



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

EFEITO DO ÓXIDO DE GRAFENO NO CRESCIMENTO DA MICROALGA *Pseudokirchneriella subcapitata* SOB INFLUÊNCIA DE SUBSTÂNCIAS HÚMICAS

Leonas Carriel de **Souza**¹; Rodrigo Fernandes **Castanha**²; Neusa **Domingos**³; Vera Lúcia S. S. **Castro**⁴; Claudio Martín **Jonsson**⁵

Nº 17409

RESUMO - O grafeno é um nanomaterial promissor na remoção de pesticidas de águas, transporte de fármacos em medicamentos e transporte de agroquímicos em formulações. A qualidade do lodo agrícola usado como biofertilizante pode ser comprometida já que é esperado que materiais a base de grafeno estejam presentes nas estações de tratamento de efluentes em quantidades consideráveis. A microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* é uma clorófitica bioindicadora que tem sido amplamente utilizada em estudos de ecotoxicidade de poluentes e recomendada no registro de agentes químicos e biopesticidas. No presente trabalho avaliou-se o efeito do óxido de grafeno (OG) na taxa de crescimento de culturas desse organismo-teste, sob diferentes concentrações do nanomaterial e de influência do ácido húmico (AH) neste efeito. Pois a última substância pode afetar a biodisponibilidade do nanomaterial. Como resultado, observou-se que a concentração que inibe o crescimento algáceo em 50% durante um período de 72 h de exposição (CE50-72h) foi de 66,60 e 242,78 mg L⁻¹, respectivamente, na ausência e na presença de AH. Não tendo se constatado diferença significativa ($p > 0,05$) entre estes valores, o primeiro categoriza o OG como “levemente tóxico” para *P. subcapitata*. Os valores de concentração de efeito não observado (CENO) foram respectivamente de 4,93 e 0,26 mg L⁻¹ para a alga exposta na ausência ou na presença do material húmico. Estas concentrações, juntamente com outros valores de parâmetros de ecotoxicidade determinados em outros bioindicadores da cadeia trófica aquática, são de utilidade para orientar políticas públicas quanto ao estabelecimento de níveis de segurança do OG.

Palavras-chaves: Bioindicador, Microalga, *Pseudokirchneriella subcapitata*, Grafeno, Nanomaterial

1 Bolsista CNPq: Graduação em Engenharia Ambiental e Sanitária, PUC-CAMPINAS, Campinas, SP; leonas.cs@puccampinas.edu.br

2 Colaborador: Técnico, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

3 Colaboradora: Assistente, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

4 Colaboradora: Pesquisadora, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

5 Orientador: Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; claudio.jonsson@embrapa.br



ABSTRACT- *Graphene is a promising nanomaterial in the removal of pesticides from water, transport of drugs in medicines and transport of agrochemicals in formulations. The quality of the agricultural sludge used as a biofertilizer can be compromised since graphene-based materials are expected to be present in wastewater treatment plants in considerable quantities. The microalgae Pseudokirchneriella subcapitata is a bioindicator chloroficea that has been widely used in ecotoxicity studies of pollutants and it was recommended in the registration of chemical agents and biopesticides. In the present work it was evaluated the effect of graphene oxide (OG) on the growth rate of this test-organism under different concentrations of the nanomaterial and under the influence of humic acid (HA). This last substance may affect the bioavailability of the nanomaterial. As a result, the concentration that inhibits the growth rate by 50% over a 72 h exposure period (EC50-72 h) was found to be 66.60 and 242.78 mg L⁻¹, respectively, in the absence and in the presence of AH. No significant difference (p>0.05) was found between both values and the former categorizes OG as "slightly toxic" for P. subcapitata. The non-observed effect concentration (CENO) values were respectively 4.93 and 0.26 mg L⁻¹ for algae exposed in the absence or in the presence of the humic material. These concentrations, together with other values of ecotoxicity parameters determined in other bioindicators of the aquatic trophic chain, are useful for guiding public policies regarding the establishment of safety levels of OG.*

KEYWORDS: Bioindicator; Microalgae; *Pseudokirchneriella subcapitata*.; Graphene; Nanomaterial

1 INTRODUÇÃO

O uso do grafeno, o qual é considerado um nanomaterial, vem atraindo bastante interesse devido à condutividade térmica e elétrica, por sua alta tensão de ruptura, também tem ótima propriedade mecânica, grande área específica e por ter uma nanocamada plana de átomos de carbono organizados em uma rede bidimensional (NGUYEN et al. 2009; RAFIEE et al., 2010). Devido a essas características, distintas áreas apontam o grafeno como um nanomaterial promissor em várias aplicações como o transporte de fármacos e retirada de poluentes da água e ar (metais, orgânicos e microrganismos). MALIYEKAL et al. (2013) propuseram sobre seu uso promissor na remoção de inseticidas, tais como clorpirifós, endosulfan e malation, de águas contaminadas por esses insumos agrícolas. Também é empregado em diversos âmbitos,



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

especialmente o da eletrônica, na produção de eletrodos de baterias, painéis táteis e outros aparelhos.

O negócio de produtos à base de grafeno e seus derivados (como o óxido de grafeno) deve chegar perto de 675 milhões de dólares em meados de 2020. Portanto espera-se a presença destes compostos nas estações de tratamento de efluentes em quantidades abundantes (AHMED & RODRIGUES, 2013). Este fenômeno poderia trazer influência sobre a mudança das propriedades do lodo agrícola usado como biofertilizante (SMITH, 2009). Considerável escape de matérias a base de grafeno pode ocorrer durante suas aplicações e assim contaminar corpos de água superficiais (ZHAO et al. 2014).

As substâncias húmicas, como ácido húmico, ficam presentes na natureza e são naturais dos processos de decomposição de dejetos de animais e vegetais. São resumidas em macromoléculas poliméricas constituídas especialmente por grupos carboxílicos e fenólicos. São apropriados para solubilizar, em meio aquoso, materiais hidrofóbicos e nanomateriais. De tal modo, as nanopartículas podem ter sua aglomeração reduzida devido à alteração de carga de superfície pela substância húmica (HYUNG et al., 2007, ZHANG et al., 2009), o que por sua vez pode alterar a biodisponibilidade do nanomaterial.

A microalga *Pseudokirchneriella subcapitata* é uma clorofícea colonial planctônica, constituída por células lunadas de ápice pontiagudo. Tem sido amplamente utilizada como bioindicadora em estudos de ecotoxicidade de poluentes ambientais e recomendada no registro de agentes químicos e de biopesticidas por órgãos nacionais e internacionais (DUARTE et al., 2014). Assim, com base no exposto anteriormente, no presente trabalho avaliou-se o efeito do óxido de grafeno no crescimento da cultura da microalga *Pseudokirchneriella subcapitata*, sob distintas concentrações do nanomaterial e influência do ácido húmico neste resultado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O material testado foi o óxido de grafeno (OG) (Figura1), que foi adquirido de Sigma Aldrich (código do produto: 763713). As suspensões estoque (1g L^{-1}) foram sonicadas durante 30 minutos antes da realização do teste.

O ácido húmico (AH) foi adquirido da Sigma Aldrich (código do produto: 53680).

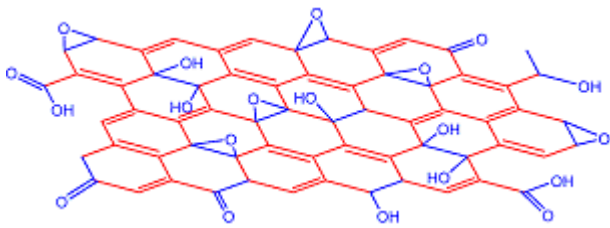


Figura 1. Estrutura do óxido de grafeno (OG). Fonte: Zhao et al., 2014.

Organismo-teste e delineamento experimental

Algas unicelulares (*P. subcapitata*) foram utilizadas como organismo-teste e cultivadas conforme a metodologia recomendada pela OECD (OECD, 1984). O cultivo foi realizado em erlenmeyers com capacidade de 250 mL, em meio autoclavado, ambiente com temperatura controlada a 20 ± 2 °C e sob luminosidade de ~ 1300 lux. A suspensão de algas foi distribuída em placas de poliestireno contendo 12 poços cada de modo a se obter um volume total de suspensão-teste equivalente a 300 μ L por poço com uma concentração de algas de $\sim 10^6$ células/mL. As algas foram expostas durante 72 horas, nas mesmas condições de cultivo, às concentrações de OG de 0 (controle); 0,1; 1; 10 e 100 mg L⁻¹. Paralelamente preparam-se placas para a avaliação do efeito do OG na presença de 20 mg L⁻¹ de ácido húmico.

No início e em intervalos de 24 horas, se fez a leitura da absorbância a 750 nm utilizando o leitor de microplaca Sunrise (Tecan Group Ltd.), já que a absorbância é proporcional à concentração algacea. A taxa específica de crescimento (TEC) para as 72 h de exposição foi calculada segundo procedimento descrito por BECARO et al. (2015). O cálculo da concentração que inibe a TEC em 50% (CE50-72h) foi determinada em função do logaritmo de base 10 (Log) da concentração do material-teste pelo modelo de regressão com melhor ajuste da relação concentração-efeito, utilizando-se o módulo “Simple Regression” do programa Statgraphics Centurion XVII Version 1.17.04 (StatPoint Technologies 2014; OECD 1984). A concentração de efeito não observado (CENO) foi estimada com base no cálculo da concentração que afeta a redução em somente 10% da TEC (EC10-72h) (OECD, 2002; WARNE & VAN DAM, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O OG inibiu a taxa de crescimento da microalga em função da concentração, tanto na ausência como na presença da substância húmica. Para ambos os casos, uma relação dose-



resposta foi estabelecida, o que permitiu calcular valores da CE50-72h referentes à inibição da TEC (Figuras 2 e 3).

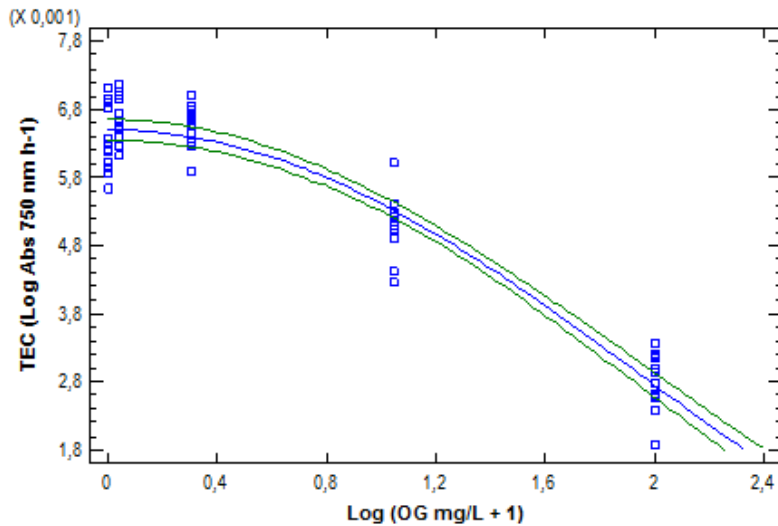


Figura 2. Curva de concentração-efeito de OG na taxa específica de crescimento (TEC) de *P. subcapitata* exposta durante 72 horas ao material-teste na ausência do ácido húmico.

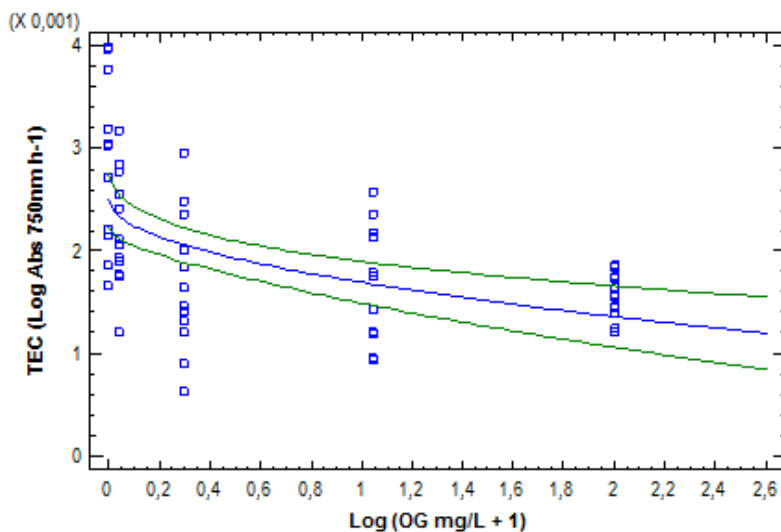


Figura 3. Curva de concentração-efeito de OG na taxa específica de crescimento (TEC) de *P. subcapitata* exposta durante 72 horas ao material-teste na presença do ácido húmico.

O valor de CE50-72h e seu intervalo de confiança 95% na ausência de AH foi de 66,60 (60,80 – 78,43) mg L⁻¹. Na presença da substância húmica, este valor aumentou para 242,78 mg L⁻¹ (33,67 – n.d.). Apesar de ser bem superior ao primeiro, a diferença entre os valores não foi



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

estatisticamente significativa a nível de 95% de certeza. Entretanto houve diferença significativa nos valores de CE10-72h: 4,93 (3,46 -5,55) mg L⁻¹ na ausência de AH e 0,26 (n.d. – 0,99) mg L⁻¹ na presença de AH, o que supõe menor valor de CENO na influencia da substância húmica. Este menor valor seria adotado para fins de análise de risco quanto ao estabelecimento de níveis máximos.

De acordo com HU et al. (2014), o OG possui a capacidade de penetrar nas células da microalga clorofícea *Chlorella vulgaris* e danificar suas organelas. As alterações evidenciadas com maior frequência foram plasmólise e aumento do numero de grãos de amido. Outras alterações observadas foram: agregação da cromatina, dano nas estruturas dos cloroplastos e redução da divisão celular. Esta última estaria associada aos achados observados no presente trabalho. Apesar dos autores não terem relatado a respeito de valores de CE50, eles apontaram que a inibição de crescimento e o estresse oxidativo tiveram um incremento a partir de concentrações de 0,1 mg L⁻¹ até a maior concentração testada de 10 mg L⁻¹. Estes efeitos adversos foram desprezíveis na concentração de 0,01 mg L⁻¹.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se que o OG se apresentou como “levemente tóxico” para a microalga *P. subcapitata* pelo fato de seu valor de CE50-72h, na ausência da substancia húmica, estar na faixa de 10 – 100 mg L⁻¹. Apesar dessa classificação caracteriza-lo como um agente relativamente inócuo, deve-se dirigir a atenção ao estabelecimento de limites máximos permissíveis nos corpos de água.

De maneira análoga aos nossos estudos, a inibição do crescimento de microalgas clorofíceas pelo OG foi constatada por outros autores, sendo que concentrações de até 0,1 mg L⁻¹ são capazes de promover este efeito adverso segundo a literatura.

A concentração de CENO equivalente 0,26 mg L⁻¹ é a que seria adotada a partir do presente estudo para finalidade de análise de risco, visando a proteção das comunidades aquáticas.

Os valores de CENO determinados no presente estudo, em conjunto com valores de parâmetros de ecotoxicidade de OG determinados em outros organismos-teste bioindicadores, são de utilidade para orientar políticas públicas quanto ao estabelecimento de níveis de segurança do OG em compartimentos ambientais.



5 AGRADecIMENTOS

À EMBRAPA Meio Ambiente (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) pela oportunidade e suporte para a realização do estudo da Iniciação Científica.

Ao CNPq por conceder a bolsa de Iniciação Científica para o devido estudo.

6 REFERÊNCIAS

AHMED, F.; RODRIGUES, D.F. Investigation of acute effects of graphene oxide on wastewater microbial community: a case study. **Journal of Hazard Materials**, v. 256, p. 33-39, 2013.

BECARO, A. A. ; JONSSON, C. M. ; PUTI, F. C. ; SIQUEIRA, M. C. ; MATTOSO, L. H. ; CORREA, D. S. ; FERREIRA, M. D. . Toxicity of PVA-stabilized silver nanoparticles to algae and microcrustaceans. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, v. 3, p. 22-29, 2015.

DUARTE, S.: AMARAL SOBRINHO, N.M.B.; JONSSON, C.M.; JOKL, L. Efeito in vitro de poluentes inorgânicos usados na agricultura sobre a atividade da catalase da alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. **Iheringia Série Botânica**, v. 69, p. 387-395, 2014.

HU, X.; LU, K.; UM, L.; KANG, J.; ZHOU, Q. Interactions between graphene oxide and plant cells: Regulation of cell morphology, uptake, organelle damage, oxidative effects and metabolic disorders. **Carbon**, v. 80, p. 665–676, 2014.

HYUNG, H.; FORTNER, J.D; HUGHES, J.B; KIM, J.H. Natural organic matter stabilizes carbon nanotubes in the aqueous phase. **Environmental Science and Technology**, v.41, n.1, p. 179-184, 2007.

MALIYEKKAL, S.M; SREEPRASAD, T.S; KRISHNAN, D; KOUSER, S; MISHRA, A.K; WAGHMARE, U.V; PRADEEP, T. Graphene: a reusable substrate for unprecedented adsorption of pesticides. **Small**. v.9, n.2, p.273-283. 2013.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7

NGUYEN, D.A.; LEE, Y.R.; RAGHU, A.V.; JEONG, H.M.; SHIN, C.M.; KIM, B.K. Morphological and physical properties of a thermoplastic polyurethane reinforced with functionalized graphene sheet, **Polymer International**, v. 58, p. 412-417, 2009.

OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals: 201. Alga, growth inhibition test.** OECD: Paris, 1984.

OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals. Proposal for updating guideline 201. Freshwater alga and cyanobacteria, growth inhibition test.** OECD: Paris, 2002.

RAFIEE, M.A.; LU, W.; THOMAS, A.V.; ZANDIATASHBAR, A.; RAFIEE, J.; TOUR, J.M.; KORATKAR, N.A. Graphene nanoribbon composites, **ACS Nano**, v. 4, p. 7415-7420, 2010.

RODRIGUES, L.C. A.; BARBOSA, S; PAZIN, M; MASELLI, B.S; BEIJO, L.A; KUMMROW, F. Fitotoxicidade e citogenotoxicidade da água e sedimento de córrego urbano em bioensaio com *Lactuca sativa*. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**. v.17, n.10, p.1099-1108, 2013.

SMITH, S. R. Organic contaminants in sewage sludge (biosolids) and their significance for agricultural recycling. *Philosophical Transactions. Series A, Mathematical, Physical, and Engineering Science*. V. 367, p. 4005-4041. 2009.

STATPOINT TECHNOLOGIES. Stat graphics Centurion XVII (Version 17.1.04), **Stat Point Technologies**, Inc., Herndon, VA, 2014.

WARNE, M.S.J ; VAN DAM, R. NOEC and LOEC data should no longer be generated or used. **Australasian Journal of Ecotoxicology** , v. 14, p. 1-5, 2008.

ZHANG, Y; CHEN, Y; WESTERHO, P; CRITTENDEN, J. Impact of natural organic matter and divalent cations on the stability of aqueous nanoparticles. **Water Research**, v. 43, p. 4249–4257, 2009.

ZHAO, J.; WANG, Z.; WHITE, J.C.; XING, B. Graphene in the aquatic environment: adsorption, dispersion, toxicity and transformation . **Environmental Science Technology** , v. 48, p. 9995-10009, 2014.



11º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2017
02 a 04 de agosto de 2017 – Campinas, São Paulo
ISBN 978-85-7029-141-7