

## AVALIAÇÃO DE RISCO AMBIENTAL ESTIMADO PELA EXPOSIÇÃO AO ÓXIDO DE GRAFENO

Vera L. Castro<sup>1</sup>, Zaira Clemente<sup>1,2</sup>, Claudio Jonsson<sup>1</sup>, Mariana Silva<sup>1</sup>, José Henrique Vallim<sup>1</sup>,  
Aline Maria Zigiotto de Medeiros<sup>2,3</sup>, Diego Stéfani T. Martinez<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna – SP

<sup>2</sup> Laboratório Nacional de Nanotecnologia, CNPEM, Campinas – SP

<sup>3</sup> Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), USP, Piracicaba - SP

[vera-lucia.castro@embrapa.br](mailto:vera-lucia.castro@embrapa.br)

**Classificação:** Cenários e avaliação dos riscos ambientais e sociais dos nanocompostos.

### Resumo

O objetivo deste trabalho foi determinar valores de concentração sem efeito previsível (PNEC) para óxido de grafeno (GO), considerando a presença ou ausência de ácido húmico no meio aquático. Para isso, foram realizados testes toxicológicos e determinados os valores de concentração de efeito não observado (CENO) para 9 organismos. A PNEC de GO no compartimento aquático, abaixo da qual os efeitos adversos provavelmente não ocorrerão durante a exposição a longo ou curto prazo, foi estimada em 20 µg/L (na ausência de ácido húmico) e 5 µg/L (na presença de ácido húmico). Estes dados contribuem para avaliação de risco da nanotecnologia.

**Palavras-chave:** PNEC; Nanotoxicologia; Carbono; Nanomaterial; Ecotoxicologia.

### EVALUATION OF ESTIMATED ENVIRONMENTAL RISK DUE TO GRAPHENE OXIDE EXPOSURE

#### Abstract

The objective of this work was to estimate the predicted no effect concentration (PNEC) for graphene oxide (GO), considering the presence or absence of humic acid in the aquatic environment. Therefore, toxicological tests were performed and the values of no observed effect concentration (NOEC) for 9 organisms were determined. PNEC of GO in the aquatic compartment, below which adverse effects are unlikely to occur during long- or short-term exposure, was estimated at 20 µg/L (in the absence of humic acid) and 5 µg/L (in the presence of acid humic). These data contribute to the risk assessment of nanotechnology.

**Keywords:** PNEC; Nanotoxicology; Carbon; Nanomaterial; Ecotoxicology.

### 1 INTRODUÇÃO

O óxido de grafeno (GO) é um material de carbono de camada única com alto teor de oxigênio, preparado pela oxidação e esfoliação do grafeno (ENOKI et al., 2013). Este nanomaterial (NM) possui diversas aplicações em biomedicina, engenharia de tecidos, biossensores e imagens. No entanto, é necessária a avaliação de risco para seu uso sustentável já que seu destino e seus efeitos para o meio ambiente ainda são pouco compreendidos (MATTSSON; SIMKÓ, 2017).

Embora GO tenha uma tendência a agregar em suspensões aquosas e, em consequência, estar menos disponível para interagir com organismos; pode causar toxicidade (CLEMENTE et al., 2017). A presença de matéria orgânica melhora significativamente a estabilidade de GO em água, principalmente devido à repulsão estérica e é possível uma maior absorção pelos organismos (CHOWDHURY et al., 2013). Assim, estudos adicionais sobre GO e suas interações com substâncias húmicas reduzirão a incerteza nas avaliações de risco ambiental do NM (SELCK et al., 2016).

Na avaliação de risco ambiental, o risco pode ser quantificado comparando a concentração ambiental prevista (PEC) com a concentração prevista sem efeito (PNEC). Ainda não há estimativas do PEC ou PNEC para GO. Assim, este estudo teve como objetivo determinar a PNEC do GO, através da avaliação de toxicidade em diversos organismos aquáticos, na presença ou não de ácido húmico.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

Para realizar este estudo, foram utilizados óxido de grafeno de camada única (GO, lote MKBV1192V, código 763713) e ácido húmico (HA, sal sódico, lote STBCS468V, código H16752), ambos da Sigma Aldrich. As suspensões estoque de GO e HA foram preparadas em água ultrapura a uma concentração de 1 mg/L. As suspensões GO e HA estoque foram sonicadas e armazenadas no escuro até serem usadas nos testes, quando foram novamente sonicadas antes de preparar as respectivas diluições.

Os efeitos do GO foram determinados através de ensaios de toxicidade aguda com: *Raphidocelis subcapitata*, *Lemna minor*, *Lactuca sativa*, *Daphnia magna*, *Artemia salina*, *Chironomus sancticarloi*, *Hydra attenuata*, *Caenorhabditis elegans* e *Panagrolaimus* sp. Todos os ensaios de ecotoxicidade foram realizados a 0, 0,1, 1, 10 e 100 mg/L de GO, com e sem 20 mg/L de HA. A fim de permitir a comparação da toxicidade para os diferentes organismos testados calculou-se o CENO para cada um dos organismos de acordo com os parâmetros testados usando o módulo ANOVA ou o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Bonferroni. O CENO também foi estimado com base na relação CE50/10 (OECD 1995; JONSSON et al. 2015) ou usando o cálculo da concentração que afeta a redução em apenas 10% do parâmetro avaliado (CE10) (OCDE, 2002; JONSSON et al., 2015).

A concentração ambiental hipotética em que apenas 5% das espécies de um meio aquático seria afetado (HC5) foi determinada por meio da distribuição log-logística dos valores de CENO (OCDE, 1995; JONSSON et al., 2015), por regressão simples (StatPoint Technologies, 2014). Os dados (CENO = 10 mg/L) da exposição de embriões *Danio rerio*, (CLEMENTE et al., 2017), foram adicionados à distribuição log-logística. Neste caso, uma CE50 > 100 mg/L foi atribuída, uma vez que não foi observada mortalidade nesta concentração. Assume-se que os organismos não sofreriam danos quando os contaminantes estiverem presentes nos ambientes aquáticos em concentrações de 10% da LC50 (TOUART, 1995). O HC5 foi calculado com um nível de confiança de 50% (HC5-50) que corresponde à estimativa "mais provável" ou "mediana" do percentil 5 (TRAAS & VAN LEEUWEN, 2007, ALDENBERG & SLOB, 1993).

Foi então calculada a Concentração sem efeito previsível – PNEC, aplicando-se a avaliação do fator de risco (valor = 5) ao HC5-50. Este valor fatorial foi adotado como o valor mais seguro na escala de 1 a 5 (TRAAS e VAN LEEUWEN, 2007) e calculado usando o módulo de regressão simples do programa Statgraphics Centurion XVII 1.17.04 (StatPoint Technologies, 2014).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A variabilidade na susceptibilidade dos organismos-teste para GO e GO e HA foi alta. Para o *C. elegans* foi observada diferença significativa entre a EC50 na ausência ou presença de HA após 96h de exposição ao GO quanto aos parâmetros de fertilidade (90,24 e 46,41 mg L<sup>-1</sup>) e reprodução (73,43 e 11,14 mg L<sup>-1</sup>) respectivamente. Também para a *R. subcapitata* foi observada diferença significativa entre a taxa de crescimento quando exposta ao GO na ausência de HA (66,60 mg L<sup>-1</sup>) e na presença de HA (242,78 mg L<sup>-1</sup>). Os valores de HC5-50 calculados foram respectivamente 0,023 e 0,10 mg L<sup>-1</sup> para GO com e sem HA. A PNEC de GO no compartimento aquático foi estimada em 20 µg L<sup>-1</sup> na ausência de HA. Na presença de HA, em uma concentração de ácido húmico ambientalmente relevante (FRIMMEL, 2004), esse parâmetro foi estimado em 5 µg L<sup>-1</sup>.

Os dados atuais estão próximos dos valores de PNEC para nanotubos de carbono (CNT) e fullerenos (55,6 e 3,84 µg/L, respectivamente), conforme estimado por Coll et al. (2016) para água doce. De acordo com estimativas derivadas de modelos matemáticos, as concentrações ambientalmente relevantes de NM devem estar nas faixas de partes por bilhão (ppb) e partes por trilhão (ppt) em águas superficiais, mas não existem dados atualmente disponíveis para GO (HU et al., 2017, DUAN et al., 2017). Alguns estudos estimaram nas águas superficiais concentrações de até 0,56 e 0,33 ng/L para CNT e C60, respectivamente (SUN et al., 2014). Na ausência de valores de PEC para GO, calculamos o quociente de risco (RQ = PEC/PNEC) usando o valor PEC estimado para CNT por Gottschalk et al. (2009) - 32,6 ng/L - assumindo uma exposição semelhante entre os dois materiais e considerando o pior cenário possível.

Assim, valores de RQ de 0,001 e 0,006 foram obtidos para GO na ausência e presença de ácido húmico, respectivamente. Um RQ <1 indica que não é de se esperar nenhum risco para o compartimento. Portanto, embora na presença de HA exista uma redução de 4 x na PNEC de GO, os valores de RQ indicam não ser esperado nenhum risco para os ecossistemas aquáticos em ambos os casos.

#### 4 CONCLUSÃO

A abordagem apresentada neste trabalho é útil na previsão de uma concentração de GO ecologicamente segura, uma vez que os dados sugerem que a exposição a GO pode causar algum dano aos organismos após sua liberação para o meio ambiente.

#### AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi apoiado pelos processos FAPESP 2014/12891-0 e 2014/01995-9. Os autores agradecem ainda ao CNPEM, CAPES, INCT-Inomat, Cigenanotox, Rede AgroNano e SisNANO.

**REFERÊNCIAS** SALDENBERG, T.; SLOB, W. Confidence limits for hazardous concentrations based on logistically distributed NOEC toxicity data. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **25**, 48-63, 1993.

CHOWDHURY, I. et al. Colloidal properties and stability of graphene oxide nanomaterials in the aquatic environment. *Environ. Sci. Technol.*, 47(12), 6288-6296, 2013.

CLEMENTE Z. et al. Nanotoxicity of graphene oxide: Assessing the influence of oxidation debris in the presence of humic acid. *Clemente, Environmental Pollution*. 225: 118-128, 2017.

COLL, C. et al. Probabilistic environmental risk assessment of five nanomaterials (nano-TiO<sub>2</sub>, nano-Ag, nano-ZnO, CNT, and fullerenes). *Nanotoxicology*, 10(4), 436-444, 2016.

DUAN, L. et al. Removal of graphene oxide nanomaterials from aqueous media via coagulation: Effects of water chemistry and natural organic matter. *Chemosphere*, 168, 1051-1057, 2017.

ENOKI, T. et al., M.A.II in the graphene family - a recommended nomenclature for two-dimensional carbon materials. *Carbon*, 65, 1-6, 2013.

FRIMMEL, F.H., Aquatic humic substances. v.1, cap 10. En: Steinbüchel A. *Biopolymers*, Wiley-VCH, 2004. Available in: [http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf/v01\\_kap10.pdf](http://www.wiley-vch.de/books/biopoly/pdf/v01_kap10.pdf). Accessed in 2/9/2014

GOTTSCHALK, F., et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO<sub>2</sub>, ZnO, Ag, CNT, fullerenes) for different regions. *Environ Sci Technol.*, 43, 9216-9222, 2009.

HU, X.; WEI, Z.; MU, L. Graphene oxide nanosheets at trace concentrations elicit neurotoxicity in the offspring of zebrafish. *Carbon*, 117, 182-191, 2017.

[JONSSON, C. M.](#) et al. Prediction of a low-risk concentration of diflufenuron to aquatic organisms and evaluation of clay and gravel in reducing the toxicity. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 10, 259-272, 2015.

MATTSSON M.-O.; SIMKÓ M. The changing face of nanomaterials: Risk assessment challenges along the value chain, *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 84, 105-115, 2017.

OECD. Guidance document for aquatic effects assessment (Paris, France), 1995.

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

SELCK, H. et al. Nanomaterials in the Aquatic Environment: a European Union-United States perspective on status of ecotoxicity testing, research priorities and challenges ahead. *Environ. Toxicol. Chem.*, 35, 1055-1067, 2016.

SUN, T.Y. et al. Comprehensive modeling of environmental emissions of engineered nanomaterials. *Environ. Pollut.*, 185, 69–76, 2014.

TOUART LW. The federal insecticide, fungicide, and rodenticide act. In: Rand GM (Ed), *Fundamentals of aquatic toxicology*, 3rd ed., Boca Raton, FL: CRC Press, p. 657-668, 1995.

TRAAS, T.P.; VAN LEEUWEN, C.J. Ecotoxicological Effects. In: Van Leeuwen, C.J.; Velmeire, T.G, eds. *Risk Assessment of Chemicals: An Introduction*. 2nd Edition, Springer, Dordrecht, p. 281-356, 2007.

VAN DAM, R.A. et al. Toxicity of DTPA to *Daphnia carinata* as modified by oxygen stress and food limitation. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 31, 117-126, 1995.