

NANOECOTOXIDADE DO ÓXIDO DE GRAFENO: INFLUÊNCIA DO CÓRION DOS EMBRIÕES DE ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) E CO-EXPOSIÇÃO COM ÁCIDO HÚMICO

Aline M. Z. de Medeiros^{1,2,3}, Gabriela H. da Silva^{1,2,3}, Vera L. Castro¹, Regina T. R. Monteiro², Diego S. T. Martínez³

¹ Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). CEP 13820-000, Jaguariúna, SP; ² Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) / Universidade de São Paulo (USP). CEP 13416-000, Piracicaba, SP; ³ Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) / Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM). CEP 13083-970, Campinas, SP.
E-mail de contato: aline.zigiotto@usp.br

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

Resumo

O óxido de grafeno (OG) é um nanomaterial baseado em carbono com propriedades físicas e químicas únicas. Com o aumento da produção deste novo material é necessário a realização de estudos para avaliação do risco à saúde humana e ambiental. Alguns estudos indicam que a presença de ácido húmico pode afetar a estabilidade coloidal do grafeno e, conseqüentemente, modificam seus efeitos tóxicos. O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos tóxicos da co-exposição de óxido de grafeno (OG) e ácido húmico (AH) em embriões de zebrafish (*Danio rerio*), com e sem córion. Embriões com 24 horas pós fertilização foram expostos durante 96 horas a 100 mg.L⁻¹, na presença e ausência de ácido húmico (AH, 20 mg.L⁻¹). Uma parcela dos embriões foi exposta na mesma condição, porém tiveram o córion removido mecanicamente. Um controle negativo também foi realizado. Não foi observado má formações morfológicas evidentes ou mortalidade nos peixes com córion expostos ao grafeno ou na co-exposição com ácido húmico. Porém, embriões sem córion exibiram taxas maiores de deformação e mortalidade em comparação com o grupo controle. Além disso, a presença de AH aumentou os efeitos tóxicos do OG. Provavelmente, este fato ocorreu devido ao aumento da estabilidade do OG na presença de AH. Estes resultados demonstram os efeitos adversos do nanomaterial OG sobre embriões de zebrafish, na presença de AH e, principalmente, a importância da barreira proporcionada pelo córion aos embriões de peixe.

Palavras-chave: Peixes; Nanomateriais; Carbono; FET

NANOECOTOXICITY OF GRAPHENE OXIDE: INFLUENCE OF CORIUM BARRIER ON ZEBRAFISH EMBRYOS (*DANIO RERIO*) AND HUMIC ACID CO-EXPOSURE

Abstract

Graphene oxide (GO) is carbon-based nanomaterial with unique physical and chemical properties. As the production of these new materials increases, the potential risks to human and environmental health should to be evaluated. Some studies indicate that humic acid can modify graphene stability and, consequently, change its ecotoxicological effects. The aim of this study was investigate the toxic effects of co-exposure of graphene oxide (GO) and humic acid (HA) in zebrafish embryos, with and without corium barrier. The 24 hours post-fertilization (hpf) embryos was exposure during 96 hours to 100 mg.L⁻¹ GO, in presence or absence of humic acid (HA, 20 mg.L⁻¹). A group of fishes had corium removed mechanically and exposure at same conditions. The negative control group exposure was also performed. No obvious morphological malformation or mortality was observed on embryos with corium exposed with graphene and co-exposed with humic acid. However, embryos without corium exhibited high rates of mortality and deformation in comparison with the control group. Besides, the presence of HA enhanced the toxic effects of GO, and high mortality and deformation rates were observed in this group. These findings emphasize the adverse effects of GO on zebrafish embryos in the presence of HA, specially, critical influence of of corium barrier on zebrafish embryos protection.

Keywords: Fishes; Nanomaterials; Carbon; FET

1 INTRODUÇÃO

O Oxido de Grafeno (OG) é nanomaterial de carbono cujos átomos de carbono estão organizados em hexágonos, formando uma única folha plana, com apenas um átomo de espessura com aproximadamente 1 nm (SHARON e SHARON, 2010; CHANG et al., 2016). Embora possua grande potencial de inovação em diversos setores, seu uso deve ser feito de modo responsável para que os potenciais riscos à saúde humana ou ao meio ambiente sejam minimizados (HANDY, 2012).

Devido ampla distribuição no ambiente, o ácido húmico (AH) é um fator importante para estudos ecotoxicológicos pois retrata um cenário mais próximo da realidade. A sua presença aumenta a estabilidade coloidal do OG, tornando-o mais biodisponível e altera sua toxicidade (CLEMENTE et al., 2017).

O teste de toxicidade em embriões de Zebrafish (*Danio rerio*) é um ensaio amplamente utilizado devido a transparência dos embriões que permite observar os efeitos adversos de xenobióticos, tais como, má formação e edemas.

Um dos desafios neste tipo de pesquisa, é a presença do córion. Esta membrana acelular envolve o embrião até o momento de sua eclosão, que ocorre entre 48 – 72 horas pós-fertilização (hps). Esta estrutura possui poros entre 0.5 e 0.7 mm de diâmetro e, desta forma, isola parcialmente o embrião do ambiente. A permeabilidade do OG está diretamente relacionada ao seu tamanho e, na maioria dos casos, o córion impede sua entrada e forma uma película de nanomaterial sob o ovo (CHEN et al., 2016). Desta forma, novos protocolos estão sendo desenvolvidos visando a remoção desta barreira. A retirada do córion permite a exposição em etapa anterior, quando inicia-se a formação de órgãos (24 hpf).

O objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da co-exposição de OG e AH em zebrafish além de analisar as diferenças entre os grupos de embriões expostos com e sem córion.

2 MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio de toxicidade em embriões de peixes teve duração de 96 horas. A concentração de Oxido de Grafeno (Sigma-Aldrich) avaliada foi de 100 mg.L⁻¹. Para simular a matéria orgânica natural escolheu-se o ácido húmico comercial na concentração de 20 mg/L, de acordo com a normativa USEPA OPPTS 850.1085 (1996). Em todos os ensaios, avaliou-se paralelamente um grupo controle isento do material-teste e outro grupo contendo apenas substância húmica

A exposição dos embriões iniciou-se 24 horas pós-fertilização. Os embriões foram divididos em dois grupos: com e sem córion. A remoção desta membrana dos embriões foi realizada mecanicamente com auxílio de pinças. Ambos os grupos foram expostos aos mesmos tratamentos: controle, AH (20 mg.L⁻¹), OG (100 mg.L⁻¹) e OG (100 mg.L⁻¹) + AH (20 mg.L⁻¹). Foram utilizados 24 embriões para cada tratamento. Ao final do período de exposição foram avaliadas taxas de má formações (deformação e edema), comprimento total da larva e mortalidade.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas alterações entre os tratamentos dos embriões expostos com córion. Os embriões expostos sem córion foram mais suscetíveis a exposição de OG, apresentando maior mortalidade (26,6%) e deformações (6,6%) que o grupo controle. Além disso, a presença de AH potencializou os efeitos deletérios, aumentando as taxas para 30% mortalidade e 20% de má formação conforme observados nas figuras 1 e 2. Não houve diferenças entre os tratamentos com relação ao parâmetro comprimento final dos peixes.

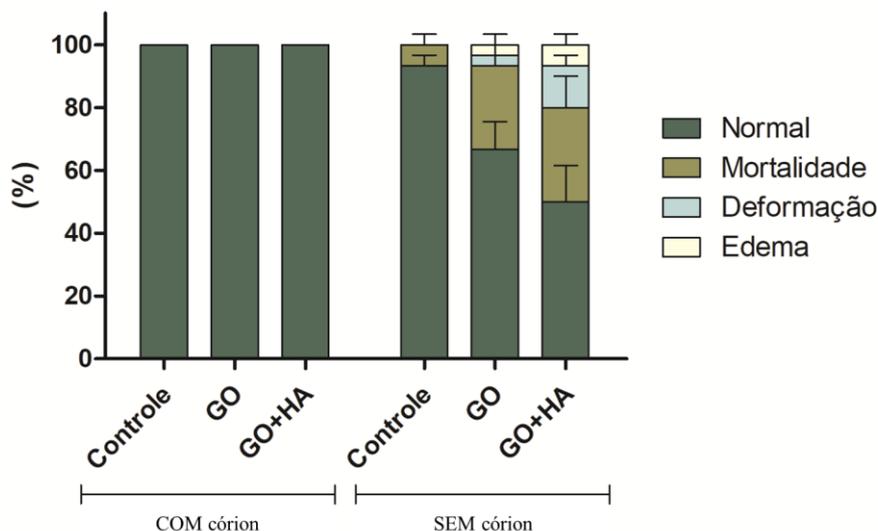


Figura 1: Taxas de mortalidade e má formação dos peixes com e sem córion expostos ao OG e OG+AH após 96 horas de exposição.

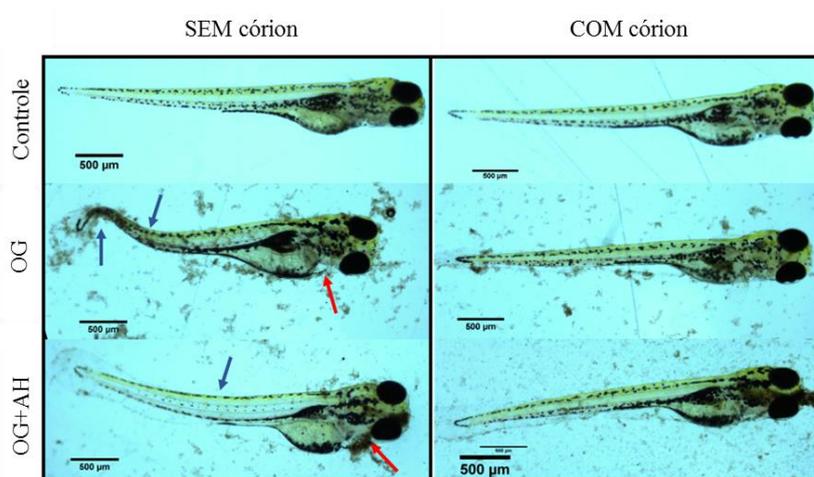


Figura 2: Embriões de Zebrafish expostos durante 96 horas a 100 mg.L-1 de OG e 100 mg.L-1 de OG com 20 mg.L-1 de AH. As setas azuis indicam deformação e as vermelhas indicam edema.

4 CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho indicam a importância da barreira física proporcionada pelo córion aos embriões de peixe. A sua retirada após 24 horas da fertilização antecipou a exposição ao OG em uma etapa mais sensível (início da organogênese). Consequentemente, foi observado aumento das taxas de má formação e mortalidade que os embriões expostos com córion.

Além disso, também foi observado o aumento dos efeitos deletérios na co-exposição com ácido húmico que pode estar correlacionado ao aumento da estabilidade coloidal tornando o nanomaterial mais biodisponível.

AGRADECIMENTOS

CAPES, FAPESP, CNPq, Rede Cigenanotox, Rede AgroNano, CBC-Nano, SisNANO

REFERÊNCIAS

CHANG, Z. et al. Two-dimensional shape memory graphene oxide. Nature Communications, 7, 2016.