

Contaminantes emergentes: fármacos, cosméticos e nanopartículas

Painel

170 - INTERAÇÃO DO NANOMATERIAL ÓXIDO DE GRAFENO COM *Danio rerio*: EFEITO SOBRE O DESENVOLVIMENTO DO TECIDO MUSCULAR

SILVA, G. H., CLEMENTE, Z., COSTA, Â. S., MONTEIRO, R. T. R., CASTRO, V. L. S. S., MARTINEZ, D. S. T.

gaby_helena@hotmail.com, zairaclemente@hotmail.com, angela.costa@Inbio.cnpem.br, monteiro@cena.usp.br, vera-lucia.castro@embrapa.br, diego.martinez@Innano.cnpem.br

Palavras-chave: Embriotoxicidade; Nanotoxicologia; Nanomateriais de carbono; Matéria orgânica; Peixe-zebra

INTRODUÇÃO

Diversos fatores podem influenciar o comportamento dos nanomateriais no ambiente. Um fator que tem recebido atenção é que a presença de matéria orgânica (i.e. ácido húmico), em águas naturais, pode influenciar na dispersão dos nanomateriais alterando sua toxicidade. O óxido de grafeno é um nanomaterial promissor, com diversas aplicações, e pouco se conhece quanto ao seu comportamento no ambiente aquático. Com objetivo de avaliar os efeitos toxicológicos do óxido de grafeno em *Danio rerio*, na presença e ausência de ácido húmico, ovos foram expostos por 96 h e as larvas analisadas por microscopia quanto ao crescimento e desenvolvimento da musculatura.

METODOLOGIA

Para o estudo, foram utilizadas amostras comerciais de óxido de grafeno (OG, Sigma Aldrich) e ácido húmico (AH, sal sódico, Sigma Aldrich). Os materiais foram caracterizados através das técnicas de microscopia de força atômica (AFM) e espalhamento dinâmico de luz (DLS).

A exposição foi realizada em água reconstituída moderadamente dura preparada de acordo com U.S.EPA (2002). A concentração de exposição foi de 100 mg/L de OG, 20 mg/L de AH e a mistura de ambos na proporção de 100:20 mg/L de OG:AH. Embriões de *D. rerio* (1 h pós-fertilização, n=30 organismos/grupo) foram expostos durante 96 h, mantendo 5 ovos/poço em 2 mL de suspensão, sob um ciclo de claro/escuro de 14/10 h e 28,5°C. Ao final do período de exposição, as larvas foram fixadas e imunomarcadas com o anticorpo primário anti-miosina de cadeia pesada (MF20) e secundário anti-IgG (Alexa 568), ambos de rato. Posteriormente, com o auxílio da microscopia de fluorescência (Axio Imager.A2, Zeiss), avaliou-se a integridade da musculatura das larvas (n=5 organismos/grupo). As larvas fixadas também foram fotografadas com o auxílio de estereomicroscópio (Stereo Discovery V20, Zeiss) para a medição do comprimento (n=5 organismos/grupo).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Observou-se que na concentração testada o tamanho hidrodinâmico do OG apresentou-se entre 400 e 450 nm e o índice de polidispersividade (Pdl) para o grafeno acima de 0.4, indicando forte agregação das partículas. Para o OG:AH foi observado aumento na estabilidade e diminuição no tamanho das partículas, obtendo-se 0.3 como índice de polidispersividade e 200 nm de tamanho hidrodinâmico médio.

A mortalidade ao final das 96 h de exposição foi inferior a 10% em todos os grupos. Assim, OG e OG:AH apresentaram ausência de toxicidade aguda para embriões de zebrafish. Também não foram observadas malformações em nenhuma das condições testadas.

As larvas do grupo exposto a OG:AH apresentaram redução de 4,2% em seu comprimento total em relação às do grupo controle, esta redução foi estatisticamente significativa (teste de Dunnett, $p=0,001$).

Lee et al. (2014) e Peng et al. (2015) relacionaram o retardo do crescimento com o desarranjo e má-formação das miofibrilas em embriões de *Danio rerio*. No ensaio imunohistoquímico observamos que em 80% dos embriões expostos a OG:AH, ocorreu alterações no alinhamento e integridade das fibras esqueléticas musculares. Considerando que os poros do córion medem entre 300 nm - 1 micrometro (LIN et al., 2013), o tamanho hidrodinâmico de OG e OG:AH encontrados neste estudo permite especular que esse material poderia penetrar o córion e atingir o embrião. Trabalho recente de Chen et al. (2016) demonstrou que o OG adere e penetra o córion, distribuindo-se principalmente em olhos, coração e saco vitelínico. Visto que o AH aumenta a estabilidade do OG em solução e assim pode atuar como facilitador à entrada do OG no organismo. Esta informação destaca a importância da avaliação dos efeitos nanoecotoxicológicos considerando as condições ambientais.

CONCLUSÃO

O óxido de grafeno pode afetar o desenvolvimento dos embriões de *Danio rerio* e na presença de ácido húmico os efeitos in vivo são mais pronunciados. Esta diferença nos efeitos pode estar relacionada à diferente biodisponibilidade dos materiais, já que OG:HA apresentou alta estabilidade e reduzida agregação, diferentemente do OG. As concentrações testadas neste estudo foram acima das ambientalmente estimadas (GOTTSCHALK et al., 2009), sendo assim os resultados servem como alerta das potenciais implicações ambientais do uso contínuo dessas nanopartículas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHEN, Y. et al. Specific nanotoxicity of graphene oxide during zebrafish embryogenesis. *Nanotoxicology*, v. 10, n. 1, p. 42-52, 23 fev. 2016.

GOTTSCHALK, F. et al. Modeled environmental concentrations of engineered nanomaterials (TiO₂, ZnO, Ag, CNT, Fullerenes) for different regions. *Environmental science & technology*, v. 43, n. 24, p. 9216-22, 15 dez. 2009.

LEE, Y.-T. et al. Toxicity assessments of chalcone and some synthetic chalcone analogues in a zebrafish model. *Molecules (Basel, Switzerland)*, v. 19, n. 1, p. 641-50, 7 jan. 2014.

LIN, S. et al. Zebrafish: an in vivo model for nano EHS studies. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)*, v. 9, n. 9-10, p. 1608-18, 27 maio 2013.

PENG, W.-H. et al. Short-term exposure of zebrafish embryos to arecoline leads to retarded growth, motor impairment, and somite muscle fiber changes. *Zebrafish*, v. 12, n. 1, p. 58-70, 20 fev. 2015.

US.EPA. Methods for measuring the acute toxicity of effluents and receiving waters to freshwater and marine organisms. 5 ed. Washington, 2002.

FONTE FINANCIADORA

FAPESP 2014/01995-9, CAPES.