total do elemento (Khan; Saeed; Khan, 2019).

Por esse motivo, os nanomateriais são amplamente utilizados atualmente, encontrando-se em medicina, eletrônicos, óptica de equipamentos, cosméticos e diversos outros produtos

do cotidiano (Aacharya; Chhipa, 2020). Eles oferecem uma ampla gama de aplicações, novas tecnologias, novos materiais e, conseqüentemente, novos produtos. Além disso, suas propriedades únicas resultam em processos mais econômicos, devido ao aumento da área superficial que melhora a reatividade, favorecendo a preservação dos recursos naturais, como a energia, e reduzindo os custos de produção, beneficiando o meio ambiente e a economia (Lazzaretti; Hupffer, 2019)

Com o passar das décadas, a escassez de alimentos, o empobrecimento do solo, a pobreza e a redução da biodiversidade tornaram-se preocupações frequentes. A nanotecnologia representa uma alternativa promissora para essas questões e tem sido utilizada na proteção e no aprimoramento de culturas, na análise patológica, na tolerância ao estresse e na agricultura de precisão (Shang *et al.*, 2019). Os nanomateriais também podem atuar como sistemas de transporte eficientes para materiais desejáveis, como fertilizantes, pesticidas, medicamentos, antioxidantes e hormônios sintéticos, atuando no local alvo e reduzindo o custo de produção e o impacto ambiental (Kah *et al.*, 2018).

Diferentemente dos tempos anteriores, quando era apenas possível manipular as nanopartículas naturais, atualmente elas são sintetizadas em laboratórios sob condições controladas, sendo denominadas nanomateriais sintéticas ou projetadas (Sekhon, 2014). Através da engenharia de nanomateriais grandes contribuições a diferentes campos estão sendo desempenhadas, incluindo a agricultura. Os nanomateriais baseadas em carbono, especialmente os nanotubos de carbono e o óxido de grafeno, têm atribuído efeitos benéficos no crescimento e desenvolvimento de diferentes espécies vegetais (Park *et al.*, 2020; Sangeetha *et al.*, 2017).

2.2 NANOMATERIAIS SINTÉTICOS

Nanomateriais projetados, também conhecidos como manufaturadas, artificiais ou industriais, são partículas com propriedades físicas e químicas distintas. Esses nanomateriais possuem características únicas, que incluem parâmetros como peso, formato, tamanho, adsorção, rompimento celular e área superficial (Phogat *et al.*, 2016). Apesar da complexidade do comportamento dos nanomateriais, sabe-se que suas propriedades singulares se devem, em grande parte, à sua alta área superficial (Saritha *et al.*, 2022).

Com a redução de escala na nanotecnologia, a densidade atômica e os limites periódicos das partículas são alterados. Devido a essas mudanças, os nanomateriais exibem propriedades físicas específicas que diferem das do material em escalas maiores. Entre essas

propriedades físicas, incluem-se as ópticas, como a capacidade de penetração da luz, absorção e reflexão, além da coloração dos nanomateriais. Também estão presentes as propriedades magnéticas e elétricas, incluindo condutividade, semicondutividade e resistência, que são utilizadas na condutividade térmica e na eletrônica para energia renovável. Outras propriedades incluem hidrofilicidade, hidrofobicidade, suspensão, difusão e sedimentação (Ealias; Saravanakumar, 2017).

As propriedades químicas, por sua vez, têm suas aplicações determinadas com base na estabilidade, reatividade dos nanomateriais com o alvo e sensibilidade a fatores como umidade, atmosfera, calor e luz. Essas propriedades também englobam desinfecção, atividade antibacteriana, antifúngica e toxicidade dos nanomateriais, sendo amplamente aplicadas nas áreas de biomedicina e meio ambiente. Além disso, incluem características como corrosão, resistência à corrosão, oxidação, redução e inflamabilidade dos nanomateriais, que são relevantes em diversas aplicações atuais (Ealias; Saravanakumar, 2017). Os nanomateriais projetados podem ser classificados em cinco tipos distintos com base em sua composição, conforme apresentado no Quadro 1.

Quadro 1 - Classificação dos nanomateriais projetados com base na sua composição.

(continua)

Tipo	Descrição	Exemplos	Aplicações	Referência
Nanomateriais à base de carbono	Nanomateriais com carbono em sua composição, na forma de tubos, esferas e elipsoides.	Grafeno, Fullerenos e seus derivados; Nanotubos de carbono de parede simples (SWCNT) e Nanotubos de carbono de parede múltiplas (MWCNT).	Agricultura, indústria automotiva, aeronáutica, plásticos e outros.	(Phogat <i>et al.</i> , 2016; Rizwan <i>et al.</i> , 2021).
Nanomateriais à base de metal	Nanomateriais metálicos, iônicas e valência zero.	Nanoestruturas metálicas ou liga metálicas a base de; (Ag), (Au), (ZnO), (Fe), (Cu), (SiO ₂), outros.	Saúde, medicamentos, registro de dados, fertilizantes, aeroespacial, produtos de limpeza e cosméticos, eletrônicos e outros.	(Phogat <i>et al.</i> , 2016; Rizwan <i>et al.</i> , 2021).

Quadro 1 - Classificação dos nanomateriais projetados com base na sua composição.

(conclusão)

Tipo	Descrição	Exemplos	Aplicações	Referência
Dendrímeros	São polímeros nanométricos multifuncionais constituídos a partir de unidades ramificadas.	Dendrímero de poliamidomina (PAMAM).	Medicina, vidros coloridos, sensores químicos, eletrodos modificados, agricultura, outros.	(Phogat <i>et al.</i> , 2016).
Pontos quânticos	Nanomateriais semicondutores portadores de características únicas ópticas e eletrônicas.	(ZnS), (CdSe), (ZnSe) e outros.	Diagnóstico no campo biomédico e baterias solares, entre outros.	(Phogat <i>et al.</i> , 2016).
Nanocompósitos	Nanomateriais híbridos formados por diferentes nanomateriais.	Nanocompósito de matriz cerâmica; Al ₂ O ₃ /SiO ₂ , Al ₂ O ₃ /SiC, outros. Nanocompósito de matriz metálica; Co/Cr, Fe-Cr, outros. Nanocompósito de matriz polimérica; poliéster/TiO ₂ , outros.	Indústria automobilística, Biotecnologia, agricultura.	(Phogat <i>et al.</i> , 2016).

Fonte: Autora (2025).

2.3 NANOMATERIAIS DE CARBONO NA AGRICULTURA

Com base nas projeções futuras, a população mundial pode alcançar 9,7 bilhões de pessoas até 2050, o que exigirá um aumento da produção agrícola em até 70% para atender à crescente demanda por alimentos (United Nations, 2022). Esse aumento é necessária não apenas para alimentar a população, mas também para combater a desnutrição, sem depender da expansão de terras agrícolas (Giller *et al.*, 2021). Além desse desafio, a agricultura enfrenta outros obstáculos, como mudanças climáticas rápidas, degradação da qualidade do

solo, deficiências nutricionais, uso excessivo de fertilizantes, pesticidas e herbicidas, baixa capacidade de retenção de água e contaminação do solo por metais pesados (Calicioglu *et al.*, 2019; Chávez- Dulanto *et al.*, 2021).

As terras agrícolas, por sua vez, têm um papel paradoxal nas mudanças climáticas. Embora sejam responsáveis por emissões significativas de gases de efeito estufa, também possuem o potencial de atuar como sumidouros de carbono (Singh; Kumar, 2020). Os efeitos danosos decorrentes de práticas agrícolas intensivas, como a remoção de resíduos de colheitas, uso excessivo de agroquímicos e as queimadas, são exemplos da causa do efeito estufa (Boubehziz *et al.*, 2020). No entanto, esses solos agrícolas também apresentam potencial para sequestrar carbono e mitigar as mudanças climáticas (Haughey *et al.*, 2023). Considerando a necessidade urgente de implementar uma agricultura mais sustentável e eficiente, a nanotecnologia surge como uma solução promissora para aumentar a produtividade agrícola e melhorar a qualidade do solo (Maholiya *et al.*, 2023).

A nanotecnologia tem demonstrado ser uma grande aliada da agricultura, principalmente através de aplicações como nanofertilizantes, nanopesticidas e nanofungicidas (Fazelian; Yousefzadi, 2022; Kah *et al.*, 2018; D. Wang *et al.*, 2022). Quando integrada aos agroquímicos, a nanotecnologia consegue superar as limitações dos produtos convencionais, como baixa solubilidade, biodisponibilidade reduzida, acúmulo de solventes orgânicos e toxicidade (Shelar *et al.*, 2021). Entre as principais aplicações, destacam-se os nanomateriais ativos e os sistemas de liberação controlada, que permitem uma ação mais eficiente dos insumos agrícolas (Sun *et al.*, 2020). Os nanomateriais ativos desempenham funções como estimular o crescimento das plantas e atuar como agentes antipatógenos, sendo os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs) um exemplo eficaz de transportadores de agroquímicos (Shelar *et al.*, 2023).

O carbono, por sua vez, é um dos elementos mais versáteis e importantes, capaz de formar materiais com propriedades variadas graças aos seus diferentes tipos de hibridização (sp³, sp² e sp). Essa versatilidade faz do carbono um material de destaque em termos de dureza, propriedades óticas, resistência ao calor, condutividade elétrica e isolamento térmico. Os nanomateriais de carbono, em particular, têm atraído grande atenção por apresentarem baixa toxicidade, alta estabilidade e baixo impacto ambiental (Yan *et al.*, 2016). Com seu tamanho reduzido, grande área superficial e alta reatividade, esses nanomateriais têm sido estudados como nanofertilizantes e aditivos, promovendo a entrega eficiente de nutrientes (Usman *et al.*, 2020).

Dentre os nanomateriais à base de carbono, destacam-se os nanotubos de carbono,

fulerenos, grafeno, óxido de grafeno, nanofibras de carbono, nanohorns e pontos de carbono (Kolahdouz *et al.*, 2022). Os nanomateriais têm sido utilizados na melhora da germinação de sementes segundo López-Vargas *et al.* (2020), divisão celular conforme Martinez-Ballesta *et al.* (2020), absorção de água segundo López-Vargas *et al.* (2020), fotossíntese conforme Santana *et al.* (2022), rendimento de culturas e qualidade do solo segundo Xin *et al.* (2022), redução de pragas e doenças conforme Wang *et al.* (2021) e na melhoria da tolerância ao estresse (Gohari *et al.*, 2021). Por exemplo, o grafeno demonstrou aumentar os níveis de clorofila, vitamina C, β -caroteno, fenóis e flavonoides nas plantas (López-Vargas *et al.*, 2020). Embora esses nanomateriais tenham uma toxicidade insignificante, é crucial avaliar parâmetros de segurança, como biocompatibilidade e ecotoxicidade, antes de seu uso generalizado na agricultura (Chan *et al.*, 2021).

Em pequenas concentrações, o GO promoveu o crescimento e a estabilidade de melancia. Foi notado que houve aumento no comprimento das raízes, na área das folhas, no número de folhas, no aumento de botões florais, bem como no aumento do teor de açúcar e ausência de citotoxicidade (Park *et al.*, 2020). Ainda que alguns estudos demonstram efeitos tóxicos de SWCNTs e MWCNTs em mudas, esses nanomateriais também podem aumentar a capacidade de defesa das plantas. Por exemplo, observou-se um aumento nas enzimas glutatona S-transferase e citocromo P450, que estão associadas à defesa antioxidante (Chang *et al.*, 2020). Hamdi *et al.* (2015), também investigaram os efeitos de MWCNTs não funcionalizados e amino-funcionalizados em alface, concluindo que esses nanomateriais não interferiram na germinação e crescimento das plantas. Além disso, elas diminuem a biodisponibilidade de pesticidas, possivelmente devido à sua associação com vermiculita, um substrato poroso com alta capacidade de adsorção e troca iônica (Hamdi *et al.*, 2015).

Os efeitos benéficos do óxido de grafeno foram observados em um estudo com macieiras, o qual concentrações de 0,1 mg L⁻¹ estimularam a formação de raízes adventícias, aumentando a transcrição de genes relacionados ao transporte de auxina (Li *et al.*, 2018). Já em culturas de arroz tratadas com MWCNTs a 20 mg L⁻¹, foi observado um crescimento acelerado das folhas, aumento da clorofila e da taxa fotossintética, bem como maior expressão de genes ligados ao desenvolvimento do cloroplasto e ao tamanho celular. A redução do ácido abscísico, o aumento da giberelina e a elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (O⁻² e H₂O₂) também foram observados, sugerindo que esses efeitos hormonais e oxidativos podem beneficiar o desenvolvimento do arroz (Zhang *et al.*, 2017).

De forma semelhante, os MWCNTs em concentrações de 500 e 125 μ g mL⁻¹ aumentaram a tolerância à seca, melhorando a absorção de água e ativando o sistema de

defesa em abóboras (Hatami, 2017). Em trigo, o uso desses nanotubos resultou em maior tamanho do xilema e floema, maior densidade estomática, número de grãos e biomassa (Joshi *et al.*, 2018). MWCNTs também aumentaram o número de nódulos e a atividade da nitrogenase na interação solo-planta segundo Yuan *et al.* (2017), além de promoverem um aumento na produção de frutos em tomates (McGehee *et al.*, 2017).

Dessa forma, conclui-se que nanomateriais de carbono, como GO e CNTs, desempenham diferentes papéis dependendo da concentração à qual as plantas são expostas. Em baixas concentrações, estimulam a germinação, o enraizamento e o crescimento das plantas, sem afetar negativamente as enzimas antioxidantes. Contudo, em altas concentrações, podem inibir o crescimento, reduzir o peso fresco, induzir estresse oxidativo e causar danos à membrana celular (Zhang *et al.*, 2016).

2.4 NANOTUBOS DE CARBONO

Existem diversas classificações de nanomateriais à base de carbono, incluindo fulerenos, grafenos, nanotubos de carbono, nanofibras de carbono, negro de fumo e, em casos específicos, carvão ativado na escala nanométrica. Os nanotubos de carbono consistem em folhas de grafeno com arranjos hexagonais planos de ligações carbono-carbono, enroladas sobre si mesmas para formar cilindros ocos. Eles têm diâmetros que variam de aproximadamente 0,7 nm para nanotubos de camada única a até 100 nm para nanotubos de múltiplas camadas. O diâmetro pode variar de um nanômetro a dezenas de nanômetros, e seu comprimento pode chegar a vários micrômetros, milímetros ou até centímetros. As extremidades dos nanotubos podem ser ocas ou fechadas por uma meia molécula de fulereno (Ealias; Saravanakumar, 2017).

Nanotubos de carbono (CNTs) foram descobertos por Lijima em 1991, durante a análise microscópica de subprodutos de fulerenos. Na época, foram identificados como uma nova estrutura finita de carbono. A microestrutura tubular observada com microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução foi chamada de Nanotubo de Carbono de Paredes Múltiplas (MWCNT) (Lijima, 1991). Poucos anos depois, um estudo em colaboração entre Iijima e Ichihashi resultou na descoberta dos Nanotubos de Carbono de Parede Simples (SWCNT) (Lijima; Ichihashi, 1993).

A estrutura extraordinária dos nanotubos de carbono deve-se ao emparelhamento do nanodiâmetro. Eles são menos suscetíveis a alterações químicas devido às suas paredes laterais, que apresentam hibridizações sp^2 com conformações hexagonais de grafeno. Assim,

são mais estáveis em relação a alterações químicas do que outros nanomateriais de carbono, além de possuírem ligações sp^3 mais fortes, que tendem a reduzir a tensão sobre os átomos de carbono nas paredes laterais (Rizwan *et al.*, 2021).

As propriedades dos nanotubos de carbono destacam-se pela alta interação com moléculas orgânicas. Essas interações ocorrem por meio de forças não covalentes, como forças eletrostáticas, de van der Waals, ligações de hidrogênio ou interações hidrofóbicas. Assim, as diversas aplicações dos CNTs podem ser explicadas por suas características de alta resistência, rigidez, condutividade e elasticidade (Makhlouf; Barhoum, 2018).

Atualmente, os métodos de preparação dos nanotubos de carbono incluem descarga de arco, ablação a laser e deposição química de vapor assistida por catalisador. Apesar das diferenças entre esses métodos, eles compartilham o processo de craqueamento da fonte de carbono em altas temperaturas, seguido pela deposição de átomos de carbono sobre catalisadores e o crescimento dos CNTs (Wang *et al.*, 2018).

Entre as estruturas conhecidas dos nanotubos de carbono estão a de parede simples (SWCNT), de parede dupla (DWCNT) e de parede múltipla (MWCNT). Os nanotubos de parede simples possuem diâmetro menor e uma única camada concêntrica de grafeno. Dependendo da sua conformação hexagonal, eles podem exibir características semicondutoras, metálicas ou semimetálicas. Por outro lado, os nanotubos de parede múltipla são semelhantes aos de parede simples em massa e caráter semicondutor, mas não apresentam caráter metálico como os SWCNTs. A estrutura dos MWCNTs é composta por vários cilindros concêntricos. Os SWCNTs são geralmente produzidos por descarga de arco na presença de um eletrodo de grafite, que inclui partículas catalíticas, enquanto os MWCNTs são produzidos sem a presença de catalisador (Aacharya; Chhipa, 2020).

No entanto, devido à baixa biocompatibilidade em ambientes biológicos e químicos, surgem preocupações ambientais e de saúde relacionadas à exposição aos nanotubos de carbono (Zhou *et al.*, 2017). Com os avanços na pesquisa, foi identificada uma relação entre a toxicidade e a reatividade *in vitro* e *in vivo* dos nanotubos de carbono, com fatores como dose, diâmetro, comprimento, método de síntese, processo de purificação, área de superfície, tendência à aglomeração e dispersão (Chetyrkina; Fedorov; Nasibulin, 2022).

2.5 ÓXIDO DE GRAFENO

O grafeno é conhecido por ser uma substância extremamente fina e resistente. Sua estrutura consiste basicamente em uma rede de favo de mel (2D) (Huang *et al.*, 2020).

O óxido de grafeno, por sua vez, resulta da oxidação do grafeno, o que melhora suas propriedades mecânicas e elétricas (Aberoumand *et al.*, 2022). Em geral, o óxido de grafeno é acompanhado por grupos funcionais de oxigênio, carbonil (C = O), hidroxila (-OH), ácido carboxílico (-COOH) e outros grupos (Aliyev *et al.*, 2019). Esse nanomaterial é altamente valorizado por cientistas devido sua alta área superficial, que lhe confere elevada condutividade elétrica, resistência mecânica e flexibilidade (Keying *et al.*, 2022). Assim, sua estrutura se torna resistente, sem risco de colapso devido ao alongamento da camada, permitindo o transporte eficiente de elétrons dentro da estrutura do material (Dhamodharan *et al.*, 2022). Além disso, seu processo bioderivativo é considerado simples, sendo biodegradável, de baixo custo, com baixa biocompatibilidade, baixa toxicidade e alta capacidade de adsorção (Farooq *et al.*, 2024).

Óxido de grafeno foi descoberto em 1859 por Benjamin C. Brodie, pesquisador do departamento de química da universidade de Oxford. Antes mesmo da descoberta do grafeno, Brodie desenvolveu uma folha semelhante a papel, com espessura de 0,05 milímetro, a partir de uma solução de clorato de potássio e ácido nítrico fumegante (Ahmad; Fan; Hui, 2018). Apesar desse marco, o método de Brodie resultava em flocos de material. Em 1898, Staudenmaier aprimorou a técnica ao adicionar ácido sulfúrico concentrado, com a finalidade de tornar o meio mais ácido, além da adição de clorato durante a reação (Al-Hakkani *et al.*, 2023). Anos depois, outros métodos de sínteses foram desenvolvidos, utilizando diferentes agentes oxidantes. Incluindo o método Hummers, desenvolvido em 1957 por Hummers e Offeman, o qual é realizado uma oxidação alternada, utilizando permanganato de potássio (KMnO₄), nitrato de sódio (NaNO₃) e ácido sulfúrico (H₂SO₄) (Iqbal *et al.*, 2020). Este método permanece como um dos mais utilizados (Alaithan *et al.*, 2023).

Apesar das muitas investigações sobre a estrutura do óxido de grafeno, ainda não há um consenso sobre sua conformação exata. Existem pelo menos seis modelos diferentes que tentam explicar a conformação do óxido de grafeno, tais como Hofmann-Holst, Ruess, Scholz-Boehm, Nakajima, Lerf-Klinowski e Zsabó-Dékány (Farooq *et al.*, 2024). A ausência de consenso se justifica pela complexidade dos produtos químicos, a individualidade de cada amostra e sua estequiometria única (Iqbal *et al.*, 2020). Em termos gerais, o GO é uma folha de grafite de camada única, com grupos de oxigênio ao redor de suas bordas e no plano basal, resultando em átomos de carbono com hibridização sp² e sp³ (Ismail *et al.*, 2019).

2.6 IMPACTO RESIDUÁRIO DO USO

Devido à complexidade dos nanotubos de carbono e óxido de grafeno, sua toxicidade pode estar relacionada a diversos fatores. Em estudos com plantas, vários autores destacam aspectos como a concentração dos nanomateriais, área superficial (tamanho das partículas), solubilidade, variedade da planta, meio de cultivo, estágio de crescimento, além da presença de grupos funcionais, que podem influenciar a germinação de sementes. Além disso, os diferentes métodos de síntese e caracterização desses nanomateriais devem ser investigados, uma vez que a toxicidade está fortemente ligada à morfologia (Dasgupta-Schubert *et al.*, 2017; Zaytseva; Neumann, 2016). Isso também permite avaliar as propriedades dos materiais em síntese e possíveis variações durante testes de ecotoxicidade.

Apesar do uso crescente de nanomateriais de carbono na agricultura, especialmente como fertilizantes, esses compostos podem ter efeitos prejudiciais na densidade, composição e população microbiana do solo (Mathew; Tiwari; Tripathi, 2021). Em um estudo com três cepas bacterianas bioluminescentes expostas a nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNTs), duas Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*) e uma Gram-positiva (*Bacillus subtilis*), foi evidenciada toxicidade, destacando-se o dano nas membranas bacterianas. A perda de integridade dessas membranas pode ter sido causada por perfuração ou aprisionamento de contaminantes devido à exposição aos MWCNTs (Hartono *et al.*, 2018). O óxido de grafeno também mostrou inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus* em 2h e 24h, e de *Pseudomonas aeruginosa* em 2h (Giulio *et al.*, 2018). Em outro estudo, a viabilidade de *Staphylococcus aureus* foi reduzida em 12h, e a de *Escherichia coli* em 168h (Gao *et al.*, 2017). O GO também foi eficaz na redução de viabilidade de *Mycobacterium smegmatis*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus mutans* (Giulio *et al.*, 2018; Kim; Rosa; Min, 2023; Zou *et al.*, 2017).

Em estudos anteriores, a combinação de MWCNTs-COOH com chumbo (Pb) e cádmio (Cd) mostrou causar danos oxidativos e induzir desequilíbrios nutricionais, levando ao acúmulo de proteínas carboniladas e à redução da síntese de HSP70 nas raízes (Rong *et al.*, 2018). No entanto, Sharifi *et al.* (2021) destacaram o potencial fitorremediador do MWCNT, utilizado em concentrações entre 50 e 250 mg L⁻¹, que ajudaram a reduzir a presença de Pb e Cd no solo, além de aumentar a defesa antioxidante enzimática e não enzimática (Sharifi *et al.*, 2021). A redução da absorção de Pb e Cd pelas plantas pode ser explicada pelo acúmulo de MWCNTs nas superfícies radiculares, criando uma barreira que impede a entrada dos metais nas plantas (Gong *et al.*, 2019).

O óxido de grafeno também tem mostrado potencial como corretivo de solos contaminados. Em um estudo sobre o efeito do GO na concentração de cádmio no milho, foi observada melhora no crescimento dos brotos, aumento do peso seco das raízes, elevação do teor de clorofila e redução de Cd nas raízes e brotos. Esses resultados sugerem o potencial do GO na redução do acúmulo de Cd nos tecidos vegetais, promovendo o crescimento e a melhoria da fertilidade do solo (Rassaei, 2024). No entanto, o GO pode também causar efeitos adversos, como a redução da biomassa, menores concentrações de enzimas antioxidantes e danos à estrutura celular quando aplicado diretamente às raízes (Gao; Yang; Song, 2019).

Song *et al.* (2020) relataram que concentrações de GO acima de 100 mg L^{-1} reduziram o comprimento, volume, diâmetro e massa seca de raízes de *Larix olgensis*. De forma semelhante, a germinação de sementes de trigo foi inibida em concentrações entre $1000\text{-}2000 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ segundo Vochita *et al.* (2019), enquanto concentrações de $50\text{-}200 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ resultaram em menor peso fresco e seco, além de menor comprimento de raízes em arroz, com efeitos prejudiciais à fotossíntese e aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), levando ao estresse oxidativo, peroxidação lipídica e apoptose (Kazlauskas *et al.*, 2023). Também observaram que o GO inibiu o crescimento de raízes laterais e a condutividade hidráulica em plantas (Zhou; Hu, 2017). Através de análises transcriptômicas e fisiológicas foi observado que GO penetra no caule e raízes de trigo e em ($>50 \text{ mg L}^{-1}$) inibem o crescimento das mudas (Liu *et al.*, 2022).

O efeito tóxico de SWCNTs e MWCNTs funcionalizados com Cd também foi estudado em mudas de trigo, onde se observou redução no comprimento total das raízes, na área superficial e no diâmetro médio, além de efeitos adversos na parte aérea (Chang *et al.*, 2020). Em mudas de alface e trigo, os CNTs mostraram toxicidade na germinação e crescimento, provavelmente devido à impureza dos MWCNTs industriais e ao transporte de contaminantes para o meio intracelular (Chang *et al.*, 2020).

Em um estudo com diferentes combinações de nanomateriais de carbono em alface (*Lactuca sativa L.*), não foram observados efeitos de toxicidade durante o crescimento, mas houve impactos variáveis na composição de pigmentos, polifenóis e na capacidade antioxidante (Podar *et al.*, 2023). Em outros estudos, o óxido de grafeno em altas concentrações ($500\text{-}2000 \text{ mg L}^{-1}$) causou inibição de crescimento, necrose e apoptose em plantas como repolho, tomate e espinafre vermelho, enquanto a alface se mostrou resistente a essas concentrações (Begum; Ikhtiari; Fugetsu, 2011). Outro teste foi conduzido utilizando espinafre vermelho, alface, arroz, pepino, pimenta, quiabo e soja em concentrações (0-2000

mg L⁻¹). Desta vez, espinafre vermelho e alface foram as culturas mais sensíveis quando expostas a 1000mg L⁻¹ e 2000mg L⁻¹ (Ikhtari, 2014). A exposição a altas doses de GO prejudicam a germinação devido seu caráter ácido (Carniel *et al.*, 2018).

Por outro lado, concentrações menores de GO e MWCNTs (0,1mg L⁻¹) demonstraram benefícios no desenvolvimento de raízes adventícias, aumento da fotossíntese e melhoria da defesa antioxidante em várias espécies vegetais (Li *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2017). Assim, em doses reduzidas, GO e CNTs podem atuar como indutores no crescimento e germinação, promovendo maior vigor em diferentes espécies vegetais conforme Verma *et al.* (2019), mas altas concentrações tendem a induzir estresse oxidativo, inibir o crescimento e reduzir a biomassa vegetal (Zhang *et al.*, 2016). Portanto, a dose e o contexto de aplicação são fatores cruciais na determinação do impacto desses nanomateriais no ambiente.

2.7 BIOENSAIOS DE TOXICIDADE

O uso crescente de nanomateriais na indústria global tem gerado preocupações sobre seus potenciais efeitos toxicológicos no meio ambiente, impactando diretamente os ecossistemas. No Brasil, a regulamentação do uso de nanomateriais ainda está em fase de discussão, sem que haja uma normatização específica definida (Lazzaretti; Hupffer, 2019). Da mesma forma, não existe uma padronização adequada para a avaliação da toxicidade de nanomateriais, o que dificulta a comparação dos resultados entre os diferentes compostos analisados. Contudo, testes *in vitro* e *in vivo* têm sido utilizados para avaliar a toxicidade desses materiais (Zielińska *et al.*, 2020).

Os testes *in vitro* apresentam vantagens significativas, como menor custo e resultados rápidos. No entanto, esses testes, por si só, não conseguem fornecer uma visão abrangente sobre os impactos dos nanomateriais no meio ambiente (Savage *et al.*, 2019). Por outro lado, considerando que os corpos d'água continentais e marinhos são recursos compartilhados por diversos organismos, testes *in vivo* com espécies aquáticas possuem um grande potencial para refletir os impactos dos nanomateriais no ecossistema (MISHRA *et al.*, 2021). A interação dos nanomateriais com organismos vivos geralmente resulta em variações de concentração, permitindo uma análise estatística para comparar a toxicidade entre diferentes nanomateriais (Zielińska *et al.*, 2020).

O teste microtox é um bioensaio baseado na determinação da medição da luminescência da bactéria marinha *Aliivibrio fischeri*, bactéria gram-negativa em forma de bastonete (Mutalib; Ghanem, 2017). Consiste em um teste rápido (5-30 minutos) para estimar a

toxicidade aguda da água, lodo de esgoto, solo, compostos puros e suas misturas. *A. fischeri* é altamente sensível a uma ampla gama de substâncias tóxicas. Quando exposta a um ambiente tóxico, ocorre uma redução na sua bioluminescência, que é quantificada em termos percentuais e correlacionada com o nível de toxicidade. O resultado do teste gera valores de EC50 (Concentração Efetiva 50%), ou seja, a concentração da substância que causa a inibição de 50% da bioluminescência bacteriana. Conforme a Norma Técnica NBR 15411-2: Ecotoxicologia Aquática - Determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (ABNT, 2012). Por sua eficácia, esse bioensaio é aceito mundialmente para avaliação de ecotoxicidade (Turek *et al.*, 2020).

Outro bioensaio amplamente utilizado é o teste com sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), que consiste em um teste de toxicidade aguda estática com 120 horas de exposição. Esse método é empregado para avaliar efeitos fitotóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos das amostras analisadas, geralmente resultando na inibição da germinação e no desenvolvimento das plântulas. Os parâmetros são medidos com base no crescimento das radículas, comparando-se amostras expostas a soluções padrão (controle negativo) e soluções contendo a amostra em estudo (controle positivo) (Aguilar-Ascón; Marrufo-Saldaña; Barra-Hinojosa, 2024). A alface se destaca como um organismo modelo para bioensaios devido a sua alta sensibilidade, baixo custo, rápido processo de germinação (cerca de 24 horas), adaptação a ampla faixa de pH e características genéticas que favorecem sua análise, como um pequeno número de cromossomos, grande número de células em divisão na zona meristemática e baixa sensibilidade a potenciais osmóticos (Govêa *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2017).

3 JUSTIFICATIVA

Apesar do crescente número de estudos sobre o uso de nanomateriais de carbono em sistemas vegetais, os dados disponíveis são contraditórios ao avaliar o potencial dessa nanotecnologia em diferentes culturas. Por isso, este trabalho tem como objetivo reunir evidências sobre o papel dos nanotubos de carbono de parede múltipla e do óxido de grafeno na germinação e no desenvolvimento de mudas de *Lactuca sativa*, uma planta amplamente conhecida pela comunidade científica, com o intuito de contribuir para futuras perspectivas na implementação de uma agricultura sustentável por meio do uso dessas nanotecnologias baseadas em carbono. Além disso, o aumento da utilização de nanomateriais em diversas áreas acarreta incertezas relacionadas à manipulação desses materiais sintéticos no ambiente, uma vez que a toxicidade desses resíduos é um aspecto controverso e ainda sem consenso. Assim, este estudo busca analisar os possíveis efeitos adversos em organismos de diferentes níveis da cadeia alimentar, incluindo vegetais superiores e bactérias. Com base nos dados obtidos, será possível avaliar os impactos dos nanotubos de carbono de parede múltipla e do óxido de grafeno no ambiente e, conseqüentemente, promover o avanço da nanotecnologia em práticas agrícolas limpas e sustentáveis.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar o potencial dos nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs) na germinação e desenvolvimento inicial de *Lactuca sativa* L. e a toxicidade do resíduo de MWCNTs e óxido de grafeno (GO) em *Aliivibrio fischeri* e *Lactuca sativa* L.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para alcançar o objetivo geral desta pesquisa, foram definidos os seguintes objetivos específicos:

- a) avaliar o uso dos MWCNTs no parâmetro fitotécnicos iniciais de *Lactuca sativa*;
- b) avaliar o uso dos MWCNTs nos parâmetros bioquímicos e fisiológicos de *Lactuca sativa*;
- c) avaliar o potencial ecotoxicológico dos MWCNTs e do GO em *Aliivibrio fischeri* e *Lactuca sativa* L;
- d) validar a técnica de nanoprimering de sementes como teste de toxicidade aguda.

5 ARTIGO I - Germinação de sementes e crescimento inicial de alface com nanotubos de carbono de paredes múltiplas

AUTORES: Arlinda de Jesus Rodrigues Resende; Lucas Adriano Moreira; Thaina Menegheti Nehme; Eduardo Jose de Souza Junior; João Vitor Barbosa Calvelli; Alexandra dos Santos Ambrósio; Sandro Barbosa; Erika dos Santos Silva; Antonio Rodrigues da Cunha Neto; Michele Valquíria dos Reis; Breno Régis Santos.

RESUMO

Nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs) são nanomateriais à base de carbono com alto potencial para a agricultura moderna, exibindo propriedades físicas e químicas únicas, incluindo seu reduzido tamanho, grande área superficial e baixo impacto ambiental. Devido a essas características, são nanomateriais com potencial para substituir agroquímicos na agricultura contemporânea, além de oferecer soluções para desafios causados pelas mudanças climáticas, como salinidade e seca. Ademais, os nanotubos de carbono prometem impulsionar a agricultura, devido seu potencial de aumentar o rendimento das culturas, preservar equilíbrio ecológico e promover a sustentabilidade ambiental e estabilidade econômica. Diante desse cenário, este estudo investigou os efeitos dos MWCNTs na germinação e desenvolvimento de alface. As sementes de alface foram embebidas em soluções nas concentrações de (100, 200, 300, 400 e 500 mg L⁻¹) de MWCNTs para avaliar parâmetros germinativos, morfológicos, bioquímicos e fisiológicos. Os resultados indicaram que, em baixas concentrações, os MWCNTs atuaram como promotores de crescimento, aumentando a biomassa das plântulas. No entanto, em concentrações mais altas, foram observados sinais de estresse oxidativo e danos na membrana celular, sem comprometimento significativo da germinação. Em razão de tais resultados, os MWCNTs podem ser utilizados como promotores de crescimento vegetal, desde que sejam aplicados em concentrações adequadas. A concentração de 200 mg L⁻¹ foi considerada a concentração ideal para o uso em sistemas vegetais.

Palavras-chave: MWCNTs, vegetal superior, nanotecnologia, agricultura, sustentabilidade.

INTRODUÇÃO

Com o foco de minimizar os impactos ocasionados pela poluição ambiental proveniente do uso exacerbado de agroquímicos no campo, bem como proporcionar maior produtividade e qualidade das culturas, a nanotecnologia representa uma solução para as barreiras existentes para a implementação de uma agricultura sustentável e resiliente. Consiste em uma tecnologia promissora de ampla utilização, sendo solução para diversos problemas ocasionados pelas mudanças climáticas, incluindo salinidade, seca, altas e baixas temperaturas (Abdel-Aziz; Hasaneen; Omer, 2019; Shrivastava; Kumar, 2015). O reduzido tamanho confere à nanotecnologia propriedades físicas e químicas únicas (Rabiee *et al.*, 2019). Entre as principais aplicações da nanotecnologia na agricultura se incluem nanofertilizantes, nanocomplexos de liberação controlada, nanopesticidas, nanoherbicidas, nanobiossensores, nanobiofarming e manipulação nanogenética (Agrawal; Rathore, 2014; Gupta *et al.*, 2020).

Dentre os nanomateriais, destacam-se os nanotubos de carbono (CNTs), os quais são folhas cilíndricas de grafeno. Deste modo, os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs) apresentam uma estrutura composta por vários cilindros concêntricos (Peng *et al.*, 2020). Tais nanomateriais exibem alto potencial na agricultura moderna, por favorecer o crescimento vegetal através de uma entrega de nutrientes eficiente, sem perda considerável da carga nutricional, devido sua capacidade de atravessar a parede celular (Kwak *et al.*, 2019). Esses nanomateriais distinguem-se dos demais, devido sua baixa toxicidade, alta estabilidade e baixo impacto ambiental (Yan *et al.*, 2016). Desempenham também papel indutor de crescimento em plantas, influenciando o aumento de biomassa, comprimento das raízes e parte aérea (Joshi *et al.*, 2020). Também são indutores de alterações na composição lipídica, rigidez e permeabilidade das membranas plasmáticas da raiz, bem como na maior expressão de aquaporina sob estresse salino (Martinez-Ballesta *et al.*, 2020). Além de estimular maior eficiência fotossintética (Lahiani *et al.*, 2018).

Para uma análise mais segura dos efeitos promotores dos nanomateriais, recomenda-se que sejam realizados bioensaios com a finalidade de expor a amostra em um bioindicador (Pedrini *et al.*, 2020). A técnica de priming de sementes, consiste na hidratação da semente antes da semeadura, o que conseqüentemente, possibilita ativação de fases responsáveis pelo rearranjo de estruturas celulares e macromoléculas. Por este motivo, o condicionamento de sementes expressa benefícios na germinação e no desenvolvimento inicial das plântulas

em diferentes temperaturas, com uniformidade em curto período, forte crescimento, floração precoce e altos rendimentos (Jamil *et al.*, 2016). Em razão disso, essa etapa de preparação de sementes tem sido usada para reduzir estresses abióticos e bióticos de sementes comerciais (Rhaman *et al.*, 2020). Além de ser uma técnica simples e eficaz de exposição de sementes a uma substância em estudo (Pedrini *et al.*, 2020).

As sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), são amplamente utilizadas como bioensaio devido sua germinação rápida e uniforme, ideal para testes fitotóxicos e citogenotóxicos (Vieira *et al.*, 2022). A hortaliça pertence ao gênero *Lettuce* da família Asteraceae, nativa da atual área mediterrânea com temperatura ideal de crescimento variando entre 15-25 °C (Zhao *et al.*, 2022). Embora seja uma cultura que permite cultivo tanto em estufas quanto em áreas abertas, é uma espécie sensível a temperaturas elevadas (Yoong *et al.*, 2016). Além disso, sua aplicação como bioindicador é validada devido sua alta sensibilidade, visto que em resposta ao estresse tendem a ocorrer mudanças morfológicas, incluindo redução na espessura foliar, aumento na altura do nó do caule e lesões sépticas, declínio nutricional e consequentemente, acarretando o rendimento das culturas (Zhao *et al.*, 2022).

Com base nas informações apresentadas, este estudo propõe comprovar o efeito promotor dos nanotubos de carbono de parede múltipla em sementes de alface nos seus estágios iniciais de germinação e crescimento. Desta forma, objetivou-se avaliar a germinação, crescimento inicial e aspectos bioquímicos e fisiológicos de sementes de alface embebidas em nanotubos de carbono de paredes múltiplas.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de execução

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade, no Instituto de Ciências da Natureza, na Universidade Federal de Alfenas. Localizado na região de Alfenas, estado de Minas Gerais, Brasil.

Nanotubo de Carbono de parede múltipla e material vegetal

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT), funcionalizados com grupos carboxílicos foram fornecidos pelo CTNano UFMG (Centro de Tecnologia em Nanomateriais e Grafeno da Universidade Federal de Minas Gerais) e preparada uma solução estoque contendo 1000 mg L⁻¹ de MWCNT.

A solução passou por um processo de sonicação (Branson – Digital Sonifier®, modelos 250 e 450) com 50% de amplitude, por três ciclos de 15 minutos. Após a homogeneização da solução no equipamento de sonicação, o pH foi medido, apresentando um valor de 5,5. A solução foi armazenada em um frasco âmbar, protegido da luz com papel alumínio e mantida sob refrigeração até o momento de uso.

Teste de germinação

O teste de germinação foi realizado em placas de Petri 60 mm de diâmetro, com duas folhas de papel germitest® por placa, umedecidas com 3 mL de nanotubos de carbono nas concentrações 100, 200, 300, 400 e 500 mg L⁻¹. Como controle negativo, as sementes foram inseridas nas mesmas condições, com o papel germitest® umedecido com água destilada no mesmo volume. Foram realizadas quatro repetições, contendo 30 sementes de alface. Foi utilizado a cultivar de alface Baba de Verão, da marca ISLA do lote 168060, com porcentagem de germinação de 95%, grau de pureza de 99,9%, com validade até 08/2025, sem tratamento. As placas foram mantidas em câmara de germinação de demanda bioquímica de oxigênio (BOD-Cienlab®) a 24 °C, com fotoperíodo de 12 horas (Cunha Neto *et al.*, 2023).

Parâmetros bioquímicos

Para analisar os parâmetros bioquímicos foram necessários 0,2 g de massa fresca de plântulas, os quais foram maceradas em nitrogênio líquido com 20% de polivinilpirrolidona (PVP) (m/v), homogeneizadas em 1,5 mL de ácido tricloroacético (TCA) a 0,1% (p/v) e submetidas à centrifugação a 12.000 × g por 15 minutos a 4 °C. A concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi medida pela absorbância a 390 nm em um meio reacional composto por tampão fosfato de potássio 100 mM, pH 7,0, e iodeto de potássio 1 M, conforme descrito por Velikova *et al.* (2000).

A peroxidação lipídica foi avaliada pela quantificação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBA), conforme o método de Buege e Aust (1978). Amostras de 0,2 g foram maceradas em nitrogênio líquido com a adição de 20% de PVP (p/v) e homogeneizadas em 1,5 mL de TCA a 0,1% (p/v). O homogeneizado foi centrifugado a 12.000 × g por 15 minutos a 4°C. Alíquotas de 250 µL do sobrenadante foram adicionadas ao meio de reação contendo 0,5% de TBA (p/v) e 10% de TCA (p/v), seguidas de incubação a 95 °C por 30 minutos. A reação foi interrompida rapidamente por resfriamento em gelo, e as leituras de absorbância

foram realizadas a 535 nm e 600 nm em espectrofotômetro.

Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento foi inteiramente casualizado com fatorial simples testando 5 concentrações (100, 200, 300, 400 e 500 mg L⁻¹) de MWCNTs e água destilada como controle negativo. O experimento foi conduzido com 4 repetições e 30 sementes de alface por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Skott-Knott para comparação das médias a 5% de significância pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A protrusão radicular de sementes de alface expostas a diferentes concentrações de nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT) em 24 horas, obteve uma taxa média igual a 92,50%. A eficiência da germinação em 96 horas e 168 horas também não diferiu nas diferentes concentrações de MWCNTs, e obteve uma taxa média de germinação igual a 98,86%. O índice de velocidade de germinação de sementes de alface expostas a diferentes concentrações de MWCNTs obteve uma média geral igual a 74,35. Tais valores foram demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1. Teste de análise de variância para protrusão radicular com 24h a 5% de significância.

Parâmetro	F calculado	p-valor	CV (%)	Média geral
Protrusão radicular (24h)	0,665	0,6546	5,76	92,50%
Primeira contagem de germinação (4 e 7 dias)	0,600	0,7006	2,25	98,86%
Índice de velocidade de germinação	0,527	0,7532	3,84	74,35

Neste estudo, as sementes de alface empregadas no bioensaio foram originadas por lotes comerciais. Os resultados indicaram a garantia de germinação de sementes comerciais, as quais asseguram a homogeneidade, com porcentagem próxima a 100%, e padronização de propriedades estabelecidas no comércio. Com base nos resultados expostos, e nas taxas próximas a 100% de germinação expressas pelo controle (0 mg L⁻¹), foi possível validar as sementes de alface como um eficiente bioensaio vegetal, comprovando sua eficiência de

germinação.

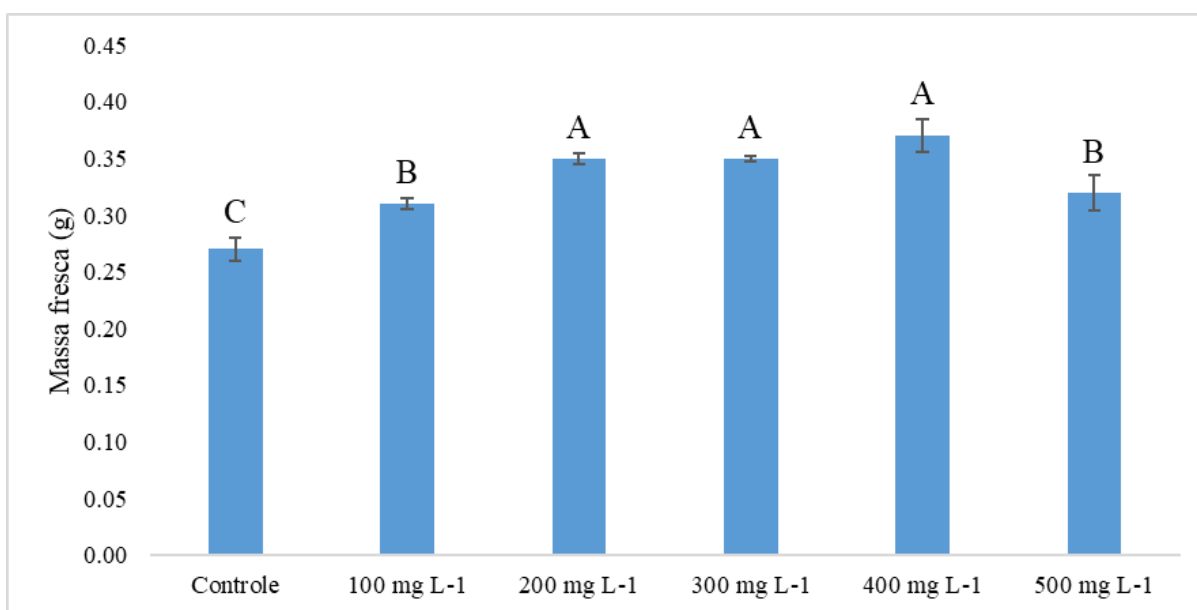
Neste sentido, este estudo utilizando as sementes comerciais de alface com a exposição dos nanotubos de carbono de parede múltipla, não forneceu prejuízo na germinação. Apesar da garantia de quase 100% de germinação do lote utilizado no presente trabalho, a germinação das sementes ocorreu normalmente e uniformemente, independentemente dos tratamentos aplicados. Desta forma, os nanotubos não influenciaram estatisticamente na germinação. Durante os 7 dias de tratamento, não foram observadas características visíveis de deficiência, toxicidade induzidas pelo tratamento ou presença de ataque patogênicos.

Apesar de não se verificar influência direta dos MWCNTs na germinação de alface, existem evidências que enaltecem benefícios de seu uso. O efeito promotor dos MWCNTs foi relacionado a sua capacidade intrínseca de penetrar no tegumento da semente e promover a absorção de água (Szöllösi *et al.*, 2020). Com isso, proporciona melhora na germinação devido ao aumento da expressão dos genes da aquaporina, responsável pelo transporte de água e barreira para íons e outros solutos (Shelar *et al.*, 2023). Além disso, foi demonstrado anteriormente que alivia a dormência de sementes conforme Ali *et al.* (2020), com alta atividade antimicrobiana, possibilitando a inibição do crescimento de patógenos (Saleemi *et al.*, 2020). Notaram também que MWCNTs promoveu aumento de frutos, números de grãos e biomassa em trigo (Joshi *et al.*, 2018).

Em estudos anteriores, utilizando MWCNTs com amino-funcionalizados em alface também notaram que não houve interferência dos nanomateriais na germinação e no crescimento, bem como, diminui a biodisponibilidade de pesticidas após sua associação com vermiculita (Hamdi *et al.*, 2015). Outro estudo similar utilizando a flor clitoria, foi observado o mesmo efeito. Segundo Barroso *et al.* (2024), a concentração de 800 mg L⁻¹ não interferiu na germinação da flor clitoria (Barroso *et al.*, 2024).

A análise da massa fresca de plântulas de alface exposta a diferentes concentrações de MWCNTs, indicaram que as concentrações 200, 300 e 400 mg L⁻¹ resultaram no aumento de biomassa (Figura 1).

Figura 1. Massa fresca (g) de plântulas de alface expostas a diferentes concentrações de MWCNTs.



Legenda: Barras representam o valor de erro padrão. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância.

Todas as concentrações de nanomateriais de carbono promoveram aumento da biomassa, se comparado ao controle. É possível observar que as concentrações mais eficientes no aumento da massa fresca de plântulas de alface foram as concentrações 200 mg L⁻¹, 300 mg L⁻¹ e 400 mg L⁻¹, sendo 400 mg L⁻¹ a concentração que mais estimulou o aumento deste parâmetro. Apesar de todos os tratamentos desempenharem respostas favoráveis se comparadas com o controle, a concentração de 500 mg L⁻¹ expressou uma leve redução da biomassa, se assemelhando a concentração inicial 100 mg L⁻¹, a qual também estimulou pouco o aumento de biomassa. Este estímulo do aumento de biomassa pode ser justificado pela capacidade dos nanomateriais de penetrar nas cascas das sementes, criando pequenos poros.

A indução de novos poros resulta no aumento da absorção de água e aumento da expressão de genes de aquaporina, proteína envolvida na absorção de água (Martinez-Ballesta *et al.*, 2020). Anteriormente, também foi observado que MWCNTs não expressou efeito na germinação e na preparação de sementes de tomate, mas resultou no aumento da biomassa da raiz e ativou o sistema antioxidante. Os autores associaram os efeitos negativos à germinação com a concentração-dependente (López-Vargas *et al.*, 2020).

A penetrabilidade dos MWCNTs através da parede celular e membranas vegetais foi apontada anteriormente. Em brócolis, os MWCNTs foram localizados no apoplasto, na

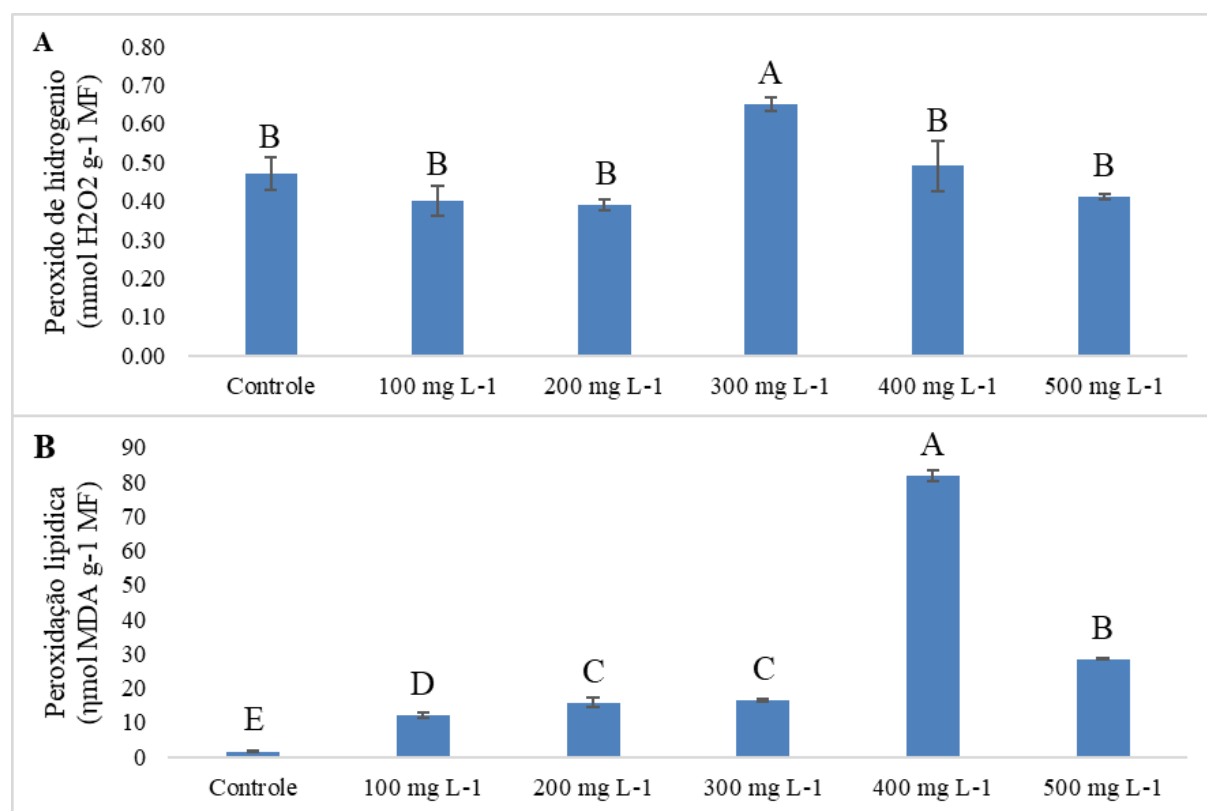
membrana plasmática e no citoplasma, alterando a composição lipídica, permeabilidade e fluidez da membrana plasmática. A superexpressão de aquaporinas em brócolis tratadas com MWCNTs foi relacionada também com aumento na condutividade hidráulica da raiz e nos parâmetros de troca gasosa (Martínez-Ballesta *et al.*, 2016). Os autores, mais recentemente, concluíram que ação direta de MWCNTs é principalmente na modulação da expressão dos genes de aquaporina (Martinez-Ballesta *et al.*, 2020).

A redução da biomassa na maior concentração (500 mg L^{-1}) de MWCNTs dá indícios que, em altas concentrações seu potencial promotor de crescimento é inibido, possivelmente devido seu caráter fitotóxico quando utilizado em altas concentrações. Essa toxicidade associada aos MWCNTs em altas concentrações é apoiada utilizando diferentes modelos vegetais. Em um estudo sobre a influência dos CNTs no crescimento de mudas de trigo e na absorção de Cd, os MWCNTs desempenharam redução da biomassa, inibiram o crescimento das raízes e aumentaram a absorção de Cd em altas concentrações, devido a capacidade dos CNTs de carregar Cd (Chang *et al.*, 2020). Também reduziu a biomassa fresca de mudas de rabanete cultivadas em estufas segundo Haghghi; Silva (2014), de soja conforme Zhai *et al.* (2015), em mudas de arroz segundo Hao *et al.* (2016) e milho (Chen *et al.*, 2023). Por outro lado, em concentrações menores promoveu aumento de biomassa, aumento no tamanho do xilema e floema e maior densidade estomática em trigo segundo Joshi *et al.* (2018), aumento da clorofila, taxa fotossintética, redução do ácido abscísico, aumento da giberelina em arroz conforme Zhang *et al.* (2017) e aumento da defesa antioxidante em trigo (Chang *et al.*, 2020).

Parâmetros bioquímicos

As análises bioquímicas de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peroxidação lipídica (MDA) de plântulas de alface expostas a diferentes concentrações de nanotubos de carbono de parede múltipla, indicaram indução de estresse oxidativo, como demonstrado na Figura 2.

Figura 2. Parâmetros bioquímicos de plântulas de alface após a exposição de MWCNTs em diferentes concentrações.



Legenda: Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. (A) Níveis de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) expressos em µmol H₂O₂ g⁻¹ de massa fresca (g). (B) Níveis de peroxidação lipídica, expressos em µmol de MDA g⁻¹ (malondialdeído) de massa fresca.

Peróxido de hidrogênio é uma espécie reativa de oxigênio (ERO) que se acumula em resposta a estresses ambientais (Gaschler; Stockwell, 2017). Por esse motivo, H₂O₂ é um indicador de estresse oxidativo em plantas. Os dados de peroxidação de hidrogênio revelaram que os nanotubos de carbono de parede múltipla não expressaram estresse oxidativo significativo na maioria de suas concentrações. De modo que, as concentrações 100 mg L⁻¹, 200 mg L⁻¹, 400 mg L⁻¹ e 500 mg L⁻¹, foram estatisticamente semelhantes ao controle (0 mg L⁻¹). Entretanto, a concentração 300 mg L⁻¹ desempenhou um aumento na produção de H₂O₂, o que sugere um aumento do estresse oxidativo nas plântulas de alface.

Apesar disso, nas concentrações subsequentes (400 e 500 mg L⁻¹) não mostraram aumento significativo, o que pode indicar uma possível resposta adaptativa das plantas ou um efeito de dose-resposta não linear.

Peroxidação lipídica é uma medida do dano às membranas celulares usualmente causada por estresse oxidativo (Hamdi *et al.*, 2015). O indicador da peroxidação é o malondialdeído

(MDA), que é um produto da degradação de ácidos graxos e peroxidação lipídica. Os nanotubos de carbono de parede múltipla induziram a produção de MDA em todas as concentrações. Foi expressado um aumento progressivo entre as concentrações de 100 a 200 mg L⁻¹ de MDA, entretanto, o maior índice de produção do indicador foi observado na concentração de 400 mg L⁻¹, sugerindo altos danos às membranas celulares.

Os resultados sugerem que os MWCNTs causam estresse oxidativo ao penetrar pela parede celular. E o aumento dos níveis de MDA após a exposição de MWCNTs são resultantes do acúmulo dos nanomateriais no meio celular, o que gera o dano na membrana. Apesar da constatação de que houve estresse oxidativo e danos na membrana celular, nenhum dos tratamentos utilizando diferentes concentrações de nanotubos de carbono de parede múltipla afetou a germinação e o crescimento da alface, sugerindo a ausência de fitotoxicidade de MWCNTs.

O mesmo foi observado em outro estudo utilizando alface, nele não houve influência dos MWCNTs na germinação das sementes. E do mesmo modo, houve aumento dos níveis de MDA quando expostas as sementes aos MWCNTs (Hamdi *et al.*, 2015). Em milho utilizando concentrações menores de MWCNTs resultou em concentrações baixas de MDA, sendo sua taxa de desenvolvimento dependente das taxas de aplicação (Sharma *et al.*, 2023).

Foi verificado que a absorção e penetração dos MWCNTs pelas células, desencadeia a geração de ROS que estimula as respostas ao estresse oxidativo através da ativação de enzimas antioxidantes, incluindo superóxido dismutase (SOD), peroxidase (POD) e catalase (CAT). Também são incluídos antioxidantes não enzimáticos, incluindo carotenoides, prolina, glutathione e ácido ascórbico (Marshlin *et al.*, 2017). Assim como, foi exposto anteriormente que CNTs podem influenciar as características bioquímicas e fisiológicas através de mudanças na fotossíntese, absorção de água, regulação de genes responsáveis pelo estresse e ativação dos sistemas de defesa das plantas (Verma *et al.*, 2018).

CONCLUSÃO

O bioensaio vegetal com sementes de alface forneceu respostas importantes sobre os efeitos gerados pelos nanotubos de carbono de parede múltipla. Foi possível constatar que os MWCNTs não interferem no processo de germinação, não causando prejuízo neste processo. Também foi possível observar um aumento significativo em baixas concentrações de MWCNTs da biomassa de plântulas de alface, indicando seu possível papel de promotor de crescimento em baixas concentrações, mas em altas concentrações esse papel foi inibido.

Além disso, foi verificado estresse oxidativo e danos na membrana celular em concentrações específicas, sendo associado a capacidade dos MWCNTs de penetrar, acumular e danificar a membrana celular. Apesar disso, nenhuma evidência sugeriu fitotoxicidade, sendo a concentração de 200 mg L⁻¹ considerada a concentração ideal para o uso em sistemas vegetais.

AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [Funding Code 001], CAPES/BRASIL PDPG-POSDOC No. 2930/2022, CAPES/BRASIL MEC/SESu/FNDE/PET. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [443971/2023-4]. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) [BPD-00571-22 e APQ-00303-21].

REFERÊNCIAS

- Agostini, R. T. de, Abrantes, F. L., Machado-Neto, N. B., Custódio, C. C. (2022). Ethanol and hormones in physiological conditioning on germination and seed dormancy of *Urochloa humidicola* cv. Llanero. **Journal of Seed Science**, 44, 1–11. <https://doi.org/10.1590/2317-1545V44261411>
- Ali, M. H., Sobze, J. M., Pham, T. H., Nadeem, M., Liu, C., Galagedara, L., Cheema, M., Thomas, R. (2020). Carbon nanotubes improved the germination and vigor of plant species from peatland ecosystem via remodeling the membrane lipidome. **Nanomaterials**, 10(9), 1–19. <https://doi.org/10.3390/nano10091852>
- Amir, M., Prasad, D., Khan, F. A., Khan, A., Ahamd, B., Astha. (2024). Seed priming: An overview of techniques, mechanisms, and applications. In **Plant Science Today** (Vol. 11, Issue 1, pp. 553–563). Horizon e-Publishing Group. <https://doi.org/10.14719/pst.2828>
- Barroso, L. T., Pereira, T. M., Neto, A. R. D. C., Paiva, P. D. D. O., Paiva, R., Nery, F. C., Reis, M. V. Dos. (2024). Seed priming in *Clitoria ternatea* L. with multi-walled carbon nanotubes: A physicochemical and morphological approach. **Ornamental Horticulture**, 30(242751), 1–8. <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v30.e242751>
- Batista, T. B., Binotti, E. D. C., Binotti, F. F. D. S., DE SÁ, M. E., DA SILVA, T. A. (2018). Priming of brachiaria seeds with different sugar sources and concentrations. **Revista Caatinga**, 31(4), 843–849. <https://doi.org/10.1590/1983-21252018V31N406RC>
- Buege, J. A.; Aust, S. D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, 52, 302–310.
- Chang, X., Song, Z., Xu, Y., Gao, M. (2020). Effects of carbon nanotubes on growth of

wheat seedlings and Cd uptake. **Chemosphere**, 240, 124931–124941.
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124931>

Chen, X., Chu, S., Chi, Y., Wang, J., Wang, R., You, Y., Hayat, K., Khalid, M., Zhang, D., Zhou, P., Jiang, J. (2023). Unraveling the role of multi-walled carbon nanotubes in a corn-soil system: Plant growth, oxidative stress and heavy metal(loid)s behavior. **Plant Physiology and Biochemistry**, 200, 107802–107811.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2023.107802>

Cunha Neto, A. R., Carvalho, M., Morais, G. M. M., Guaraldo, M. M. dos S., dos Santos, H. O., Pereira, W. V. S., Barbosa, S. (2023). Changes in Chromosome Complement and Germination of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Exposed to Heavy Metal Stress. **Water, Air, and Soil Pollution**, 234(4), 243–254. <https://doi.org/10.1007/s11270-023-06262-3>

Gaschler, M. M., Stockwell, B. R. (2017). Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 482(3), 419–425.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.10.086>

Haghighi, M., Silva, J. A. T. Da. (2014). The effect of carbon nanotubes on the seed germination and seedling growth of four vegetable species. **Journal of Crop Science and Biotechnology**, 17(4), 201–208. <https://doi.org/10.1007/s12892-014-0057-6>

Hamdi, H., Torre-Roche, R. D. La, Hawthorne, J., White, J. C. (2015). Impact of non-functionalized and amino-functionalized multiwall carbon nanotubes on pesticide uptake by lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Nanotoxicology**, 9(2), 172–180.
<https://doi.org/10.3109/17435390.2014.907456>

Hao, Y., Yu, F., Lv, R., Ma, C., Zhang, Z., Rui, Y., Liu, L., Cao, W., Xing, B. (2016). Carbon nanotubes filled with different ferromagnetic alloys affect the growth and development of rice seedlings by changing the C:N ratio and plant hormones concentrations. **PLoS ONE**, 11(6), 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157264>

Jamil, E., Zeb, S., Ali, Q. S., Ahmad, N., Sajid, M., Siddique, S., Saleem, M. S. (2016). Effect of Seed Soaking on Seed Germination and Growth of Bitter Gourd Cultivars. **Pure and Applied Biology**, 5(1), 31–36. <https://doi.org/10.19045/bspab.2016.50005>

Joshi, A., Kaur, S., Dharamvir, K., Nayyar, H., Verma, G. (2018). Multi-walled carbon nanotubes applied through seed-priming influence early germination, root hair, growth and yield of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 98(8), 3148–3160. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8818>

Maguire, James D. (1962). Speed of germination—a selection aid and evaluation for seedling emergence and vigor. **Speed of Germination**, 2(2), 176–177.

Mansoor, S., Wani, O. A., Lone, J. K., Manhas, S., Kour, N., Alam, P., Ahmad, A., Ahmad, P. (2022). Reactive Oxygen Species in Plants: From Source to Sink. In **Antioxidants** (Vol. 11, Issue 2, pp. 225–239). MDPI. <https://doi.org/10.3390/antiox11020225>

Marslin, G., Sheeba, C. J., Franklin, G. (2017). Nanoparticles alter secondary metabolism in plants via ROS burst. **Frontiers in Plant Science**, 8, 832–840.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00832>

Martinez-Ballesta, M. C., Chelbi, N., Lopez-Zaplana, A., Carvajal, M. (2020). Discerning the mechanism of the multiwalled carbon nanotubes effect on root cell water and nutrient transport. **Plant Physiology and Biochemistry**, 146, 23–30.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.008>

Martínez-Ballesta, M. C., Zapata, L., Chalbi, N., Carvajal, M. (2016). Multiwalled carbon nanotubes enter broccoli cells enhancing growth and water uptake of plants exposed to salinity. **Journal of Nanobiotechnology**, 14(1), 42–36.
<https://doi.org/10.1186/s12951-016-0199-4>

Pedrini, S., Balestrazzi, A., Madsen, M. D., Bhalsing, K., Hardegree, S. P., Dixon, K. W., & Kildisheva, O. A. (2020). Seed enhancement: getting seeds restoration-ready. In **Restoration Ecology** (Vol. 28, Issue S3, pp. S266–S275). Blackwell Publishing Inc.
<https://doi.org/10.1111/rec.13184>

Rhaman, M. S., Rauf, F., Tania, S. S., Khatun, M. (2020). Seed Priming Methods: Application in Field Crops and Future Perspectives. **Asian Journal of Research in Crop Science**, 8–19. <https://doi.org/10.9734/ajrcs/2020/v5i230091>

Saleemi, M. A., Fouladi, M. H., Yong, P. V. C., Wong, E. H. (2020). Elucidation of antimicrobial activity of non-covalently dispersed carbon nanotubes. **Materials**, 13(7), 1676–1694. <https://doi.org/10.3390/ma13071676>

Sharma, A., Kothari, S. L., Kachhwaha, S. (2023). Impacts of multi-walled carbon-nanotubes on the growth of pearl millet. **Journal of Applied Biology and Biotechnology**, 11(4), 170–177. <https://doi.org/10.7324/JABB.2023.11513>

Shelar, A., Nile, S. H., Singh, A. V., Rothenstein, D., Bill, J., Xiao, J., Chaskar, M., Kai, G., Patil, R. (2023). Recent Advances in Nano-Enabled Seed Treatment Strategies for Sustainable Agriculture: Challenges, Risk Assessment, and Future Perspectives. In **Nano-Micro Letters** (Vol. 15, Issue 1, pp. 54–90). Springer Science and Business Media B.V.
<https://doi.org/10.1007/s40820-023-01025-5>

Simões, M. S., Madail, R. H., Barbosa, S., Nogueira, M. D. L. (2013). Padronização de bioensaios para detecção de compostos alelopáticos e toxicantes ambientais utilizando alface. **Biotemas**, 26(3), 36–44. <https://doi.org/10.5007/2175-7925.2013v26n3p29>

Souza, G. G. de, Pinheiro, A. L. M., Silva, J. A., Veroneze-Júnior, V., Carvalho, M., Bertoli, A. C., Barbosa, S., Souza, T. C. de. (2018). Morpho-physiological Tolerance Mechanisms of *Talinum patens* to Lead. **Water, Air, and Soil Pollution**, 229(1), 4–18.
<https://doi.org/10.1007/s11270-017-3658-0>

Szőllősi, R., Molnár, Á., Kondak, S., Kolbert, Z. (2020). Dual effect of nanomaterials on germination and seedling growth: Stimulation vs. phytotoxicity. **Plants**, 9(12), 1–30.
<https://doi.org/10.3390/plants9121745>

Velikova, V., Yordanov, I., Edreva, A. (2000). Oxidative stress and some antioxidant systems in acid rain-treated bean plants Protective role of exogenous polyamines. **Plant Science**, 151, 59–66. www.elsevier.com/locate/plantsci

Verma, S. K., Das, A. K., Patel, M. K., Shah, A., Kumar, V., Gantait, S. (2018). Engineered nanomaterials for plant growth and development: A perspective analysis.

Science of the Total Environment, 630, 1413–1435.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.313>

Vieira, C. S. S., Nicola, P. A., Bortoleti, K. C. de A. (2022). Determination of phytotoxicity and cytogenotoxicity due to exposure to particles originating from sugarcane burning using test systems *Lactuca sativa* L. and *Allium cepa* L. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, 85(14), 561–572.
<https://doi.org/10.1080/15287394.2022.2054483>

Yan, Q. L., Gozin, M., Zhao, F. Q., Cohen, A., Pang, S. P. (2016). Highly energetic compositions based on functionalized carbon nanomaterials. In **Nanoscale** (Vol. 8, Issue 9, pp. 4799–4851). Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/c5nr07855e>

Yoong, F. Y., O'Brien, L. K., Truco, M. J., Huo, H., Sideman, R., Hayes, R., Michelmore, R. W., Bradford, K. J. (2016). Genetic variation for thermotolerance in lettuce seed germination is associated with temperature-sensitive regulation of ethylene response factor1 (ERF1)1[OPEN]. **Plant Physiology**, 170(1), 472–488. <https://doi.org/10.1104/pp.15.01251>

Zhai, G., Gutowski, S. M., Walters, K. S., Yan, B., Schnoor, J. L. (2015). Charge, Size and Cellular Selectivity for Multi-wall Carbon Nanotubes by Maize and Soybean. **Environmental Science Technology**, 49(12), 1–13.

Zhang, H., Yue, M., Zheng, X., Xie, C., Zhou, H., Li, L. (2017). Physiological Effects of Single- and Multi-Walled Carbon Nanotubes on Rice Seedlings. **IEEE Transactions on Nanobioscience**, 16(7), 563–570.
<https://doi.org/10.1109/TNB.2017.2715359>

Zhao, X., Sui, X., Zhao, L., Gao, X., Wang, J., Wen, X., Li, Y. (2022). Morphological and Physiological Response Mechanism of Lettuce (*Lactuca Sativa* L.) to Consecutive Heat Stress. **Scientia Horticulturae**, 301, 111112–111121.
<https://doi.org/10.1016/j.scienta.2022.111112>

6 ARTIGO II - Toxicidade aguda em *Aliivibrio fischeri* e *Lactuca sativa* L. de nanomateriais doadores de carbono

Arlinda de Jesus Rodrigues Resende^{1*}; Erika dos Santos Silva¹; Antonio Rodrigues da Cunha Neto¹; Thaina Menegheti Nehme¹; Anelise Vieira Rosa Fernandes da Silva¹; Juliana Leme Barbosa¹; Alexandra dos Santos Ambrósio¹; Lucilaine Valéria de Souza Santos²; Sandro Barbosa¹; Maria José dos Santos Wisniewski¹; Michele Valquíria dos Reis³; Breno Régis Santos¹.

1 Instituto de Ciências da Natureza, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas-MG, Brasil. 2 Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Produtos e Processos/CEFET/MG, Belo Horizonte, Brasil. 3 Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, Lavras-MG, Brasil. * Autor correspondente: AJR Resende.

RESUMO

Os nanomateriais de carbono têm despertado grande interesse devido às suas propriedades únicas, como tamanho reduzido, ampla área superficial e alta reatividade. Por este motivo, este estudo investigou o impacto de dois nanomateriais doadores de carbono sendo os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs) e o óxido de grafeno (GO), em organismos teste. O estudo incluiu dois testes ecotoxicológicos: o bioteste Microtox com a bactéria *Aliivibrio fischeri* e um bioensaio vegetal utilizando nanoprimings em sementes de *Lactuca sativa* L. Os resultados do teste Microtox revelaram que ambos nanomateriais apresentaram toxicidade para *A. fischeri*, sendo o GO classificado como "muito tóxico", enquanto os MWCNTs apresentaram toxicidade moderada. O valor de EC50 para o GO variou entre 0,368% e 0,395%, indicando uma alta toxicidade mesmo em baixas concentrações. Já para os MWCNTs, os valores variaram de 39,92% a 45,44%, sugerindo uma toxicidade menos pronunciada, mas ainda relevante. No bioensaio com *Lactuca sativa*, o nanopriming indicou efeitos deletérios no comprimento radicular após exposição ao óxido de grafeno, apesar disso, a germinação e o comprimento da parte aérea não foram interferidos. Os MWCNTs favoreceram o crescimento radicular, comprimento de parte aérea e não interferiu na germinação das sementes. Os resultados sugerem que, apesar do potencial promissor dos nanomateriais doadores de carbono, seu uso deve ser controlado devido ao seu potencial efeito ecotóxico, o qual foi evidenciado sobre a microbiota e vegetal superior.

Palavras-chave: MWCNTs, óxido de grafeno, nanotecnologia, Microtox, Nanopriming.

ABSTRACT

Carbon-based nanomaterials have attracted significant interest due to their unique properties, such as reduced size, large surface area, and high reactivity. Therefore, this study investigated the impact of two carbon donor nanomaterials multi walled carbon nanotubes (MWCNTs) and graphene oxide (GO) on test organisms. The study included two ecotoxicological assays: the Microtox bioassay using the bacterium *Aliivibrio fischeri* and a plant bioassay applying nanopriming on *Lactuca sativa L.* seeds. The Microtox test results revealed that both nanomaterials exhibited toxicity to *A. fischeri*, with GO classified as “highly toxic,” while MWCNTs showed moderate toxicity. The EC50 value for GO ranged from 0.368% to 0.395%, indicating high toxicity even at low concentrations. For MWCNTs, values ranged from 39.92% to 45.44%, suggesting less pronounced but still relevant toxicity. In the *Lactuca sativa* bioassay, nanopriming with GO had deleterious effects on root length, although seed germination and shoot length were unaffected. MWCNTs promoted root and shoot growth and did not interfere with seed germination. The results suggest that despite the promising potential of carbon-donor nanomaterials, their use should be controlled due to their potential ecotoxic effects, as evidenced in both microbial and higher plant systems.

Keywords: MWCNTs, graphene oxide, nanotechnology, Microtox, nanopriming.

INTRODUÇÃO

Com o crescente uso dos nanomateriais de carbono em diferentes ambientes, incluindo a indústria automotiva, aeronáutica, plástico e agricultura segundo Rizwan *et al.* (2021), gera-se uma preocupação com o impacto residual de tais nanomateriais no ecossistema. Na agricultura, suas potenciais contribuições são como nanofertilizantes, nanopesticidas e promotores de crescimento (Paiva *et al.*, 2023; Barroso *et al.*, 2024; Valdés *et al.*, 2024). Os nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs) e óxido de grafeno (GO) são nanomateriais de carbono com alto potencial na agricultura, devidos seu tamanho reduzido, grande área superficial e alta reatividade (Usman *et al.*, 2020). Apesar disso, suas propriedades únicas também podem conferir efeitos danosos, como a indução de danos oxidativos e o prejuízo à microbiota do solo, dependendo de sua concentração e tipo de exposição (Hao *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2016).

Diante da sua disseminação global, a regulação de seu uso ainda é uma questão sensível, com pouca atenção e sem uma padronização global adequada para a avaliação de sua toxicidade (Zielińska *et al.*, 2020). Além disso, as evidências sobre a toxicidade desses materiais ainda são limitadas, e a falta de consenso sobre o tema gera incertezas quanto ao uso de nanomateriais. Essa situação ressalta a necessidade de estudos mais aprofundados para investigar os possíveis impactos de materiais em escala nanométrica (Martins, 2016). Por esse motivo, testes *in vitro* e *in vivo* têm sido usados para nortear o potencial tóxico agudo desses materiais. Em geral, em testes agudos submetem os organismos às concentrações crescentes com base em uma faixa estabelecida por curto período, geralmente de 24 horas a 96 horas, para observar possíveis efeitos deletérios (Roberts *et al.*, 2022).

Dentre os testes agudos, inclui-se o teste de toxicidade Microtox, o qual é amplamente utilizado como teste de toxicidade aguda de amostras líquidas (CETESB, 2001; ABNT, 2021). Este teste tem duração de 5-30 minutos e consiste no uso da bactéria marinha *Aliivibrio fischeri* como indicadora de toxicidade, devido sua alta sensibilidade a uma diversidade de substâncias tóxicas. Quando exposta a uma amostra danosa, a bactéria tem redução expressiva na sua bioluminescência, a qual pode ser expressa em termos percentuais e correlacionada com o grau de toxicidade. O resultado do teste é indicado como EC50, o qual indica a concentração da substância que causa a inibição de 50% da bioluminescência bacteriana (Turek *et al.*, 2020).

Os bioensaios com espécies vegetais também podem ser uma ferramenta eficaz na avaliação da toxicidade aguda de nanomateriais. Um exemplo disso são os testes com

Lactuca sativa L., espécie muito utilizada pois possui uma germinação rápida, uniforme e alta sensibilidade, ideal para testes fitotóxicos e citogenotóxicos (Vieira *et al.*, 2022; Cunha Neto *et al.*, 2023).

Assim, a exposição de sementes à nanomateriais pode ser realizada por meio da técnica de priming de sementes. A técnica, também conhecida por condicionamento fisiológico, consiste na hidratação parcial da semente por um curto período, permitindo que a pré-germinação (fase II) ocorra, mas evitando a protrusão da radícula (fase III, crescimento). A fase II é responsável por vários processos metabólicos, incluindo a síntese de proteínas, respiração, metabolismo de açúcar e outros (Corbineau *et al.*, 2023).

O Priming usando nanomateriais (nanoprimer) tem se mostrado mais promissor do que as abordagens tradicionais de priming na agricultura (Corbineau *et al.*, 2023). Isso ocorre porque, devido ao tamanho dos nanomateriais e suas propriedades catalíticas, os primings interagem com as sementes atravessando barreiras biológicas e se acumulando rapidamente, permitindo que participem e modulem os processos metabólicos celulares nas sementes. Dessa maneira, têm grande importância na melhora da velocidade de germinação, promovendo o vigor de mudas e aumentando a tolerância das plantas a condições adversas (Zhao *et al.*, 2024). Além disso, a tecnologia de tratamento de sementes consiste em um método simples, fácil e econômico, o que provavelmente permitirá que se torne uma técnica adotável e acessível para análises de toxicidade aguda.

Em razão disso, este estudo busca investigar o efeito do uso de dois nanomateriais doadores de carbono, os nanotubos de carbono de parede múltipla e óxido de grafeno, através de duas metodologias de bioensaio ecotoxicológico. Supõe-se que, devido às características físicas e químicas únicas dos nanomateriais e sua influência em processos metabólicos, os MWCNTs e GO expressem efeito deletério nos bioensaios. Sendo assim, este estudo tem como objetivos realizar bioensaios com MWCNTs e GO para avaliar a toxicidade aguda: i) em bactérias marinhas *Aliivibrio fischeri*, teste agudo amplamente utilizado devido sua eficiência e ii) via nanoprimer de sementes de *Lactuca sativa* L.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de execução

O trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biotecnologia Ambiental e Genotoxicidade, no Instituto de Ciências da Natureza, na Universidade Federal de Alfenas. Localizado na região de Alfenas, estado de Minas Gerais, Brasil (latitude 45° 57' 14" Sul e

longitude 21° 24' 56" Oeste).

Obtenção das amostras

Os nanotubos de carbono de paredes múltiplas (MWCNT), funcionalizados com grupos carboxílicos foram fornecidos pelo CTNano UFMG (Centro de Tecnologia em Nanomateriais e Grafeno da Universidade Federal de Minas Gerais) e preparada uma solução estoque contendo 1000 mg L⁻¹ de MWCNT.

A solução passou por um processo de sonicação (Branson – Digital Sonifier®, modelos 250 e 450) com 50% de amplitude, por 15 minutos, em três ciclos. Após a homogeneização da solução no equipamento de sonicação, o pH foi medido, apresentando um valor de 5,5. A solução foi armazenada em um frasco âmbar, protegido da luz com papel alumínio e mantida sob refrigeração até o momento de uso.

O óxido de grafeno também foi sintetizado pelo CTNano UFMG o qual foi utilizado o método de Hummers descrito por Reis *et al.* (2020) com modificações.

Teste ecotoxicológico - Microtox

O teste de toxicidade aguda foi realizado com a bactéria *Aliivibrio fischeri*, pelo equipamento MICROTOX®, modelo 500 Analyzer (SDI), que se encontra no Laboratório de Ensaio Biológicos do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental da UFMG. Os testes foram realizados seguindo a Norma Técnica Brasileira NBR 15411-3, (ABNT, 2021), utilizando bactérias liofilizadas e seguiram o procedimento recomendado pelo fabricante do próprio equipamento (MICROTOX® Omni Software, versão 4.1). Os parâmetros de pH e salinidade das amostras foram previamente medidos, mas não houve a necessidade de ajuste com base nos requisitos do teste. As bactérias liofilizadas e armazenadas em -20 °C, passaram por processo de ativação para o teste por meio de uma solução de reconstituição. Foram realizados testes preliminares de sensibilidade com a solução de referência de sulfato de zinco heptahidratado (100 mg L⁻¹) para controle de qualidade da bactéria.

Para a determinação da concentração de efeito (CE50) foi realizado Teste Básico MICROTOX® 81,9%, usando nove concentrações das amostras (81,9%, 40,95%, 20,48%, 10,24%, 5,12%, 2,56%, 1,28%, 0,64% e 0,32% v/v). Cada ampola de bactéria contém uma cultura de 108 células. A toxicidade aguda foi determinada a partir das diluições das amostras, e as medições da bioluminescência das bactérias foram lidas em 30 minutos. O controle neste teste é a solução diluente de cloreto de sódio (NaCl) 2%, visto que são bactérias marinhas, não apresentando toxicidade. Os resultados obtidos no controle não são apresentados, seu

papel é validar a luminescência da bactéria para determinar o efeito tóxico dos tratamentos. Desta forma, o software MICROTOXOmni[®] compara os resultados da emissão de luz entre a solução controle e as amostras. Quanto mais luz emitida pelos organismos, menor a taxa de toxicidade da amostra. A toxicidade da amostra é dada em porcentagem de Concentração Efetiva capaz de gerar efeito sobre metade da população (CE50) (Gámez *et al.*, 2019).

Teste ecotoxicológico - Bioensaio vegetal

O bioensaio vegetal utilizando *Lactuca sativa* foi realizado com a finalidade de avaliar a toxicidade aguda das amostras quando expostas ao condicionamento fisiológico que é uma técnica agrônômica que consiste na imersão de sementes em soluções definidas, com a finalidade de preparar as sementes para ativar vias metabólicas de crescimento (Agostini *et al.*, 2022). Deste modo, neste estudo o condicionamento fisiológico foi aplicado para avaliar a toxicidade aguda para o modelo vegetal.

Para *Lactuca sativa* foi utilizado a cultivar Babá de Verão, da marca ISLA do lote 168060, com porcentagem de germinação de 95%, grau de pureza de 99,9%, com validade até 08/2025, sem tratamento. As sementes de *L. sativa* foram expostas às diferentes concentrações dos nanomateriais (200, 400, 600, 800 e 1000 mg L⁻¹) mantidos no escuro, em aeração constante e temperatura de 24 °C por 5 horas. Como controle dos tratamentos foi utilizado água destilada e controle da técnica, sementes que não passaram pelo condicionamento fisiológico. Após este período de condicionamento fisiológico, foram montados os testes de germinação com quatro repetições em placas de Petri 60 mm de diâmetro, contendo 30 sementes de *L. sativa* por repetição. Cada placa foi forrada com duas folhas de papel germitest[®], umedecidas com 3 mL de água destilada. As placas foram mantidas em câmara de germinação de demanda bioquímica de oxigênio (BOD-Cienlab[®]) a 24 °C, com fotoperíodo de 12 horas (Cunha Neto *et al.*, 2023).

Após 24 horas, foi mensurado a protrusão da radícula. Seguindo as diretrizes de Maguire (1962), o índice de velocidade de germinação (IVG) foi medido por contagens a cada 12 horas até o sétimo dia, calculado através da equação 1 (Maguire, 1962). No quarto e sétimo dia foram realizadas a porcentagem de germinação de *L. sativa* seguindo a Regra de Análise de Sementes (Brasil, 2009). No sétimo dia, foi aferido comprimento de parte aérea e raiz.

$$(1) \text{ IVG: } (N1/1) + (N2/2) + \dots + (Nn/n)$$

Onde: Nn= número total de sementes germinadas; n = intervalo de tempo

Delineamento experimental e análises estatísticas

O delineamento foi inteiramente casualizado testando 5 concentrações de MWCNTs e GO, e água destilada como controle negativo. O experimento foi conduzido com 4 repetições e 30 sementes de *L. sativa* por repetição. Os dados foram submetidos à análise de variância e teste de Skott-Knott para comparação das médias a 5% de significância pelo programa estatístico SISVAR (Ferreira, 2019).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Microtox

A análise de toxicidade aguda dos nanotubos de carbono de parede múltipla (MWCNTs) e óxido de grafeno (GO) realizadas pelo teste ecotoxicológico Microtox, revelou toxicidade de ambos nanomateriais para a bactéria marinha bioluminescente *Aliivibrio fischeri*, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Valores CE50% obtidos para as amostras de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e óxido de grafeno obtidos com os testes de toxicidade aguda com *Aliivibrio fischeri*.

Amostra	Tempo de exposição	CE50%	Classificação
MWCNTs	5 minutos	39,92%	Tóxico
MWCNTs	15 minutos	48,47%	Tóxico
MWCNTs	30 minutos	45,44%	Tóxico
GO	5 minutos	03,68%	Muito tóxico
GO	15 minutos	03,51%	Muito tóxico
GO	30 minutos	03,95%	Muito tóxico

Os resultados da exposição da bactéria *A. fischeri* aos MWCNTs e GO mostraram toxicidade significativa, conforme indicado pelo valor de CE50 com 30 minutos de exposição de MWCNTs e GO, resultando em 45,44% e 3,95%, respectivamente. A 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 (Turek *et al.*, 2020).

Esse resultado indica que, em concentração de aproximadamente 45,44% de MWCNTs e 3,95% de GO, ocorre uma redução considerável da atividade luminescente da bactéria *A. fischeri*. A luminescência reduzida sugere um possível comprometimento da viabilidade celular ou função metabólica da bactéria (Mutalib; Ghanem, 2017), evidenciando a toxicidade dos nanotubos de carbono e óxido de grafeno para organismos dessa microbiota.

Durante toda a exposição dos MWCNTs, os valores de CE50% variaram de 39,92% a

45,44%, indicando uma toxicidade moderada para o organismo marinho. Apesar disso, houve uma ligeira redução na toxicidade (aumento do valor de CE50) com o aumento da duração de exposição de 5 para 30 minutos, sugerindo que a toxicidade dos MWCNTs pode apresentar uma pequena taxa de diminuição com o tempo, possivelmente devido a fatores de dispersão ou sedimentação.

Com relação ao GO, os valores de CE50% durante todo o teste ecotoxicológico variaram de 3,68% a 3,95%, indicando uma toxicidade alta, muito superior em comparação com os MWCNTs. Esses valores de CE50 observados pela exposição de GO indicam um efeito adverso intenso sobre a bioluminescência de *A. fischeri*, mesmo em baixas concentrações. Além disso, a toxicidade alta se demonstrou constante durante os tempos de exposição, indicando que o óxido de grafeno mantém uma toxicidade significativa ao longo do tempo. A inibição da bioluminescência da bactéria marinha pode estar relacionada a danos mecânicos na membrana, gerados pela dimensão das partículas e interações eletrostática, devido ao caráter bactericida de óxido de grafeno (Cerrillo *et al.*, 2015).

Apesar do indício de toxicidade, um estudo recente associou a diminuição da intensidade da bioluminescência de *A. fischeri* conforme o aumento da concentração de GO, devido às características do nanomaterial (Bergua *et al.*, 2021). Por ser um material 2D marrom escuro, a diminuição da bioluminescência pode ser ocasionada pela absorção da luz pelo GO. Ou seja, os flocos de GO, ao entrar em contato com a bactéria, não causaram danos à sua parede celular e foram observadas bactérias em divisão celular.

São poucos os relatos sobre a toxicidade dos nanotubos de carbono em bactérias luminescentes. Em um estudo anterior, EC50 para nanotubos de carbono de parede única após 15 minutos de exposição à bactéria *A. fischeri* foi superior a 100 mg L⁻¹ conforme Blaise *et al.* (2008), enquanto em outro estudo, O CE50 para MWCNTs variaram entre 50 e 84 mg L⁻¹ (Zheng *et al.*, 2010). Por outro lado, valores menores de CE50 foram observados com maior tempo de exposição de MWCNTs. Neste estudo, os autores relacionaram seus resultados com o tamanho do tubo da nanopartícula, sendo que as partículas com menor diâmetro desempenharam maior toxicidade (Cerrillo *et al.*, 2015),

Diferentes nanomateriais já foram analisadas utilizando o teste ecotoxicológico Microtox. Dentre eles, são incluídos nanomateriais de óxido de cobalto, óxido de titânio, óxido de cobre, óxido de magnésio, óxido de manganês, óxido de antimônio, dióxido de silício, óxido de zinco, óxido de tungstênio e paládio segundo Aruoja *et al.* (2013), nanomateriais de óxido de zinco e sulfeto de zinco conforme Oleszczuk *et al.* (2019) boro e

alumínio segundo Rossetto *et al.* (2014), dióxido de cério conforme Villa *et al.* (2020), alumina gama e níquel suportado em alumina gama (Svartz *et al.*, 2017).

Embora existam muitas suposições sobre nanomateriais de carbono, não existem até o momento investigações detalhadas baseadas em testes ecotoxicológicos completos. Os dados apresentados no presente estudo, servem como base para elucidar tais questionamentos. *Aliivibrio fischeri* é uma bactéria pertencente a uma espécie altamente sensível, por este motivo, é amplamente utilizada como bioindicadora de toxicidade em ambientes aquáticos (Mutalib; Ghanem, 2017; ABNT, 2021). Com base nos dados de toxicidade aguda apresentados aqui, a presença dos nanotubos de carbono de parede múltipla e principalmente, óxido de grafeno, podem impactar a saúde de comunidades microbianas essenciais. Esses impactos podem comprometer as cadeias tróficas e a biogeoquímica local, afetando a qualidade dos ecossistemas em que esses materiais são dispersos.

Bioensaio vegetal

Preliminarmente, a técnica agronômica de nanopriming de sementes foi realizada com *Lactuca sativa*. Não houve diferença estatística para os parâmetros germinativos indicando que os nanomateriais não influenciaram neste processo, como demonstrado na Tabela 2.

Tabela 2. Média geral dos parâmetros de germinação obtidos para as amostras de nanotubos de carbono de paredes múltiplas e óxido de grafeno obtidos pelo teste de toxicidade aguda com *Lactuca sativa*.

Nanomateriais	Protrusão radicular	Primeira contagem de germinação	Germinação	Índice de velocidade de germinação
MWCNTs	93% \pm 0.71	95% \pm 0.52	95% \pm 0.52	73.60 \pm 1.47
GO	90% \pm 0.85	90% \pm 0.85	94% \pm 0.57	69.47 \pm 2.06

Ambos nanomateriais de carbono (MWCNTs e GO) não manifestaram efeitos negativos na germinação das sementes. Não houve diferença significativa na germinação das sementes de *L. sativa* entre os MWCNTs e GO, mesmo em diferentes concentrações. Por esse motivo,

os tratamentos com os nanomateriais de carbono não foram considerados prontamente tóxicas para esta espécie a partir dos dados expostos através da germinação das sementes.

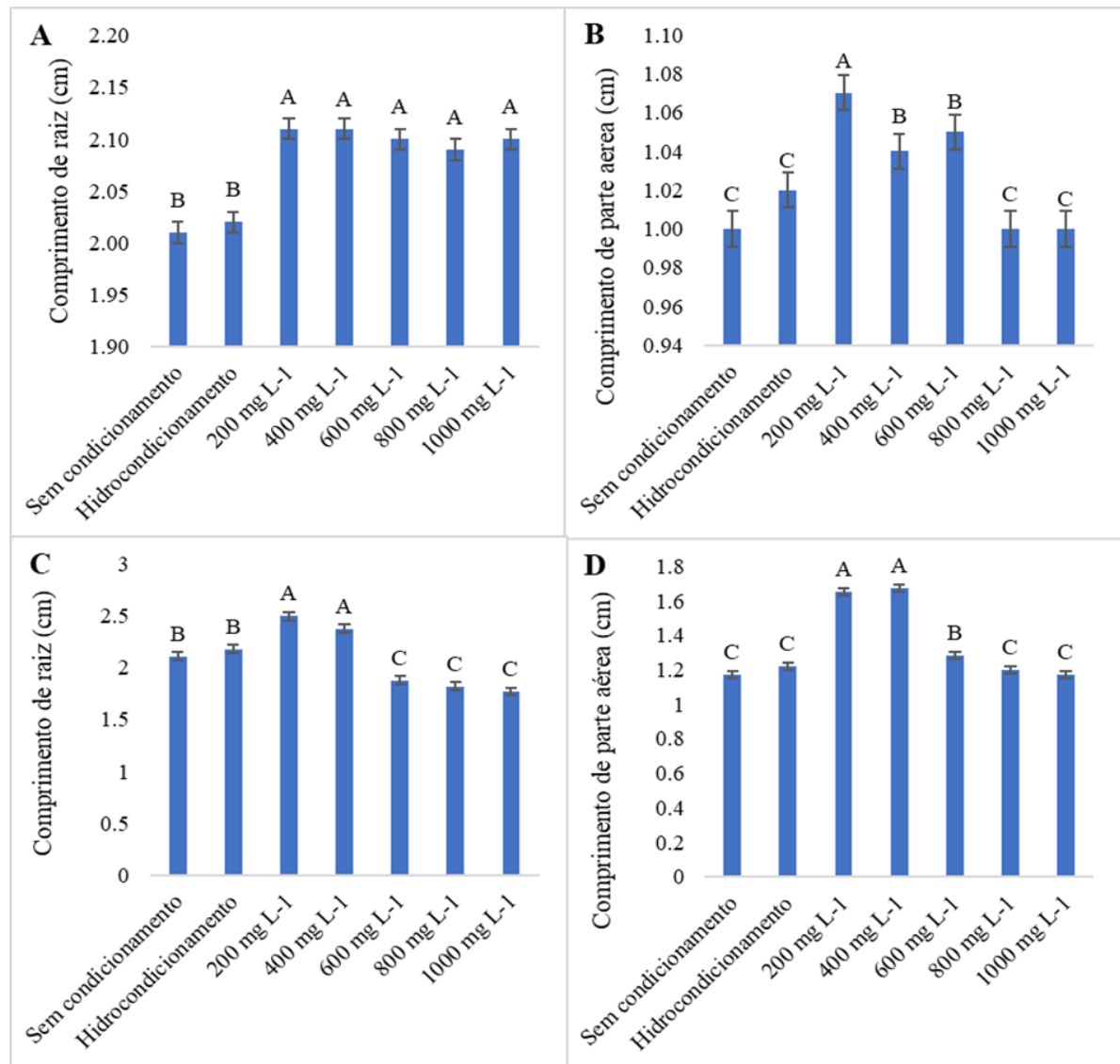
Em um estudo anterior, Ji-Yeon *et al.* (2021) avaliaram os efeitos da exposição com GO na germinação e crescimento inicial de plantas, entre elas, *Lactuca sativa*. Os autores observaram que a taxa de germinação de *Lactuca sativa* diminuiu conforme a concentração de GO aumenta, apesar de não expressar diminuição para as demais plantas analisadas. Além disso, induziu a redução do crescimento, comprimento do broto e raiz para taxas de aproximadamente 86% em *Lactuca sativa* em concentrações maiores (Ji-Yeon *et al.*, 2021). Em sua maioria, os relatos da influência dos GO na germinação de plantas são positivos, incluindo o aumento da germinação das sementes, altura das plantas, aumento de biomassa, crescimento de caule/broto e outros (Guo *et al.*, 2021; He *et al.*, 2018).

Embora existam poucos relatos dos efeitos danosos do óxido de grafeno na germinação de *Lactuca sativa*, efeitos adversos como, a redução da biomassa, menores concentrações de enzimas antioxidantes e danos à estrutura, podem ocorrer quando a aplicação ocorre na zona radicular (Gao; Yang; Song, 2019). Além disso, a germinação de sementes é prejudicada em ambientes ácidos, o que contempla a diminuição da germinação de *Lactuca sativa* quando exposta ao GO, devido seu caráter ácido (Carniel *et al.*, 2018).

Neste estudo, nenhuma concentração de MWCNTs afetou a germinação e o desenvolvimento inicial de *L. sativa*. Isso pode ser explicado pelo fato de que MWCNTs não são fitotóxicos. Similar ao que foi observado, Hamdi *et al.* (2015) observaram a ausência de toxicidade de *Lactuca sativa*, após a exposição direta em vermiculita enriquecida com MWCNTs. A ausência de impactos danosos ou efeitos positivos na germinação de plantas após a exposição a nanomateriais de carbono já foi relatada anteriormente. Foi demonstrado que os MWCNTs penetram no tegumento da semente, estimulando a germinação e a emergência ao aumentar a absorção de água nos estágios iniciais do desenvolvimento da planta (Joshi *et al.*, 2018).

Também foi avaliado o comprimento da raiz e da parte aérea de plântulas de *L. sativa*, em diferentes concentrações de MWCNTs e GO conforme a Figura 1. Foi observado maiores índices para comprimento radicular e parte aérea das plântulas expostas ao condicionamento fisiológico, quando comparadas aos controles (sem condicionamento). De modo geral, MWCNTs e GO induziram respostas positivas no comprimento de raiz e parte aérea, com efeito promotor de crescimento de plântulas de *L. sativa* principalmente na concentração de 200 mg L⁻¹.

Figura1. Comprimento da raiz e da parte aérea de plântulas de *L. sativa*, em diferentes concentrações de MWCNTs e GO.



Legenda: (A) Comprimento da raiz de *L. sativa* exposta a MWCNTs, (B) comprimento parte aérea de *L. sativa* exposta a MWCNTs, (C) comprimento da raiz de *L. sativa* exposta a GO e (D) comprimento da parte aérea de *L. sativa* exposta a GO. Letras iguais não diferem entre si pelo teste de Skott-Knott a 5% de significância. Barras representam erro padrão.

Os MWCNTs estimularam o crescimento radicular das plântulas de *L. sativa*, sendo maior que a do controle. Aumentaram significativamente o comprimento da raiz em todas as concentrações testadas (200 a 1000 mg L⁻¹), não apresentando diferenças significativas entre si, sugerindo um efeito positivo na morfologia da raiz em resposta aos MWCNTs. Por outro lado, o comprimento da parte aérea foi aumentado em concentrações menores de MWCNTs (200 a 600 mg L⁻¹), com aumento expressivo em 200 mg L⁻¹, sendo definida como a concentração ideal para o desenvolvimento de plântulas de *L. sativa*. Enquanto, em concentrações maiores (800 e 1000 mg L⁻¹) apresentaram um decréscimo na taxa, se igualando as condições expressas pelo controle. Ou seja, possivelmente, doses moderadas de MWCNTs são benéficas, mas em concentrações altas não desempenha papel promotor de crescimento de parte aérea.

Das *et al.* (2018) relataram anteriormente que a exposição e absorção de MWCNTs pelas raízes de *Lactuca sativa* são influenciadas pela concentração aplicada. MWCNTs em concentrações menores aumentaram a largura da folha, a área da folha, o comprimento da raiz e a biomassa segundo Ghasempour *et al.* (2019), enquanto, em altas concentrações, exibem um declínio drástico no crescimento celular (Tavabe *et al.*, 2020). Anteriormente foi relatado que a regulação positiva entre CNTs e SLR1 e RTCS (genes envolvidos no desenvolvimento da raiz) e as regulações negativas nos genes RTH1 e RTH3 (genes envolvidos no desenvolvimento do pelo radicular), foram apontados como mecanismos responsáveis pela alteração do fenótipo radicular (Yan *et al.*, 2013). Assim, o efeito dos MWCNTs no aumento do crescimento foi atribuído à regulação positiva nas transcrições de diferentes genes envolvidos em eventos biológicos, incluindo a divisão celular (CycB), extensão da parede celular (NtLRX1) e aquaporina (NtPIP1) (Khodakovskaya *et al.*, 2012).

O óxido de grafeno, por outro lado, induziu efeito promotor no desenvolvimento de plântulas de *L. sativa* em duas concentrações (200 e 400 mg L⁻¹), o que diferencia seu papel promotor em relação aos MWCNTs. Enquanto, em concentrações mais elevadas (600 a 1000 mg L⁻¹) foi notado efeito negativo, resultando na redução no comprimento das raízes. Similar a isso, o GO induziu aumento do comprimento da parte aérea em concentrações menores (200 e 400 mg L⁻¹), mas em concentrações maiores (600 a 1000 mg L⁻¹) não ocasionou efeito promotor. Tais resultados sugerem que, GO promove crescimento da raiz e parte aérea em concentrações baixas, mas pode ser considerado fitotóxico em concentrações altas, pois inibe o desenvolvimento radicular, provavelmente devido seu potencial tóxico ao se acumular nas raízes (Gao; Yang; Song, 2019).

Estudos indicaram que o acúmulo de óxido de grafeno ocorre principalmente nas raízes

e de modo mais limitado no caule e na folha (Chen *et al.*, 2017). Além disso, promove efeitos adversos na morfologia em concentrações altas (Chen *et al.*, 2018). Relatos anteriores mostraram que GO promoveu maior crescimento em concentrações de 400 e 800 mg L⁻¹ e inibição do crescimento em 1600 mg L⁻¹, com diminuição de enzimas antioxidantes para *Vicia faba* (Anjum *et al.*, 2014). Análogo a isso, observaram que GO em concentrações baixas (125 e 250 µg mL⁻¹) promoveram o crescimento de raízes e inibição do crescimento em concentrações de 500, 1000 e 2000 µg mL⁻¹ (Chen *et al.*, 2018). Tais efeitos podem ser associados às propriedades dos nanomateriais. Visto que, em dosagem baixa os GO podem influenciar na indução da divisão celular e no crescimento celular (Ruiz *et al.*, 2011).

Portanto, este estudo constatou a toxicidade apresentada pelos MWCNTs e GO em dois diferentes níveis tróficos. O teste com a bactéria marinha indicou toxicidade moderada para MWCNTs e alta toxicidade para o GO. Por outro lado, os resultados do bioensaio vegetal revelaram que os dois nanomateriais não influenciaram na germinação de sementes de *L. sativa*. Além disso, os MWCNTs não causaram efeitos negativos no desenvolvimento da plântula, pelo contrário, favoreceu o crescimento radicular e comprimento aéreo em concentração baixa (200 mg L⁻¹), mas em concentrações maiores (800 a 1000 mg L⁻¹) não apresentaram efeito. O GO por outro lado, apresentou efeito inibitório de crescimento radicular nas concentrações de 600 a 1000 mg L⁻¹, possivelmente devido ao acúmulo do nanomaterial no tecido radicular. Mas vale ressaltar, que em concentrações menores (200 e 400 mg L⁻¹), favoreceu o crescimento de raízes e parte aérea. Apesar dos benefícios de ambos nanomateriais no sistema vegetal em doses moderadas, tais achados sugerem que seu uso deve ser realizado com cuidado, visto que foi comprovado que possuem efeitos danosos em diferentes níveis tróficos.

CONCLUSÃO

O teste ecotoxicológico Microtox realizado com os dois nanomateriais, revelou que nanotubo de carbono de parede múltipla (MWCNTs) expressou toxicidade e que, o óxido de grafeno (GO) é muito tóxico para a bactéria *Aliivibrio fischeri*. Tais resultados reforçam que MWCNTs e GO possuem caráter antibacteriano, e por isso, induziram alta toxicidade para a bactéria marinha. De modo similar, o bioensaio vegetal realizado com *Lactuca sativa*, apontou que o GO desempenha efeitos fitotóxicos, com inibição do crescimento de raízes e do desenvolvimento de plântulas em concentrações maiores. MWCNTs, no entanto, promoveu o crescimento radicular, mas com o aumento da concentração esse efeito promotor

foi inibido, sugerindo efeitos moderados de toxicidade, conforme o teste com a bactéria. Esses resultados destacam o impacto potencial desses nanomateriais nos ecossistemas, evidenciando que eles podem ser utilizados na agricultura para promover o crescimento vegetal em concentrações controladas. Contudo, seu uso requer cautela, pois apresentam risco de toxicidade para a microbiota do solo e, em altas concentrações, inibem o desenvolvimento vegetal devido ao seu potencial tóxico. Além disso, o estudo validou o nanoprimering como uma técnica simples, rápida e economicamente viável para análise de toxicidade aguda e investigações ecotoxicológicas.

AGRADECIMENTOS

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) [Funding Code001], CAPES/BRASIL PDPG-POSDOC N° 2930/2022, CAPES/BRASIL MEC/SESu/FNDE/PET. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [443971/2023-4]. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) [BPD-00571-22 e APQ-00303-21].

REFERÊNCIAS

- ABNT, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS () (2021). **Ecotoxicologia aquática – determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri* (ensaio de bactéria luminescente)**. Parte 3: Método utilizando bactérias liofilizadas. 3ª ed. In: ABNT NBR 15411-3
- Agostini, R. T. de, Abrantes, F. L., Machado-Neto, N. B., Custódio, C. C. (2022). Ethanol and hormones in physiological conditioning on germination and seed dormancy of *Urochloa humidicola* cv. Llanero. **Journal of Seed Science**, 44, 1–11. <https://doi.org/10.1590/2317-1545V44261411>
- Amâncio, B. C. S., Govêa, K. P., Neto, A. R. C., Trindade, L. D. O. R., Souza, T. C. De, Silva, G. A. Da, Barbosa, S. (2021). Allelopathic activity of different *Byrsonima* spp. leaf extracts on *Lactuca sativa* L. bioassay. **Biologia**, 76, 3201–3209. <https://doi.org/10.1007/s11756-021-00872-0/Published>
- Amir, M., Prasad, D., Khan, F. A., Khan, A., Ahamd, B., Astha. (2024). Seed priming: An overview of techniques, mechanisms, and applications. In *Plant Science Today* (Vol. 11, Issue 1, pp. 553–563). **Horizon e-Publishing Group**. <https://doi.org/10.14719/pst.2828>
- Anjum, N. A., Singh, N., Singh, M. K., Sayeed, I., Duarte, A. C., Pereira, E., Ahmad, I. (2014). Single-bilayer graphene oxide sheet impacts and underlying potential mechanism assessment in germinating faba bean (*Vicia faba* L.). **Science of the Total Environment**, 472, 834–841. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.018>

- Aruoja, V., Pokhrel, S., Sihtmäe, M., Mortimer, M., Mädler, L., Kahru, A. (2013). Toxicity of 12 metal-based nanoparticles to algae, bacteria and protozoa. **Environmental Science: Nano**, 2(6), 630–644. <https://doi.org/10.1039/x0xx00000x>
- Barroso, L. T., Pereira, T. M., Cunha, A. R. D., Paiva, P. D. D. O., Paiva, R., Nery, F. C., & Reis, M. V. D. (2024). Seed priming in *Clitoria ternatea* L. with multi-walled carbon nanotubes: A physicochemical and morphological approach. **Ornamental Horticulture**, 30, e242751. <https://doi.org/10.1590/2447-536X.v30.e242751>
- Batista, T. B., Binotti, E. D. C., Binotti, F. F. D. S., DE SÁ, M. E., DA SILVA, T. A. (2018). Priming of brachiaria seeds with different sugar sources and concentrations. **Revista Caatinga**, 31(4), 843–849. <https://doi.org/10.1590/1983-21252018V31N406RC>
- Bergua, J. F., Álvarez-Diduk, R., Hu, L., Hassan, A. H. A., Merkoçi, A. (2021). Improved *Aliivibrio fischeri* based-toxicity assay: Graphene-oxide as a sensitivity booster with a mobile-phone application. **Journal of Hazardous Materials**, 406, 124434–124443. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124434>
- Blaise, C., Gagné, F., Férard, J. F., Eullaffroy, P. (2008). Ecotoxicity of selected nano-materials to aquatic organisms. **Environmental Toxicology**, 23(5), 591–598. <https://doi.org/10.1002/tox.20402>
- Brasil. (2009). Regras para análise de sementes. **Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, 1–399.
- Carniel, F. C., Gorelli, D., Flahaut, E., Fortuna, L., Del Casino, C., Cai, G., Nepi, M., Prato, M., Tretiach, M. (2018). Graphene oxide impairs the pollen performance of *Nicotiana tabacum* and *Corylus avellana* suggesting potential negative effects on the sexual reproduction of seed plants. **Environmental Science: Nano**, 5(7), 1608–1617. <https://doi.org/10.1039/c8en00052b>
- Cerrillo, C., Barandika, G., Igartua, A., Areitioaurtena, O., Marcaide, A., Mendoza, G. (2015). Ecotoxicity of multiwalled carbon nanotubes: Standardization of the dispersion methods and concentration measurements. **Environmental Toxicology and Chemistry**, 34(8), 1854– 1862. <https://doi.org/10.1002/etc.2999>
- CETESB, C. A. do E. de S. P. (2001). Teste de toxicidade com a bactéria luminescente *Vibrio fischeri*: método de ensaio. In **Diário Oficial do Estado de São Paulo – Caderno Executivo I (Poder Executivo, Seção I)**.
- Chen, J., Yang, L., Li, S., Ding, W. (2018). Various Physiological Response to Graphene Oxide and Amine-Functionalized Graphene Oxide in Wheat (*Triticum aestivum*). **Molecules**, 23(5), 1104–1119. <https://doi.org/10.3390/molecules23051104>
- Chen, L., Wang, C., Li, H., Qu, X., Yang, S. T., Chang, X. L. (2017). Bioaccumulation and Toxicity of ¹³C-Skeleton Labeled Graphene Oxide in Wheat. **Environmental Science and Technology**, 51(17), 10146–10153. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b00822>

Corbineau, F., Taskiran-Özbingöl, N., El-Maarouf-Bouteau, H. (2023). Improvement of Seed Quality by Priming: Concept and Biological Basis. **Seeds**, 2(1), 101–115. <https://doi.org/10.3390/seeds2010008>

Cunha Neto, A. R., Carvalho, M., Morais, G. M. M., Guaraldo, M. M. dos S., dos Santos, H. O., Pereira, W. V. S., Barbosa, S. (2023). Changes in Chromosome Complement and Germination of Lettuce (*Lactuca sativa* L.) Exposed to Heavy Metal Stress. **Water, Air, and Soil Pollution**, 234(4), 243–254. <https://doi.org/10.1007/s11270-023-06262-3>

Das, K. K., Nava, V., Chang, C. W., Chan, J. W., Xing, B., Yang, Y. (2019). Emerging investigator series: quantification of multiwall carbon nanotubes in plant tissues with spectroscopic analysis. **Environmental Science: Nano**, 6(2), 380–387. <https://doi.org/10.1039/C8EN01252K>

Ferreira, D. F. (2019). Sisvar: a computer analysis system to fixed effects split plot type designs. **Revista Brasileira de Biometria**, 37(4), 529–535. <https://doi.org/10.28951/rbb.v37i4.450>

Gámez, O. R., Laffont-Schwob, I., Prudent, P., Vassalo, L., Rodríguez, I. A., Macías, R. P., Petit, M. E., Ibarra, A. T. A., Masotti, V., Perraud-Gaime, I., Rodríguez, A. A. (2019). Assessment of water quality from the Blue Lagoon of El Cobre mine in Santiago de Cuba: a preliminary study for water reuse. **Environmental Science and Pollution Research**, 26(16), 16366–16377. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-05030-3>

Gao, M., YujuanYang, Song, Z. (2019). Toxicity of cadmium to wheat seedling roots in the presence of graphene oxide. **Chemosphere**, 233, 9–16. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.127>

Ghasempour, M., Iranbakhsh, A., Ebadi, M., Ardebili, Z. O. (2019). Multi-walled carbon nanotubes improved growth, anatomy, physiology, secondary metabolism, and callus performance in *Catharanthus roseus*: an in vitro study. **Biotech**, 9(11), 404–414. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1934-y>

Guo, X., Zhao, J., Wang, R., Zhang, H., Xing, B., Naeem, M., Yao, T., Li, R., Xu, R., Zhang, Z., Wu, J. (2021). Effects of graphene oxide on tomato growth in different stages. **Plant Physiology and Biochemistry**, 162, 447–455. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.013>

Hamdi, H., Torre-Roche, R. D. La, Hawthorne, J., White, J. C. (2015). Impact of non-functionalized and amino-functionalized multiwall carbon nanotubes on pesticide uptake by lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Nanotoxicology**, 9(2), 172–180. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.907456>

Hao, Y., Ma, C., Zhang, Z., Song, Y., Cao, W., Guo, J., Zhou, G., Rui, Y., Liu, L., Xing, B. (2018). Carbon nanomaterials alter plant physiology and soil bacterial community composition in a rice-soil-bacterial ecosystem. **Environmental Pollution**, 232, 123–136. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.024>

He, Y., Hu, R., Zhong, Y., Zhao, X., Chen, Q., Zhu, H. (2018). Graphene oxide as a water transporter promoting germination of plants in soil. **Nano Research**, 11(4),

1928–1937. <https://doi.org/10.1007/s12274-017-1810-1>

Khalaki, M. A., Moameri, M., Lajayer, B. A., Astatkie, T. (2021). Influence of nano-priming on seed germination and plant growth of forage and medicinal plants. In *Plant Growth Regulation* (Vol. 93, Issue 1, pp. 13–28). **Springer Science and Business Media B.V.** <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00670-9>

Khodakovskaya, M. V., Silva, K. De Biris, A. S., Dervishi, E., Villagarcia, H. (2012). Carbon nanotubes induce growth enhancement of tobacco cells. *ACS Nano*, 6(3), 2128–2135. <https://doi.org/10.1021/nn204643g>

López-Vargas, E. R., González-García, Y., Pérez-Álvarez, M., Cadenas-Pliego, G., González-Morales, S., Benavides-Mendoza, A., Cabrera, R. I., Juárez-Maldonado, A. (2020). Seed priming with carbon nanomaterials to modify the germination, growth, and antioxidant status of tomato seedlings. *Agronomy*, 10(5), 639–661. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050639>

Maguire, James D. (1962). Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. *Speed of Germination*, 2(2), 176–177. <https://doi.org/10.2135/cropsci1962.0011183X000200020033x>

Martins, P. S. (2016). **O sistema de normas ISO e as nanotecnologias: As interfaces regulatórias e o diálogo entre as fontes do Direito.** UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS.

Mutalib, M. I. A., Ghanem, O. Ben. (2017). Ecotoxicity of Ionic Liquids Towards *Vibrio fischeri*: Experimental and QSAR Studies. In **Progress and Developments in Ionic Liquids** (Vol. 1, pp. 429–449). InTech. <https://doi.org/10.5772/65795>

Oleszczuk, P., Czech, B., Kończak, M., Bogusz, A., Siatecka, A., Godlewska, P., & Wiesner, M. (2019). Impact of ZnO and ZnS nanoparticles in sewage sludge-amended soil on bacteria, plant and invertebrates. *Chemosphere*, 237, 124359–124369. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124359>

Paiva, P. D. D. O., Silva, D. P. C. D., Silva, B. R. D., Sousa, I. P. D., Paiva, R., & Reis, M. V. D. (2023). How scarification, GA3 and graphene oxide influence the in vitro establishment and development of *Strelitzia*. *Plants*, 12(11), 2142. <https://doi.org/10.3390/plants12112142>

Reis, T. M. C. do, Assis, A. L. S., Castro, V. G. Silva, G. G. **Processo de obtenção de óxido de grafeno e produto.** (2020)

Rhaman, M. S., Rauf, F., Tania, S. S., Khatun, M. (2020). Seed Priming Methods: Application in Field Crops and Future Perspectives. *Asian Journal of Research in Crop Science*, 8–19. <https://doi.org/10.9734/ajrcs/2020/v5i230091>

Rizwan, M., Shoukat, A., Ayub, A., Razzaq, B., Tahir, M. B. (2021). Types and classification of nanomaterials. In **Nanomaterials: Synthesis, Characterization, Hazards and Safety** (Vol. 1, pp. 31–54). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823823-3.00001-X>

Roberts, S. M., James, R. C., Williams, P. L. (2022). **Principles of toxicology: environmental and industrial applications**. (John Wiley & Sons).

Rossetto, A. L. de O. F., Melegari, S. P., Ouriques, L. C., Matias, W. G. (2014). Comparative evaluation of acute and chronic toxicities of CuO nanoparticles and bulk using *Daphnia magna* and *Vibrio fischeri*. **Science of the Total Environment**, 490, 807–814. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.05.056>

Ruiz, O. N., Fernando, K. A. S., Wang, B., Brown, N. A., Luo, P. G., McNamara, N. D., Vangsness, M., Sun, Y. P., Bunker, C. E. (2011). Graphene oxide: a nonspecific enhancer of cellular growth. **ACS Nano**, 5(10), 8100–8107. <https://doi.org/10.1021/nn202699t>

Svartz, G., Papa, M., Gosatti, M., Jordán, M., Soldati, A., Samter, P., Guraya, M. M., Pérez Coll, C., & Perez Catán, S. (2017). Monitoring the ecotoxicity of γ -Al₂O₃ and Ni/ γ -Al₂O₃ nanomaterials by means of a battery of bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 144, 200–207. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.06.029>

Turek, M., Różycka-Sokołowska, E., Owsianik, K., Marciniak, B., Bałczewski, P. (2020). 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, 122839–122866. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122839>

Usman, M., Farooq, M., Wakeel, A., Nawaz, A., Cheema, S. A., Rehman, H. ur, Ashraf, I., Sanaullah, M. (2020). Nanotechnology in agriculture: Current status, challenges and future opportunities. In **Science of the Total Environment** (Vol. 721, Issue 13, pp. 77–93). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778>

Valdés, S. S.-, González, J. A. R.-, Martínez, A. C. S.-, Bustos, K., Cruz, M. V., Martínez, L. C., González, J. T.-, Barron, S. N. R.-. (2024). Tendencias en el uso de nanopartículas en la agricultura. **Latinoamericana de Difusión Científica**, 6(11), 1–21. <https://doi.org/10.5281/zenodo.12686022>

Vieira, C. S. S., Nicola, P. A., Bortoleti, K. C. de A. (2022). Determination of phytotoxicity and cytogenotoxicity due to exposure to particles originating from sugarcane burning using test systems *Lactuca sativa* L. and *Allium cepa* L. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, 85(14), 561–572. <https://doi.org/10.1080/15287394.2022.2054483>

Villa, S., Maggioni, D., Hamza, H., Di Nica, V., Magni, S., Morosetti, B., Parenti, C. C., Finizio, A., Binelli, A., & Della Torre, C. (2020). Natural molecule coatings modify the fate of cerium dioxide nanoparticles in water and their ecotoxicity to *Daphnia magna*. **Environmental Pollution**, 257, 1–26. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113597>

Yan, S., Zhao, L., Li, H., Zhang, Q., Tan, J., Huang, M., He, S., Li, L. (2013). Single-walled carbon nanotubes selectively influence maize root tissue development accompanied by the change in the related gene expression. **Journal of Hazardous Materials**, 246–247, 110–118. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.12.013>

Zhang, P., Zhang, R., Fang, X., Song, T., Cai, X., Liu, H., Du, S. (2016). Toxic effects of graphene on the growth and nutritional levels of wheat (*Triticum aestivum* L.): short- and long-term exposure studies. **Journal of Hazardous Materials**, 317, 543–551. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.06.019>

Zhao, L., Zhou, X., Kang, Z., Peralta-Videa, J. R., & Zhu, Y. G. (2024). Nano-enabled seed treatment: A new and sustainable approach to engineering climate-resilient crops. In **Science of the Total Environment** (Vol. 910, pp. 168640–168651). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.168640>

Zheng, H., Liu, L., Long, Y., Wang, L., Ho, K.-P., Wong, K.-Y. (2010). Rapid Determination of nanotoxicity using Luminous Bacteria. **Analytical sciences**, 26, 125–129. <https://doi.org/10.2116/analsci.26.125>

Zielińska, 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. (2020). Nanotoxicology and nanosafety: Safety-by-design and testing at a glance. In **International Journal of Environmental Research and Public Health** (Vol. 17, Issue 13, pp. 1–22). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijerph171346>

REFERÊNCIAS

- AACHARYA, R.; CHHIPA, H. Nanocarbon fertilizers: implications of carbon nanomaterials in sustainable agriculture production. *In: ABD-ELSALAM, Kamel A. (ed.). Carbon nanomaterials for agri-food and environmental applications*. Kota: Elsevier, 2020. p. 297–321. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819786-8.00015-3>.
- ABDEL-AZIZ, H. M. M.; HASANEEN, M. N. A.; OMER, A. M. Impact of engineered nanomaterials either alone or loaded with NPK on growth and productivity of French bean plants: seed priming vs foliar application. *South African journal of botany*, Almançora, v. 125, p. 102–108, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.07.005>.
- ABEROUMAND, S. *et al.* Reduced graphene oxide nanofluidic electrolyte with improved electrochemical properties for vanadium flow batteries. *Journal of energy storage*, Gold Coast, v. 49, p. 104133–104144, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.est.2022.104133>.
- ACHARYA, A.; PAL, P. K. Agriculture nanotechnology: translating research outcome to field applications by influencing environmental sustainability. *Nanoimpact*, Palampur, v. 19, p. 100232–100246, 2020. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.impact.2020.100232>.
- AGUILAR-ASCÓN, E.; MARRUFO-SALDAÑA, L.; BARRA-HINOJOSA, J. A. Toxicity assessment of tanning effluents treated via electrocoagulation and ozonation using a bioassay with *Lactuca sativa* L. *Journal of ecological engineering*, Lima, v. 25, n. 9, p. 316–327, 2024. <https://doi.org/10.12911/22998993/190685>.
- AHMAD, H.; FAN, M.; HUI, D. Graphene oxide incorporated functional materials: a review. *Composites part b: engineering*, Londres, v. 145, p. 270–280, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2018.02.006>.
- ALAITHAN, F. *et al.* Improving the Durability of Chitosan Films through Incorporation of Magnesium, Tungsten, and Graphene Oxides for Biomedical Applications. *Chemistry and biodiversity*, Saudi Arabia, v. 20, n. 11, p. 1–12, 2023. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202301018>.
- AL-HAKKANI, M. F. *et al.* Cefoperazone rapidly and sensitive quantitative assessment via a validated RP-HPLC method for different dosage forms, in-use stability, and antimicrobial activities. *BMC chemistry*, Assiut, v. 17, n. 1, p. 72–83, 2023. <https://doi.org/10.1186/s13065-023-00989-0>.
- ALIYEV, E. *et al.* Structural characterization of graphene oxide: surface functional groups and fractionated oxidative debris. *Nanomaterials*, Geesthacht, v. 9, n. 8, p. 1180–1195, 2019. <https://doi.org/10.3390/nano9081180>.
- ANSARI, A. S. *et al.* Citation for this article: BADAR A. *et al.* Nano based drug delivery systems: present and future prospects. *Nanomedicine and nanotechnology journal*, India, v. 2, n. 1, p. 121–131, 2019. <https://www.researchgate.net/publication/342067418>.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **ABNT NBR 15411-2**: Ecotoxicologia aquática: determinação do efeito inibitório de amostras de água sobre a emissão de luz de *Vibrio fischeri*. Ensaio de bactéria luminescente. Rio de Janeiro: ABNT, 2012.

- BABU, P. J. *et al.* Nanobiotechnology-mediated sustainable agriculture and post-harvest management. **Current Research in Biotechnology**, Mizoram, v. 4, p. 326–336, 2022. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.crbiot.2022.07.004>.
- BEGUM, P.; IKHTIARI, R.; FUGETSU, B. Graphene phytotoxicity in the seedling stage of cabbage, tomato, red spinach, and lettuce. **Carbon**, Japan, v. 49, n.12, p. 3907–3919, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2011.05.029>.
- BINNIG, G.; QUATE, C. F.; GERBER, C. H. Atomic force microscope. **Physical review letters**, Stanford, v. 56, n. 9, p. 930–934, 1986.
- BOUBEHZIZ, S. *et al.* Predictive mapping of soil organic carbon in Northeast Algeria. **Catena**, Annaba, v. 190, p. 104539–104550, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.catena.2020.104539>.
- CALICIOGLU, O. *et al.* The future challenges of food and agriculture: an integrated analysis of trends and solutions. **Sustainability**, Rome, v. 11, n. 1, p. 222–243, 2019. <https://doi.org/10.3390/su11010222>.
- CARNIEL, F. C. *et al.* Graphene oxide impairs the pollen performance of *Nicotiana tabacum* and *Corylus avellana* suggesting potential negative effects on the sexual reproduction of seed plants. **Environmental science: nano**, Trieste, v. 5, n. 7, p. 1608–1617, 2018. <https://doi.org/10.1039/c8en00052b>.
- CHAN, M. H. *et al.* Natural carbon nanodots: toxicity assessment and theranostic biological application. **Pharmaceutics**, Taipei, v. 13, n. 11, p. 1874–1906, 2021. MDPI. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13111874>.
- CHANG, X. *et al.* Effects of carbon nanotubes on growth of wheat seedlings and Cd uptake. **Chemosphere**, Tianjin, v. 240, p. 124931–124941, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.124931>.
- CHÁVEZ-DULANTO, P. N. *et al.* Increasing the impact of science and technology to provide more people with healthier and safer food. **Food and energy security**, Lima, v. 10, n. 1, p. 1–31, 2021. Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1002/fes3.259>.
- CHEN, J.; MU, Q.; TIAN, X. Phytotoxicity of graphene oxide on rice plants is concentration dependent. **Materials express**, Jingzhou, v. 9, n. 6, p. 635–640, 2019. <https://doi.org/10.1166/mex.2019.1538>.
- CHETYRKINA, M. R.; FEDOROV, F. S.; NASIBULIN, A. G. In vitro toxicity of carbon nanotubes: a systematic review. **Royal society of chemistry**, Espoo, v. 12, n. 25, p. 16235–16256, 2022. <https://doi.org/10.1039/d2ra02519a>.
- DASGUPTA-SCHUBERT, N. *et al.* Plant responses to nano and micro structured carbon allotropes: water imbibition by maize seeds upon exposure to multiwalled carbon nanotubes and activated carbon. **Advances in nano research**, Mich, v. 5, n. 3, p. 245–251, 2017. <https://doi.org/10.12989/anr.2017.5.3.245>.
- DHAMODHARAN, D. *et al.* A review on graphene oxide effect in energy storage devices. **Journal of industrial and engineering chemistry**, Yeosu, v. 106, pp. 20–36, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.10.033>.

- EALIAS, A. M.; SARAVANAKUMAR, M. P. A review on the classification, characterisation, synthesis of nanoparticles and their application. **IOP conference series: materials science and engineering**, Tamil Nadu, v. 263, n. 3, p. 1–16, 2017. <https://doi.org/10.1088/1757-899X/263/3/032019>.
- FAROOQ, N. *et al.* Graphene oxide and based materials: synthesis, properties, and applications – a comprehensive review. **Matsci express**, Bahawalpur, v. 01, n. 04, p. 185–231, 2024. <https://doi.org/10.69626/mse.2024.0185>.
- FAZELIAN, N.; YOUSEFZADI, M. Nano-biofertilizers for enhanced nutrient use efficiency. **Nano-enabled agrochemicals in agriculture**, Tabriz, v. 8, n. 8, p. 145–158, 2022. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91009-5.00023-9>.
- FRANCISCO, E. V.; GARCÍA-ESTEPA, R. M. Nanotechnology in the agrofood industry. **Journal of food engineering**, Granada, v. 238, n. 1, p. 1–11, 2018. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.024>.
- GAO, M.; YANG, Y.; SONG, Z. Toxicity of cadmium to wheat seedling roots in the presence of graphene oxide. **Chemosphere**, Shantou, v. 233, p. 9–16, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2019.05.127>.
- GAO, Y. *et al.* Impact of graphene oxide on the antibacterial activity of antibiotics against bacteria. **Environmental science: nano**, Hefei, v. 4, n. 5, p. 1016–1024, 2017. <https://doi.org/10.1039/c7en00052a>.
- GILLER, K. E. *et al.* Regenerative agriculture: an agronomic perspective. **Outlook on agriculture**, Giller, v. 50, n. 1, p. 13–25, 2021. <https://doi.org/10.1177/0030727021998063>.
- GIULIO, M. D. *et al.* Antimicrobial and antibiofilm efficacy of graphene oxide against chronic wound microorganisms. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Chieti, v. 62, n. 7, p. 1–9, 2018. <https://journals.asm.org/journal/aac>.
- GOHARI, G. *et al.* Putrescine-functionalized carbon quantum dot (put-CQD) nanoparticles effectively prime grapevine (*Vitis vinifera* cv. ‘Sultana’) against salt stress. **Plant biology**, Maragheh, v. 21, n. 1, p. 120–135, 2021. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-02901-1>.
- GONG, X. *et al.* Roles of multiwall carbon nanotubes in phytoremediation: cadmium uptake and oxidative burst in *Boehmeria nivea* (L.) Gaudich. **Environmental science nano**, Changsha, v. 6, n. 3, p. 851–862, 2019. <https://doi.org/10.1039/c8en00723c>.
- GOVÊA, K. P. *et al.* Response of *Lactuca sativa* L. ‘babá de verão’ exposed to different substrates for laboratory bioassays. **Pakistan journal of botany**, Alfenas, v. 52, n. 5, p. 1625–1629, 2020. [https://doi.org/10.30848/PJB2020-5\(22\)](https://doi.org/10.30848/PJB2020-5(22)).
- GUPTA, A. *et al.* New insights into application of nanoparticles for plant growth promotion: present and future prospects. In: Ghorbanpour, M. *et al.* (ed.). **Biogenic nanoparticles and their use in agro-ecosystems**. Lucknow: Springer, 2020, p. 259–279.
- GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; ABDI. Agência Brasileira de Desenvolvimento Industrial. **Nanotecnologia na área da saúde: mercado, segurança e regulação**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, p. 7-50, 2013.

HAMDJ, H. *et al.* Impact of non- functionalized and amino-functionalized multiwall carbon nanotubes on pesticide uptake by lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Nanotoxicology**, New Haven, v. 9, n. 2, p. 172–180, 2015. <https://doi.org/10.3109/17435390.2014.907456>.

HAO, Y. *et al.* Carbon nanomaterials alter plant physiology and soil bacterial community composition in a rice-soil-bacterial ecosystem. **Environmental pollution**, Beijing, v. 232, p. 123–136, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.09.024>.

HARTONO, M. R. *et al.* Probing the toxicity mechanism of multiwalled carbon nanotubes on bacteria. **Environmental science and pollution research**, Singapore, v. 25, n. 5, p. 5003–5012, 2018. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0782-8>.

HATAMI, M. Toxicity assessment of multi-walled carbon nanotubes on *Cucurbita pepo* L. under well-watered and water-stressed conditions. **Ecotoxicology and environmental safety**, Arak, v. 142, p. 274–283, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.04.018>.

HAUGHEY, E. *et al.* Sustainable intensification and carbon sequestration research in agricultural systems: a systematic review. **Environmental science and policy**, Galway, v. 143, p. 14–23, 2023. Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.envsci.2023.02.018>.

HUANG, H. *et al.* The chemistry and promising applications of graphene and porous graphene materials. **Advanced functional materials**, Dalian, v. 30, n. 41, p. 1909035–1909074, 2020. <https://doi.org/10.1002/adfm.201909035>.

IKHTIARI, Refi. **Studies on phytotoxicities of carbon nanomaterials in seedling stage**. 2014. 119f. Thesis (Doctorate in Environmental Sciences) - Hokkaido University, Japan, 2014.

IQBAL, A. A. *et al.* Graphene-based nanocomposites and their fabrication, mechanical properties and applications. **Materialia**, Pekan, v. 12, p. 100815–100827, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.mtla.2020.100815>.

ISMAIL, M. *et al.* Pollution, toxicity and carcinogenicity of organic dyes and their catalytic bio- remediation. **Current pharmaceutical design**, Pakistan, v. 25, n. 34, p. 3645–3663, 2019. <https://doi.org/10.2174/1381612825666191021142026>.

JOSHI, A. *et al.* Multi walled carbon nanotubes applied through seed-priming influence early germination, root hair, growth and yield of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). **Journal of the science of food and agriculture**, Chandigarh, v. 98, n. 8, p. 3148–3160, 2018. <https://doi.org/10.1002/jsfa.8818>.

JOSHI, A. *et al.* Plant nanobionic effect of multi-walled carbon nanotubes on growth, anatomy, yield and grain composition of rice. **BioNanoScience**, Mohali, v. 10, n. 2, p. 430–445, 2020. <https://doi.org/10.1007/s12668-020-00725-1>.

KAH, M. *et al.* A critical evaluation of nanopesticides and nanofertilizers against their conventional analogues. **Nature nanotechnology**, Vienna, v. 13, n. 8, p. 677–684, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41565-018-0131-1>.

KAZLAUSKAS, M. *et al.* Effect of graphene oxide on the uptake, translocation and toxicity of metal mixture to *Lepidium sativum* L. plants: mitigation of metal phytotoxicity due to nanosorption. **Chemosphere**, Vilnius, v. 312, p. 1–13, 2023.

<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.137221>.

KEYING, C. *et al.* Recent advance of Ni–Co–X (X = O, S, Se, Te) bimetallic compound nanoarray electrode materials applied in supercapacitors. **American scientific publishers**, Anyang, v. 14, n. 5, p. 819–828, 2022.

KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: properties, applications and toxicities. **Arabian journal of chemistry**, Saudi Arabia, v. 12, n. 7, p. 908–931, 2019. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2017.05.011>.

KIM, M. A.; ROSA, V.; MIN, K. S. Effect of two graphene derivatives on *Enterococcus faecalis* biofilms and cytotoxicity. **Dental materials journal**, Jeonju, v. 42, n. 2, p. 211–217, 2023. <https://doi.org/10.4012/dmj.2022-095>.

KOLAHDOUZ, M. *et al.* Carbon-related materials: graphene and carbon nanotubes in semiconductor applications and design. **Micromachines**, Tehran, v. 13, n. 8, p. 1257–1321, 2022. MDPI. <https://doi.org/10.3390/mi13081257>.

KWAK, S. Y. *et al.* Chloroplast-selective gene delivery and expression in planta using chitosan-complexed single-walled carbon nanotube carriers. **Nature nanotechnology**, Woburn, v. 14, n. 5, p. 447–455, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0375-4>.

LAZZARETTI, L. L.; HUPFFER, H. M. Nanotechnologies and its regulations in Brazil. **Revista gestão e desenvolvimento**, Novo Hamburgo, v. 16, n. 3, p. 153–177, mar./jul. 2019. <https://www.redalyc.org/journal/5142/514262384008/html/>.

LI, F. *et al.* The effect of graphene oxide on adventitious root formation and growth in apple. **Plant physiology and biochemistry**, Nanjing, v. 129, p. 122–129, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2018.05.029>.

LIJIMA, S. Helical microtubules of graphitic carbon. **Letters to nature**, Tsukuba, v. 354, p. 56–58, 1991. <https://doi.org/10.1038/354056a0>.

LIJIMA, S.; ICHIHASHI, T. Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. **Nature**, Tsukuba, v. 363, n. 6430, p. 603–605, 1993.

LIN, X. *et al.* Toxicity of graphene oxide to white moss *Leucobryum glaucum*. **RSC advances**, Chengdu, v. 7, n. 79, p. 50287–50293, 2017. <https://doi.org/10.1039/c7ra10096e>.

LIU, C. *et al.* Integrating transcriptome and physiological analyses to elucidate the molecular responses of buckwheat to graphene oxide. **Journal of hazardous materials**, Sichuan, v. 424, p. 127443–127457, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127443>.

LÓPEZ-VARGAS, E. R. *et al.* Seed priming with carbon nanomaterials to modify the germination, growth, and antioxidant status of tomato seedlings. **Agronomy**, Saltillo, v. 10, n. 5, p. 639–661, 2020. <https://doi.org/10.3390/agronomy10050639>.

LOWRY, G. V.; AVELLAN, A.; GILBERTSON, L. M. Opportunities and challenges for nanotechnology in the agri-tech revolution. **Nature nanotechnology**, Pittsburgh, v. 14, n. 6, p. 517–522, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41565-019-0461-7>.

LUO, Q. *et al.* All-carbon-electrode-based durable flexible perovskite solar cells. **Advanced functional materials**, Beijing, v. 28, n. 11, p. 1706777–1706785, 2018. <https://doi.org/10.1002/adfm.201706777>.

MAHOLIYA, A. *et al.* An insight into the role of carbon dots in the agriculture system: a review. **Environmental science: nano**, Bhopal, v. 10, n. 4, p. 959–995, 2023. Royal society of chemistry. <https://doi.org/10.1039/d2en00954d>.

MAKHLOUF, A. S. H.; BARHOUM, A. **Emerging applications of nanoparticles and architectural nanostructures**, Amsterdam, Elsevier, 2018. <https://books.google.com.br/books?hl=pt->

MARTINEZ-BALLESTA, M. C. *et al.* Discerning the mechanism of the multiwalled carbon nanotubes effect on root cell water and nutrient transport. **Plant physiology and biochemistry**, Murcia, v. 146, p. 23–30, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.11.008>.

MARTINS, Patricia Santos. **O Sistema de normas ISO e as nanotecnologias: as interfaces regulatórias e o diálogo entre as fontes do direito**. 2016. 157 f. Dissertação (Mestrado em Direito) - Universidade do Vale do Rio dos Sinos, São Leopoldo, 2016.

MATHEW, S.; TIWARI, D. K.; TRIPATHI, D. Interaction of carbon nanotubes with plant system: a review. **Carbon letters**, Thrissur, v. 31, n. 2, p. 167–176, 2021. Springer. <https://doi.org/10.1007/s42823-020-00195-1>.

MCGEHEE, D. L. *et al.* Multiwalled carbon nanotubes dramatically affect the fruit metabolome of exposed tomato plants. **Applied materials and interfaces**, Arkansas, v. 9, n. 38, p. 32430–32435, 2017. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b10511>.

MISHRA, Y. K. *et al.* Zebrafish (*Danio rerio*) as an ecotoxicological model for nanomaterial induced toxicity profiling. **Precision nanomedicine**, Uppsala, v. 4, n. 1, p. 750–781, 2021. Andover House, Inc. <https://doi.org/10.33218/001c.21978>.

MOHAJERI, M.; BEHNAM, B.; SAHEBKAR, A. Biomedical applications of carbon nanomaterials: drug and gene delivery potentials. **Journal of cellular physiology**, Mashhad, v. 234, n. 1, p. 298–319, 2018. Wiley-Liss Inc. <https://doi.org/10.1002/jcp.26899>.

MUTALIB, M. I. A.; GHANEM, O. BEN. Ecotoxicity of Ionic liquids towards *Vibrio fischeri*: experimental and QSAR studies. *In*: Handy, Scott (ed.) **Progress and developments in ionic liquids**. Rijeka: InTech, 2017, v. 1, cap. 18, p. 429–449. <https://doi.org/10.5772/65795>.

National nanotechnology initiative. **Nanotechnology**. Alexandria: NNI, 2023. Disponível em: <https://www.nano.gov/about-nanotechnology>. Acesso em: 15 nov. 2024.

PACHECO, I.; BUZEA, C. Nanoparticle uptake by plants: beneficial or detrimental? *In*: FAISAL, M. *et al.* (org.). **Phytotoxicity of nanoparticles**. Riad: Springer, 2018. p. 1–61. International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-76708-6_1.

PARK, S. *et al.* Graphene oxide-assisted promotion of plant growth and stability. **Nanomaterials**, Gwangju, v. 10, n. 4, p. 758–769, 2020.

<https://doi.org/10.3390/nano10040758>.

PENG, Z. *et al.* Advances in the application, toxicity and degradation of carbon nanomaterials in environment: a review. **Environment international**, Changsha, v. 134, p. 105298–105312, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105298>.

PHOGAT, N. *et al.* Fate of inorganic nanoparticles in agriculture. **Advanced materials letters**, Schwenningen, v. 7, n. 1, p. 3–12, 2016. VBRI Press. <https://doi.org/10.5185/amlett.2016.6048>.

PODAR, D. *et al.* The Effect of functionalized multiwall carbon nanotubes with Fe and Mn oxides on *Lactuca sativa* L. **Plants**, Cluj-Napoca, v. 12, n. 10, p. 1959–1978, 2023. <https://doi.org/10.3390/plants12101959>.

RASSAEI, F. Influence of graphene oxide on cadmium concentration in maize plant: implications for contaminant uptake and remediation strategies. **Chemistry and ecology**, Isfahan, v. 40, n. 5, p. 571–595, 2024. <https://doi.org/10.1080/02757540.2024.2335328>.

RIZWAN, M. *et al.* Types and classification of nanomaterials. *In*: TAHIR, Muhammad Bilal; MUHAMMAD, Sagir; ASIRI, Abdullah M. **Nanomaterials: synthesis, characterization, hazards and safety**. Gujrat: Elsevier, 2021, v. 1, p. 31–54. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823823-3.00001-X>.

ROCO, M. C.; WILLIAMS, S. R.; ALIVISATOS, P. **Nanotechnology research directions: iwgn workshop report vision for nanotechnology in the next decade**. Boston: Springer Science, 2000.

RONG, H. *et al.* Carboxylated multi-walled carbon nanotubes exacerbated oxidative damage in roots of *Vicia faba* L. seedlings under combined stress of lead and cadmium. **Ecotoxicology and environmental safety**, Huainan, v.161, p. 616–623, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.06.034>.

RÓZ, A. L. *et al.* **Técnicas de nanocaracterização: princípios e aplicações**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

SALEH, T. A. Nanomaterials: classification, properties, and environmental toxicities. **Environmental technology and innovation**, Dhahran, v. 20, p. 101067–101083, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101067>.

SANGEETHA, J. *et al.* Nanomaterials: implications on agroecosystem. *In*: PRASAD, R.; KUMAR, Manoj.; KUMAR, Vivek. (ed.). **Nanotechnology: an agricultural paradigm**. Arak: Springer, 2017. https://doi.org/10.1007/978-981-10-4573-8_4.

SANTANA, I. *et al.* Targeted carbon nanostructures for chemical and gene delivery to plant chloroplasts. **ACS nano**, California, v. 16, n. 8, p. 12156–12173, 2022. <https://doi.org/10.1021/acsnano.2c02714>.

Santos, S. C. *et al.* Genotypes selection for plant bioassays using *Lactuca sativa* L. and *Allium cepa* L. **Pakistan journal of botany**, Alfenas, v. 49, n. 6, p. 2201–2212, 2017.

SARITHA, G. N. G.; ANJU, T.; KUMAR, A. Nanotechnology big impact: how nanotechnology is changing the future of agriculture? **Journal of agriculture and food**

research, Kasaragod, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2022.100457>.

SASAKI, T. *et al.* In vitro chromosomal aberrations induced by various shapes of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs). **Journal of occupational health**, Hadano, v. 58, n. 6, p. 622–631, 2016. <https://doi.org/10.1539/joh.16-0099-OA>.

SAVAGE, D. T.; HILT, J. Z.; DZIUBLA, T. D. In vitro methods for assessing nanoparticle toxicity. **Methods in molecular biology**, Lexington, v. 1894, p. 1–29, 2019. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8916-4_1.

SEKHON, B. S. Nanotechnology in agri-food production: an overview. **Taylor and francis**, Ludhiana, v. 7, n. 2, p. 31–53, 2014. <https://doi.org/10.2147/NSA.S39406>.

SHANG, Y. *et al.* Applications of nanotechnology in plant growth and crop protection: a review. **Molecules**, Hangzhou, v. 24, n. 14, p. 2558–2573, 2019. <https://doi.org/10.3390/molecules24142558>.

SHARIFI, P. *et al.* Efficacy of multi-walled carbon nanotubes in regulating growth performance, total glutathione and redox state of *Calendula officinalis* L. cultivated on Pb and Cd polluted soil. **Ecotoxicology and environmental safety**, Urmia, v. 213, p. 112051–112062, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112051>.

SHATKIN, J. A. **Nanotechnology health and environmental risks**. 2. ed. Boca Raton: Taylor e Francis, 2017. <https://doi.org/https://doi.org/10.1201/9781315216799>.

SHELAR, A. *et al.* Recent advances in nano-enabled seed treatment strategies for sustainable agriculture: challenges, risk assessment, and future perspectives. **Nano-micro letters**, Maharashtra, v. 15, n. 1, p. 54–90, 2023. <https://doi.org/10.1007/s40820-023-01025-5>.

SHELAR, A. *et al.* Sustainable agriculture through multidisciplinary seed nanoprimering: prospects of opportunities and challenges. **Cells**, Pune, v. 10, n. 9, p. 2428–2450, 2021. <https://doi.org/10.3390/cells10092428>.

SHUKLA, P. *et al.* Nanotechnology in sustainable agriculture: studies from seed priming to post-harvest management. **Nanotechnology for environmental engineering**, Lucknow, v. 4, n. 11, p. 1–15, 2019. <https://doi.org/10.1007/s41204-019-0058-2>.

SILVA, P. R.; LOPES, J. G. S. Nanociência e nanotecnologia em foco: reflexões sobre um tema a ser explorado na educação em ciências. **Revista de ensino de ciências e matemática**, São Paulo, v. 11, n. 6, p. 497–513, 2020. <https://doi.org/10.26843/rencima.v11i6.2007>.

SINGH, J.; KUMAR, S. Responses of soil microbial community structure and greenhouse gas fluxes to crop rotations that include winter cover crops. **Geoderma**, Brookings, v. 385, p. 114843–114884, 2020. <https://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>.

SONG, J. *et al.* Effects of graphene on larix olgensis seedlings and soil properties of haplic cambisols in Northeast China. **Forests**, Harbin, v. 11, n. 3, p. 258–274, 2020. <https://doi.org/10.3390/f11030258>.

STUTTGEN, V. *et al.* The UCD nanosafety workshop (03 December 2018): towards

developing a consensus on safe handling of nanomaterials within the Irish university labs and beyond—a report. **Nanotoxicology**, Dublin, v. 13, n. 6, p. 717–732, 2019. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1621402>.

SUN, Y. *et al.* Metal–organic framework nanocarriers for drug delivery in biomedical applications. **Nano-micro letters**, Changsha, v. 12, n. 1, p. 103–132, 2020. <https://doi.org/10.1007/s40820-020-00423-3>.

TANIGUCHI, N. On the basic concept of “nano-technology”. **Proceedings of the international conference on production engineering: Tokyo, Japan**, v. 1974, p. 1–50, 1974. <https://cir.nii.ac.jp/crid/1572261550373135488>.

TUREK, M. *et al.* Modification of the Microtox® basic solid phase test: a new application for the ecotoxicological studies on poorly soluble antihypertensive drugs. **Journal of hazardous materials**, Częstochowa, v. 399, p. 122839–122866, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.122839>.

United Nations. **Global issues: food**, united nations. Nova York: ONU, 2021. Disponível em: <https://www.un.org/en/global-issues/food>. Acesso em: 20 nov. 2024.

United Nations. **Peace, dignity and equality on a healthy planet**. Nova York: ONU, 2022. Disponível em: <https://www.un.org/en/global-issues/population>.

USMAN, M. *et al.* Nanotechnology in agriculture: current status, challenges and future opportunities. **Science of the total environment**, Oman, v. 721, n. 13, p. 77–93, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137778>.

VERMA, S. K. *et al.* Applications of carbon nanomaterials in the plant system: a perspective view on the pros and cons. **Science of the total environment**, Indore, v. 667, p. 485–499, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.02.409>.

VOCHITA, G. *et al.* Graphene oxide effects in early ontogenetic stages of *Triticum aestivum* L. seedlings. **Ecotoxicology and environmental safety**, Iasi, v. 181, p. 345–352, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.06.026>.

VOGEL, E. *et al.* The effects of climate extremes on global agricultural yields. **Environmental research letters**, Parkville, v. 14, n. 5, p. 54010–54023, 2019. <https://doi.org/10.1088/1748-9326/ab154b>.

WANG, D. *et al.* Nano-enabled pesticides for sustainable agriculture and global food security. **Nature nanotechnology**, Austin, v. 17, n. 4, p. 347–360, 2022. <https://doi.org/10.1038/s41565-022-01082-8>.

WANG, P. *et al.* Application of a magnetic graphene nanocomposite for organophosphorus pesticide extraction in environmental water samples. **Journal of chromatography a**, Beijing, v. 1535, p. 9–16, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.01.003>.

WANG, X. Managing land carrying capacity: key to achieving sustainable production systems for food security. **Land**, Yan'an, v. 11, n. 4, p. 84–105, 2022. <https://doi.org/10.3390/land11040484>.

WANG, X. *et al.* Synergistic antifungal activity of graphene oxide and fungicides against

fusarium head blight in vitro and in vivo. **Nanomaterials**, Qinhuangdao, v. 11, n. 9, p. 2393–2418, 2021. <https://doi.org/10.3390/nano11092393>.

XIN, X. *et al.* Carbon nanoparticles improve corn (*Zea mays* L.) growth and soil quality: comparison of foliar spray and soil drench application. **Journal of cleaner production**, Fort Pierce, v. 363, p. 132630–132638, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2022.132630>.

YAN, Q. L. *et al.* Highly energetic compositions based on functionalized carbon nanomaterials. **Nanoscale**, Tel Aviv, v. 8, n. 9, p. 4799–4851, 2016. <https://doi.org/10.1039/c5nr07855e>.

YI, H. *et al.* Selective prepared carbon nanomaterials for advanced photocatalytic application in environmental pollutant treatment and hydrogen production. **Applied catalysis b: environmental**, Changsha, v. 239, p. 408–424, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2018.07.068>.

YUAN, Z. *et al.* Novel impacts of functionalized multi-walled carbon nanotubes in plants: promotion of nodulation and nitrogenase activity in the rhizobium-legume system. **Nanoscale**, Wuhan, v. 9, n. 28, p. 9921–9937, 2017. <https://doi.org/10.1039/c7nr01948c>.

ZAYTSEVA, O.; NEUMANN, G. Carbon nanomaterials: production, impact on plant development, agricultural and environmental applications. **Chemical and biological technologies in agriculture**, Stuttgart, v. 3, n. 1, p. 17–43, 2016. <https://doi.org/10.1186/s40538-016-0070-8>.

ZHANG, H. *et al.* Physiological effects of single- and multi-walled carbon nanotubes on rice seedlings. **IEEE transactions on nanobioscience**, Wuhan, v. 16, n. 7, p. 563–570, 2017. <https://doi.org/10.1109/TNB.2017.2715359>.

ZHANG, P. *et al.* Toxic effects of graphene on the growth and nutritional levels of wheat (*Triticum aestivum* L.): short- and long-term exposure studies. **Journal of hazardous materials**, Hangzhou, v. 317, p. 543–551, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2016.06.019>.

ZHOU, L. *et al.* Multi walled carbon nanotubes: a cytotoxicity study in relation to functionalization, dose and dispersion. **Toxicology in vitro**, Los Angeles, v. 42, p. 292–298, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.027>.

ZHOU, Q.; HU, X. Systemic stress and recovery patterns of rice roots in response to graphene oxide nanosheets. **Environmental science and technology**, Washington, v. 51, n. 4, p. 2022–2059, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b05591>.

ZIELIŃSKA, A. *et al.* Nanotoxicology and nanosafety: safety-by-design and testing at a glance. **Environmental research and public health**, Coimbra, v. 17, n. 13, p. 1–22, 2020. <https://doi.org/10.3390/ijerph17134657>.

ZOU, F. *et al.* Wrinkled surface-mediated antibacterial activity of graphene oxide nanosheets. **Applied materials and interfaces**, Busan, v. 9, n. 2, p. 1343–1351, 2017. <https://doi.org/10.1021/acsami.6b15085>.