



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015  
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

## AValiação ECOTOXICOLÓGICA DE NANOMATERIAIS DE CARBONO EM HYDRA ATTENUATA

Sara Blumel **Ferreira**<sup>1</sup>; José Henrique **Vallim**<sup>2</sup>; Zaira **Clemente**<sup>3</sup>; Diego **Martinez**<sup>4</sup>;  
Vera Lúcia de **Castro**<sup>5</sup>

Nº 15409

**RESUMO** - O óxido de grafeno (OG) nanoestruturado apresenta aplicações nas áreas eletrônica, farmacêutica e ambiental. *Hydra attenuata* é um organismo de água doce e sensível a vários de poluentes. Ela é facilmente cultivada em laboratório proporcionando um grande número de animais-teste e podem ser utilizadas em bioensaios simples e de baixo custo para avaliar as toxicidades aguda e crônica. Este estudo foi planejado com o objetivo de avaliar os possíveis efeitos de diferentes três configurações de grafeno (grafeno comercial (Cheaptubes – CTB), resíduo da queima do bagaço de cana (RQB) e carvão ativo nanoestruturado (CAN) em *Hydra attenuata* como bioindicador. Os organismos foram mantidos em condições ambientais controladas durante 96h. O CTB causou alterações morfológicas nas maiores doses testadas de acordo com escala de escores. Verificou-se que a *Hydra attenuata* mostrou-se sensível enquanto bioindicador e que o grafeno pode causar efeitos alterações físicas em organismos aquáticos.

**Palavras-chaves:** Nanocompostos, ecotoxicologia, grafeno, hydra.

1 Autor, Bolsista CNPq (PIBIC): Graduação em Medicina Veterinária, FAJ, Jaguariúna-SP; sara.blumel@hotmail.com

2 Colaborador, Analista da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; jose.vallim@embrapa.br.

3 Bolsista Pós-doc Fapesp, SP; zaira.clemente@hotmail.com

4 Colaborador, pesquisador LNNano, CNPEN, Campinas-SP; diegostefani.br@gmail.com

5 Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; vera-lucia.castro@embrapa.br



**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015  
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

**ABSTRACT-** *Nanostructured graphene oxide has applications in areas such as electronics, pharmaceutical and environmental. Hydra attenuata is an organism of freshwater ecosystems and sensitive to a range of pollutants. It can be easily cultured in the laboratory, to provide a large number of test animals and may be used in simple and cost-effective bioassay for acute and chronic toxicities. This study was designed to evaluate the possible effects of three different graphene settings (commercial graphene (Cheaptubes – CTB), residue of burning sugarcane bagasse (RQB) and active coal nanostructured (CAN) in Hydra attenuata as bioindicator. The organisms were maintained under controlled environmental conditions during 96h. CTB caused morphological changes at higher doses tested according a scale scores. It was found that Hydra attenuata was sensitive as bioindicator and graphene can cause physical changes in aquatic organisms.*

**Key-words:** Nanocompound, ecotoxicology, graphene, hydra.

## **1. INTRODUÇÃO**

O grafeno, um dos alótropos do carbono com estrutura de única camada, tem-se revelado um nanomaterial promissor para aplicação em diversas áreas como no desenvolvimento de dispositivos eletrônicos, compósitos, biosensores, sistemas para transporte de fármacos, além de aplicações ambientais, como remoção de metais, de poluentes orgânicos e de microorganismos contaminantes da água e do ar. Enquanto para nanotubos de carbono os estudos de ecotoxicidade expandiram-se consideravelmente nos últimos anos (KAHRU e DUBOURGIER, 2010), poucos estudos com o grafeno foram publicados até o momento.

Os vários usos do grafeno têm despertado preocupações sobre o seu risco para a saúde humana e para o ambiente. Uma fonte possível de contaminação ambiental pode ser o descarte inadequado de seus resíduos ou ainda devido às excretas de pacientes que recebem o grafeno em determinada terapia (por exemplo, em quimioterapia neoplásica), já que alguns estudos demonstram que o grafeno é eliminado na urina e fezes (LI et al., 2011). Surge assim, a necessidade da investigação dos possíveis impactos da nanotecnologia ao meio ambiente (HU e ZHOU, 2013). Por sua vez, o carvão ativo nanoestruturado produzido através da queima do bagaço da cana também é um nanomaterial que possui potencial de uso em diferentes processos.

Apesar de haver consenso entre a comunidade científica que os métodos e estratégias de avaliação de risco existentes atendem genericamente às necessidades de avaliação de risco das



## 9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

nanotecnologias, os detalhes para cada teste ou grupo de testes requer modificações/validações para trabalhar adequadamente com cada nanomaterial (HANDY et al., 2012 a,b). Especificamente nos ensaios de toxicologia aquática têm sido discutidos fatores como a dificuldade na manutenção da estabilidade das suspensões e a agregação das NPs à matéria orgânica e consequente alteração das características da exposição. Ainda, as características do meio de exposição, como pH e força iônica combinadas às características das NPs, como área e carga de superfície, dopagem, etc, afetam consideravelmente o comportamento das NPs em suspensão, podendo ser motivo de grande variabilidade nos resultados.

A *Hydra attenuata* é um cnidário que tem sido utilizado em estudos para avaliação de potencial teratogênico e de toxicidade de diversos agentes e de amostras ambientais. Ela tem sido bastante utilizada em baterias de ensaios toxicológicos para avaliação da qualidade de água (CASTILLO et al., 2000; HARFORD et al., 2013) e tem sido recomendada como um modelo padrão para a ecotoxicologia.

A conveniência de uso da hidra como organismo de ensaios de toxicidade é devida a características como fácil cultivo, rápida reprodução, tamanho pequeno, anatomia simples, e não apresentarem facilmente mudanças físicas reconhecíveis ao longo do tempo (TROTTIER et al., 1997). A sua grande capacidade de regeneração permite a avaliação de compostos teratogênicos (QUINN et al., 2012). No entanto, a exposição da hidra a compostos químicos altera a morfologia do organismo. A hidra pode mostrar sinais de intoxicação inicial em seus tentáculos, passando por seu encurtamento e chegando à morte.

Vários estudos têm verificado que estes organismos são sensíveis a diversos poluentes ambientais (QUINN et al., 2012; MARKUS et al., 2013, HARFORD et al., 2013). Atualmente, a hidra tem sido apontada como modelo para avaliação do impacto ecotoxicológico de nanomateriais na saúde ambiental (AMBROSONE et al., 2012; AMBROSONE e TORTIGLIONE, 2013; MARCHESANO et al., 2013). Trabalhos recentes determinaram a toxicidade crônica expondo as hidras a substâncias químicas, ampliando as condições experimentais da exposição aguda de 24h para vários dias (ARKHIPCHUK et al., 2006).

Uma vez que podem ser mensuradas várias respostas nos ensaios com este organismo e devido a sua grande sensibilidade aos metais (AMBROSE e TORTIGLIONE, 2013; HARFORD et al., 2013), as hidras mostram-se um bons organismos indicadores (bioindicadores) para o estudo de nanopartículas inorgânicas. Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar os efeitos ecotoxicológicos do nanomaterial óxido de grafeno de diferentes origens em compartimentos aquáticos através de bioensaios com hidras. Para tanto, foram usados óxido de grafeno comercial



## 9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015 10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

e dois produtos obtidos recentemente em laboratório a partir do resíduo da queima do bagaço de cana e do carvão ativo nanoestruturado.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Organismo

A hidra foi mantida em condições padronizadas de luz - ciclo claro/escuro de 12/12h e temperatura ( $24\pm 1^\circ\text{C}$ ). O meio de cultivo da hidra foi composto de 2,94 g de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), 2,2 g de N-(Tris(hydroxymethyl)methyl)-2-aminoethanesulfonic acid sodium salt (tampão TES, ácido livre) para cada 20 L de água ultrapura em pH  $7,0\pm 0,1$ .

### 2.2 Ensaio de verificação de alterações morfológicas

Os organismos não foram alimentados 24h antes e durante o teste. Foram selecionados organismos que apresentam tentáculos normais sem quaisquer alterações morfológicas e que não apresentam brotos. O teste foi realizado por 96h em placas de poliestireno de 12 poços. Para cada concentração testada foram preparados 3 poços, cada um contendo 4 mL de solução e 3 organismos. Para cada dose foram usados 9 organismos, totalizando 72 hidras. Os organismos expostas ao grafeno comercial (Cheaptubes – CTB), ao resíduo da queima do bagaço de cana (RQB) ou ao carvão ativo nanoestruturado (CAN), foram observados a cada 24h através de estereomicroscópio (aumento de 6 a 10X) quanto à presença de alterações. Para cada hidra observada foi atribuído um escore de acordo com Wilby (1988) (Tabela 1) que variam desde tentáculos com bulbos (baixa toxicidade) a encurtamento dos tentáculos (toxicidade severa), aspecto de tulipa e desintegração (letal). Para os produtos avaliados, foram testados um grupo controle (apenas meio de cultura) e concentrações seriadas dos produtos: 0,1  $\mu\text{g/mL}$ ; 1,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 5,0  $\mu\text{g/mL}$ ; 10  $\mu\text{g/mL}$ ; 25  $\mu\text{g/mL}$ ; 50  $\mu\text{g/mL}$  e 100  $\mu\text{g/mL}$ . Um escore médio para cada concentração foi calculado e a Concentração Letal para 50% dos organismos ( $\text{CL}_{50}$ ) foi estimada (Statgraph®).

**Tabela 1** - Escores de avaliação de efeitos tóxicos progressivos (WILBY, 1988).

Score	Descrição do status morfológico do pólipo
Normal	



**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015**  
**10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

---

10	Tentáculos estendidos e corpo reativo
----	---------------------------------------

---

**Grau progressivo de toxicidade**

9	Parcialmente contraído, mostra reações
8	Tentáculos e corpo ligeiramente contraído
7	Tentáculos encurtados e corpo ligeiramente contraído
6	Tentáculos danificados e corpo encurtado
5	Tentáculos visíveis e corpo totalmente contraído
4	Tentáculos não visíveis e corpo totalmente contraído

---

**Perda de osmoregulação**

3	Expansão visível dos tentáculos
2	Expandida e tentáculos não visíveis

---

**Estágios terminais**

1	Morta mas intacta
0	Desintegrada

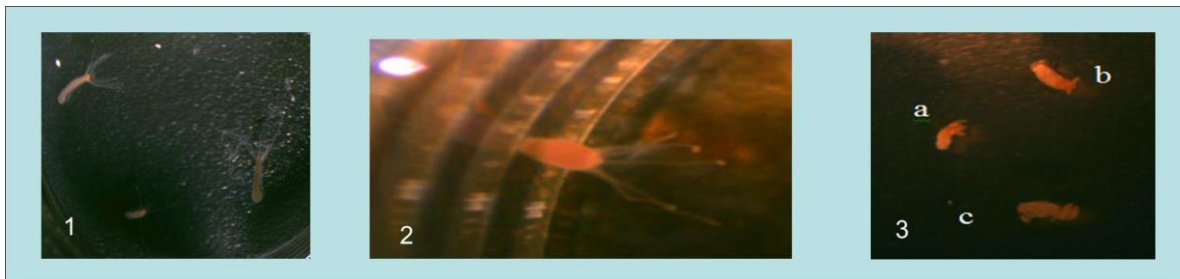
---

### **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **3.1 Exposição ao grafeno comercial (Cheaptubes - CTB)**

A necessidade de sistemas experimentais com invertebrados para toxicologia está aumentando devido à crescente preocupação com o bem-estar animal. Hidra é o animal multicelular mais simples que tem sido usado como um modelo animal para estudos ecotoxicológicos, e pode ser avaliado por vários parâmetros relacionados à sobrevivência, capacidade de regeneração e aspectos do sistema nervoso (GALLIOT, 2012).

As hidras apresentaram morte e/ou desintegração em 72h da exposição a 100 µg/mL de grafeno, em todos os organismos avaliados (triplicata de 3 organismos em cada poço). Na dose de 50 µg/mL houve encurtamento dos tentáculos após 72h da exposição (Tabela 2). As hidras do grupo controle não apresentaram alterações morfológicas durante o ensaio. As outras doses não provocaram alterações morfológicas nas hidras pelo sistema de escores adotado. Só ocorreram mortes na concentração 100 µg/mL. Deve ser verificado se a morte ocorreu por ação física do grafeno. A  $CE_{50}$  calculada pelo método binomial foi de 70,71 µg/mL e o intervalo de confiança 95% é 50 – 100 µg/mL, segundo o método binomial (Tabela 2).



**Figura 1** – 1. Hidras sem alterações morfológicas – 24h; 2. apresentando bulbos nos tentáculos e corpo levemente contraído após 72h de exposição a 50 µg/mL de grafeno e 3. mortas mas intactas (a e b) e apresentando início de desintegração (c) após 96h exposta a 100 µg/mL de **CTB**.

### 3.2 Exposição ao RQB e CAN

As hidras do grupo controle não apresentaram alterações morfológicas durante o ensaio. As concentrações testadas de resíduo da queima do bagaço de cana (RQB) e ao carvão ativo nanoestruturado (CAN) não provocaram alterações morfológicas nas hidras pelo sistema de escores adotado (Tabela 2), portanto a  $CE_{50}$  foi maior que 100 µg/mL para RQB e CAN. Os resultados obtidos são favoráveis a avaliação de futuras aplicações do CAN em remediação ambiental e na agricultura.



**Figura 2** – 1. Hidras sem alterações morfológicas – 24h; 2. expostas a 100 µg/mL de **RQB** após 72 h e 3. expostas a 100 µg/mL de **CAN** após 72h

Como nanopartículas e nanocompostos podem ir para águas naturais através de efluentes de esgoto e de aterros, o risco para as espécies aquáticas de água doce é muitas vezes desconhecido. A sensibilidade de cnidários à poluição, em especial aos efeitos de nanomateriais, torna estes animais bons indicadores biológicos para monitorar a poluição da água, com alterações morfológicas facilmente detectáveis e quantificáveis. Assim, recomendamos que os testes de invertebrados sejam utilizados não só para avançar quanto ao conhecimento em nanoecotoxicologia, mas também para investigar o comportamento e biodisponibilidade de nanopartículas e nanocompostos no ambiente aquático através de testes padronizados.



9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015  
10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo

**Tabela 2** – Escores morfológicos das hidras expostas a diferentes doses de **CTB** durante 96h de acordo com a escala proposta por Wilby (1988). Considera-se morto o indivíduo com escore  $\leq 1$  e vivo escore  $>1$ . Foram calculadas três réplicas para cada concentração, com três indivíduos cada.

Tempo após a exposição (h)	Dose de CTB ( $\mu\text{g/mL}$ )							
	0	0,1	1	5	10	25	50	100
24	10	10	10	10	10	10	10	10
48	10	10	10	10	10	10	10	10
72	10	10	10	10	10	10	9,22	1
96	10	10	10	10	10	10	8,67	0,89

#### 4. CONCLUSÃO

O bioensaio com hidra pode ser usado como uma avaliação inicial *in vivo* da toxicidade dos nanomateriais de carbono.

#### 5. AGRADECIMENTOS

Ao CNPq pela bolsa concedida.

#### 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMBROSONE, A.; MATTERA, L.; MARCHESANO, V.; QUARTA, A.; SUSHA, A. S.; TINO, A.; ROGACH, A. L.; TORTIGLIONE, C. Mechanisms underlying toxicity induced by CdTe quantum dots determined in an invertebrate model organism. **Biomaterials**, v.33, p.1991-2000, 2012.

AMBROSONE, A. E.; TORTIGLIONE, C. Methodological approaches for nanotoxicology using cnidarian models. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v.23, n.3, p.207-216, 2013.

ARKHIPCHUK, V.V.; BLAISE, C.; MALINOVSKAYA, M.V. Use of hydra for chronic toxicity assessment of waters intended for human consumption. **Environmental Pollution**, v.142, p.200-211, 2006.



**9º Congresso Interinstitucional de Iniciação Científica – CIIC 2015**  
**10 a 12 de agosto de 2015 – Campinas, São Paulo**

GALLIOT, B. *Hydra*, a fruitful model system for 270 years. **The International Journal of Developmental Biology**, v.56, p.411-423, 2012.

HANDY RD. Practical considerations for conducting ecotoxicity test methods with manufactured nanomaterials: what have we learnt so far? **Ecotoxicology**, v. 21, p. 933-72, 2012 a.

HANDY, R.D.; CORNELIS, G.; FERNANDES, T. TSYUSKO, O.; DECHO, A.; SABO-ATTWOOD, T.; METCALFE, C.; STEEVENS, J.A.; KLAINE, S.J.; KOELMANS, A.A.; HORNE, N. Ecotoxicity test methods for engineered nanomaterials: practical experiences and recommendations from the bench. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.31, n.1, p.15-31, 2012 b.

HARFORD, A. J.; JONES, D.R.; VAN DAM, R. A. Highly treated mine waters may require major ion addition before environmental release. **Science of the Total Environment**, v.443, p.143-151, 2013.

HU, X.; ZHOU, Q. Health and ecosystem risks of graphene. **Chemical Reviews**. v.113, p.3815-3835, 2013.

KAHRU, A.; DUBOURGUIER, H. C. From ecotoxicology to nanoecotoxicology. **Toxicology**, v.269, n.2-3, p. 105-19, 2010.

LI, Z.; GENG, Y.; ZHANG, X.; WEI, Q.; QIAOHUI, F.; YAN, L.; ZONGXIAN, J.; JIANJUN, W.; YUQIN, T.; XIAOJIANG, D.; WANGSUO, W. Biodistribution of co-exposure to multi-walled carbon nanotubes and graphene oxide nanoplatelets radiotracers. **Journal of Nanoparticle Research**, v.13, p.2939-2947, 2011.

MARCHESANO, V.; HERNANDEZ, Y.; SALVENMOSER, W.; AMBROSONE, A.; TINO, A.; HOBMAYER, B.; DE LA FUENTE, J.; TORTIGLIONE, C. Imaging inward and outward trafficking of gold nanoparticles in whole animals. **ACS Nano**, v.7, n.3, p.2431-2442, 2013.

MARKUS, A. A.; PARSONS, J. R.; ROEX, E. W. M.; KENTER, G. C. M.; LAANE, R. W. P. M. Predicting the contribution of nanoparticles (Zn, Ti, Ag) to the annual metal load in the Dutch reaches of the Rhine and Meuse. **Science of the Total Environment**, v.456-457, p.154-160, 2013.

QUINN, B.; GAGNÉ, F.; BLAISE, C. *Hydra*, a model system for environmental studies. **The International Journal of Developmental Biology**, v.56, p.613-625, 2012.

TROTTIER, S.; BLAISE, C.; KUSUI, T.; JOHNSON, E. M. Acute toxicity assessment of aqueous samples using a microplate based *Hydra attenuata* assay. **Environmental Toxicology and Water Quality**, v.12, p.265-271, 1997.

WILBY, O. K. The *Hydra* regeneration assay. Proceedings of workshop organised by Association Francaise de Teratologie, Royaumont, France, June 3, 1988. pp 108–124., In: Pachura-Bouchet, S., Blaise, C., Vasseur, P., Toxicity of Nonylphenol on the Cnidarian *Hydra attenuata* and Environmental Risk Assessment. **Environmental Toxicology**, v.21, p.388-394, 2006.