



Projeto de pesquisa- Iniciação Científica

Relatório final

**Avaliação toxicológica de óxido de grafeno (rGO) em algas
verdes *Raphidocelis subcapitata*.**

Orientador: Prof^a. Dra. Silvia Pierre Irazusta

Co- orientador: Amanda Leopoldina Soares Gomes

Aluna: Denise Diniz Campos

Sorocaba

2018

RESUMO

A síntese de diferentes nanopartículas e o crescente desenvolvimento nanotecnológico, levantam novas questões a cerca da toxicidade das nanopartículas no ambiente. Os estudos nanotoxicológicos ainda são escassos, contudo podem fornecer informações a respeito dos potenciais riscos associados ao ambiente e os ecossistemas. A falta de padronizações e protocolos de análises tornam mais difíceis os estudos a respeito da toxicidade de materiais como o óxido de grafeno reduzido (rGO). Os resultados destes estudos dependem das propriedades físico-químicas, como a pureza, comprimento, diâmetro, carga superficial, funcionalização e estado de agregação. Os testes de toxicidade, empregando organismos-indicadores fornecem informações sobre as condições de um ecossistema perante a presença de um impacto ambiental, como forma de biomonitoramento. As algas por exemplo, como base da cadeia alimentar e também dos níveis tróficos, são os seres que pioneiramente sofrem com as alterações no meio devido a presença de agentes tóxicos. O objetivo deste estudo foi verificar a potencial toxicidade do óxido de grafeno reduzido, baseando-se na biomassa algal de algas *Raphidocelis subcapitata*, bioindicadores ambientais. Os resultados dos ensaios mostraram que o óxido de grafeno reduzido (rGO) é potencialmente tóxico apenas na concentração de 100 ppm. Conclui-se que há toxicidade em altos níveis de rGO, podendo-se inferir sua relativa segurança ambiental, já que estes níveis (100ppm), muito improvavelmente estariam no ambiente, mesmo a longo prazo.

Palavras-chave: óxido de grafeno reduzido; biomonitoramento; *Raphidocelis subcapitata*.

ABSTRAC

The synthesis of different nanoparticles and the growing nanotechnological development raise new questions about the toxicity of nanoparticles in the environment. Nanotoxicological studies are still scarce, but can provide information on the potential risks associated with the environment and ecosystems. The lack of standardization and analysis protocols make it more difficult to study the toxicity of materials such as reduced graphene oxide (rGO). The results of these studies depend on the physicochemical properties, such as purity, length, diameter, surface charge, functionalization and state of aggregation. The toxicity tests using indicator organisms provide information on the conditions of an ecosystem in the presence of an environmental impact as a form of biomonitoring. Algae, for example, as the basis of the food chain and also of the trophic levels, are the beings that first suffer from changes in the environment due to the presence of toxic agents. The objective of this study was to verify the potential toxicity of reduced graphene oxide, based on algal biomass of algae *Raphidocelis subcapitata*, environmental bioindicators. The results of the tests showed that reduced graphene oxide (rGO) is potentially toxic only at the concentration of 100 ppm. It is concluded that there is toxicity at high levels of rGO, and its relative environmental safety can be inferred, since these levels (100 ppm) would very unlikely be in the environment, even in the long term.

Keywords: reduced graphene oxide; Biomonitoring; *Raphidocelis subcapitata*.

SUMÁRIO

RESUMO	1
ABSTRAC	2
1. INTRODUÇÃO	5
1.1 Nanomateriais.	6
1.2 Avaliação toxicológicas de óxidos de grafeno.	7
1.2.1 Organismo teste.	8
2. JUSTIFICATIVA	9
3. OBJETIVO	9
4. MATERIAIS E MÉTODOS	10
4.1 Óxido de grafeno reduzido (rGO).	10
4.2 Algas <i>Raphidocelis subcapitata</i> .	10
4.3 Delineamento experimental.	10
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	11
5.1 Controle de Qualidade das Culturas das algas verdes <i>Raphidocelis subcapitata</i> .	12
5.2 Ensaio de toxicidade do rGO.	14
6. CONCLUSÃO	17
REFERÊNCIAS	19

1. INTRODUÇÃO

A ecotoxicologia é a ciência que avalia os efeitos tóxicos de uma substância sobre os ecossistemas e seus componentes, tendo como finalidade obter conhecimentos sobre o quão nocivo são as substâncias tóxicas [1]. Ela permite constatar a toxicidade como um todo, observando os diversos efeitos causados por uma amostra. Além de identificar como o contaminante pode intervir no meio, é essencialmente importante saber quais as soluções para evitar possíveis danos causados ao ambiente e aos seres vivos. O efeito tóxico de contaminantes se dá por meio da exposição e a quantidade exposta. Os testes toxicológicos são feitos através da exposição de organismos-teste a substâncias tóxicas, observando interações com o organismo a fim de disponibilizar informações sobre a ação da substância. Os testes com algas consistem na observação de seu crescimento em diversas diluições de soluções tóxicas a serem avaliadas, onde observa-se a concentração de clorofila, biomassa, atividade fotossintética em relação a amostra controle [2].

Com o descobrimento da nanotecnologia, ainda se é muito escassa informações sobre a toxicidade dos nanomateriais. Estudos que comprovem a interação dessas nanopartículas se faz necessária, principalmente no que se refere à interação direta com os organismos a nível celular [3]. Com esta nova área de conhecimento, a manipulação de material em escala nanométrica, promove o desenvolvimento de nanomateriais sintéticos, com diferentes possíveis aplicações em diversas áreas e produtos [4]. A evolução da aplicabilidade tecnológica dos nanomateriais vem trazendo muitos benefícios, contudo pode se tornar indesejáveis sua exposição no ambiente. Por serem materiais muito pequenos podem ser transportados por difusão em solo, na água e na atmosfera, assim causando uma grande dificuldade quanto a sua remoção do material do

ambiente [5]. Entretanto a liberação dessas nanopartículas podem acumular-se em células vivas, podendo modificar as superfícies das partículas, alterando as propriedades superficiais, agregação de partículas, entre outras propriedades [6].

Os nanomateriais à base de carbono são muito promissores, com aplicabilidade em diversas áreas no campo tecnológico devido a suas propriedades óptica, mecânica e magnéticas, principalmente em estudos que se referem à melhor qualidade de vida e do meio ambiente [7]. O óxido de grafeno reduzido (rGO) é obtido por meio da intervenção de agentes químicos redutores, redução eletroquímica ou redução térmica [8]. Tendo como finalidade restabelecer diversas propriedades, como aumentar sua condutividade eletrônica [8].

1.1 Nanomateriais.

A nanotecnologia é a ciência que estuda materiais que tem como referência dimensões nanométricas, especificamente de 1 a 100 nanômetros. Seu princípio é a elaboração de novos materiais com estruturas diversas por meio dos átomos, a manipulação dos mesmos promoveu o desenvolvimento nanotecnológico e aplicações em vários setores [11].

Os nanomateriais a base de carbono podem ser sintetizados facilmente, suas propriedades eletrônicas, ópticas e químicas geram grande destaque no que e refere à aplicabilidade e grandes avanços em várias áreas, principalmente em melhorias na qualidade de vida e do ambiente, como por exemplo o grafeno, óxido de grafeno, óxido de grafeno reduzido, nanotubos , fulereno [12] onde já são testados na área ,biomédica, como a administração de fármacos, utilização de biossensores, terapia fototérmica, etc. [7].

1.2 Avaliação toxicológicas de óxidos de grafeno.

A avaliação toxicológica do óxido de grafeno é feita por meio de levantamento de dados ecotoxicológicos, classificando-os toxicologicamente, e viabilizar conhecimento a respeito à impacto ambiental. Os ensaios ecotoxicológicos determinam relações dose-resposta/ dose-efeito que constituem considerações indispensáveis para a avaliação de riscos. Os testes podem ser utilizados em um futuro próximo para definir um ponto de partida na determinação dos riscos ambientais potencialmente provocados pelo rGO, assim podendo determinar uma norma regulamentadora para este nanomaterial [16].

A hidrofobicidade do rGO tende a se aglomerar em condições fisiológicas. Também por conta das forças de van der Waals, são atraídos uns pelos outros [17] contudo essa condição de aglomeração pode influenciar na toxicidade, dependendo do tamanho, da carga superficial, composição do rGO [18]. Por conta da hidrofobicidade pode ser realizado ligação de átomos ou moléculas às suas paredes [19], essas alterações orgânicas compreendem longas cadeias alquilas, reações de radicais, polímeros, entre outras, possibilitando a obtenção de rGO funcionalizados tanto lateralmente como longitudinalmente, originando materiais mais solúveis e biocompatíveis [20].

Em relação a dosimetria utilizada em testes com rGO há desavenças entre os pesquisadores, pois ainda não se tem estudos que comprovem correlação direta entre a massa e o efeito citotóxico e genotóxico, sendo assim novos padrões de efeitos tóxicos vêm sendo propostos, como por exemplo o número de rGO existente no meio de exposição e não sua massa [21].

A avaliação toxicológica apresenta certas características da toxicologia convencional, porém cada nanomaterial necessita de uma adequação, assim

primordialmente necessita-se da caracterização do nanomaterial [22]. A avaliação toxicológica de rGO em algas fundamenta-se em testes crônicos, onde observa-se a inibição do crescimento das algas que é feito na comparação da contagem das células de cada amostra com o controle [23].

1.2.1 Organismo teste.

As algas são organismos pertencentes ao Reino Protista, são seres unicelulares ou pluricelulares eucarióticos. Possuem pigmentos fotossintéticos com a habilidade em transformar energia solar em biomassa, produzir oxigênio e ter um cargo ativo no ciclo de nutrientes, sendo alimento para outros seres. Elas podem ser encontradas em diversas condições ambientais da Terra, desde desertos a solos férteis, mas são em meios aquáticos (água doce e salgada) que se encontram em maior abundância. Para produzir energia elas necessitam de água, dióxido de carbono e íons inorgânicos solúveis em água [15].

A alga *Raphidocelis subcapitata* pertence a Classe das Clorofíceas, uma classe de algas verdes. Estas algas sucedem-se em meios oligotrófico e eutrófico. Ela é uma espécie de plâncton que vivem em rios, lagos e lagoas de água doce, possui formato helicoidal, semicircular na fase vegetativa, e em culturas velhas possui a forma de torção. Sua reprodução ocorre através da divisão da célula mãe em dois, quatro ou oito autoesporos. Servem como fonte de oxigênio para o metabolismo dos consumidores [24].

2. JUSTIFICATIVA

O óxido de grafeno é derivado do óxido de grafite, cuja sua estrutura difere por meio do método oxidativo [13]. O óxido de grafeno reduzido (rGO) provém do óxido de grafeno em condições redutoras, pode ser obtido por meio da intervenção de agentes químicos redutores, redução eletroquímica ou redução térmica [8]. Tendo como finalidade restabelecer diversas propriedades, como aumentar sua condutividade eletrônica [9]. Aumentando sua hidrofobicidade, reduzindo o teor de oxigênio, devido a liberação de CO e CO₂ incorpora defeitos na estrutura do carbono, e há uma redução de carga e na capacidade de dispersão de água [14].

Contudo ainda não se tem muita informação disponível sobre a toxicidade deste material, estas características podem ser indesejáveis quando expostos aos seres vivos e ao ambiente. Este presente projeto pretende contribuir com os estudos, tentando compreender o potencial tóxico do rGO utilizando-se de teste toxicológicos com algas verdes da espécie *Raphidocelis subcapitata* bioindicadoras de toxicidade aquática.

3. OBJETIVO

Realizar análises das células de algas *Raphidocelis subcapitata* por meio do bioensaio de toxicidade aquática, a fim de avaliar os impactos potenciais da presença destas nanopartículas carbonáceas no ambiente aquático.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Óxido de grafeno reduzido (rGO).

O óxido de grafeno reduzido que será utilizado foi fornecido pelo Prof. Dr. Helder José Ceragioli, do laboratório de Eletrônica da Faculdade de Engenharia Elétrica da Unicamp, e sintetizado através de deposição de vapor químico-filamento quente na Universidade Estadual de Campinas – Unicamp. Para a realização dos testes foram pesados e diluídos nas concentrações de 0,01, 0,1, 1,0, 10, 100 ppm, e sonicados por 15 minutos.

4.2 Algas *Raphidocelis subcapitata*.

As algas foram cedidas pelo Departamento de Saneamento e Ambiente – DAS-FEC – UNICAMP LABORATÓRIO DE SANEAMENTO - LABSAN, e serão mantidas através do repique semanal em meio oligotrófico, conforme os reagentes listados na norma ABNT NBR 12648 [25]. Quando exposta a amostra líquidas contendo um tóxico disponível, ocorre inibição de crescimento comparado com uma cultura controle não exposta [26].

4.3 Delineamento experimental.

O teste de toxicidade crônica foi feito com as algas da espécie *Raphidocelis subcapitata*, seguindo o protocolo da Environmental Canadá EPS1/ RM/ 25,1992. A partir de uma cultura de algas de 7 dias, foi realizado um inóculo com $2,56 \times 10^5$ cels/mL. Cada amostra foi preparada com óxido de grafeno reduzido nas concentrações de 0,01; 0,1; 1,0; 10 e 100 ppm, num volume de 2,5 mL de água tamponada. Colocou-se em cada amostra 100 µL do inóculo de algas com concentração conhecida. Após 72 horas executou-se a contagem das células na Câmara de Neubauer. As amostras foram feitas em triplicata, as médias das contagens foram comparadas pelo teste “t” de Student, assumindo 0,05 como intervalo de confiança, e feito o cálculo da EC50 para análise de regressão.

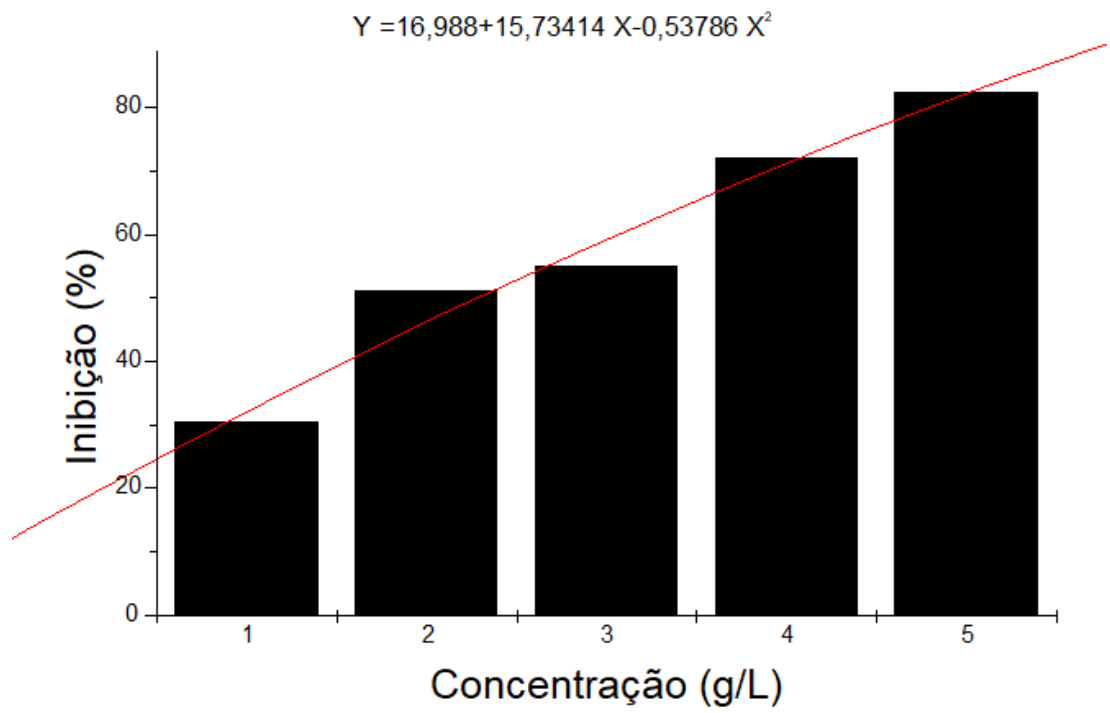
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

O crescente o uso de nanopartículas vem gerando preocupações sobre seu risco ambiental, estudos anteriores revelam por exemplo, que, nanopartículas como as de óxido de cobre e óxido de cromo são consideradas muito tóxicas [29]. Em outro verificou-se a concentração efetiva de prata que causa 50% ($4,70 \mu\text{g L}^{-1}$) de imobilidade em *Daphnia similis* no teste de ecotoxicidade aguda [30]. Em um outro estudo identificou-se o potencial tóxico e a capacidade de induzir danos ao DNA com nanopartículas carbonáceas, como nanotubos de carbono e nanopartículas de prata e nanocéria [31].

5.1 Controle de Qualidade das Culturas das algas verdes *Raphidocelis subcapitata*.

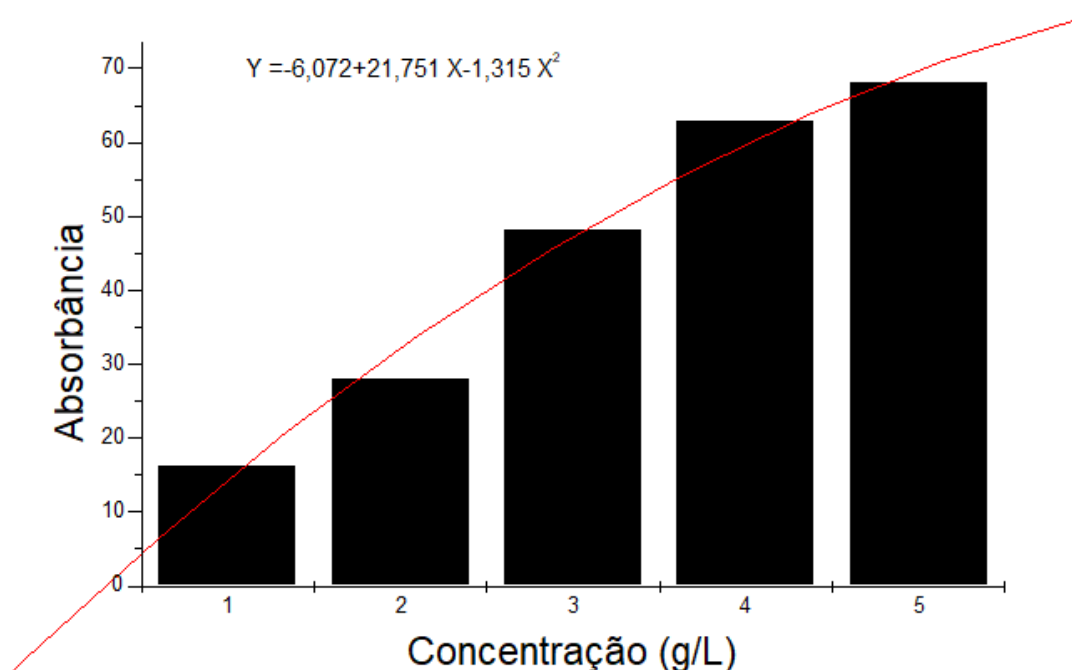
O ensaio de sensibilidade das algas *Raphidocelis subcapitata*, utilizando-se como substância referência o cloreto de sódio (NaCl) em 5 concentrações, quais sejam 0,2, 0,4, 0,8, 1,0, e 1,6 g/L, em triplicata, e 5 controles com água tamponada. Foram realizados três testes idênticos a fim de se fazer um controle de qualidade das culturas, considerando-se o NaCl como tóxico de referência [34]. Utilizou-se de técnicas de contagem das células por meio da câmara de Neubauer e por espectrofotometria [figuras 1 e 2], os gráficos foram feitos por meio do programa Origin. A EC50 estabelece a concentração na qual um tóxico estimula uma resposta na metade, entre a taxa inicial e a máxima depois de um determinado tempo de exposição [27]. Os resultados obtidos nas EC50 por meio da média das contagens algais e por espectrofotometria foram de 1,04 g/L e 0,284 g/L respectivamente.

FIGURA 1- GRÁFICO EC50 OBTIDO POR MEIO DE CONTAGENS ALGAIS.



FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.

FIGURA 2- GRÁFICO EC50 OBTIDO POR MEIO DE ESPECTROFOTOMETRIA.



FONTE: ELABORADO PELO AUTOR

5.2 Ensaio de toxicidade do rGO.

As algas são microrganismos usados em métodos de toxicidade recomendados por entidades internacionais como EPA (Environmental Protection Agency) e a OCDE (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento econômico). Estudos mostram a toxicidade de metais pesados para algas *P. subcapitata* [24]. Outro demonstra a toxicidade do nanotubos de carbono em concentração de 100 ppm para a mesma espécie de alga [9].

Neste estudo avaliou-se o efeito do óxido de grafeno reduzido (rGO) a nível celular nas algas bioindicadoras de toxicidade aquática. Preparou -se amostras com

concentrações de rGO de 0,01, 0,1, 1, 10 e 100 ppm e após 72 horas observou-se os níveis de inibição que cada concentração proporcionou.

Os resultados visuais obtidos foram pequenos sedimentos verdes no fundo do tubo das amostras de 0,01, 0,1,1 e 10 ppm e a concentração de 100 ppm um pouco turva, sem resquícios verdes (Figura 3). A tabela 1 mostra a o número de células algais referente a cada concentração, resultado este obtido por meio da contagem de células na câmara de Neubauer.

FIGURA 3- TUBOS DE ENSAIO COM AS AMOSTRAS INOCULADAS COM AS ALGAS. OBSERVA-SE A BIOMASSA DEPOSITADA NO FUNDO EM VERDE.



FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.

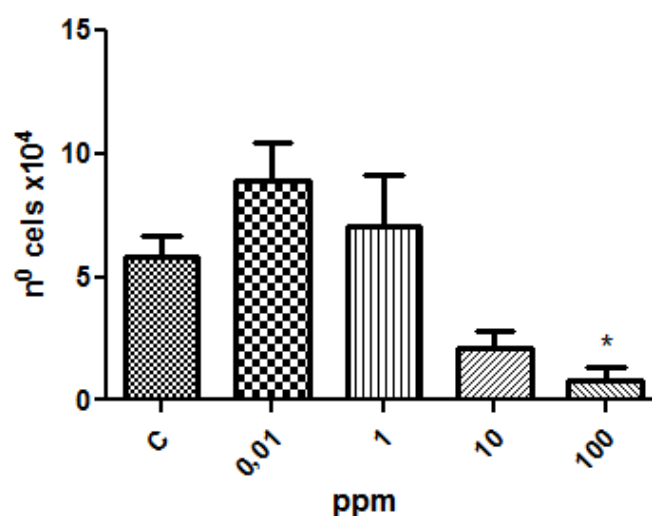
Tabela 1- Contagem das células.

(ppm)	controle	0,01 ppm	1 ppm	10 ppm	100 ppm
Número de algas	10	16	15	6	5
	10	14	13	4	1
	9	12	12	4	1

	8	9	10	1	0
	8	9	11	3	0
	8	8	1	1	0
	7	6	1	0	0
	6	3	0	0	0
	4	3	0	0	0
	3				
	3				
	2				
	2				
	1				
	Média: 5,7	Média: 8,9	Média: 7	Média:2,1	Média: 0,8

FIGURA 4-TOXICIDADE AQUÁTICA DO rGO EM *R. SUBCAPITATA*.

Toxicidade Aquática do rGO em *R.subcapitata*



FONTE: ELABORADO PELO AUTOR.

O gráfico foi elaborado pelo programa Prisma 5.0, a análise estatística foi realizada pela análise ANOVA “one way”, seguida pelo teste de Dunnet, este que determina a existência de diferença significativa entre as médias de dois ou mais grupos (controle) [28], indicou redução significativa apenas para a amostra de 100 ppm em relação ao controle (C).

6. CONCLUSÃO

O conjunto de resultados do presente trabalho nos revelou que em concentrações de 0,01, 0,1, 1 e 10 ppm de rGO não se tem uma toxicidade significativa. As avaliações da toxicidade aquática foram positivas apenas para a concentração de 100 ppm, como visto por GOMES 2016 [9], em seu trabalho feito com nanotubos de carbono, partícula semelhante ao rGO. Sendo assim, trabalhos como do KOHLER et. al. (2007) avaliam as possíveis fontes de lançamentos de nanotubos de carbono, e recomendam a

implementação de medidas de precaução no que se refere a exposição deste material no meio ambiente, pois não se tem conhecimento completo sobre os potenciais efeitos adversos dos nanotubos de carbono, uma vez que em grandes concentrações podem apresentar persistência no meio ambiente [32]. O artigo do GOTTSCHALK et. al. (2009) avalia os nanomateriais artificiais que são lançados em compartimentos ambientais, neste estudo revela que o nanotubo de carbono também apresenta riscos para os organismos [33]. Conclui-se que apesar de improváveis, estes altos níveis de rGO devem ser considerados em relação à sua persistência.

REFERÊNCIAS

[1] CUNHA, L. M. R. **Ecotoxicologia e a qualidade da água para o uso na agricultura**. Planaltina. 2011. Disponível em:

<http://bdm.unb.br/bitstream/10483/3886/1/2011_LucasMonteiroRegisCunha.pdf>.

Acesso em 11 mar 2017.

[2] HOBOLD, V. **Avaliação de metodologias para análise toxicológica utilizando Algas do tipo *Scenedesmus subspicatus* e *Daphnia magna***. Criciúma.

2007. Disponível em:

<[http://www.aguas.sc.gov.br/jsmallfib_top/Comite%20Rio%20Ararangua/Usoda%20Terra/Avaliacao-de-metodologias-para-analise-toxicologica-utilizando-algas-do-tipo-](http://www.aguas.sc.gov.br/jsmallfib_top/Comite%20Rio%20Ararangua/Usoda%20Terra/Avaliacao-de-metodologias-para-analise-toxicologica-utilizando-algas-do-tipo-Scenedesmus-subspicatus-e-Daphnia-magna..pdf)

[Scenedesmus-subspicatus-e-Daphnia-magna..pdf](http://www.aguas.sc.gov.br/jsmallfib_top/Comite%20Rio%20Ararangua/Usoda%20Terra/Avaliacao-de-metodologias-para-analise-toxicologica-utilizando-algas-do-tipo-Scenedesmus-subspicatus-e-Daphnia-magna..pdf)> Acesso em: 18 fev. 2017.

[3] RODRIGUEZ, M.T.R. **O uso de bioindicadores para avaliação da qualidade do ar em Porto Alegre. In: Zurita M.L.L; Tolfo A.M. (Org.) A Qualidade do Ar em Porto Alegre**. Porto Alegre: Secretaria Municipal do Meio Ambiente, 2000.

[4] BORM, P. J. A.; ROBBINS, D.; HAUBOLD, S.; KUHLBUSCH, T.; FISSAN, H.; DONALDSON, K.; SCHINS, R.; STONE, V.; KREYLING, W.; LADEMANN, J.; KRUTMANN, J.; WARHEIT, D.; OBERDORSTER, E. **The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. *Particle and***

Fibre Toxicology, v. 3, p. 11, 14 ago. 2006. Disponível em:
<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16907977>>. Acesso: 11 mar 2017.

[5] KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H. C. **From ecotoxicology to nanoecotoxicology.** *Toxicology*, 2010. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19732804>>. Acesso em: 11 mar 2017.

[6] BORM, P. J. A.; ROBBINS, D.; HAUBOLD, S.; KUHLBUSCH, T.; FISSAN, H.; DONALDSON, K.; SCHINS, R.; STONE, V.; KREYLING, W.; LADEMANN, J.; KRUTMANN, J.; WARHEIT, D.; OBERDORSTER, E. **The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC.** *Particle and Fibre Toxicology*, v. 3, p. 11, 14 ago. 2006. Disponível em:
<<http://particleandfibretoxicology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1743-8977-3-11>>. Acesso: 11 mar 2017.

[7] MENDONÇA, M. C. P.; SOARES, E. S.; JESUS, M. B.; et al. **Óxido de grafeno reduzido induz abertura de barreira hemato-encefálica transitória: um estudo in vivo.** *J Nanotecnologia*, Vol. 13, 2015. Disponível em: <
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4628296/#>> Acesso em: 26 fev. 2017.

[8] CAMARGO, M. N. L. **Influência do grau de redução do óxido de grafeno eletroquimicamente reduzido nas suas propriedades eletroquímicas.** Campinas, 2015.

[9] GOMES, Amanda Leopoldina Soares. **AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE NANOMATERIAL DE ÓXIDO DE GRAFENO REDUZIDO EM ALGAS UNICELULARES**. Sorocaba, 2016.

[10] QUINA, F. H. Nanotecnologia e o meio ambiente: perspectivas e riscos. **Sociedade Brasileira de Química**, São Paulo, vol.27 no.6 nov. Dez. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-40422004000600031&script=sci_arttext> Acesso em : 13 mar. 2017.

[11] ADHIKARI, B.-R.; GOVINDHAN, M.; CHEN, A. **Carbon Nanomaterials Based Electrochemical Sensors/Biosensors for the Sensitive Detection of Pharmaceutical and Biological Compounds**. *Sensors (Basel, Switzerland)*, v. 15, n. 9, p. 22490–22508, 4 set. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4610543/>>. Acesso em: 12 mar. 2017.

[12] PRYZHKOVA, M. V. **Concise Review: Carbon Nanotechnology: Perspectives in Stem Cell Research**. *Stem Cells Translational Medicine*, v. 2, n. 5, p. 376–383, 9 maio 2013. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.5966/sctm.2012-0151/pdf>> . Acesso em: 12 mar. 2017.

[13] COMPTON, O. C.; NGUYEN, S. T. **Graphene oxide, highly reduced graphene oxide, and graphene: Versatile building blocks for carbon-based**.

Materials Small, 2010. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20225186>>. Acesso em : 12 mar. 2017.

[14] GEORGAKILAS, V.; TIWARI, J. N.; KEMP, K. C.; PERMAN, J. A.; BOURLINOS, A. B.; KIM, K. S.; ZBORIL, R. **Noncovalent Functionalization of Graphene and Graphene Oxide for Energy Materials, Biosensing, Catalytic, and Biomedical Applications**. *Chemical Reviews*, v. 116, n. 9, p. 5464–5519, 11 maio 2016. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.chemrev.5b00620>> Acesso em: 12 mar. 2017.

[15] JR, Michael J. Pelczar; CHAN, E.C.S; KRIEG, Noel R.; Edwards, Daine D.; PELCZAR, Merna F. **Microbiologia conceitos e aplicações**. São Paulo: Pearson, 1997.

[16] KELLER, D. A.; JUBERG, D. R.; CATLIN, N.; FARLAND, W. H.; HESS, F. G.; WOLF, D. C.; DOERRER, N. G. **Identification and Characterization of Adverse Effects in 21(st) Century Toxicology**. *Toxicological Sciences*, v. 126, n. 2, p. 291–297, 19 abr. 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22262567>> . Acesso em: 15 mar. 2017.

[17] HUBBS, A.F.; MERCER, R.R.; BENKOVIC, S.A; HARKEMA, J.; SRIRAM, K.; SCHWEGLER – BERRY, D.; GORAVANAHALLY, M.P.;

NURKIEWICZ, T.R.; CASTRANOVA, V.; SARGENT, L.M. **Nanotoxicology - A Pathologist's Perspective**. *Toxicol Pathol*, 39 (2), pp. 301-324, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21422259>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

[18] GATOO, M. A.; NASEEM, S.; ARFAT, M. Y.; MAHMOOD DAR, A.; QASIM, K.; ZUBAIR, S. **Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations**. *BioMed Research International*, v. 2014, p. 498420, 6 ago. 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Physicochemical+Properties+of+Nanomaterials%3A+Implication+in+Associated+Toxic+Manifestations.>>. Acesso em: 15 mar. 2017.

[19] MOUT, R.; MOYANO, D. F.; RANA, S.; ROTELLO, V. M. **Surface functionalization of nanoparticles for nanomedicine**. *Chemical Society reviews*, v. 41, n. 7, p. 2539–2544, 7 abr. 2012.

[20] HERBST, M.H.; MACÊDO, M.I.F.; ROCCO, A.M. **Echnology of carbon nanotubes: trends and perspectives of a multidisciplinary area**. *Quím. Nova vol.27* no.6 São Paulo Nov./Dec. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000600025>. Acessoem: 15 mar. 2017.

[21] FRANCHI, L.P.; SANTOS, R.A.; MATSUBARA, E.Y.;LIMA, J.C.;ROSELEN, J.L.; TAKAHASHI, C.S. **Citotoxicidade e genotoxicidade de**

nanotubos de carbono. *Quím. Nova*[online]. 2012, vol.35, n.3, pp. 571-580.

Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422012000300025> . Acesso em: 15 mar. 2017.

[22] HANDY, R. D.; VON DER KAMMER, F.; LEAD, J. R.; HASSELLÖV, M.; OWEN, R.; CRANE, M. **The ecotoxicology and chemistry of manufactured nanoparticles.** *Ecotoxicology*, v. 17, n. 4, p. 287–314, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18351458>> . Acesso em: 15 mar. 2017.

[23] NAVARRO, E.; BAUN, A.; BEHRA, R.; HARTMANN, N. B.; FILSER, J.; MIAO, A.-J.; QUIGG, A.; SANTSCHI, P. H.; SIGG, L. **Environmental behavior and ecotoxicity of engineered nanoparticles to algae, plants, and fungi.** *Ecotoxicology*, v. 17, n. 5, p. 372–386, 2008. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18461442>>. Acesso em: 17 mar. 2017.

[24] BRITO, Nuno Roberto Brandão de. **Efeito de metais pesados na alga *Pseudokirchneriella subcapitata*:** As Algas. 2011. Disponível em: <<http://docplayer.com.br/20405807-Efeito-de-metais-pesados-na-alga-pseudokirchneriella-subcapitata.html>>. Acesso em: 22 fev. 2017.

[25] ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 12648: Água – Ensaio de toxicidade com *Chlorella vulgaris* (Chlorophyceae).** Rio de Janeiro: ABNT, 1992. Disponível em:

<<http://docs12.minhateca.com.br/467145496,BR,0,0,NBR-12648.pdf>>. Acesso em: 20 mar. 2017.

[26] GOMES, Amanda Leopoldina Soares. **Influência dos CNT's em algas unicelulares, bioindicadores de toxicidade aquática: análise ultraestrutural**. Sorocaba. 2014.

[27] GRAPHPAD CURVE FITTING GUIDE. **What is the EC50?**. Disponível em: <https://www.graphpad.com/guides/prism/7/curve-fitting/reg_the_ec50.htm?toc=0&printWindow>. Acesso em: 19 fev. 2018.

[28] VIEIRA, Sônia. **Teste de Dunnett: comara médias de grupos tratados com a média do controle**. 2016. Disponível em: <<http://soniavieira.blogspot.com.br/2016/07/teste-de-dunett.html>> Acesso em: 19 fev. 2018.

[29] TAVARES, K. P. **Avaliação da toxicidade de óxido de cobre e de óxido de cromo para *Daphnia similis* e *Brachionus calyciflorus***. Alfenas.2014.

[30] MAZIERO, J. S.; ROGERO, S. O.; ALEMANY, A. **Estudo ecotoxicológicos da nanopartícula de prata em *Daphnia similis***. São Paulo. 2016.

[31] RODRIGUES, A.L. **Estudo da toxicidade e genotoxicidade induzidas por diferentes nanopartículas *in vivo***. Goiânia. 2012.

[32] KOHLER, A. R.; SOM, C.; HELLAND, A.; GOTTSCHALK, F. **Studying the potential release of carbon nanotubes throughout the application life cycle.** Science Direct. 2007.

[33] GOTTSCHALK, F.; SONDERER, T.; SCHOLZ, R. W.; NOWACK, B. **Modeled Environmental Concentrations of Engineered Nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for Different Regions.** Environ. Sci. Technol. 2009.

[34] SANTOS, M. A. P. F.; VICENSOTTI, J.; MONTEIRO, R. T. R. **Sensitivity of Four Test Organisms (Chironomus xanthus, Daphnia magna, Hydra attenuata and Pseudokirchneriella subcapitata) to NaCl: an Alternative Reference Toxicant.** J. Braz. Soc. Ecotoxicol., v. 2, n. 3, 2007, 229-236. Piracicaba 2007.