

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR

YULLI ROXENNE ALBUQUERQUE

**EFEITO DO NANOMATERIAL DE ÓXIDO DE GRAFENO (GO) DE INTERESSE DA
INDÚSTRIA PETROLÍFERA: *In vitro* E *In vivo***

São Carlos – SP

2026

YULLI ROXENNE ALBUQUERQUE

**EFEITO DO NANOMATERIAL DE ÓXIDO DE GRAFENO (GO) DE INTERESSE DA
INDÚSTRIA PETROLÍFERA: *In vitro* E *In vivo***

Tese apresentada para o Programa de Pós-graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Fernanda de Freitas Anibal

São Carlos – SP

2026



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Yulli Roxenne Albuquerque, realizada em 30/01/2026.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha (UFSCar)

Profa. Dra. Maria Teresa Marques Novo Mansur (UFSCar)

Profa. Dra. Fernanda Canduri (USP)

Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros (UNESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

*Dedico,
À Ricardo, com gratidão por tornar tudo possível.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelas bênçãos concedidas, por ser meu guia e por me fazer compreender que, embora existam sombras, não há escuridão, pois Ele sempre será a luz em minha vida.

À Prof.^a Dr.^a Fernanda de Freitas Anibal, pela orientação, ensinamentos, paciência e compreensão ao longo de dez anos da minha trajetória acadêmica.

Aos colegas do Laboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas da UFSCar, pela contribuição, disponibilidade e participação nos experimentos realizados.

À veterinária patologista Dr.^a Mayara Caroline Rosolem, pela valiosa contribuição na condução das análises histológicas.

Aos Profs. Dr. Ricardo Carneiro Borra, do DGE-UFSCar, Dr. Rodrigo Lambert Oréfice e Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes, do DEMET-UFMG, pela disponibilização de laboratórios e equipamentos que foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique da Silva, do DGE-UFSCar, e à pesquisadora Dr.^a Cristina Toscano Fonseca, da Fiocruz Minas, por me receberem durante o desenvolvimento de outro projeto, mas que contribuiu significativamente para a minha formação.

À Universidade Federal de São Carlos e ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, pelo suporte institucional e pela formação acadêmica.

À Universidade Federal de Ouro Preto, pelo incentivo à qualificação de doutorado.

Aos servidores da ENUT-UFOP, que se tornaram amigos, foram fonte de força e torceram por mim ao longo dessa jornada.

À ANP-Petrobras, pelo financiamento do projeto, e à CAPES, pela concessão da bolsa.

À minha amada família Sônia, Yasmin, Yanick, Fátima, Rubens, Rodrigo e Gisele, os alicerces da minha vida, que sempre me acompanharam com compreensão e afeto.

E, por último, mas definitivamente não menos importante, ao meu marido Ricardo, minha maior fonte de apoio, amor, amizade e parceria, meus agradecimentos mais especiais.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Número do Processo: 88887.464455/2019-00.

RESUMO

O óxido de grafeno (GO) é um nanomaterial bidimensional derivado do grafite, funcionalizado com grupos oxigenados que conferem propriedades hidrofílicas e reatividade superficial, favorecendo aplicações industriais. No entanto, a expansão de seu uso exige a compreensão de seus efeitos biológicos e potenciais riscos à saúde. Este estudo teve como objetivo avaliar a nanotoxicidade do GO desenvolvido para recuperação avançada de petróleo, considerando suas características físico-químicas e respostas biológicas em modelos experimentais. O GO foi caracterizado por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier, análise termogravimétrica, espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta e microscopia eletrônica de varredura. Os resultados confirmaram a presença de grupos funcionais oxigenados característicos do GO e indicaram comportamento dependente do meio de dispersão, com maior estabilidade coloidal em água ultrapura em comparação à solução salina (0,9%) e ao DMEM, além de diâmetro circular equivalente médio de 11,37 μm em água e 11,78 μm em DMEM. *In vitro*, em células HepG2, observou-se aumento transitório da atividade metabólica mitocondrial (100 a 500 $\mu\text{g/mL}$), sugerindo respostas celulares adaptativas. Na avaliação *in vivo*, camundongos BALB/c foram expostos ao GO por via intraperitoneal nas doses de 5 a 50 mg/kg. Verificou-se redução transitória do consumo de ração e água e do peso corporal, além de alterações no perfil leucocitário, caracterizadas por aumento de neutrófilos e redução de leucócitos totais, células mononucleares e eosinófilos no lavado da cavidade peritoneal, bem como aumento de neutrófilos no lavado broncoalveolar. Entre as citocinas avaliadas (IL-6, IFN- γ e TNF), apenas a IL-6 apresentou redução significativa no lavado da cavidade peritoneal. Observou-se ainda aumento do peso relativo do fígado associado ao acúmulo de GO, elevação da enzima aspartato aminotransferase sérica e alterações histopatológicas no fígado, baço e pulmão, caracterizadas por infiltrado inflamatório. Esses achados sugerem que o GO pode induzir respostas inflamatórias locais leves e acúmulo hepático dependente da dose, sendo relevantes estudos adicionais com exposição prolongada para avaliar os potenciais efeitos adversos e investigar a reversibilidade das respostas biológicas observadas.

Palavras-chave: óxido de grafeno, nanomateriais, toxicologia, célula HepG2, *Mus musculus*.

ABSTRACT

Graphene oxide (GO) is a two-dimensional nanomaterial derived from graphite, functionalized with oxygen-containing groups that confer hydrophilic properties and surface reactivity, enabling a wide range of industrial applications. However, expanding its use requires a better understanding of its biological effects and potential health risks. This study aimed to evaluate the nanotoxicity of GO developed for enhanced oil recovery, considering its physicochemical properties and biological responses in experimental models. GO was characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy, thermogravimetric analysis, dynamic light scattering, zeta potential, and scanning electron microscopy. The results confirmed the presence of characteristic oxygen-containing functional groups and demonstrated dispersion medium-dependent behavior, with greater colloidal stability in ultrapure water than in saline solution (0.9%) or DMEM, and mean equivalent circular diameters of 11.37 μm in water and 11.78 μm in DMEM. *In vitro*, HepG2 cells exposed to GO (100-500 $\mu\text{g}/\text{mL}$) showed a transient increase in mitochondrial metabolic activity, suggesting adaptive cellular responses. *In vivo*, BALB/c mice were exposed via intraperitoneal administration at doses ranging from 5 to 50 mg/kg. Transient reductions in food and water intake and body weight were observed, accompanied by changes in the leukocyte profile. These changes included increased neutrophils and decreased total leukocytes, mononuclear cells, and eosinophils in peritoneal cavity lavage, as well as elevated neutrophil counts in bronchoalveolar lavage. Among the cytokines evaluated (IL-6, IFN- γ , and TNF), only IL-6 showed a significant reduction in peritoneal cavity lavage. An increase in relative liver weight associated with GO accumulation, elevated serum aspartate aminotransferase levels, and histopathological alterations in the liver, spleen, and lungs characterized by inflammatory infiltrates were also observed. These findings suggest that GO may induce mild local inflammatory responses and dose-dependent hepatic accumulation, highlighting the importance of further studies with prolonged exposure to assess potential adverse effects over time and to investigate the reversibility of the observed biological responses.

Keywords: graphene oxide, nanomaterials, toxicology, HepG2 cell, *Mus musculus*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura de carbono de acordo com suas dimensões e ano de descoberta	18
Figura 2. Estrutura química do GO	20
Figura 3. Interação do GO na interface água-petróleo, alterando as propriedades de tensão interfacial	23
Figura 4. Espectro de ATR-FTIR do GO	37
Figura 5. Decomposição térmica do GO	38
Figura 6. DH, Pdl e PZ do GO em diferentes meios de dispersão ao longo do tempo	39
Figura 7. Morfologia e distribuição do DCE das folhas de GO por MEV	40
Figura 8. Viabilidade das células HepG2 após exposição ao GO avaliada pelo ensaio MTT	41
Figura 9. Consumo de ração e água por grupo de animais durante o período experimental.....	42
Figura 10. Peso corporal dos animais durante o período experimental.....	42
Figura 11. Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue, LBA e LCP	44
Figura 12. Concentração de citocinas no plasma sanguíneo, LCP e LBA	45
Figura 13. Atividades séricas das enzimas AST e ALT	46
Figura 14. Peso relativo dos órgãos dos animais expostos ao GO	47
Figura 15. Avaliação histológica do tecido hepático de animais expostos ao GO	48
Figura 16. Avaliação histológica do tecido esplênico de animais expostos ao GO ..	49
Figura 17. Avaliação histológica do tecido renal de animais expostos ao GO.....	50
Figura 18. Avaliação histológica do tecido pulmonar de animais expostos ao GO...51	

LISTA DE SIGLAS

2D – Bidimensional

ANOVA – *Analysis of Variance* (Análise de Variância)

ALT – Alanina Aminotransferase

AST – Aspartato Aminotransferase

ATR-FTIR – *Attenuated Total Reflectance Fourier Transformed Infrared* (Infravermelho com Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier)

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

DCE – Diâmetro Circular Equivalente

DH – Diâmetro Hidrodinâmico

DLS – *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento Dinâmico de Luz)

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DP – Desvio Padrão

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilenodiamino tetra-acético)

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio Imunoenzimático)

GO – *Graphene Oxide* (Óxido de grafeno)

HE – Hematoxilina-Eosina

HPAM – Poliacrilamida Hidrolisada

IL-1 β – Interleucina-1 beta

IL-6 – Interleucina-6

INF- γ – Interferon-gama

LBA – Lavado Broncoalveolar

LCP – Lavado da Cavidade Peritoneal

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT – 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina

NM – Nanomaterial

OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato-Salino)

PdI – *Polydispersity index value* (Índice de Polidispersidade)

PZ – Potencial Zeta

RAP – Recuperação Avançada de Petróleo

rGO – Oxido de Grafeno Reduzido

SFB – Soro Fetal Bovino

TGA – *Thermogravimetric analyses* (Análise Termogravimétrica)

TNF – *Tumor Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Nanotecnologia	15
1.2 Nanotoxicologia	16
1.3 Nanomateriais de carbono	18
1.4 Oxido de grafeno (GO)	20
1.5 Aplicações do GO	21
1.6 Biocompatibilidade e toxicidade do GO	25
1.7 Efeito corona.....	26
2. JUSTIFICATIVA.....	28
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral.....	29
3.2 Objetivos específicos	29
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	30
4.1 Óxido de grafeno (GO)	30
4.2 Caracterização do GO	30
4.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR-FTIR)	30
4.2.2 Análise termogravimétrica (TGA)	30
4.2.3 Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersidade (Pdl) e potencial zeta (PZ).....	31
4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	31
4.3 Avaliação da citotoxicidade de GO	32
4.4 Animais	32
4.5 Exposição dos animais ao GO.....	33
4.6 Monitoramento do consumo de ração e água e do peso corporal dos animais	33
4.7 Coleta de sangue, LCP e LBA e análise leucocitária dos animais.....	33

4.8	Quantificação de citocinas	34
4.9	Determinação das atividades séricas das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).....	34
4.10	Avaliação da variação do peso pulmonar e hepático.....	35
4.11	Avaliação histológica do pulmão, fígado, baço e rim	35
4.12	Análise estatística	35
5.	RESULTADOS.....	37
5.1	Caracterização do GO	37
5.1.1	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR-FTIR)	37
5.1.2	Análise termogravimétrica (TGA).....	37
5.1.3	Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersidade (Pdl) e potencial zeta (PZ).....	38
5.1.4	Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	40
5.2	Avaliação da citotoxicidade de GO	41
5.3	Monitoramento do consumo de ração e água e do peso corporal dos animais	41
5.4	Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue, LBA e LCP	43
5.5	Quantificação de citocinas	45
5.6	Atividades séricas das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT).....	46
5.7	Avaliação da variação do peso pulmonar e hepático em animais.....	46
5.8	Histologia	47
6.	DISCUSSÃO.....	52
7.	CONCLUSÕES.....	59
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	60
	ANEXO A – Artigo publicado.....	70
	ANEXO B – Certificado CEUA	71

1. INTRODUÇÃO

O avanço da nanotecnologia tem transformado profundamente diversas áreas do conhecimento, impulsionando inovações científicas e tecnológicas com elevado potencial de impacto econômico e social. Esse cenário tem estimulado investimentos cada vez maiores em pesquisa, desenvolvimento e uso de materiais e dispositivos na escala nanométrica (1-100 nm) (Singh, Kumar e Singh, 2016), tornando fundamental a compreensão dos riscos associados a essas inovações, especialmente aqueles relacionados à saúde humana e ao meio ambiente.

Os nanomateriais (NMs) se diferenciam de materiais convencionais em escala micro ou macroscópica por exibirem propriedades físico-químicas únicas, o que amplia de maneira expressiva as possibilidades de aplicação em diferentes segmentos (Mekuye e Abera, 2023). Essas características vêm impulsionando a modernização de setores estratégicos, como as áreas biomédica, eletrônica, ambiental e energética.

Por outro lado, devido à alta mobilidade e reatividade dos NMs (Boyes e Van Thriel, 2020), a avaliação de risco de cada NM deve ser incorporada desde as etapas iniciais do desenvolvimento de materiais e processos, aliada a práticas contínuas de monitoramento (Poikkimäki et al., 2025). Diante disso, a nanotoxicologia, ramo da toxicologia dedicado à investigação dos efeitos adversos dos NMs, tem se desenvolvido como ferramenta fundamental para a avaliação de sua segurança, principalmente por meio de estudos *in vitro* e *in vivo* (Di Sia, 2017; Shatkin e Ong, 2016; Zielińska et al., 2020).

O óxido de grafeno (GO), NM à base de carbono, tem despertado crescente interesse no setor industrial, especialmente na indústria petrolífera, devido às suas propriedades físico-químicas, elevada área superficial e capacidade de interação com diferentes fases (Vasconcelos et al., 2022). Considerando seu potencial de aplicação em processos de recuperação avançada de petróleo (RAP), torna-se relevante avaliar a toxicidade do GO desenvolvido pelo Centro de Pesquisa Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES/Petrobras). Neste contexto, este estudo tem como objetivo investigar seus efeitos tóxicos e inflamatórios em modelos *in vitro* e *in vivo*, contribuindo para a compreensão de seus impactos biológicos e para a segurança de sua aplicação, sendo que os dados, resultados e interpretações aqui apresentados foram originalmente publicados por Albuquerque et al. (2026) (ANEXO A).

1.1 Nanotecnologia

Embora o conceito de “nanômetro” (nm) tenha sido introduzido por Richard Zsigmondy em 1925, inicialmente para caracterizar partículas de ouro coloidal observadas por microscopia, a ideia de nanotecnologia moderna é geralmente atribuída ao físico teórico Richard Feynman. Em sua palestra intitulada *There's Plenty of Room at the Bottom* (“Há muito espaço lá embaixo”), proferida em 1959, Feynman apresentou as bases conceituais para a manipulação da matéria em escalas atômicas e moleculares, antecipando avanços tecnológicos que só seriam concretizados décadas depois (Hulla, Sahu e Hayes, 2015).

O termo “nanotecnologia” foi empregado pela primeira vez aproximadamente 15 anos após a palestra de Feynman pelo pesquisador Norio Taniguchi, ao descrever processos de fabricação de semicondutores na escala de um nanômetro (Hulla, Sahu e Hayes, 2015). No entanto, a nanotecnologia passou a se consolidar como uma área científica apenas a partir da década de 1980, impulsionada principalmente pelos trabalhos de Eric Drexler, do Instituto de Tecnologia de Massachusetts, com o artigo intitulado *Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation* (“Engenharia molecular: uma abordagem para o desenvolvimento de capacidades gerais para manipulação molecular”) (Santamaria, 2012).

Atualmente, a nanotecnologia é compreendida como um conjunto de técnicas voltadas à manipulação e ao controle da matéria em nível atômico ou molecular, visando ao desenvolvimento e à aplicação de materiais com dimensões nanométricas (Singh; Kumar e Singh, 2016). O prefixo “nano”, oriundo do grego *nánnos* (anão), é empregado na ciência para indicar uma parte em um bilhão. Dessa forma, 1 nm equivale a um bilionésimo de metro (10^{-9} m) (Bocconi et al., 2008).

Os NMs são partículas que possuem pelo menos uma de suas dimensões com tamanho inferior a 100 nm (Boholm e Arvidsson, 2016). Tais materiais podem ser projetados e produzidos em diferentes tamanhos, formatos e composições, o que permite uma adaptação mais precisa às aplicações desejadas. Atualmente, os NMs têm sido empregados em medicamentos, cosméticos, alimentos, eletrônicos, energia, meio ambiente, entre outros (Khan, Saeed e Khan, 2017; Singh, Kumar e Singh, 2016).

As propriedades físico-químicas dos materiais em nanoescala são fortemente influenciadas pelas suas dimensões. À medida que o tamanho diminui, a razão entre a área superficial e o volume total aumenta, promovendo alterações físico-químicas e estruturais significativas. A partir de um determinado tamanho crítico, podem surgir novas propriedades (elétricas, ópticas, mecânicas, de condutividade térmica, entre outras) que diferem daquelas observadas em materiais de maior escala, mesmo quando a composição química é idêntica (Nel, Mädler e Li, 2006; Zarbin, 2007). Um exemplo clássico é o ouro: enquanto na macroescala apresenta coloração amarela, na nanoescala pode apresentar tons alaranjados, roxos, vermelhos ou esverdeados, refletindo mudanças na interação com a luz em função do tamanho das partículas (Dreaden et al., 2012; Eustis e El-Sayed, 2005).

As primeiras aplicações comerciais de NMs envolveram o uso de dióxido de titânio (TiO₂) e óxido de zinco (ZnO) em protetores solares, NMs de prata em embalagens de alimentos, tecidos e produtos desinfetantes, além da incorporação de nanotubos de carbono em materiais têxteis para conferir propriedades antimanchas e maior resistência (Macdonald, 2015).

1.2 Nanotoxicologia

A introdução dos NMs no mercado estimulou o interesse científico e regulatório em relação aos seus potenciais impactos biológicos, impulsionando o desenvolvimento da nanotoxicologia como campo de investigação. Nesse contexto, o termo “nanotoxicologia” foi utilizado pela primeira vez em 2004, em um editorial publicado por Donaldson e colaboradores. Em 2007, membros da Sociedade de Toxicologia fundaram o periódico “Nanotoxicology”, o que marcou e impulsionou significativamente a expansão de estudos *in silico*, *in vivo* e *in vitro* dedicados à avaliação dos efeitos adversos associados à exposição a NMs (Santamaria, 2012; Shatkin e Ong, 2016; Zielińska et al., 2020).

Metodologias *in silico* desempenham papel fundamental nas etapas iniciais de avaliação, pois são rápidas e apresentam menor custo, embora exijam maior capacidade computacional. Ensaio *in vitro*, como o teste de MTT, apesar de sua simplicidade, oferecem estimativas preliminares do potencial tóxico dos NMs. Por sua vez, os ensaios *in vivo* diferem das abordagens anteriores ao considerar a complexidade fisiológica do organismo e suas interações sistêmicas com os NMs. Em

conjunto, essas estratégias constituem uma base essencial para o desenvolvimento de NMs mais seguros e menos tóxicos, com aplicações em diferentes áreas (Akhtar et al., 2025).

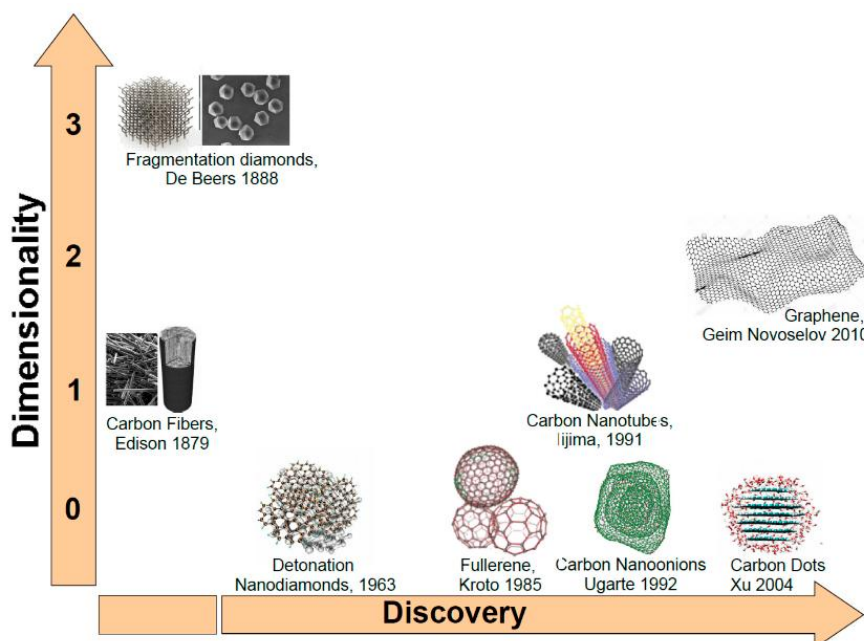
Os seres humanos podem ser expostos aos NMs por diferentes vias de entrada no organismo, como os pulmões, a pele e o trato gastrointestinal, resultando em posterior distribuição sistêmica para diferentes tecidos e órgãos (Akhtar et al., 2025). Entre as medidas preventivas recomendadas para os manipuladores desses materiais, destacam-se o uso de sistemas de filtração de alta eficiência, como filtros HEPA, e a adoção de equipamentos de proteção individual adequados, incluindo máscaras com filtragem apropriada, óculos de proteção e luvas, conforme estabelecido por normas técnicas internacionais (DIN EN 143 e 14387) (Cirillo et al., 2024). Além disso, NMs dispersos em meios líquidos apresentam menor risco de dispersão aérea, reduzindo a exposição ocupacional (Poikkimäki et al., 2025). Assim, recomenda-se evitar a forma em pó, priorizando o uso em suspensões líquidas ou incorporados a matrizes sólidas (Jiménez et al., 2022).

A caracterização dos NMs é fundamental no campo da nanotoxicologia, pois determinadas propriedades desses materiais podem influenciar de maneira significativa os resultados toxicológicos (Akhtar et al., 2025). Entre essas características, destacam-se fatores como tamanho, formato, concentração e agregação dos NMs (Abonyi et al., 2025). Por exemplo, no contexto de exposição pela via respiratória, partículas com diâmetro aerodinâmico inferior a 4 μm são consideradas respiráveis, enquanto aquelas com até 10 μm integram a fração torácica e podem alcançar regiões profundas do trato respiratório (Brown et al., 2013). O menor tamanho das partículas pode facilitar uma internalização mais rápida, resultando em maior toxicidade, estresse oxidativo, resposta imune exacerbada, danos intracelulares e morte celular (Abonyi et al., 2025; Akhtar et al., 2025). O formato das partículas, como hastes, fios, folhas ou esferas, constitui um fator crítico para a absorção celular. Ademais, NMs biologicamente ativos podem perder eficácia devido à agregação e sedimentação, já que a agregação pode impedir que os NMs entrem em contato direto com o núcleo celular (Abonyi et al., 2025).

1.3 Nanomateriais de carbono

O carbono tem a capacidade de reorganizar seus elétrons de valência em diferentes estados de hibridização, o que lhe confere uma notável versatilidade estrutural. Essa característica permite ao elemento assumir diversas formas alotrópicas e originar uma ampla variedade de estruturas, que vão desde pequenas moléculas até longas cadeias. Por esse motivo, o carbono pode manifestar-se sob diferentes formas, como grafite e diamante (alótropos), além de formar diversas nanoestruturas, incluindo folhas únicas de grafeno, nanotubos, fibras, fulerenos e *carbon onions* (nanocébolos de carbono), conforme ilustrado na Figura 1 (Speranza, 2021).

Figura 1. Estrutura de carbono de acordo com suas dimensões e ano de descoberta



Fonte: Speranza, 2021.

Fibras de carbono são materiais constituídos por longas cadeias de carbono, contendo cerca de 90% ou mais de carbono em sua composição, com diâmetro variando entre 5 e 10 μm . Quando a pureza do carbono se aproxima de 99%, essas fibras também são denominadas fibras de grafite (Ali et al., 2021; Huang, 2009). Devido a propriedades como elevada orientação estrutural e alta condutividade térmica, as fibras de carbono têm sido amplamente empregadas em compósitos poliméricos, contribuindo para o aprimoramento da eficiência de dispositivos eletrônicos (Ali et al., 2021).

Os fulerenos são compostos por átomos de carbono interligados por ligações simples e duplas, formando uma configuração em gaiola poliédrica, também conhecida como *buckyballs* (Kulkarni et al., 2024; Schwerdtfeger, Wirz e Avery, 2015). Entre as principais propriedades desses materiais, destacam-se a estabilidade química, a elevada resistência, a reatividade controlada e a capacidade de atravessar membranas celulares, o que possibilita aplicações que vão desde a medicina até a eletrônica (Kulkarni et al., 2024).

Carbon onions são estruturas esféricas, geralmente com diâmetro inferior a 10 nm, formadas por múltiplas camadas concêntricas de carbono, dispostas de maneira análoga a uma “boneca russa” ou a uma cebola. Entre suas principais propriedades destacam-se a grande área superficial, elevada condutividade e a capacidade de suportar rápidas taxas de carga e descarga, características que viabilizam aplicações em supercapacitores e materiais elétricos (Zeiger et al., 2016).

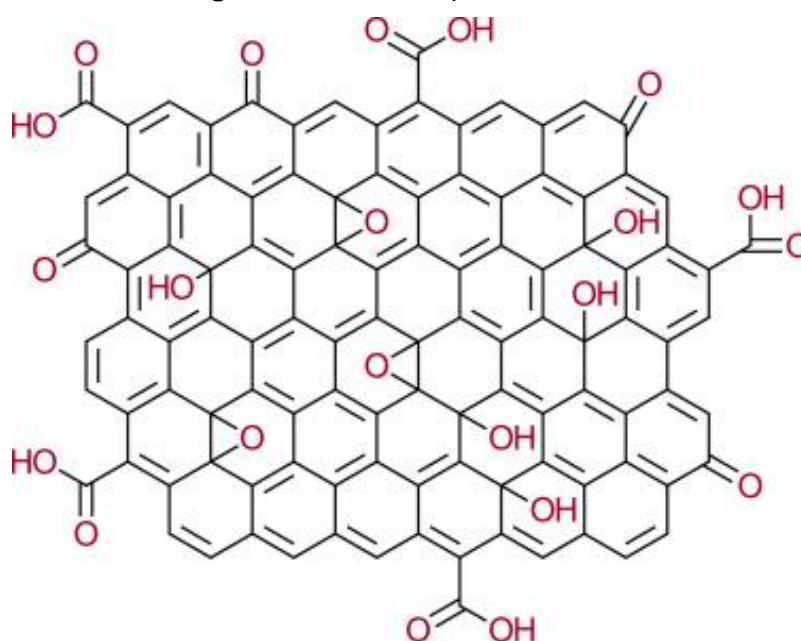
Nanodiamantes são estruturas predominantemente cúbicas, compostas por átomos de carbono interligados por ligações covalentes. Destacam-se por sua elevada resistência mecânica, estabilidade química, superfície passível de modificação, biocompatibilidade e propriedades ópticas e eletrônicas. Essas características conferem aos nanodiamantes um amplo potencial de aplicação, abrangendo desde a administração controlada de fármacos (*drug delivery*) e sistemas de liberação de vacinas até o desenvolvimento de biossensores e sensores eletroquímicos (Buledi et al., 2024).

O grafeno é um NM bidimensional (2D) constituído por uma única camada de átomos de carbono organizados em uma estrutura hexagonal (Novoselov et al., 2004). Um dos métodos mais simples para sua obtenção é a esfoliação do grafite, material composto por múltiplas camadas de grafeno empilhadas de forma paralela em uma ordem tridimensional e cristalina (Tadyszak, Wychowaniec e Litowczenko, 2018). O grafeno destaca-se por sua ampla área superficial e por propriedades como alta mobilidade eletrônica, excelente condutividade térmica, elevada transmitância óptica e boa condutividade elétrica (Suvarnaphaet e Pechprasarn, 2017; Tadyszak, Wychowaniec e Litowczenko, 2018).

1.4 Óxido de grafeno (GO)

O GO é um NM 2D semelhante ao grafeno, porém caracterizado pela presença de grupos funcionais oxigenados introduzidos em sua estrutura por meio de modificações químicas. Entre esses grupos, destacam-se as hidroxilas ($-OH$) e os epóxidos ($C-O-C$), que se distribuem predominantemente no plano basal, além das carbonilas ($C=O$) e das carboxilas ($-COOH$), localizadas principalmente nas bordas da estrutura (Kornilov e Gubin, 2020), conforme ilustrado pela Figura 2.

Figura 2. Estrutura química do GO



Estrutura hexagonal do GO com a distribuição dos grupos funcionais oxigenados. Fonte: Magro, Vella e Cassar, 2025.

Em geral, as folhas de GO podem ser obtidas por meio de processos de oxidação química do grafite seguidos de esfoliação, utilizando agentes oxidantes potentes, como ácido sulfúrico, ácido nítrico e permanganato de potássio, conforme descrito nos métodos clássicos de síntese (Hummers Junior e Offeman, 1958; Jiříčková et al., 2022; Kornilov e Gubin, 2020).

O GO pode ainda ser convertido em sua forma reduzida, denominada óxido de grafeno reduzido (rGO), por meio de processos de redução térmica, química ou eletroquímica, que promovem a remoção parcial dos grupos oxigenados. Esse procedimento resulta em aumento da condutividade elétrica do material, ao mesmo tempo em que parte de sua reatividade química é preservada (Tarcan et al., 2020).

O GO possui espessura na escala atômica, enquanto suas dimensões laterais podem variar da nanoescala à microescala (Guo et al., 2022). Sua estrutura 2D em folha, organizada em rede hexagonal, confere propriedades mecânicas relevantes, como resistência à fratura da ordem de 80 MPa e módulo de elasticidade de aproximadamente 32 GPa (Farjadian et al., 2020).

Devido à sua composição química, o GO apresenta caráter hidrofílico, elevada reatividade química e notável versatilidade para modificações e funcionalizações superficiais (Dideikin e Vul', 2019). A presença de oxigênio favorece sua dispersão tanto em água quanto em diferentes matrizes sólidas e solventes orgânicos (Farjadian et al., 2020). Os grupos quimicamente reativos podem ser utilizados para funcionalização por ligações covalentes. Além disso, as folhas de GO também podem interagir de forma não covalente com algumas moléculas por interação hidrofóbica, interação π - π ou forças de van der Waals, o que permite funcionalizações com diferentes características de solubilidade, estabilidade e especificidade (Ghulam et al., 2022). Em razão de sua elevada área superficial e das regiões de carbono sp^2 , o GO destaca-se ainda como eficiente transportador de moléculas funcionais, possibilitando alta capacidade de carga em ambas as faces da estrutura (Ghulam et al., 2022).

O GO apresenta vantagens importantes, como o custo relativamente baixo e a facilidade de obtenção, fatores que viabilizam sua produção em larga escala (Guo et al., 2022; Tarcan et al., 2020). No entanto, trata-se de um conjunto heterogêneo de materiais, cujas propriedades físico-químicas e possíveis aplicações dependem diretamente de sua composição e organização estrutural. Essas características são fortemente influenciadas pelo método de síntese empregado, abrangendo aspectos como o grau de oxidação, a quantidade e a localização dos grupos oxigenados, a distribuição dos grupos funcionais na estrutura, a densidade de defeitos e nanoporos, bem como a variação de tamanho e o arranjo relativo das folhas de GO (Guo et al., 2022).

1.5 Aplicações do GO

As múltiplas características do GO possibilitam aplicações promissoras em diferentes áreas, destacando-se a geração de energia, o desenvolvimento de supercapacitores, a construção de sensores e diversas aplicações biológicas, biomédicas e ambientais (Ghulam et al., 2022; Singh, Kumar e Singh, 2016).

O GO apresenta potencial de aplicação tanto na geração quanto no armazenamento de energia. Diversos compósitos à base de GO têm demonstrado desempenho e estabilidade superiores como materiais de ânodo para baterias de íon-lítio (Li-Ion). Já foram relatados, por exemplo, o uso de folhas de GO intercaladas em nanofios de Si/C, esferas de SnO₂/GO, rGO/EDA e compósitos rGO/CoO em estruturas de cubo oco, visando ao aumento da capacidade de armazenamento de lítio (Singh, Kumar e Singh, 2016). Além disso, a literatura apresenta trabalhos que exploram o GO como material catódico. Guo et al. (2015) demonstraram que um compósito de GO/LiFeSO₂ pode melhorar a estabilidade do ciclo e a taxa de capacidade dessas baterias. O emprego do GO também é relatado em outros tipos de baterias, como Li-S e Li-O₂, bem como em dispositivos para geração de energia, como células solares (Singh, Kumar e Singh, 2016). No estudo de Farmani e Omidniaee (2025), observou-se que o GO combinado com NiO em placas solares atua como modificador interfacial, melhorando a condutividade elétrica, a afinidade energética e o transporte de carga, além de aumentar a absorção de luz e o desempenho geral da célula solar.

O GO também tem sido empregado no desenvolvimento de supercapacitores, dispositivos de armazenamento de energia utilizados em equipamentos eletrônicos que demandam alta densidade energética, rápidas taxas de carga e descarga e longa vida útil. Compósitos modificados com GO apresentam mecanismos capacitivos de dupla camada elétrica e, de modo geral, exibem desempenho superior, maior área superficial e condutividade aprimorada em comparação aos materiais puros. Além disso, a incorporação de GO em compósitos com óxidos, sulfetos e calcogenetos metálicos torna esses supercapacitores mais acessíveis em termos de custo e facilita sua produção (Sriram et al., 2024).

Nas áreas biológica e biomédica, o GO tem demonstrado resultados promissores em terapias anticâncer, no desenvolvimento de implantes dentários e ósseos, na biofuncionalização com proteínas e DNA, além de aplicações em sistemas de liberação controlada de fármacos e no desenvolvimento de biossensores. Como agente antimicrobiano, o GO tem se mostrado eficaz contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos, com potencial para ser utilizado tanto no tratamento de infecções causadas por patógenos multirresistentes quanto no revestimento de dispositivos médicos, embalagens e tecidos (Ghulam et al., 2022).

No âmbito ambiental, o GO pode ser empregado em processos de tratamento de água e de remoção de poluentes. Mesmo em baixas concentrações, alguns poluentes podem causar danos ambientais, afetando plantas e animais e podendo se acumular na cadeia alimentar. Materiais à base de GO interagem diretamente com substâncias poluentes, seja de forma molecular ou iônica, por meio de interações eletrostáticas. Posteriormente, esses poluentes são adsorvidos com elevado grau de eficiência (Wang et al., 2019).

A poluição causada por derramamento de petróleo bruto é um problema ambiental de escala global, gerando impactos significativos sobre os ecossistemas. Métodos convencionais de remediação, como queima, remoção manual e biorremediação, apresentam limitações relacionadas ao alto custo, ao tempo de execução e à elevada viscosidade do petróleo (Ghulam et al., 2022). Nesse cenário, compósitos de rGO com melamina têm se destacado na adsorção de óleo em água, em virtude de suas propriedades hidrofóbicas e oleofílicas, demonstrando capacidade de adsorver *in situ* até 95 vezes o próprio peso em apenas 12 minutos (Wang et al., 2020).

O GO também pode ser desenvolvido para aumentar a eficiência de extração em poços de petróleo, como no caso do NM utilizado neste trabalho. O GO possui a capacidade de estabilizar a interface entre água e óleo, além de contribuir para a redução da viscosidade do petróleo. Assim, favorece a estabilidade das emulsões e pode ser empregado como componente de fluidos em processos de RAP (McCoy, Pottage e Tabor, 2014; Vasconcelos et al., 2022). A interação do GO entre a água e o petróleo está ilustrada na Figura 3.

Figura 3. Interação do GO na interface água-petróleo, alterando as propriedades de tensão interfacial



Fonte: Haruna, Tangparitkul e Wen, 2024.

Cerca de metade das reservas de petróleo encontra-se em reservatórios carbonáticos, cuja extração demanda a aplicação de técnicas de RAP. Três mecanismos básicos estão envolvidos nesse processo: tensão interfacial, ângulo de contato e controle de mobilidade (Haruna, Tangparitkul e Wen, 2024). Para atuar nesses mecanismos, são empregados diversos fluidos contendo NMs, em uma abordagem conhecida como nanoinundação ou recuperação assistida por nanofluidos (Khoramian et al., 2019).

A molhabilidade da superfície da rocha é um fator determinante nos processos de extração de petróleo. Quando a rocha apresenta característica úmida por água (hidrofílica), a água se fixa na superfície. Já quando a rocha apresenta superfície molhada por óleo (oleofílica), o petróleo se fixa na rocha. Em geral, os reservatórios apresentam formação oleofílica ou mista, sendo necessário alterar a molhabilidade para neutra ou hidrofílica. Para promover essa alteração, dois mecanismos principais podem ser empregados: a adsorção de substâncias na superfície sólida (revestimento) e a remoção de moléculas previamente adsorvidas da superfície da rocha (limpeza) (Natalya et al., 2022).

Khoramian et al. (2019) demonstraram que folhas de GO puras foram eficazes na separação de filmes de petróleo em corpos porosos. A solução contendo folhas de GO foi capaz de alterar a molhabilidade, melhorar a eficiência microscópica, modificar a viscosidade em soluções salinas e proporcionar um aumento de 28% no total de petróleo recuperado em materiais porosos. Em outro estudo, Haruna, Tangparitkul e Wen (2024) avaliaram as propriedades e a eficácia de um compósito de GO com poliacrilamida hidrolisada (HPAM – do inglês *Hydrolyzed PolyAcrylamide*) para recuperação de petróleo, comparando soluções contendo GO com soluções contendo apenas HPAM. De forma semelhante ao estudo anterior, os autores observaram que a presença de GO resultou em aumento da viscosidade das soluções, que se mantiveram mais estáveis. Além disso, foi registrada uma redução na tensão interfacial água-petróleo e na diminuição do ângulo de contato. No mesmo trabalho, ensaios de inundação piloto mostraram que a presença de GO aumentou a eficácia da solução, indicando que o compósito HPAM-GO atende aos requisitos necessários para ser considerado uma alternativa promissora em processos de RAP.

1.6 Biocompatibilidade e toxicidade do GO

O GO tem sido amplamente investigado quanto à sua biocompatibilidade, especialmente em aplicações biomédicas, como a engenharia de tecidos, a liberação controlada de fármacos e o desenvolvimento de biossensores (Zare et al., 2021). De modo geral, o material apresenta potencial biocompatível. Contudo, essa característica não é intrínseca e está condicionada a diversos fatores, incluindo o tamanho das folhas, a concentração, o tempo de exposição, o estado de agregação e o tipo de funcionalização superficial, além de aspectos relacionados ao processo de síntese, como o grau de oxidação e a presença de impurezas (Ghulam et al., 2022; Liao, Li e Tjong, 2018). Portanto, apesar dos relatos positivos sobre a utilização do GO em diversas áreas, a toxicidade desse material precisa ser adequadamente avaliada antes de qualquer aplicação.

Em relação aos efeitos celulares do GO, enquanto alguns trabalhos relatam aumento da adesão e proliferação celular (Ruiz et al., 2011), outros demonstram efeitos adversos (Chen et al., 2016; Couvillion et al., 2023; Dasmahapatra, Dasari e Tchounwou, 2019; Khan et al., 2019). Esses efeitos estão associados principalmente à interação com a membrana celular e à indução de estresse oxidativo (Ren et al., 2020; Srikanth et al., 2018). A afinidade entre os grupos oxigenados do GO e componentes da membrana pode levar a alterações estruturais, lise celular e hemólise (Liao et al., 2011), além de promover extração de fosfolípidios da membrana celular (Tu et al., 2013).

No ambiente, o GO pode se acumular e interagir com íons e moléculas, afetando organismos vivos e ecossistemas (Chen et al., 2016; Duo, Wang e Zhao, 2022; Fekete-Kertesz et al., 2020). Estudos demonstram sua bioacumulação ao longo das cadeias alimentares, com maior acúmulo e toxicidade associados a partículas em escala nanométrica (Dasmahapatra, Dasari e Tchounwou, 2019; Hashemi et al., 2024).

Em modelos animais, o GO tem sido relacionado a efeitos tóxicos em diversos sistemas fisiológicos (respiratório, digestivo, urinário, nervoso central, reprodutivo e de desenvolvimento) e potencial genotóxico dependente da dose (Li et al., 2025; Liu et al., 2024; Poulsen et al., 2021; Rhazouani et al., 2021; Seabra et al., 2014; Xiaoli et al., 2021; Yang et al., 2019). Em humanos, estudos iniciais de exposição por inalação

não evidenciaram efeitos agudos relevantes, embora tenham indicado aumento na trombogenicidade sanguínea (Andrews et al., 2024).

Além do cuidado com a síntese do GO, a toxicidade pode ser modulada por meio de revestimentos. No entanto, revestimentos como biopolímeros e surfactantes podem alterar significativamente a biocompatibilidade e a biodistribuição do GO, sendo a funcionalização importante para tornar o material mais biocompatível (Kiew et al., 2016). Em meio biológico, pode ocorrer a formação de uma corona proteica (CP) ao redor do NM, tanto em sistemas *in vivo* quanto *in vitro*. Duan et al. (2015) observaram que a formação da CP em GO diminuiu a internalização das partículas pelas células. Além disso, a adsorção de albumina pelas folhas de GO reduziu a interação das nanofolhas com a membrana celular, resultando em diminuição significativa da citotoxicidade.

1.7 Efeito corona

O efeito corona ocorre devido à formação de uma camada de biomoléculas, composta principalmente por proteínas, ao redor do NM quando este entra em contato com meios biológicos. Essa camada de CP influencia diretamente as interações dos NMs com biosistemas, como células e organelas (Saei, Sun e Mahmoudi, 2025).

A composição da corona proteica em NMs é resultado de um processo complexo e dinâmico, influenciado por diversas propriedades físico-químicas dos NMs, como tamanho, formato, carga superficial e hidrofobicidade. Além disso, fatores biológicos, incluindo a concentração de proteínas, o pH, a temperatura e o tempo de exposição, também exercem impacto significativo sobre a formação dessa camada (Ahmadi et al., 2025).

A formação da CP pode ocorrer de duas formas distintas: corona mole e corona dura. A corona dura é formada por proteínas de alta afinidade, ligadas diretamente ao NM. Já a corona mole é formada por proteínas altamente móveis, com ligações mais fracas, provenientes de interações entre as proteínas que a compõem e aquelas presentes na corona dura (Northwick e Carlson, 2025).

A presença da CP em NMs influencia diretamente sua toxicidade, podendo promover a agregação de partículas, aumentar a concentração efetiva do NM ou favorecer sua retenção em determinadas regiões do ambiente, alterando sua distribuição. A CP pode facilitar a dessorção e solubilização de metais pesados

presentes nos NMs, modificando sua toxicidade. Por outro lado, a presença de CP também pode facilitar a internalização celular de NMs e permitir que alcancem organelas ou o DNA, intensificando seus efeitos tóxicos (Northwick e Carlson, 2025).

2. JUSTIFICATIVA

Com o aumento do uso e da incorporação de novos NMs em diferentes setores tecnológicos e industriais, torna-se indispensável o avanço dos estudos em nanotoxicologia, a fim de garantir a aplicação segura desses materiais e prevenir potenciais danos à saúde humana, animal e ao meio ambiente. No caso do NM GO, variações no processo de síntese podem resultar em alterações significativas no grau de oxidação, refletindo diretamente em mudanças estruturais, na distribuição de grupos funcionais oxigenados e, conseqüentemente, na forma como o material interage com sistemas biológicos. Tais modificações influenciam parâmetros críticos, como estabilidade coloidal, biodisponibilidade, internalização celular e respostas biológicas associadas à exposição. Além disso, o GO apresenta caráter anfipático, o que lhe confere a capacidade de interagir tanto com moléculas polares quanto apolares, ampliando seu espectro de aplicações, mas também potencializando sua interação com componentes celulares, biomoléculas e membranas biológicas. Assim, a compreensão integrada das propriedades físico-químicas do GO e de seus efeitos biológicos é fundamental para a avaliação de riscos e para o desenvolvimento de estratégias que assegurem seu uso responsável e seguro.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a nanotoxicidade do GO de interesse da indústria petrolífera, considerando suas características físico-químicas e as respostas biológicas em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, visando contribuir para a avaliação de potenciais riscos à saúde associados à sua exposição.

3.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste estudo foram:

- Caracterizar físico-quimicamente o GO em diferentes meios de dispersão;
- Avaliar a citotoxicidade de GO em hepatócitos humanos (HepG2) por meio de ensaio de viabilidade celular;
- Monitorar parâmetros gerais de toxicidade sistêmica *in vivo* decorrentes da exposição ao GO, incluindo o consumo de água e ração, bem como variações no peso corporal de camundongos BALB/c;
- Realizar a análise leucocitária em amostras de sangue, lavado broncoalveolar (LBA) e do lavado da cavidade peritoneal (LCP);
- Quantificar as citocinas TNF, IFN- γ e IL-6 em amostras de plasma sanguíneo, LBA e LCP;
- Avaliar a função hepática por meio da dosagem das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) em amostras plasmáticas;
- Avaliar alterações no peso relativo dos pulmões e do fígado entre os grupos experimentais;
- Avaliar alterações histopatológicas, incluindo a presença de GO e de infiltrado inflamatório, nos tecidos de pulmão, fígado, baço e rim.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Óxido de grafeno (GO)

O GO foi fornecido para este estudo pelo Centro de Pesquisas Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES/Petrobras). O GO foi disperso em água ultrapura estéril e submetido duas vezes à sonicação a 10% de amplitude por 1 min, com intervalos de 1 s. A partir dessa dispersão aquosa, alíquotas foram diluídas em *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) ou em salina 0,9% (m/v), sendo então utilizadas nos experimentos de caracterização e nos ensaios de toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

4.2 Caracterização do GO

4.2.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR-FTIR)

A composição química superficial do GO foi analisada por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR-FTIR), utilizando um espectrômetro Bruker Alpha-P (Bruker, Billerica, MA, EUA) equipado com cristal de diamante com janela de 4 mm² do Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais da Universidade Federal de Minas Gerais (DEMET-UFMG). As análises foram realizadas com resolução espectral de 4 cm⁻¹ e aquisição de 128 varreduras entre 450 e 4000 cm⁻¹. As amostras foram analisadas na fase sólida, e os dados espectrais obtidos foram processados utilizando o software OMNIC 8.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), visando à identificação das bandas características em número de onda.

4.2.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A análise termogravimétrica (TGA) foi realizada visando identificar as porcentagens de elementos oxigenados presentes na amostra. O GO em fase sólida foi adicionado a um cadinho de platina (massa inicial: 5,8 mg). Para essa análise foi utilizado o equipamento EXSTAR TG/DTA 7200 (SII NanoTechnology Inc., Chiba,

Japão) do Laboratório de Polímeros e Compósitos (LEPCom-DEMET-UFMG). As medições foram realizadas sob atmosfera de nitrogênio (N₂) (fluxo de 20 mL/min), com aquecimento de 25 a 800 °C a uma taxa de 10 °C/min. O software Origin (versão 9.6.5; OriginLab, Northampton, MA, EUA) foi utilizado para analisar os dados.

4.2.3 Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersidade (Pdl) e potencial zeta (PZ)

O diâmetro hidrodinâmico (DH) e o índice de polidispersidade (Pdl) do GO foram determinadas por espalhamento dinâmico da luz (DLS). A carga superficial foi determinada por análise de potencial zeta (PZ). O equipamento utilizado foi o Zeta PALS Zeta Potential Analyzer (Brookhaven Instruments, Holtsville, NY, EUA), disponível no LEPCom-DEMET-UFMG. As medições foram realizadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h, sendo conduzidas em água ultrapura (viscosidade = 0,8872 cP; índice de refração = 1,330), solução salina (viscosidade = 1,0 cP; índice de refração = 1,334) e DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (viscosidade = 0,9400 cP; índice de refração = 1,338). Para cada tempo experimental, as análises de DH e Pdl foram realizadas em quintuplicata, enquanto as medições de PZ foram realizadas em decuplicata. A concentração de GO em todas as dispersões foi de 1 µg/mL.

4.2.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

O GO disperso em água ultrapura ou em DMEM foi seco sobre suportes de alumínio (*Stubs*) para análise do tamanho por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As imagens foram obtidas utilizando um microscópio Inspect S50 (FEI Company, Eindhoven, Holanda), no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura (LABMEV-DEMET-UFMG). As imagens foram feitas com aceleração de elétrons de 10 a 15 Kv e magnitude de 600 x por detecção de elétrons secundários. O tamanho das partículas foi determinado a partir das imagens através do cálculo do diâmetro circular equivalente (DCE). A área das partículas foi calculada utilizando o software ImageJ (versão 1.54i; National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), e o software Origin foi utilizado para o cálculo do DCE e para a obtenção dos gráficos de distribuição de tamanho (Chemello et al., 2025; OECD, 2023).

4.3 Avaliação da citotoxicidade de GO

A análise da citotoxicidade do GO foi realizada por meio do ensaio de viabilidade celular utilizando o método de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo (MTT) (Mosmann, 1983). O ensaio foi realizado com a linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) em placas de microtitulação de 96 poços, contendo 1×10^4 células/poço. As células foram incubadas durante 24 h a 37 °C e 5% CO₂ em meio DMEM suplementado com 10% SFB, 2 mM L-glutamina e 1% penicilina/Estreptomicina) para a adesão das células à superfície dos poços. Em seguida o meio foi substituído por um novo contendo GO nas concentrações de 5, 10, 50, 100, 250 ou 500 µg/mL. Como branco, foram utilizadas soluções nas mesmas condições experimentais, porém na ausência de células, enquanto o controle negativo (C-) consistiu em células mantidas nas mesmas condições, sem adição de GO. As placas foram incubadas por 24, 48 ou 72 h. Após a exposição, as células foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (Composição: 8,0 g/L de NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,43 g/L de Na₂HPO₄ e 0,2 g/L KH₂PO₄) para remover o GO residual e evitar interferências na redução do MTT e nas medições espectrofotométricas. Em seguida, foram adicionados 100 µL de solução de MTT (0,5 mg/mL – Sigma Aldrich), com incubação por 4 h. Os cristais de formazan formados foram solubilizados com 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a absorbância (abs.) foi determinada a 570 nm em espectrofotômetro de microplacas Multiskan GO (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A viabilidade celular foi expressa em relação ao C-, considerado como 100%:

$$\text{viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{abs. da amostra} - \text{média abs. do branco (GO)}}{\text{média abs. do controle negativo} - \text{média abs. do branco}} \times 100$$

4.4 Animais

Camundongos fêmeas da linhagem BALB/c (*Mus musculus*) foram utilizados no estudo de toxicidade *in vivo*. Os animais foram recebidos com 6 semanas do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP) e aclimatados no Biotério Experimental do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Os

camundongos foram mantidos em isoladores ventilados (ALESCO, São Paulo, SP, BR) sob condições padronizadas: acesso *ad libitum* à água e ração para roedores, temperatura de 23 °C e ciclo claro/escuro controlado de 12 h. Os procedimentos experimentais envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais sob o protocolo CEUA: nº 1443040320 (ANEXO B).

4.5 Exposição dos animais ao GO

Os camundongos (idade: 8 semanas) foram expostos ao GO por via intraperitoneal em 4 ocasiões, com intervalos de três dias entre as administrações (dias 1, 4, 7 e 10), sendo administrados 200 µL da dispersão de GO em solução salina (0,9%) por animal. Os camundongos foram distribuídos em cinco grupos experimentais: um grupo C-, que recebeu apenas solução salina (0,9%), e quatro grupos expostos ao GO em diferentes doses: 5, 12,5, 25 e 50 mg/kg. Foi realizado um experimento independente, com 6 camundongos por grupo.

4.6 Monitoramento do consumo de ração e água e do peso corporal dos animais

O peso corporal dos animais, assim como a ingestão de ração e água, foi monitorado ao longo do período de exposição ao NM. No primeiro dia do experimento, a quantidade de ração destinada a cada grupo foi pesada (variando entre 100 e 110 g) e disponibilizada *ad libitum*, juntamente com 300 mL de água. O consumo de ração e água foi registrado em intervalos regulares entre os dias 1 e 4, 4 e 7, 7 e 10 e 10 e 13, com reposição das quantidades após cada medição. O peso corporal dos animais foi registrado no dia 1, antes do início da exposição ao NM, e posteriormente nos dias 7 e 13 do experimento.

4.7 Coleta de sangue, LCP e LBA e análise leucocitária dos animais

Após 14 dias, os animais foram anestesiados por administração intraperitoneal de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), e a eutanásia foi realizada por exsanguinação total. O sangue foi coletado por meio de punção da veia braquial esquerda e transferido para tubos contendo o anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) a 10% (m/v). Para obtenção do lavado

broncoalveolar (LBA) e do lavado da cavidade peritoneal (LCP), foram usados, respectivamente, 1 mL e 3 mL de PBS contendo 0,5% de citrato de sódio.

As contagens de leucócitos totais no sangue, LBA e LCP foram realizadas em câmara de Neubauer, após diluição em solução de Turk (1:20) (Composição: ácido acético glacial 3%, cristal violeta 0,01%). As contagens diferenciais de leucócitos foram realizadas em lâminas de esfregaço sanguíneo e em lâminas de LBA e LCP, estas últimas obtidas por citocentrifugação a 1500 rpm por 3 min utilizando o equipamento Serocito® 2400 (FANEM, São Paulo, SP, BR). A coloração das lâminas foi realizada utilizando o kit de Panótico Rápido (Laborclin, Pinhais, PR, BR).

Para obtenção do plasma sanguíneo ou dos sobrenadantes de LBA e LCP, utilizados nos ensaios descritos abaixo, as amostras coletadas foram centrifugadas a 1500 rpm por 15 min (Heraeus Megafuge 16R, Thermo Scientific, Osterode am Harz, Alemanha).

4.8 Quantificação de citocinas

Foram dosadas as citocinas TNF (fator de necrose tumoral), IFN- γ (interferon gama) e IL-6 (interleucina-6) nas amostras de plasma sanguíneo e nos sobrenadantes de LBA e LCP, por meio do método de ensaio imunoenzimático (ELISA) do tipo sanduíche, em placas de 96 poços, seguindo as instruções do fabricante (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, EUA). A leitura da absorbância foi realizada no comprimento de onda de 450 nm, utilizando o leitor de placas MultiSkan GO. As concentrações foram determinadas em pg/mL com base na curva padrão gerada para cada analito.

4.9 Determinação das atividades séricas das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)

As atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) foram determinadas em amostras de plasma sanguíneo, utilizando kits comerciais (LabTest, Lagoa Santa, MG, Brasil), seguindo as instruções do fabricante. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro de microplacas MultiSkan GO, no comprimento de onda de 505 nm. As concentrações enzimáticas (U/mL) foram determinadas com base na curva padrão.

4.10 Avaliação da variação do peso pulmonar e hepático

Ambos os pulmões e o fígado foram pesados após a remoção, a fim de avaliar variações entre os grupos experimentais. O peso relativo dos órgãos (%) foi calculado pela razão entre o peso do órgão e o peso corporal do animal, multiplicada por 100.

4.11 Avaliação histológica do pulmão, fígado, baço e rim

Foram realizadas análises histológicas do fígado, baço, rim direito e pulmão direito de três animais por grupo experimental. Após a remoção, os órgãos foram lavados com PBS, secos em papel absorvente e fixados em solução de formol tamponado (4 g de NaH_2PO_4 , 6,5 g de Na_2HPO_4 , 100 mL de formol a 37% e 900 mL de água destilada) por 24 h. Em seguida, os tecidos foram desidratados em séries crescentes de etanol (70% a 100%), diafanizados em xilol e incluídos em blocos de parafina para obtenção dos cortes histológicos. Os cortes foram realizados com espessura de 5 μm e posteriormente corados em lâminas pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas foram digitalizadas no equipamento Panoramic Desk (3D Histech, Budapeste, Hungria), e as microfotografias foram obtidas por meio do software Panoramic Viewer 1.15.4 (3D Histech, Budapeste, Hungria). A análise das lâminas e a emissão dos laudos histopatológicos foram realizadas pela médica veterinária e patologista Dr.^a Mayara Caroline Rosolem (CRMV-SP 28.192).

4.12 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad Prism versão 7 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA, 2018). A normalidade dos dados foi avaliada usando o teste de Shapiro-Wilk. Para os dados paramétricos, empregou-se a análise de variância de um fator (*One-way ANOVA*), seguida do pós-teste de comparações múltiplas de Dunnett, ou a análise de variância de dois fatores (*Two-way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de Tukey. Para os dados não paramétricos, foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn para comparações múltiplas. O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

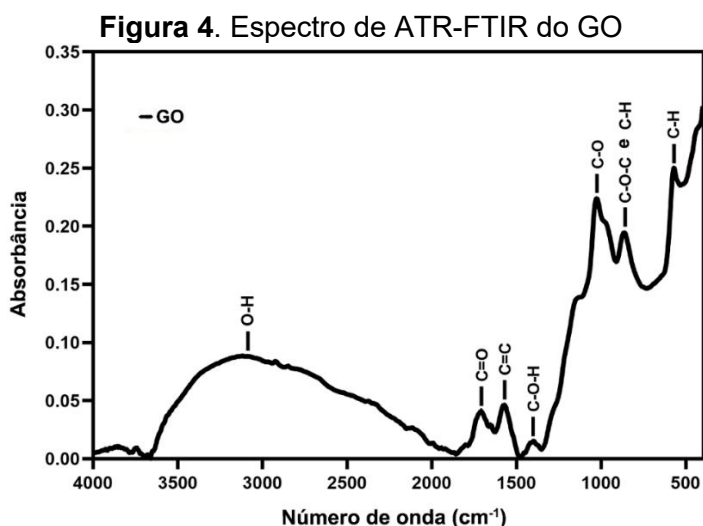
Análises estatísticas dos experimentos *in vitro* e *in vivo* compararam cada grupo com o respectivo C-, usando o C- do mesmo ponto temporal quando mais de um período de tempo foi analisado. O peso corporal foi o único parâmetro avaliado usando comparações intragrupos entre pontos de tempo consecutivos.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do GO

5.1.1 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier com reflectância total atenuada (ATR-FTIR)

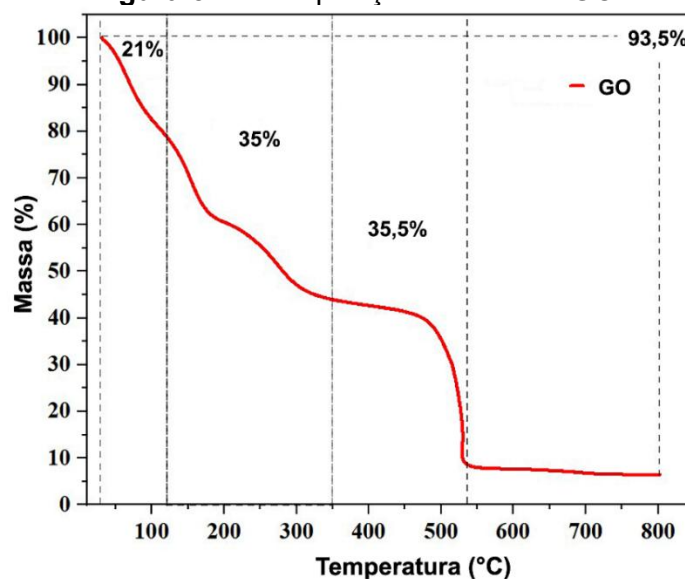
A Figura 4 apresenta a caracterização química do GO por ATR-FTIR, evidenciando bandas de absorção em diferentes regiões de número de onda. Observam-se picos característicos em 569, 862, 1025, 1397, 1569, 1708 e 3117 cm^{-1} , associados a modos vibracionais de grupos funcionais contendo carbono, hidrogênio e oxigênio, conforme detalhado na seção de Discussão.



Espectro obtido por espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier com Reflectância Total Atenuada (ATR-FTIR) do óxido de grafeno (GO), evidenciando bandas de absorção em 569 (C-H), 862 (C-O-C e C-H), 1025 (C-O), 1397 (C-O-H), 1569 (C=C), 1708 (C=O) e 3117 cm^{-1} (O-H). Fonte: Adaptado de Albuquerque et al. (2026).

5.1.2 Análise termogravimétrica (TGA)

A Figura 5 apresenta a análise termogravimétrica (TGA) do GO, evidenciando uma perda total de massa de 93,5% até 800 °C. As perdas de massa foram distribuídas em três principais faixas de temperatura: 31-120 °C (~21%), 120-350 °C (~35%) e 350-535 °C (~35,5%). Acima de 535 °C, o material apresentou maior estabilidade térmica até 800 °C, com perda adicional de massa de ~2%.

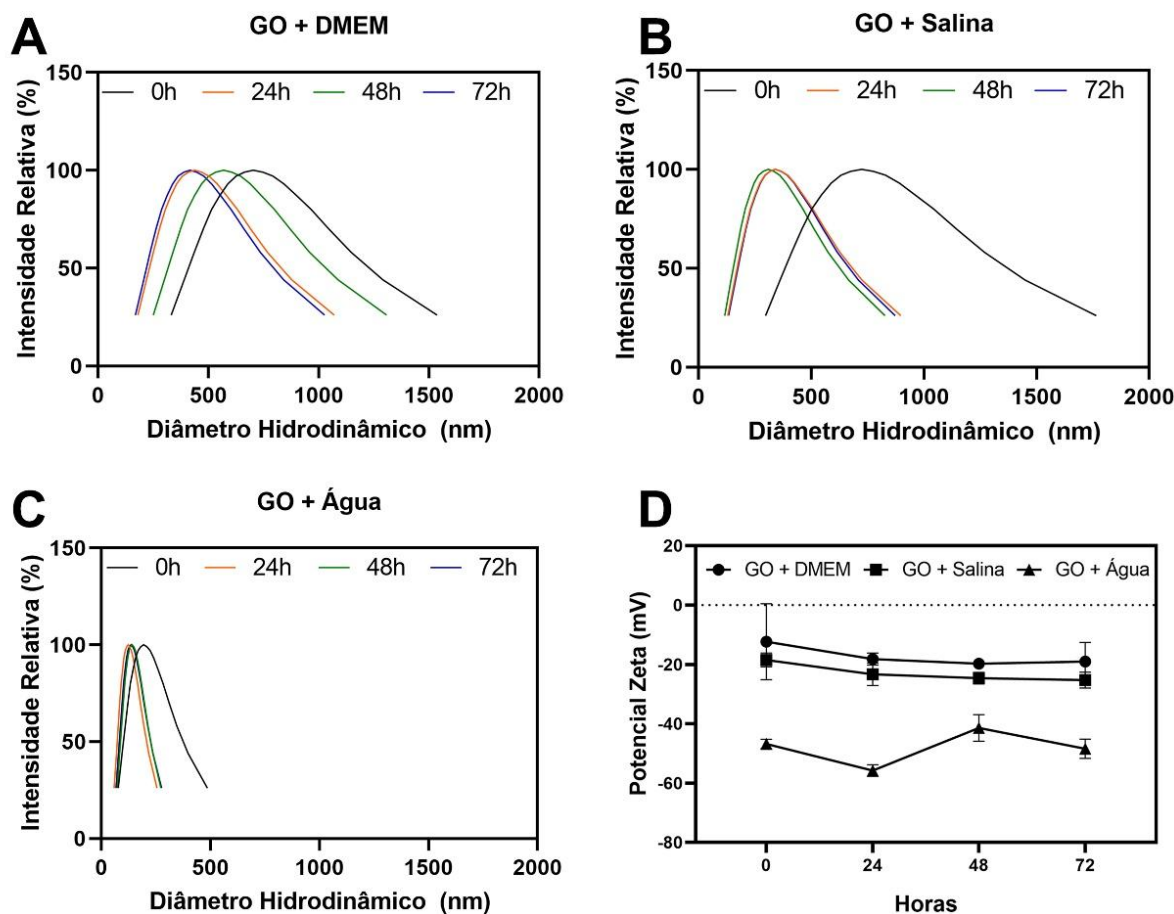
Figura 5. Decomposição térmica do GO

Análise termogravimétrica (TGA) do óxido de grafeno (GO), evidenciando 93,5% de perda de massa em função da temperatura (25-800 °C), sob atmosfera de nitrogênio e taxa de aquecimento de 10 °C/min (massa inicial: 5,8 mg). Observam-se três principais faixas de perda de massa: 31-120 °C (~21%), 120-350 °C (~35%) e 350-535 °C (~35,5%), seguidas de maior estabilidade térmica até 800 °C. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2026).

5.1.3 Diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersidade (Pdl) e potencial zeta (PZ)

A distribuição de tamanho e os valores médios do DH, bem como do Pdl e do PZ do GO disperso em água ultrapura, solução salina (0,9%) e DMEM, estão apresentados na Figura 6. Observou-se redução do DH em todas as dispersões em relação ao tempo inicial (0 h). O GO disperso em água ultrapura apresentou os menores valores de DH ao longo de todo o período experimental. Em solução salina, foram observados os maiores valores de DH apenas no tempo inicial, enquanto nos tempos subsequentes (24, 48 e 72 h), as maiores médias foram observadas para as dispersões em DMEM (Figura 6A-C, E). Valores de Pdl superiores a 0,3, observados para GO em DMEM e solução salina em todos os tempos avaliados, indicam elevada heterogeneidade na distribuição de tamanho das partículas (Figura 6E) (Filippov et al., 2023). Por outro lado, os valores de Pdl obtidos para GO em água ultrapura ($\geq 0,2$ e $< 0,3$) após 24 h indicam menor heterogeneidade em comparação com as demais dispersões. As medições de PZ indicaram carga superficial negativa para o GO em todas as condições avaliadas, com valores inferiores a -30 mV em água ultrapura e superiores a -30 mV em DMEM e solução salina (Figura 6D-E).

Figura 6. DH, Pdl e PZ do GO em diferentes meios de dispersão ao longo do tempo



E

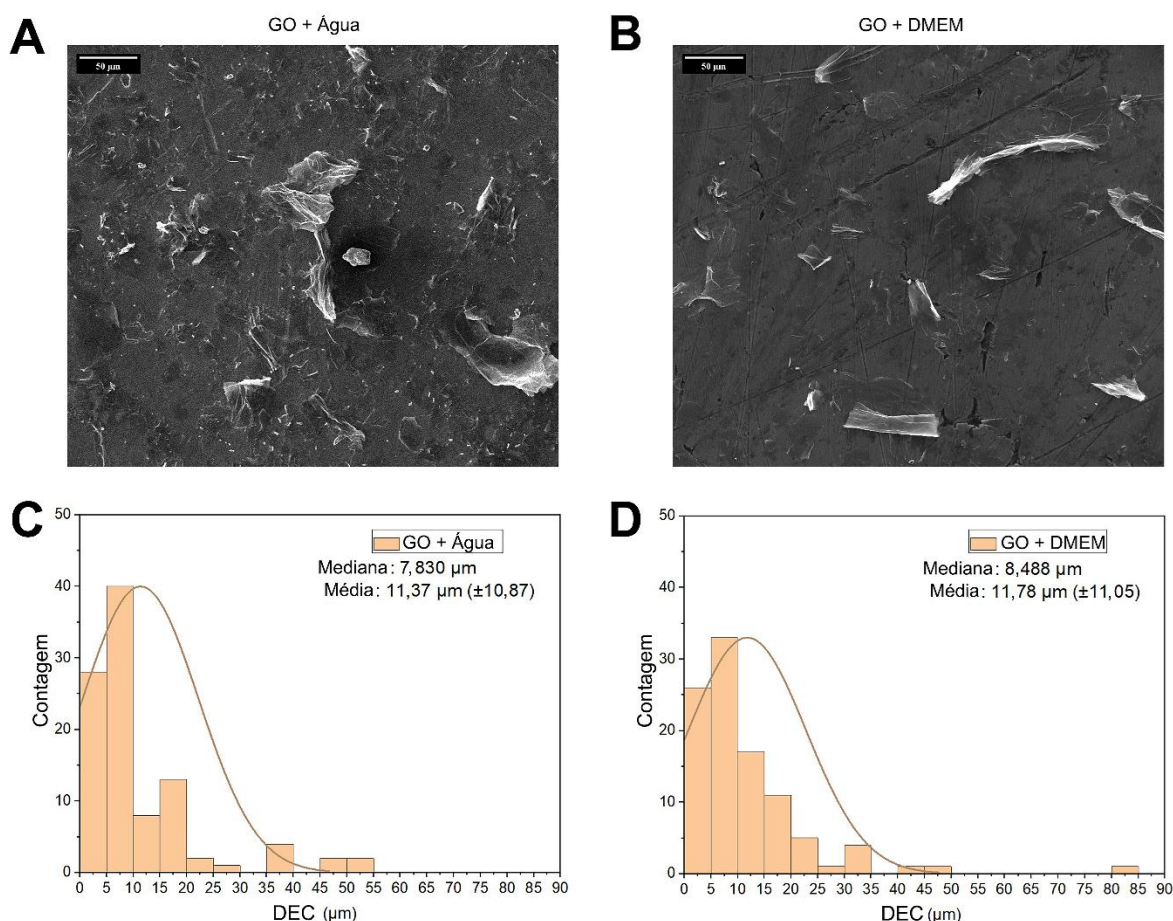
		0h	24h	48h	72h
GO + DMEM	DH (nm)	789,9 ± 323,90	508,2 ± 127,90	575,7 ± 198,90	484,7 ± 79,11
	Pdl	0,326 ± 0,1206	0,378 ± 0,0685	0,333 ± 0,0957	0,372 ± 0,0257
	PZ (mV)	-12,35 ± 12,830	-18,21 ± 2,022	-19,74 ± 0,904	-19,08 ± 6,441
GO + Salina	DH (nm)	817,6 ± 180,70	393,9 ± 121,00	370,3 ± 82,74	401,3 ± 124,60
	Pdl	0,367 ± 0,0340	0,434 ± 0,0184	0,447 ± 0,0360	0,408 ± 0,0417
	ZP (mV)	-18,50 ± 2,303	-23,33 ± 3,777	-24,62 ± 1,967	-25,30 ± 2,651
GO + Água	DH (nm)	226,9 ± 55,64	135,5 ± 8,21	152,4 ± 13,10	149,3 ± 12,01
	Pdl	0,386 ± 0,0535	0,241 ± 0,0234	0,200 ± 0,0203	0,209 ± 0,0553
	PZ (mV)	-46,82 ± 1,555	-55,77 ± 1,959	-41,40 ± 4,471	-48,43 ± 3,240

Distribuição dos valores de diâmetro hidrodinâmico (DH) obtida por espalhamento dinâmico da luz (DLS) do óxido de grafeno (GO), nas dispersões em **(A)** DMEM, **(B)** salina (0,9%) e **(C)** água ultrapura, analisadas nos tempos de 0, 24, 48 e 72 h. **(D)** Potencial zeta (PZ) (média ± DP) do GO disperso nos diferentes meios e tempos avaliados. **(E)** Tabela contendo os valores (média ± DP) do DH, índice de polidispersidade (Pdl) e PZ de GO nas diferentes condições experimentais. Observa-se comportamento dependente do meio de dispersão, com menores valores de DH e maior estabilidade coloidal em água ultrapura, enquanto dispersões em DMEM e solução salina apresentam maior heterogeneidade de tamanho e menor estabilidade coloidal. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2026).

5.1.4 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A Figura 7A-B revelou a morfologia 2D típica do GO, caracterizada por folhas finas e enrugadas com bordas irregulares. As amostras secas, previamente dispersas em água ultrapura ou DMEM, apresentam ampla distribuição do DCE (Figura 7C-D), obtido a partir de imagens de MEV, com predominância de folhas com DCE inferior a 10 μm (68% em água ultrapura e 59% em DMEM). Em água ultrapura, as folhas apresentam média de DCE de 11,37 μm e mediana de 7,830 μm , enquanto em DMEM observam-se valores médios de 11,78 μm e mediana de 8,488 μm (Figura 7C–D).

Figura 7. Morfologia e distribuição do DCE das folhas de GO por MEV

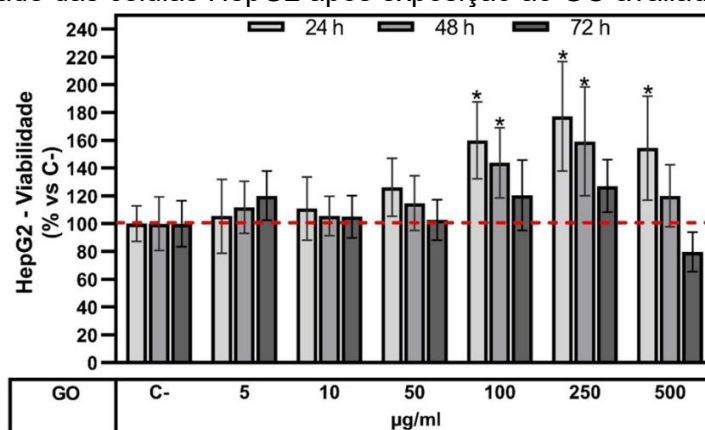


Imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) do óxido de grafeno (GO) disperso em (A) água ultrapura e (B) DMEM. Distribuição do diâmetro circular equivalente (DCE) das folhas de GO, determinada a partir das imagens de MEV, indicando mediana e média \pm DP para as dispersões em (C) água ultrapura e (D) DMEM. Observa-se morfologia bidimensional típica, com folhas finas e enrugadas, além de ampla distribuição de tamanho, com predominância de partículas com DCE inferior a 10 μm em ambas as condições. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2026).

5.2 Avaliação da citotoxicidade de GO

A Figura 8 apresenta os resultados da avaliação de citotoxicidade por meio do ensaio MTT. Os dados demonstram que a exposição ao GO promoveu aumento significativo da atividade metabólica mitocondrial em células HepG2 após 24 e 48 h. Após 24 h, observaram-se alterações na atividade metabólica nas concentrações de 100, 250 e 500 µg/mL. Esse efeito manteve-se no período de 48 h nas concentrações de 100 e 250 µg/mL.

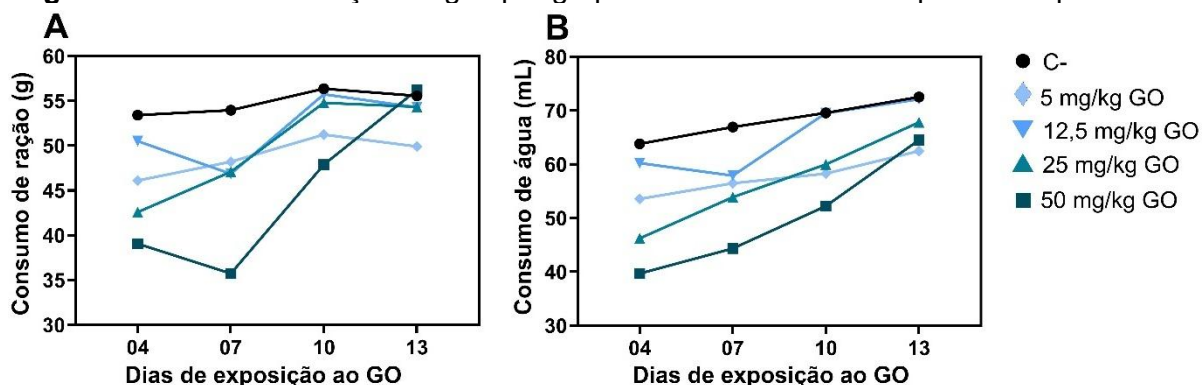
Figura 8. Viabilidade das células HepG2 após exposição ao GO avaliada pelo ensaio MTT



Viabilidade de células HepG2 (média \pm DP) após exposição ao óxido de grafeno (GO) por 24, 48 e 72 h. A linha vermelha representa 100% de viabilidade em relação ao controle negativo (C-). * Indica diferença significativa em relação ao C- no respectivo tempo experimental, conforme determinado pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). Observa-se aumento da atividade metabólica mitocondrial em determinadas concentrações e tempos de exposição, sugerindo resposta celular adaptativa ao GO. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2026).

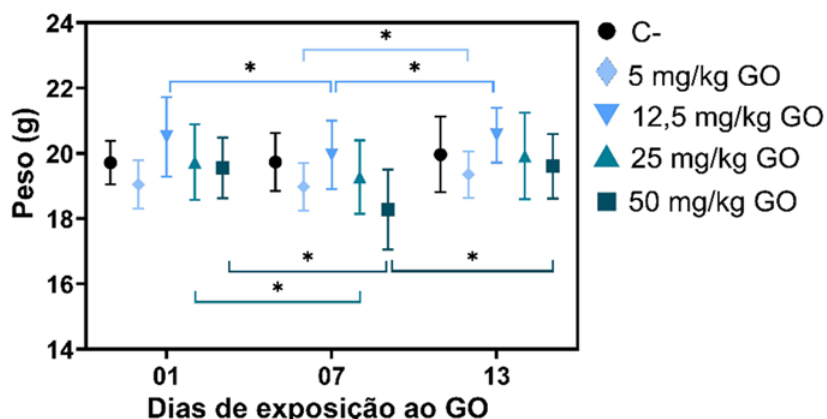
5.3 Monitoramento do consumo de ração e água e do peso corporal dos animais

Entre os dias 1 e 4, observou-se que quanto maior a dose administrada de GO, menor a ingestão de ração e água (Figura 9). Entre os dias 4 e 7, os grupos expostos a 5, 12,5 e 25 mg/kg apresentaram consumo semelhante entre si, embora ainda inferior ao grupo controle negativo (C-). Em contraste, o grupo exposto a 50 mg/kg apresentou redução adicional no consumo de ração (dias 4 a 7) em relação ao período anterior (dias 1 a 4), além de menor ingestão de água quando comparado aos demais grupos. Entre os dias 7 e 13, todos os grupos expostos ao GO apresentaram aumento na ingestão de ração e água, aproximando-se dos níveis do grupo C-, acompanhado de recuperação do peso corporal.

Figura 9. Consumo de ração e água por grupo de animais durante o período experimental

Consumo de **(A)** ração (g) e **(B)** água (mL) dos grupos experimentais expostos a diferentes doses de óxido de grafeno (GO), durante o período de 13 dias, em um experimento *in vivo* independente. Observa-se redução do consumo nos grupos expostos ao GO, especialmente nas maiores doses, com tendência de recuperação ao longo do tempo. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2026).

A Figura 10 apresenta o peso corporal dos animais nos dias 1, 7 e 13 do período experimental. Os grupos expostos ao GO nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg apresentaram redução do peso corporal entre os dias 1 e 7. O grupo de 50 mg/kg exibiu a redução mais pronunciada, em concordância com o menor consumo observado no mesmo período. Entre os dias 7 e 13, o peso corporal dos animais expostos ao GO apresentou recuperação.

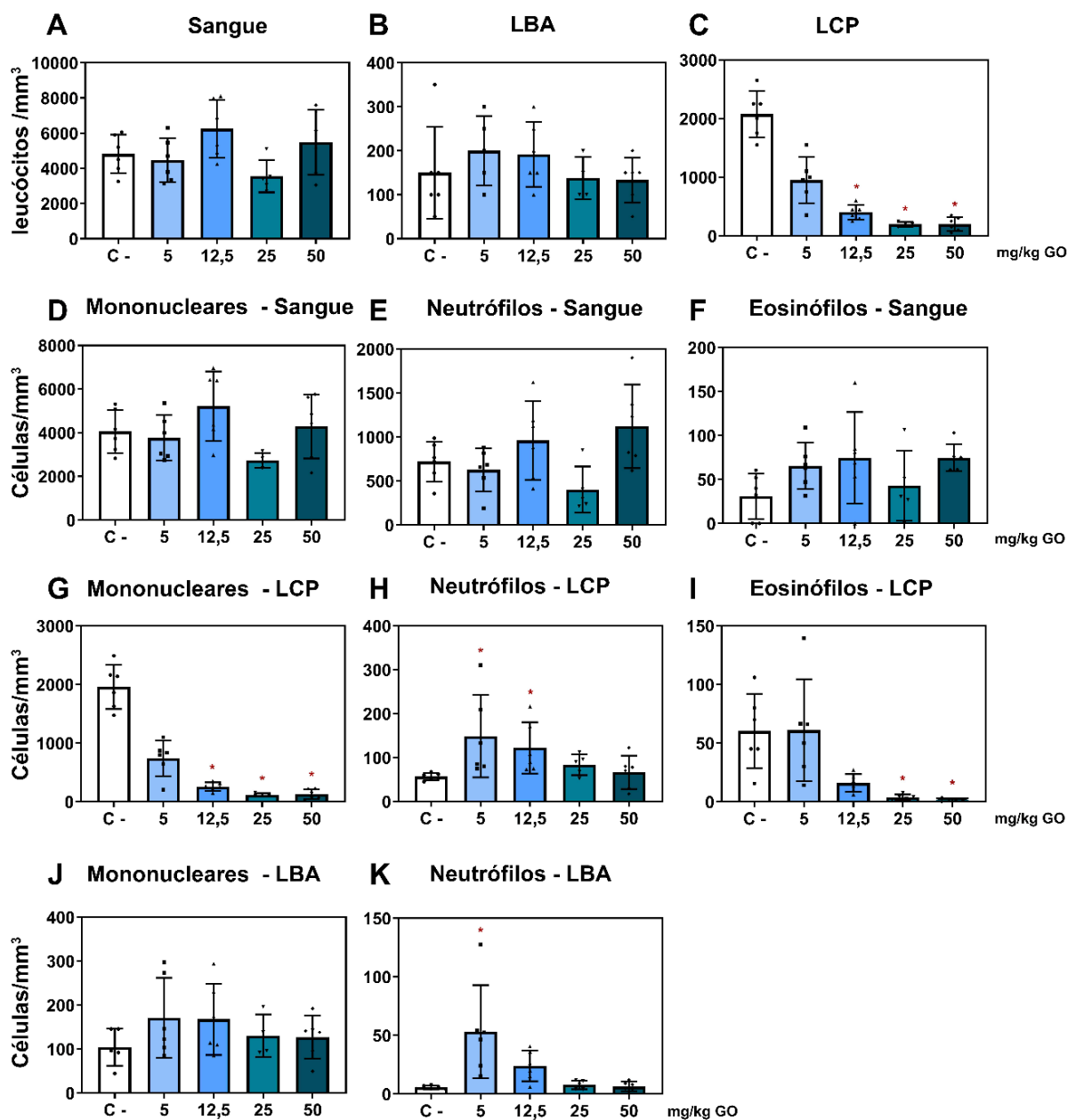
Figura 10. Peso corporal dos animais durante o período experimental

Peso corporal dos animais (média \pm DP) nos grupos experimentais ($n = 6$) expostos a diferentes doses de óxido de grafeno (GO), avaliado nos dias 1, 7 e 13 do período experimental, em um experimento *in vivo* independente. * Indica diferença significativa entre os tempos dentro do mesmo grupo, conforme determinado por análise de variância (ANOVA) de dois fatores, seguida do pós-teste de Tukey ($p < 0,05$). Observa-se redução do peso corporal nos grupos expostos ao GO, especialmente nas maiores doses, com recuperação ao longo do tempo. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2026).

5.4 Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue, LBA e LCP

A Figura 11 apresenta dados de contagem total e diferencial de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares) no sangue, LBA e LCP. No sangue (Figura 11A) e no LBA (Figura 11B), não foram observadas diferenças significativas na contagem total de leucócitos. Em contraste, o LCP dos animais expostos às três maiores doses de GO (12,5, 25 e 50 mg/kg) (Figura 11C) apresentou redução significativa na contagem total de leucócitos em comparação com o grupo C-.

As contagens diferenciais de leucócitos no sangue (Figura 11D-F) não apresentaram diferenças significativas. No entanto, observou-se aumento significativo de neutrófilos no LCP (5 e 12,5 mg/kg) (Figura 11H) e no LBA (Figura 11K) (5 mg/kg). Adicionalmente, foram observadas reduções significativas de células mononucleares (Figura 11G) (12,5, 25 e 50 mg/kg) e eosinófilos (Figura 11I) (25 e 50 mg/kg) no LCP. Não foram observadas diferenças significativas na contagem de células mononucleares no LBA (Figura 11J).

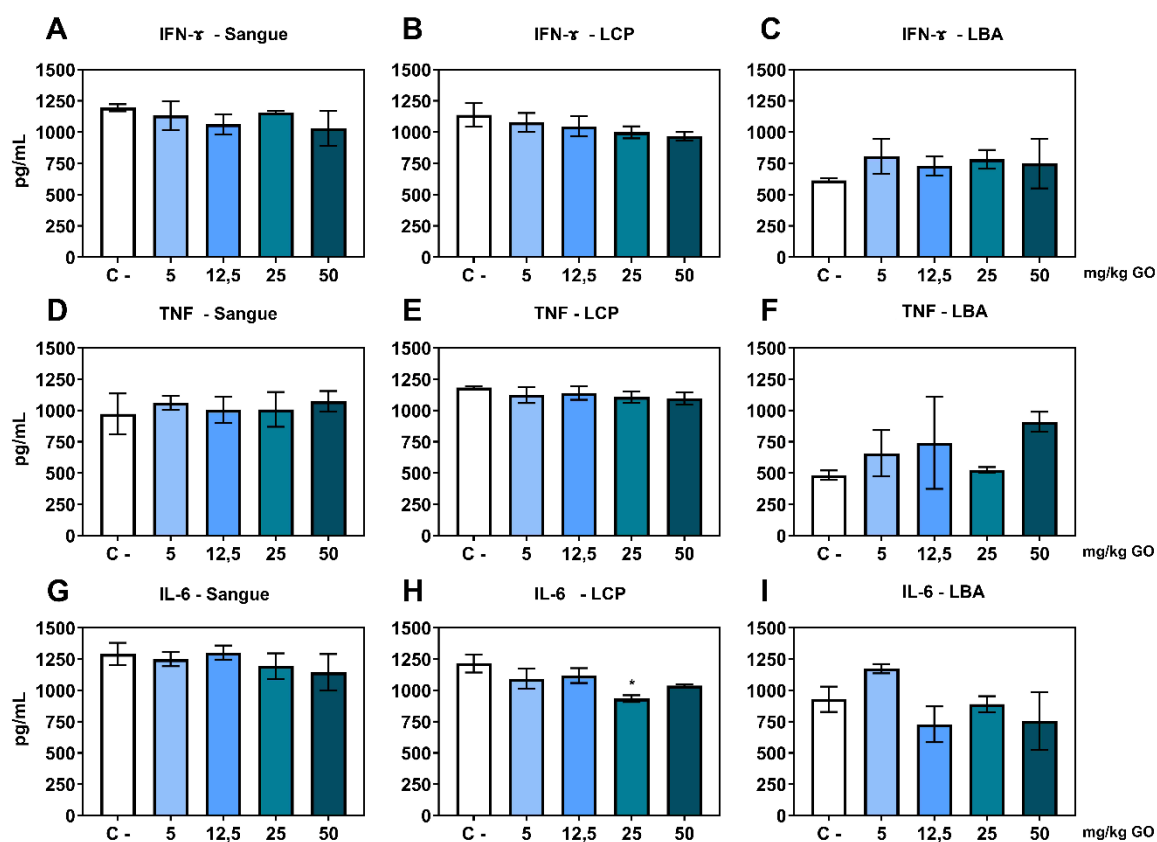
Figura 11. Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue, LBA e LCP

Contagem total de leucócitos no (A) sangue, no (B) lavado broncoalveolar (LBA) e no (C) lavado da cavidade peritoneal (LCP), e contagem diferencial de leucócitos (mononucleares, neutrófilos e eosinófilos) no sangue (D-F), no LCP (G-I) e no LBA (J-K), em um experimento *in vivo* independente. Os dados são expressos como média \pm DP dos grupos experimentais expostos a diferentes doses de óxido de grafeno (GO) por 14 dias. Para dados paramétricos (A, B, D, E, F e J), utilizou-se análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Dunnett; para dados não paramétricos (C, G, H, I e K), empregou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). * Indica diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo (C-). Observam-se alterações predominantes no LCP, com redução de leucócitos totais e mudanças na população de células inflamatórias. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2026).

5.5 Quantificação de citocinas

A Figura 12 apresenta os níveis das citocinas IFN- γ , TNF e IL-6 nas amostras de plasma sanguíneo, LCP e LBA. De modo geral, não foram observadas diferenças significativas nos níveis dessas citocinas entre os grupos experimentais. No entanto, observou-se redução significativa dos níveis de IL-6 no LCP no grupo exposto ao GO na dose de 25 mg/kg.

Figura 12. Concentração de citocinas no plasma sanguíneo, LCP e LBA

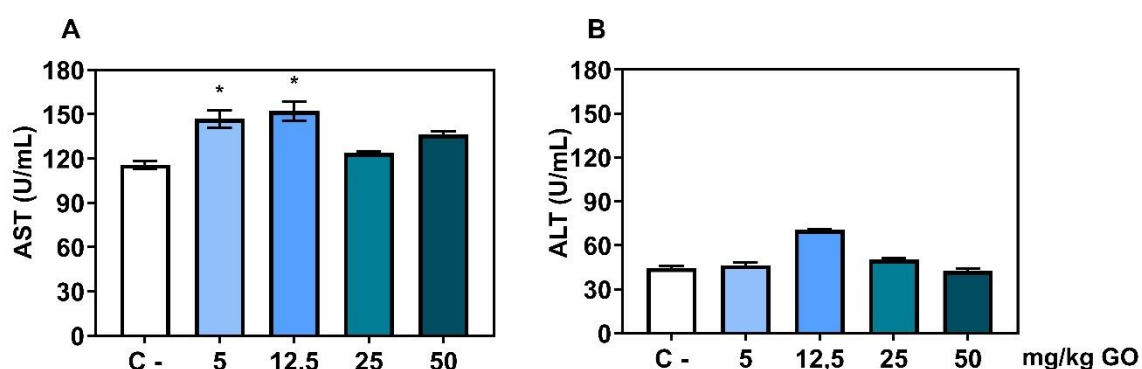


Concentrações (pg/mL) de **(A–C)** IFN- γ , **(D–F)** TNF e **(G–I)** IL-6 no plasma sanguíneo, no lavado da cavidade peritoneal (LCP) e no lavado broncoalveolar (LBA) de animais expostos ao óxido de grafeno (GO) por 14 dias. Os dados são apresentados como média \pm DP ($n = 6$), referentes a um experimento *in vivo* independente. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). * Indica diferença significativa em relação ao grupo controle negativo (C-). De modo geral, não foram observadas alterações significativas nos níveis das citocinas, exceto por redução de IL-6 no LCP em uma das condições experimentais. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2026).

5.6 Atividades séricas das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT)

A Figura 13 apresenta as atividades séricas das enzimas AST e ALT em animais após exposição a diferentes doses de GO. Observou-se aumento significativo da atividade da AST nos grupos expostos a 5 e 12,5 mg/kg em comparação ao grupo C-. Para a ALT, não foram observadas diferenças significativas.

Figura 13. Atividades séricas das enzimas AST e ALT

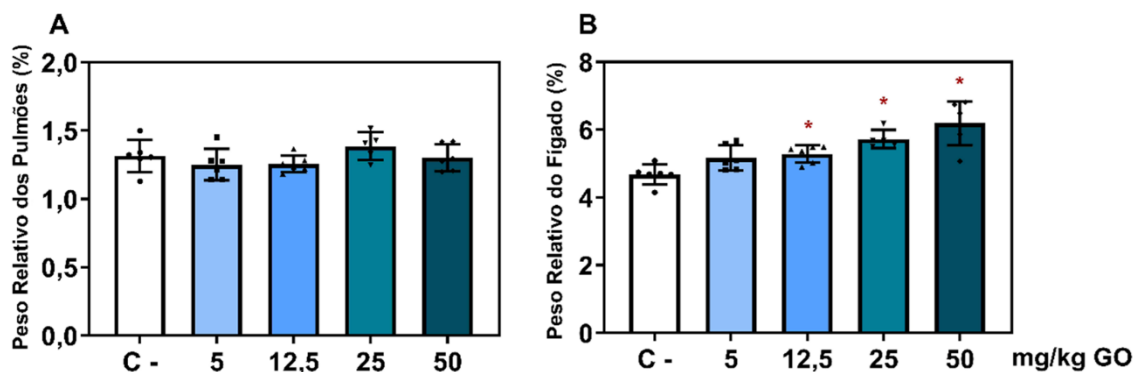


Atividade das enzimas séricas **(A)** aspartato aminotransferase (AST) e **(B)** alanina aminotransferase (ALT) dos animais expostos ao óxido de grafeno (GO). Os dados são expressos como média \pm DP ($n = 6$), referentes a um experimento *in vivo* independente. A análise estatística foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do pós-teste de Dunn ($p < 0,05$). * Indica diferença significativa em relação ao grupo controle negativo (C-). Observa-se aumento da atividade de AST em doses específicas, sem alterações significativas para ALT. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2026).

5.7 Avaliação da variação do peso pulmonar e hepático em animais

A Figura 14 apresenta o peso relativo (%) dos pulmões e do fígado em relação ao peso corporal dos animais. Não foram observadas diferenças significativas no peso pulmonar (Figura 14A) entre os grupos expostos ao GO e o grupo controle (C-). Em contraste, observou-se aumento do peso hepático (Figura 14B) nos animais expostos ao GO, exceto no grupo tratado com a menor dose (5 mg/kg).

Figura 14. Peso relativo dos órgãos dos animais expostos ao GO

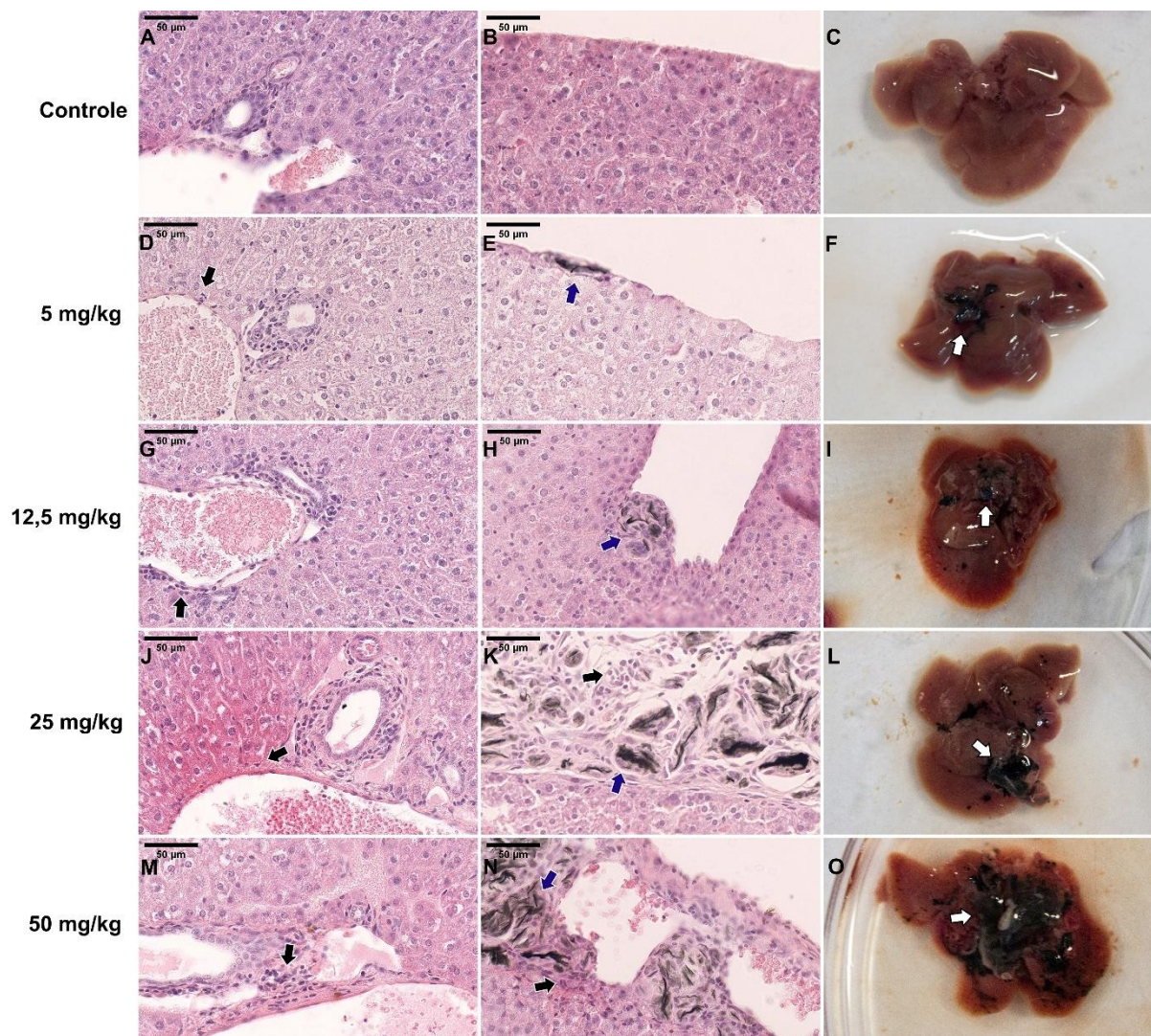


Peso relativo (%) dos **(A)** pulmões e do **(B)** fígado de animais expostos ao óxido de grafeno (GO). Os dados são expressos como média \pm DP ($n = 6$), referentes a um experimento *in vivo* independente. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do pós-teste de Dunnett ($p < 0,05$). * Indica diferença significativa em relação ao grupo controle negativo (C-). Observa-se aumento do peso hepático nos grupos expostos ao GO, sem alterações significativas no peso pulmonar. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2026).

5.8 Histologia

O exame histológico de animais expostos ao GO demonstrou múltiplas alterações teciduais em diferentes órgãos. No fígado (Figura 15), foram observadas vasculite periportal e infiltrados inflamatórios em todos os grupos, com presença de depósitos de GO na cápsula de Glisson e regiões adjacentes, mais pronunciados nas doses de 25 e 50 mg/kg. O grupo de 12,5 mg/kg apresentou infiltrado mononuclear focal moderada, enquanto os grupos de 25 e 50 mg/kg apresentaram infiltrado polimorfonuclear focal moderado associado à necrose multifocal. Hemorragia leve foi observada apenas no grupo de 50 mg/kg.

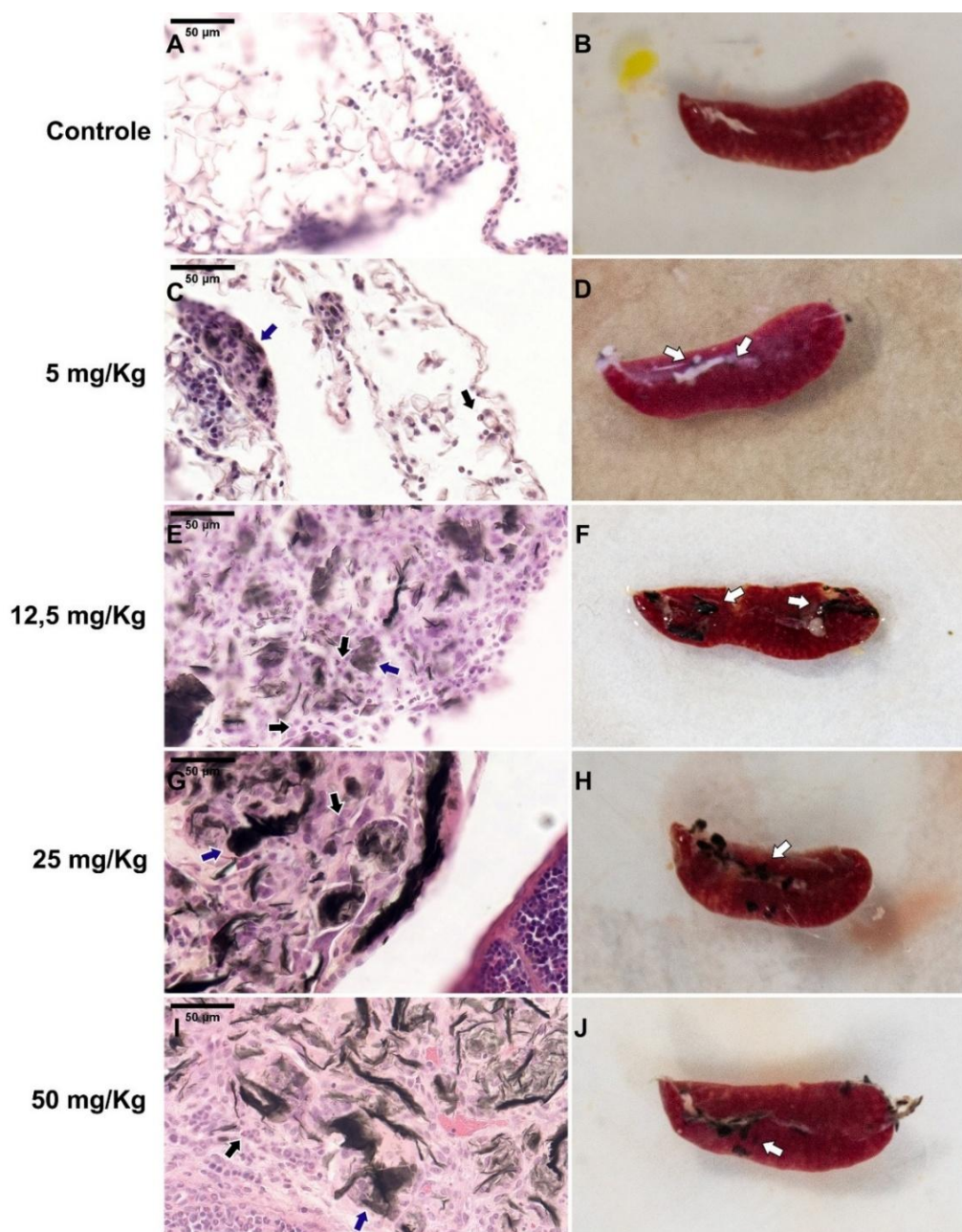
Figura 15. Avaliação histológica do tecido hepático de animais expostos ao GO



Seções histológicas do tecido hepático coradas com hematoxilina e eosina (HE) e imagens macroscópicas do fígado: grupo (A-C) controle e grupos expostos ao óxido de grafeno (GO) nas doses de (D-F) 5 mg/kg, (G-I) 12,5 mg/kg, (J-L) 25 mg/kg e (M-O) 50 mg/kg. Setas pretas indicam alterações histopatológicas e infiltrado inflamatório; setas azuis indicam a presença de GO no corte histológico; e setas brancas indicam a deposição de GO no fígado. Observam-se alterações inflamatórias e acúmulo de GO mais evidentes nas maiores doses, sugerindo efeito dependente da dose. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2026).

No baço (Figura 16), depósitos de GO foram identificados no tecido adiposo adjacente à cápsula esplênica, acompanhados por infiltrado inflamatório nas doses de 5 e 12,5 mg/kg. Nas doses de 25 e 50 mg/kg, observou-se infiltrado inflamatório mais intenso, associado à maior presença de GO aderido à cápsula esplênica.

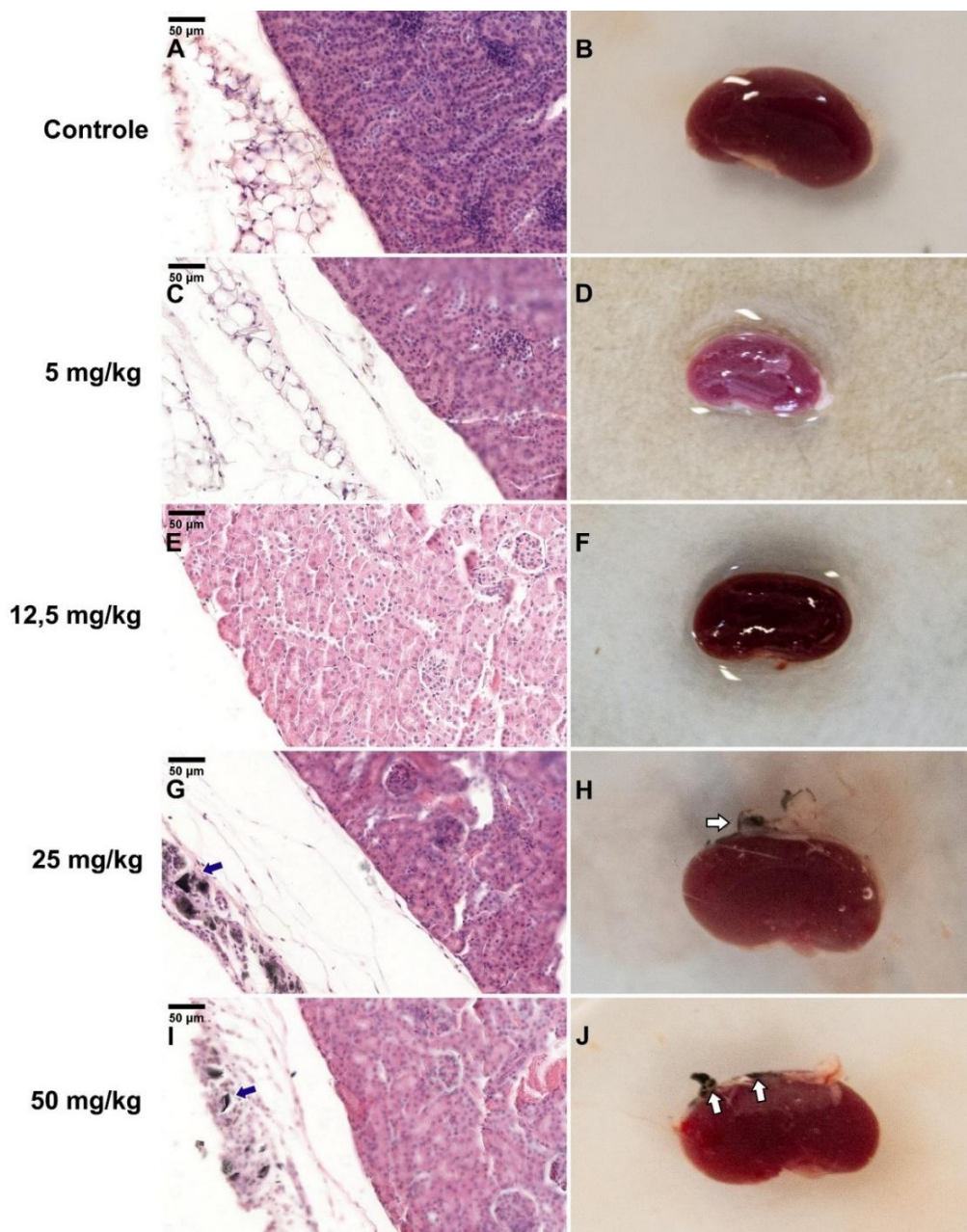
Figura 16. Avaliação histológica do tecido esplênico de animais expostos ao GO



Seções histológicas do tecido esplênico coradas com hematoxilina e eosina (HE) e imagens macroscópicas do baço: grupo (A–B) controle e grupos expostos ao óxido de grafeno (GO) nas doses de (C–D) 5 mg/kg, (E–F) 12,5 mg/kg, (G–H) 25 mg/kg e (I–J) 50 mg/kg. Setas pretas indicam alterações histopatológicas e infiltrado inflamatório; setas azuis indicam a presença de GO no corte histológico; e setas brancas indicam a deposição de GO no baço. Observam-se depósitos de GO no tecido adiposo adjacente e na cápsula esplênica, acompanhados por infiltrado inflamatório. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2026).

Nos rins (Figura 17), não foram observadas alterações histopatológicas significativas nos grupos expostos ao GO. Foi observado a presença de deposição de GO no tecido adiposo adjacente

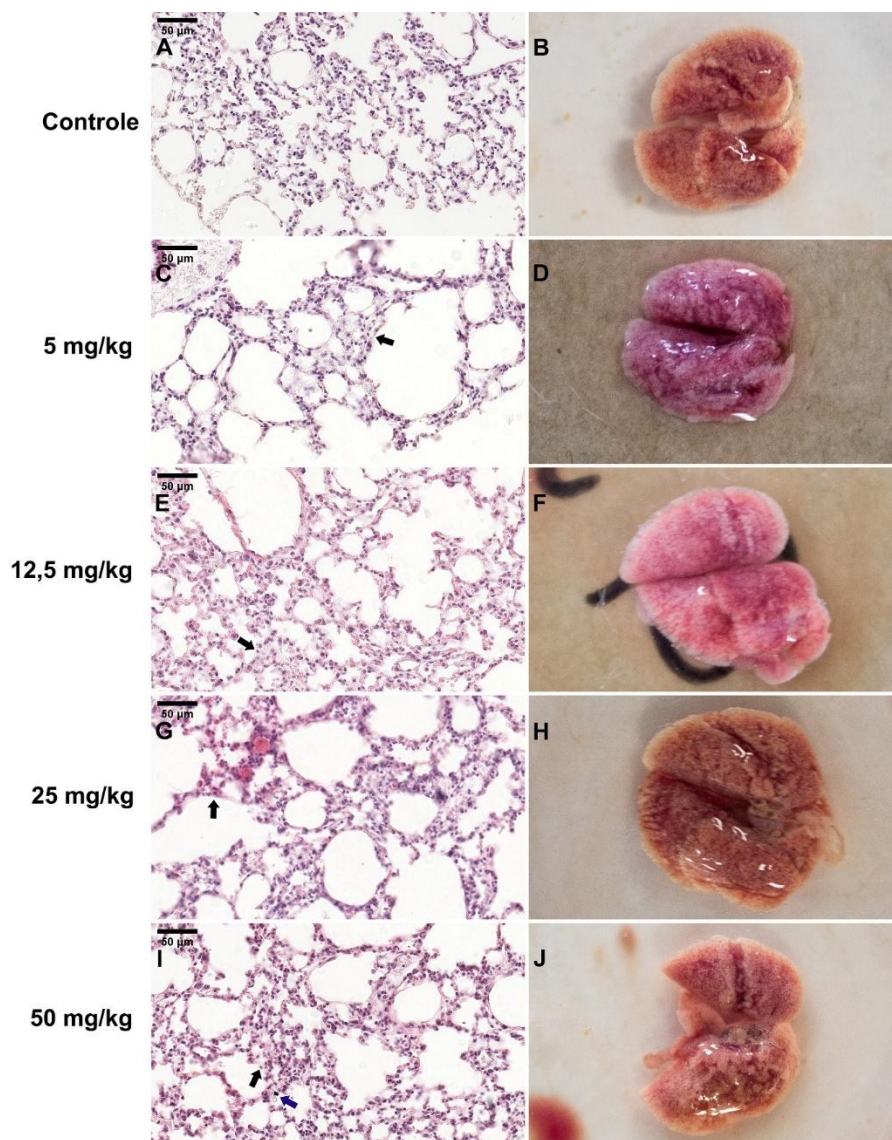
Figura 17. Avaliação histológica do tecido renal de animais expostos ao GO



Seções histológicas do tecido renal coradas com hematoxilina e eosina (HE) e imagens macroscópicas do rim: grupo (A–B) controle e grupos expostos ao óxido de grafeno (GO) nas doses de (C–D) 5 mg/kg, (E–F) 12,5 mg/kg, (G–H) 25 mg/kg e (I–J) 50 mg/kg. Setas azuis indicam a presença de GO no corte histológico; e setas brancas indicam a deposição de GO no rim. Observam-se ausência de alterações histopatológicas significativas e a presença de deposição de GO no tecido adiposo adjacente. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2026).

O pulmão (Figura 18) apresentou atelectasia e leve espessamento dos septos alveolares. Na dose de 12,5 mg/kg, observou-se leve acúmulo de muco na região brônquica, enquanto os grupos de 25 e 50 mg/kg exibiram infiltrados inflamatórios polimorfonucleares e mononucleares leves, distribuídos difusamente pelo tecido, com presença de partículas de GO no grupo exposto à maior dose.

Figura 18. Avaliação histológica do tecido pulmonar de animais expostos ao GO



Seções histológicas do tecido pulmonar coradas com hematoxilina e eosina (HE) e imagens macroscópicas dos pulmões: grupo **(A–B)** controle e grupos expostos ao óxido de grafeno (GO) nas doses de **(C–D)** 5 mg/kg, **(E–F)** 12,5 mg/kg, **(G–H)** 25 mg/kg e **(I–J)** 50 mg/kg. Setas pretas indicam alterações histopatológicas; e setas azuis indicam a presença de GO no tecido pulmonar. Observam-se atelectasia e espessamento septal, com infiltrado inflamatório leve mais evidente nas maiores doses, além de presença de partícula de GO na maior dose. Fonte: adaptado de Albuquerque et al. (2026).

6. DISCUSSÃO

As propriedades estruturais e de superfície do GO influenciam diretamente sua interação com sistemas biológicos e, conseqüentemente, seus efeitos toxicológicos (Forest, 2022). No presente estudo, a integração de modelos *in vitro* e *in vivo*, aliada à caracterização físico-química do NM, permitiu correlacionar respostas celulares com desfechos sistêmicos, proporcionando uma avaliação mais integrada dos efeitos nanotoxicológicos.

Para esse propósito, o GO foi caracterizado inicialmente quanto à sua composição química através das análises de ATR-FTIR e TGA. No espectro ATR-FTIR, a banda observada em 569 cm^{-1} foi relacionada a vibrações de ligações C–H, enquanto a região em torno de 862 cm^{-1} foi atribuída às vibrações de estiramento C–O–C e à flexão C–H (Brusko et al., 2024; Pertiwi et al., 2022). A absorção em 1025 cm^{-1} foi associada ao estiramento C–O de grupos funcionais oxigenados presentes na estrutura do NM (Azis et al., 2023; Dzikunu et al., 2024). A banda em 1397 cm^{-1} foi atribuída ao estiramento C–O–H, enquanto o sinal em 1569 cm^{-1} está relacionado a ligações C=C na rede carbônica (Brusko et al., 2024; Marcelina et al., 2018). A presença de grupos carbonila foi indicada pelo pico em 1708 cm^{-1} , correspondente ao estiramento C=O (Brusko et al., 2024; Noriega-Navarro et al., 2020). Já a banda ampla com pico em 3117 cm^{-1} foi associada ao estiramento O–H, sugerindo a presença de grupos hidroxila e/ou água adsorvida, uma vez que o GO possui caráter hidrofílico e higroscópico (Chatterjee, Sivareddy e De, 2017; El-Rafie e El-Rafie, 2016). Assim, o espectro ATR-FTIR apresentou bandas compatíveis com ligações envolvendo carbono, oxigênio e hidrogênio, em conformidade com as características descritas para o GO na literatura (Brusko et al., 2024).

De forma complementar, a TGA permitiu avaliar a proporção de grupos oxigenados no GO. O perfil de perda de massa observado indica a eliminação de água fisicamente adsorvida em temperaturas mais baixas (31 e 120 °C), seguida pela decomposição térmica de grupos funcionais oxigenados (120 a 350 °C) e, em temperaturas mais elevadas (350 a 535 °C), pela degradação de grupos carbônicos menos estável, com liberação de espécies gasosas como CO e CO₂, conforme descrito para o GO na literatura (Farivar, 2021; Sharma et al., 2017; Song, Wang e Chang, 2014).

Além disso, avaliou-se o comportamento das partículas ao longo do tempo nas dispersões utilizadas sob as condições experimentais *in vitro* e *in vivo*, incluindo meio de cultura (DMEM + SFB) e solução salina 0,9%, em comparação com água ultrapura, por meio das determinações de DH, Pdl e PZ. O DH do GO apresentou redução acentuada após 24 h nos diferentes meios de dispersão, mantendo-se inferior a 1000 nm. Em solução salina, o aumento da força iônica, decorrente da presença de íons Na⁺, favorece a agregação das partículas, justificando os valores de DH superiores aos observados em água ultrapura (Li et al., 2022). No meio de cultura DMEM, o GO exibiu valores mais elevados e variações temporais do DH, com aumento inicial seguido de redução, podendo estar associado com a formação e reorganização dinâmica de coronas proteicas na superfície do NM (García-Álvarez e Vallet-Regí, 2021). Esses resultados são consistentes com os valores de PZ, que revelaram menor estabilidade coloidal em DMEM e salina, sugerindo maior propensão à agregação e floculação das partículas (Németh et al., 2022; Rodriguez-Loya, Lerma e Gardea-Torresdey, 2024). Em contraste, o GO disperso em água ultrapura apresentou valores de PZ mais negativos (< -30 mV) ao longo de todo o período analisado, indicando maior estabilidade eletrostática e corroborando com os resultados obtidos para o DH. Em consonância, os valores de Pdl indicaram uma distribuição de tamanho heterogênea do GO, principalmente nas dispersões em DMEM e salina, o que pode estar relacionado à morfologia assimétrica das folhas de GO e à ampla variação de tamanhos resultante do processo de sonicação (Jorge, Tienne e Marques, 2021). Além disso, os valores de DCE determinados a partir das imagens de MEV evidenciaram uma distribuição heterogênea do tamanho das partículas em amostras secas de GO anteriormente dispersas em DMEM e água ultrapura, com valores médios de 11,78 e 11,37 µm, respectivamente. Observou-se, ainda, maior proporção de partículas inferiores a 10 µm na dispersão em água ultrapura.

Os resultados do ensaio de viabilidade celular em células HepG2 sugerem um aumento transitório da atividade metabólica mitocondrial em determinadas concentrações de GO e tempos de exposição. Esse comportamento é compatível com evidências prévias de que a redução do MTT pode ser intensificada em situações de estresse subletal, sem necessariamente refletir um aumento no número de células viáveis. Conforme descrito por Stepanenko e Dmitrenko (2015), exposições de curta duração (até 72 h) podem induzir respostas celulares adaptativas, resultando em

elevação aparente da viabilidade associada a alterações bioquímicas, como a reprogramação do metabolismo mitocondrial. Esses mecanismos adaptativos podem aumentar a atividade redox mitocondrial, elevando o sinal do MTT de forma independente da proliferação celular.

Além disso, é importante considerar que a presença de proteínas em meios de cultura suplementados com SFB favorece a adsorção de biomoléculas na superfície do GO, resultando na formação de uma corona proteica capaz de modular sua interação com as células. Esse fenômeno pode atenuar efeitos citotóxicos diretos, ao preservar a integridade da membrana celular e estimular respostas metabólicas compensatórias (Hu et al., 2011; Rhazouani et al., 2021).

No presente estudo, embora o sobrenadante tenha sido removido e as células lavadas previamente à adição do MTT, a possibilidade de internalização de partículas de GO ou de sua adesão à membrana celular não pode ser descartada, o que pode contribuir para uma elevação artificial do sinal do ensaio. Dessa forma, os resultados obtidos devem ser interpretados com cautela, considerando tanto os mecanismos adaptativos desencadeados pelas células quanto as limitações inerentes ao ensaio MTT na avaliação da citotoxicidade induzida por NMs.

Apesar das vantagens, o uso de modelos de monocultura celular não é capaz de reproduzir integralmente a complexidade dos tecidos, especialmente no que se refere à interação entre diferentes tipos celulares, à bioacumulação e aos processos de regeneração. Dessa forma, torna-se necessário o uso de modelos *in vivo* para uma avaliação mais abrangente da toxicidade de NMs (Kermanizadeh, Powell e Stone, 2020). Portanto, os camundongos BALB/c foram escolhidos como modelo experimental neste trabalho devido à sua ampla utilização em pesquisas nanotoxicológicas e ao perfil imunológico bem estabelecido. Essa linhagem apresenta predomínio de respostas imunes do tipo Th2, o que a torna particularmente sensível a efeitos inflamatórios, imunotóxicos e ao estresse oxidativo induzidos por NM, incluindo o GO (Mills et al., 2000; Watanabe et al., 2004). A via intraperitoneal foi selecionada por permitir rápida distribuição sistêmica, boa reprodutibilidade de dose e avaliação de órgãos-alvo, sendo amplamente utilizada em investigações com NMs à base de carbono (Kumar, Sharman e Maitra, 2017; Yang et al., 2013).

Nos primeiros dias após a exposição ao GO, os animais tratados apresentaram redução no consumo de ração e água em relação ao grupo controle, acompanhada de diminuição do peso corporal, mais evidente nas doses de 12,5, 25

e 50 mg/kg, sendo esta última associada às alterações mais pronunciadas. Ao longo do experimento, entretanto, observou-se recuperação gradual desses parâmetros, com restabelecimento do consumo alimentar, da ingestão hídrica e do peso corporal no 13º dia. Esses achados sugerem a ocorrência de respostas fisiológicas transitórias capazes de modificar o comportamento animal (Li et al., 2024). Resultados semelhantes foram relatados por Fu et al. (2015), que observaram redução inicial do peso corporal após a administração oral de GO (0,5 mg/mL), seguida de recuperação em períodos mais prolongados de acompanhamento. De modo semelhante, Rhazouani et al. (2024) demonstraram que camundongos Swiss expostos via intraperitoneal (2 e 5 mg/kg) ao GO apresentaram perda de peso nos primeiros 4 dias após a exposição, com posterior restabelecimento, além de sinais comportamentais compatíveis com desconforto abdominal. Considerando que alterações no consumo alimentar e no peso corporal podem ser influenciadas tanto pelo manuseio experimental quanto pela exposição a NMs (Ko et al., 2015), a ausência de variações desses parâmetros no grupo controle indica que as alterações observadas nos grupos tratados estão associadas a efeitos fisiológicos temporários decorrentes da exposição ao GO, e não exclusivamente ao estresse experimental.

As análises leucocitárias e a quantificação de citocinas no sangue indicaram que a exposição ao GO desencadeou uma resposta inflamatória discreta. Ainda assim, nos grupos expostos às menores doses do NM, observou-se um aumento expressivo no recrutamento de neutrófilos tanto no LCP quanto no LBA, sem elevação concomitante dos níveis de citocinas pró-inflamatórias. Esse perfil sugere a ocorrência de uma resposta inflamatória leve e possivelmente transitória. Paralelamente, observou-se uma redução no número de células mononucleares no LCP, sem alterações significativas nas concentrações de IFN- γ ou TNF, enquanto o grupo exposto à dose de 25 mg/kg apresentou diminuição significativa de IL-6.

Sydlik et al. (2015) observaram que implantes de GO em camundongos reduziram a liberação de IL-6 e o número de macrófagos, com aumento transitório de monócitos no terceiro dia, seguido de queda até o 14º dia, sem diferenças em relação ao controle. Hoyle et al. (2018) relataram que o GO não induziu resposta pró-inflamatória em macrófagos e ainda suprimiu a liberação de citocinas pró-inflamatórias, incluindo IL-1 β e IL-6. De forma consistente, Kolaczowska e Kubes (2013) descreveram recrutamento de neutrófilos independente de citocinas, mediado por quimiocinas como CINC e CXCL2, indicando que seu aumento pode ocorrer sem

elevação de IL-6. Já estudos realizados por Lim et al. (2023) demonstraram que nanotubos de carbono induzem efeito pró-inflamatório, promovendo a polarização de macrófagos para o fenótipo M1, bem como o aumento da produção de citocinas como TNF- α e IL-1 β e de mediadores lipídicos inflamatórios, como o leucotrieno B4, identificado como um dos principais responsáveis pela quimiotaxia de neutrófilos.

A biodistribuição do GO no organismo está relacionada com diversos fatores, entre os quais se destacam suas propriedades físico-químicas, o estado de agregação das partículas, as características da superfície e a via de administração empregada (Rhazouani et al., 2021). O dano tecidual associado ao GO pode apresentar relação inversa com o tamanho das partículas, como observado em células-tronco mesenquimatosas humanas, nas quais partículas menores induziram efeitos mais pronunciados (Akhavan, Ghaderi e Akhavan, 2012). No presente estudo, o aumento do peso hepático e a presença de GO no fígado, assim como no tecido adiposo adjacente ao baço e ao rim, sugerem acúmulo do NM decorrente da administração intraperitoneal, especialmente nas doses mais elevadas.

Corroborando esses achados, Kurantowicz et al. (2015) demonstraram que partículas de GO administradas por via intraperitoneal tendem a se agregar predominantemente no local de aplicação. De maneira semelhante, Yang et al. (2013) relataram que o GO administrado intraperitonealmente se acumula nas proximidades do local de injeção, com formação de agregados principalmente no fígado e no baço. Além disso, a presença de GO em seções histológicas dos pulmões e rins pode ser explicada pelo tamanho das partículas, já que partículas menores podem entrar na corrente sanguínea e se acumular nesses órgãos (Kurantowicz et al., 2015). Kong et al. (2024) demonstraram que partículas de grafeno com tamanhos variando entre 0,1 e 10 μm , quando administradas por vias intratraqueal, intravenosa ou intraperitoneal, desencadearam inflamação pulmonar, evidenciada pelo aumento do infiltrado neutrofílico e pela elevação da permeabilidade capilar pulmonar, com intensidade proporcional à dose administrada. No entanto, não há evidências fortes de presença de GO na cavidade torácica, nem da quantidade de partículas translocadas do local de aplicação para outras regiões no presente estudo.

Rodrigues et al. (2018) descreveram a detecção de GO em órgãos além da cavidade peritoneal após administração intraperitoneal em camundongos, incluindo diafragma e bexiga urinária nas primeiras horas após a exposição, sugerindo a participação da drenagem linfática na translocação do NM. De forma complementar,

Cai et al. (2024) demonstraram que a absorção e a distribuição sistêmica de nanocápsulas poliméricas administradas por via intraperitoneal são dependentes do tamanho das partículas, com rápida captação de frações em torno de 30 nm, acúmulo preferencial no sistema linfático de partículas próximas a 200 nm e retenção predominante no peritônio de partículas superiores a 1000 nm. Assim, frações menores de NM tendem a favorecer a translocação sistêmica, enquanto agregados de maior tamanho permanecem majoritariamente confinados à região peritoneal.

Apesar das alterações histológicas observadas no fígado, não foram identificadas mudanças na atividade sérica de ALT, enquanto a AST apresentou elevação nas menores doses de GO. Esse resultado pode estar relacionado à menor agregação do material nessas concentrações, favorecendo uma distribuição sistêmica mais ampla e possível dano em outros tecidos, o que é compatível com a presença de infiltrados celulares observados. Apesar das alterações histológicas observadas no tecido hepático, a atividade sérica da enzima ALT, considerada um marcador mais específico para a detecção de lesão hepatocelular, não foi alterada significativamente. No entanto, foi observado aumento da atividade da AST nas menores doses avaliadas, possivelmente relacionado a uma menor agregação das partículas de GO e à consequente maior distribuição sistêmica do NM. Esse comportamento pode ter favorecido a liberação enzimática decorrente de danos em outros tecidos, hipótese corroborada pela presença de infiltrados celulares observados nesses órgãos.

Estudos prévios demonstram que o GO pode se acumular no fígado de forma dependente da dose, sendo associado a alterações hepáticas geralmente transitórias. Wen et al. (2015) observaram acúmulo hepático dependente da dose de GO funcionalizado com 4-estirenosulfonato de sódio em camundongos após administração intravenosa, associado a aumentos transitórios de AST e ALT, compatíveis com lesão hepática reversível. Amrollahi-Sharifabadi et al. (2018) também observaram acúmulo de GO no fígado, acompanhado de infiltrado celular e alterações hepáticas dependentes da dose. Já Alamro et al. (2021) relataram alterações hepáticas após exposição a GO funcionalizado, incluindo infiltração extensa de células mononucleares e neutrófilos e focos de apoptose e necrose, com recuperação tecidual ao longo do tempo.

Em conjunto, os resultados demonstram que os efeitos do GO são influenciados por suas propriedades físico-químicas, pela dose administrada e pela via de exposição. A heterogeneidade estrutural do NM, aliada às suas interações com

biomoléculas, pode influenciar diretamente sua biodistribuição e os desfechos biológicos observados. Embora as respostas identificadas sejam predominantemente transitórias, a exposição ao GO pode favorecer processos inflamatórios localizados e o acúmulo desse NM em determinados órgãos. Tais achados fornecem informações relevantes para a avaliação de risco e para o uso seguro do GO em aplicações industriais.

7. CONCLUSÕES

Este estudo abordou, de forma integrada, a relação entre as propriedades físico-químicas e os efeitos toxicológicos do GO fornecido pelo CENPES/Petrobras, com foco em sua aplicação em processos de RAP. A caracterização evidenciou que o material possui estrutura e funcionalização superficial semelhantes às descritas na literatura, além de apresentar comportamento coloidal fortemente influenciado pelo meio de dispersão, com variações ao longo do tempo do DH, do estado de agregação e da carga superficial. Embora a análise por MEV tenha indicado partículas predominantemente na escala micrométrica, os resultados obtidos por DLS revelaram a presença de frações submicrométricas ($< 1 \mu\text{m}$) em água e em DMEM, sugerindo potencial de exposição por inalação sob determinadas condições de manipulação.

No ensaio *in vitro*, o GO não reduziu significativamente a viabilidade de células HepG2, embora tenha induzido alterações transitórias na atividade metabólica, possivelmente relacionadas a mecanismos adaptativos e/ou limitações do ensaio MTT. No modelo *in vivo*, a exposição intraperitoneal ao GO em camundongos BALB/c resultou em alterações transitórias no consumo de ração e água, refletindo-se também no peso corporal. Essas mudanças foram acompanhadas por uma resposta local discreta, evidenciada principalmente pelo aumento de neutrófilos na cavidade peritoneal, sem indicação de ativação inflamatória sistêmica significativa.

A integração das análises histopatológicas e bioquímicas indica que o GO apresenta acúmulo hepático associado à dose administrada, acompanhado por alterações inflamatórias locais de baixa intensidade, sem alterações significativas na atividade sérica do marcador de dano hepático ALT no tempo avaliado. Em conjunto, os resultados obtidos apontam que, nas condições experimentais deste estudo, a exposição ao GO resulta predominantemente em efeitos biológicos leves, localizados e de natureza transitória, reforçando a influência das características do NM, da dose e da via de administração na avaliação do seu perfil toxicológico. Entretanto, a extrapolação desses resultados requer cautela, sendo necessária a realização de estudos adicionais que contemplem exposições de maior duração, diferentes vias de administração e investigações mecanísticas mais detalhadas. Essas abordagens são fundamentais para uma melhor compreensão da segurança a longo prazo, da reversibilidade dos efeitos observados e dos possíveis impactos ocupacionais e ambientais associados ao uso do GO em aplicações industriais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABONYI, H. N. et al. Nanotoxicology: Developments and new insights. **Nanomedicine**, v. 20, n. 2, p. 225-241, 2025. DOI: 10.1080/17435889.2024.2443385
- AHMADI, M. et al. A review on protein corona formation on nanoparticles and prediction of its composition using artificial intelligence tools. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 683, n. 126094, 2025. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2025.126094
- AKHAVAN, O.; GHADERI, E.; AKHAVAN, A. Size-dependent genotoxicity of graphene nanoplatelets in human stem cells. **Biomaterials**, v. 33, n. 32, p. 8017-8025, 2012. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.040
- AKHTAR, M. et al. Nanotechnology to nanotoxicology: An esplanade to explore. **Trends in Biomaterials and Artificial Organs**, v. 39, n. 1, p. 68-80, 2025. DOI: 10.5281/zenodo.16793106
- ALAMRO, A. A. et al. Hepatotoxicity induced by intravenous administration of PEGylated nano-graphene oxide in albino mice. **Materials Express**, v. 11, n. 10, p. 1668-1673, 2021. DOI: 10.1166/mex.2021.2078
- ALBUQUERQUE, Y. R. et al. Toxicological evaluation of industrially relevant graphene oxide using human hepatocytes and a murine model. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 89, n. 12, p. 534-558, 2026. DOI: 10.1080/15287394.2025.2607462
- ALI, Z. et al. Preparation, properties and mechanisms of carbon fiber/polymer composites for thermal management applications. **Polymers**, v. 13, n. 1, 2021. DOI: 10.3390/polym13010169
- AMROLLAHI-SHARIFABADI, M. et al. In vivo toxicological evaluation of graphene oxide nanoplatelets for clinical application. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, n. 1, p. 4757-4769, 2018. DOI: 10.2147/IJN.S168731
- ANDREWS, J. P. M. et al. First-in-human controlled inhalation of thin graphene oxide nanosheets to study acute cardiorespiratory responses. **Nature Nanotechnology**, v. 19, p. 705-714, 2024. DOI: 10.1038/s41565-023-01572-3
- AZIS, T. et al. ZnO-enhanced reduced graphene oxide electrodes from cocoa shell: nanoarchitectonics platform for photoelectrocatalytic detection of methylene blue. **Journal of Oleo Science**, v. 72, n. 12, p. 1133-1140, 2023. DOI: 10.5650/jos.ess23152
- BOCCUNI, F. et al. Potential occupational exposure to manufactured nanoparticles in Italy. **Journal of Cleaner Production**, v. 16, n. 8-9, p. 949-956, 2008. DOI: 10.1016/j.jclepro.2007.04.021
- BOHOLM, M.; ARVIDSSON, R. A definition framework for the terms nanomaterial and nanoparticle. **Nanoethics**, v. 10, p. 25-40, 2016. DOI: 10.1007/s11569-015-0249-7

- BOYES, W. K.; VAN THRIEL, C. Neurotoxicology of nanomaterials. **Chemical Research in Toxicology**, v. 33, n. 5, p. 1121-1144, 2020. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.0c00050
- BROWN, J. S. et al. Thoracic and respirable particle definitions for human health risk assessment. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 10, n. 12, 2013. DOI: 10.1186/1743-8977-10-12
- BRUSKO, V. et al. Unraveling the infrared spectrum of graphene oxide. **Carbon**, v. 229, n. 119507, 2024. DOI: 10.1016/j.carbon.2024.119507
- BULEDI, J. A. et al. Nano-diamonds: Transformative nanoscale material in advancing biosensor technology. **Inorganic Chemistry Communications**, v. 160, n. 111934, 2024. DOI: 10.1016/j.inoche.2023.111934
- CAI, Y. et al. Size-dependent translocation and lymphatic transportation of polymeric nanocarriers post intraperitoneal administration. **Journal of Controlled Release**, v. 376, p. 553-565, 2024. DOI: 10.1016/j.jconrel.2024.10.032
- CHATTERJEE, S.; SIVAREDDY, I.; DE, S. Adsorptive removal of potentially toxic metals (cadmium, copper, nickel and zinc) by chemically treated laterite: Single and multicomponent batch and column study. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 5, n. 4, p. 3273-3289, 2017. DOI: 10.1016/j.jece.2017.06.029
- CHEMELLO, G. et al. Approaches for the measurement of lateral dimensions of graphene oxide flakes using scanning electron microscopy. **Nano Express**, v. 6, n. 1, p. 015006, 2025. DOI: 10.1088/2632-959X/adae28
- CHEN, Y. et al. Specific nanotoxicity of graphene oxide during zebrafish embryogenesis. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 1, p. 42-52, 2016. DOI: 10.3109/17435390.2015.1005032
- CIRILLO, C. et al. Nanoparticle usage in leather processing: Worker safety and health. **ACS Chemical Health & Safety**, v. 31, n. 4, p. 276-290, 2024. DOI: 10.1021/acs.chas.4c00006
- COUVILLION, S. P. et al. Graphene oxide exposure alters gut microbial community composition and metabolism in an in vitro human model. **NanoImpact**, v. 30, p. 100463, 2023. DOI: 10.1016/j.impact.2023.100463
- DASMAHAPATRA, A. K.; DASARI, T. P. S.; TCHOUNWOU, P. B. Graphene-based nanomaterials toxicity in fish. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 247, p. 1-58, 2019. DOI: 10.1007/398_2018_15
- DI SIA, P. Nanotechnology among innovation, health and risks. **Procedia - Social and Behavioral Sciences**, v. 237, p. 1076-1080, 2017. DOI: 10.1016/j.sbspro.2017.02.158
- DIDEIKIN, A. T., VUL' A. Y. Graphene oxide and derivatives: The place in graphene family. **Frontiers in Physics**, v. 6, p. 149, 2019. DOI: 10.3389/fphy.2018.00149
- DREADEN, E. C. The golden age: gold nanoparticles for biomedicine. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2740-2779, 2012. DOI: 10.1039/C1CS15237H

DUAN, G. et al. Protein corona mitigates the cytotoxicity of graphene oxide by reducing its physical interaction with cell membrane. **Nanoscale**, v. 7, n. 37, p. 15214-15224, 2015. DOI:10.1039/c5nr01839k

DUO, L., WANG, Y., ZHAO, S. Individual and histopathological responses of the earthworm (*Eisenia fetida*) to graphene oxide exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 229, p. 113076, 2022. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2021.113076

DZIKUNU, P. et al. Electrochemical performance of graphene oxide synthesized from graphitic spent potlining for energy storage application. **Journal of Energy Storage**, v. 101, p. 113896, 2024. DOI: 10.1016/j.est.2024.113896

EL-RAFIE, S.; EL-RAFEI, A. M. Role of ozone and UV light on oxygenated groups attached with commercially prepared graphene oxide. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 7, n. 5, p. 557-573, 2016.

EUSTIS, S.; EL-SAYED, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. **Chemical Society Reviews**, v. 35, n. 3, p. 209-217, 2006. DOI: 10.1039/b514191e

FARIVAR, F. et al. Unlocking thermogravimetric analysis (TGA) in the fight against "Fake graphene" materials. **Carbon**, v. 179, p. 505-513, 2021. DOI: 10.1016/j.carbon.2021.04.064

FARJADIAN, F. et al. Recent developments in graphene and graphene oxide: Properties, synthesis, and modifications: A review. **ChemistrySelect**, v. 5, n. 33, p. 10200-10219, 2020. DOI: 10.1002/slct.202002501

FARMANI, A.; OMIDNIAEE, A. Improvement of the efficiency and stability of solar cells using grating and hole-transferring nickel oxide-graphene oxide double-layer. **Materials for Renewable and Sustainable Energy**, v. 14, n. 27, 2025. DOI: 10.1007/s40243-025-00301-1

FEKETE-KERTÉSZ, I. et al. Ecotoxicity assessment of graphene oxide by *Daphnia magna* through a multimarker approach from the molecular to the physiological level including behavioral changes. **Nanomaterials**, v. 10, n. 10, p. E2048, 2020. DOI: 10.3390/nano10102048

FILIPPOV, S. K. et al. Dynamic light scattering and transmission electron microscopy in drug delivery: A roadmap for correct characterization of nanoparticles and interpretation of results. **Materials Horizons**, v. 10, n. 12, p. 5354-5370, 2023. DOI: 10.1039/D3MH00717K

FOREST, V. Experimental and computational nanotoxicology: Complementary approaches for nanomaterial hazard assessment. **Nanomaterials**, v. 12, n. 8, p. 1346, 2022. DOI: 10.3390/nano12081346

FU, C. et al. Effects of graphene oxide on the development of offspring mice in lactation period. **Biomaterials**, v. 40, n. 1, p. 23-31, 2015. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.11.014

GARCÍA-ÁLVAREZ, R.; VALLET-REGÍ, M. Hard and soft protein corona of nanomaterials: Analysis. **Nanomaterials**, v. 11, n. 4, p. 888, 2021. DOI: 10.3390/nano11040888

GHULAM, A. N. et al. Graphene oxide (GO) materials: applications and toxicity on living organisms and environment. **Journal of Functional Biomaterials**, v. 13, n. 2, 2022. DOI:10.3390/jfb13020077

GUO, S. et al. Controlling covalent chemistry on graphene oxide. **Nature Reviews Physics**, v. 4, n. 1, p. 247-262, 2022. DOI: 10.1038/s42254-022-00422-w

GUO, Z. et al. Improved cycle stability and rate capability of graphene oxide wrapped tavorite LiFeSO₄F as cathode material for lithium-ion batteries. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 25, p. 13972-13979, 2015. doi: 10.1021/acsami.5b02966

HARUNA, M. A.; TANGPARITKUL, S.; WEN, D. Dispersion of polyacrylamide and graphene oxide nano-sheets for enhanced oil recovery. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 699, n. 2, p. 134689, 2024. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2024.134689

HASHEMI, E. et al. Impacts of graphene oxide contamination on a food web: threats to somatic and reproductive health of organisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 285, p. 117032, 2024. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2024.117032

HOYLE, C. et al. Small, thin graphene oxide is anti-inflammatory activating nuclear factor erythroid 2-related factor 2 via metabolic reprogramming. **ACS Nano**, v. 12, n. 12, p. 11949-11962, 2018. DOI: 10.1021/acsnano.8b03642

HU, W. et al. Protein corona-mediated mitigation of cytotoxicity of graphene oxide. **ACS Nano**, v. 5, n. 5, p. 3693-3700, 2011. DOI: 10.1021/nn200021j

HUANG, X. Fabrication and properties of carbon fibers. **Materials**, v. 2, n. 4, p. 2369-2403, 2009. DOI: 10.3390/ma2042369

HULLA, J. E.; SAHU, S. C.; HAYES, A. W. Nanotechnology: history and future. **Human and Experimental Toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1318-1321, 2015. DOI: 10.1177/0960327115603588

HUMMERS JUNIOR, W. S.; OFFEMAN, R. E. Preparation of graphitic oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339-1339, 1958.

JIMÉNEZ, A. et al. Safe(r) by design guidelines for the nanotechnology industry. **NanoImpact**, v. 25, n. 1, p. 100385, 2022. DOI: 10.1016/j.impact.2022.100385

JIŘÍČKOVÁ, A. et al. Synthesis and applications of graphene oxide. **Materials**, v. 15, n. 3, 2022. DOI: 10.3390/ma15030920

JORGE, F. E.; TIENNE, L. G. P.; MARQUES, M. F. V. Preparation and characterization of polyaniline nanocomposites with graphene oxide-zinc oxide hybrids in different morphologies. **Materials Science and Engineering: B**, v. 263, n. 1, p. 114851, 2021. DOI: 10.1016/j.mseb.2020.114851

- KERMANIZADEH, A.; POWELL, L. G.; STONE, V. A review of hepatic nanotoxicology – Summation of recent findings and considerations for the next generation of study designs. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B**, v. 23, n. 4, p. 137-176, 2020. DOI: 10.1080/10937404.2020.1751756
- KHAN, I.; SAEED, K.; KHAN, I. Nanoparticles: Properties, applications and toxicities. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 12, n. 7, p. 908-931, 2017. DOI: 10.1016/j.arabjc.2017.05.011
- KHAN, B. et al. Effects of graphene oxide nanomaterial exposures on the marine bivalve, *Crassostrea virginica*. **Aquatic Toxicology**, v. 216, p. 105297, 2019. DOI: 10.1016/j.aquatox.2019.105297
- KHORAMIAN, R. et al. Graphene oxide nanosheets for oil recovery. **ACS Applied Nano Materials**, v. 2, n. 9, p. 5730-5742, 2019. DOI: 10.1021/acsanm.9b01215
- KIEW, S. F. et al. Assessing biocompatibility of graphene oxide-based nanocarriers: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 226, n. 1, p. 217-228, 2016. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.02.015
- KO, J. W. et al. Evaluation of 2-week repeated oral dose toxicity of 100 nm zinc oxide nanoparticles in rats. **Laboratory Animal Research**, v. 31, n. 3, p. 139-147, 2015. DOI: 10.5625/lar.2015.31.3.139
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013. DOI: 10.1038/nri3399
- KONG, C. et al. Respiratory toxicology of graphene-based nanomaterials: A review. **Toxics**, v. 12, n. 1, p. 82, 2024. DOI: 10.3390/toxics12010082
- KORNILOV, D. Y., GUBIN, S. P. Graphene oxide: structure, properties, synthesis, and reduction (a review). **Russian Journal of Inorganic Chemistry**, v. 65, p. 1965-1976, 2020. DOI: 10.1134/S0036023620130021
- KULKARNI, K. et al. A review on the smallest carbon fullerene C₂₀: Applications and device formation. **Materials Today: Proceedings**, 2024. DOI: 10.1016/j.matpr.2024.05.147
- KUMAR, V.; SHARMAN, N.; MAITRA, S. S. In vitro and in vivo toxicity assessment of nanoparticles. **International Nano Letters**, v. 7, p. 243-256, 2017. DOI: 10.1007/s40089-017-0221-3
- KURANTOWICZ, N. et al. Biodistribution of a high dose of diamond, graphite, and graphene oxide nanoparticles after multiple intraperitoneal injections in rats. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, n. 1, p. 398, 2015. DOI: 10.1186/s11671-015-1107-9
- LI, C. et al. Colloidal stability and aggregation kinetics of nanocrystal CdSe/ZnS quantum dots in aqueous systems: Effects of ionic strength, electrolyte type, and natural organic matter. **Discover Applied Sciences**, v. 4, n. 101, 2022. DOI: 10.1007/s42452-022-04948-7

- LI, M. et al. Graphene oxide nanosheets induce mitochondrial toxicity in human ovarian granulosa cells: Implications for female reproductive health. **International Journal of Nanomedicine**, v. 20, p. 4461-4479, 2025. DOI: 10.2147/IJN.S495259
- LI, Y. T. et al. Graphene oxide nanosheets toxicity in mice is dependent on protein corona composition and host immunity. **ACS Nano**, v. 18, n. 33, p. 22572-22585, 2024. DOI: 10.1021/acsnano.4c08561
- LIAO, C.; LI, Y.; TJONG, S. C. Graphene nanomaterials: Synthesis, biocompatibility, and cytotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 11, 2018. DOI: 10.3390/ijms19113564
- LIAO, K. H. et al. Cytotoxicity of graphene oxide and graphene in human erythrocytes and skin fibroblasts. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 3, n. 7, p. 2607-2615, 2011. DOI: 10.1021/am200428v
- LIM, C. S. et al. Multi-walled carbon nanotubes induce arachidonate 5-lipoxygenase expression and enhance the polarization and function of M1 macrophages in vitro. **Nanotoxicology**, v. 17, n. 3, p. 249-269, 2023. DOI: 10.1080/17435390.2023.2204161
- LIU, X. et al. Changes in gut microbiota and metabolites of mice with intravenous graphene oxide-induced embryo toxicity. **Toxicological Research**, v. 40, n. 4, p. 571-584, 2024. DOI: 10.1007/s43188-024-00242-3
- MACDONALD, R. L. Nanoparticles and microparticles. **Neurosurgery**, v. 62, n. CN_suppl_1, p. 152-159, 2015.
- MAGRO, M. R.; VELLA, D. A.; CASSAR, G. Synthesis of graphene oxide: A refined approach. **Carbon Trends**, v. 20, p. 100509, 2025. DOI: 10.1016/j.cartre.2025.100509
- MARCELINA, V. et al. Preparation of graphene oxide thin films using voltage cyclic electrochemical deposition method and its characterization. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 1080, n. 1, p. 012028, 2018. DOI: 10.1088/1742-6596/1080/1/012028
- MCCOY, T. M.; POTTAGE, M. J.; TABOR, R. F. Graphene oxide-stabilized oil-in-water emulsions: pH-controlled dispersion and flocculation. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 8, p. 4529-4535, 2014. DOI: 10.1021/jp500072a
- MEKUYE, B., ABERA, B. Nanomaterials: An overview of synthesis, classification, characterization, and applications. **Nano Select**, v. 4, n. 8, p. 486-501, 2023. DOI: 10.1002/nano.202300038
- MILLS, C. D. et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 12, p. 6166-6173, 2000. DOI: 10.4049/jimmunol.164.12.6166
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4

NATALYA, S. A. C. et al. Two-dimensional nanomaterials for enhanced oil recovery (EOR): a review. **FlatChem**, v. 34, n. 1, p. 100383, 2022. DOI: 10.1016/j.flatc.2022.100383

NEL, A. X. T.; MÄDLER L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. **Science**, v. 133, n. 5761, p. 622-627, 2006. DOI: 10.1126/science.1114397

NÉMETH, Z. et al. Quality by design-driven zeta potential optimisation study of liposomes with charge imparting membrane additives. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 9, p. 1798, 2022. DOI: 10.3390/pharmaceutics14091798

NORIEGA-NAVARRO, R. et al. Control of pH-responsiveness in graphene oxide grafted with poly-DEAEMA via tailored functionalization. **Nanomaterials**, v. 10, n. 4, p. 614, 2020. DOI: 10.3390/nano10040614

NORTHWICK, A. B.; CARLSON, E. E. Challenges of biological complexity in the study of nanotoxicology. **Chemical Research in Toxicology**, v. 38, n. 1, p. 7-14, 2025. DOI: 10.1021/acs.chemrestox.4c00220

NOVOSELOV, K. S. et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. **Science**, v. 306, n. 5696, p. 666-669, 2004. DOI: 10.1126/science.11102896

OECD. **Test No. 125: Nanomaterial particle size and size distribution of nanomaterials**. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 1. Paris: OECD Publishing, 2023. DOI: 10.1787/af5f9bda-en

PERTIWI, S. R. R. et al. Effect of heat-moisture treatment on the physicochemical properties of native canistel starch. **Food Science and Technology (Brazil)**, v. 42, p. 103921, 2022. DOI: 10.1590/FST.103921

POIKKIMÄKI, M. et al. Occupational exposure to graphene-related materials: From workplace emissions to health risk assessment. **Nanoscale**, v. 17, n. 44, p. 25589-25604, 2025. DOI: 10.1039/d5nr01885d

POULSEN, S. S. et al. A transcriptomic overview of lung and liver changes one day after pulmonary exposure to graphene and graphene oxide. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 410, p. 115343, 2021. DOI: 10.1016/j.taap.2020.115343

REN, W.; et al. Effect of graphene oxide on growth of wheat seedlings: Insights from oxidative stress and physiological flux. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 105, n. 1, p. 139-145, 2020. DOI: 10.1007/s00128-020-02888-9

RHAZOUANI, A. et al. Synthesis and toxicity of graphene oxide nanoparticles: A literature review of in vitro and in vivo studies. **BioMed Research International**, v. 2021, n. 1, p. 518999, 2021 DOI: 10.1155/2021/5518999

RHAZOUANI, A., et al. Graphene oxide (GO) sub-chronic toxicity in liver, kidney and spleen: Macroscopic observation and histo-biochemical examination. **BioNanoScience**, v. 14, n. 3, p. 2559-2570, 2024. DOI: 10.1007/s12668-024-01502-0

RODRIGUES, A. F. et al. Immunological impact of graphene oxide sheets in the abdominal cavity is governed by surface reactivity. **Immunotoxicology**, v. 92, p. 3359-3379, 2018. DOI: 10.1007/s00204-018-2303-z

RODRIGUEZ-LOYA, J.; LERMA, M.; GARDEA-TORRESDEY, J. L. Dynamic light scattering and its application to control nanoparticle aggregation in colloidal systems: a review. **Micromachines**, v. 15, n. 1, p. 24, 2024. DOI: 10.3390/mi15010024

RUIZ, O. N. et al. Graphene oxide: A nonspecific enhancer of cellular growth. **ACS Nano**, v. 5, n. 10, p. 8100-8107, 2011. DOI: 10.1021/nn202699t

SAEI, A. A.; SUN, L.; MAHMOUDI, M. The role of protein corona in advancing plasma proteomics. **Proteomics**, v. 25, n. 1-2, 2025. DOI: 10.1002/pmic.202400028

SANTAMARIA, A. Historical overview of nanotechnology and nanotoxicology. **Nanotoxicology**, v. 1, p. 1-12, 2012. DOI: 10.1007/978-1-62703-002-1_1

SCHWERDTFEGER, P.; WIRZ, L. N.; AVERY, J. The topology of fullerenes. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Computational Molecular Science**, v. 5, n. 1, p. 96-145, 2015. DOI: 10.1002/wcms.1207

SEABRA, A. B. et al. Nanotoxicity of graphene and graphene oxide. **Chemical Research in Toxicology**, v. 27, n. 2, p. 159-168, 2014. DOI: 10.1021/tx400385x

SHARMA, N. et al. Synthesis and characterization of graphene oxide (GO) and reduced graphene oxide (rGO) for gas sensing application. **Macromolecular Symposia**, v. 376, n. 1, p. 1700006, 2017. DOI: 10.1002/masy.201700006

SHATKIN, J. A., ONG, K. J. Alternative testing strategies for nanomaterials: State of the science and considerations for risk analysis: Alternative testing strategies for nanomaterials. **Risk Analysis**, v. 36, p. 1564-1580, 2016. DOI: 10.1111/risa.12642.

SINGH, R. K.; KUMAR, R.; SINGH, D. P. Graphene oxide: Strategies for synthesis, reduction and frontier applications. **RSC Advances**, v. 6, n. 69, p. 64993-65011, 2016. DOI: 10.1039/c6ra07626b

SONG, J.; WANG, X.; CHANG, C. T. Preparation and characterization of graphene oxide. **Journal of Nanomaterials**, v. 2014, n. 1, p. 276143, 2014. DOI: 10.1155/2014/276143

SPERANZA, G. Carbon nanomaterials: Synthesis, functionalization and sensing applications. **Nanomaterials**, v. 11, n. 4, p. 967, 2021. DOI:10.3390/nano11040967

SRIKANTH, K. et al. Graphene oxide induces cytotoxicity and oxidative stress in bluegill sunfish cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, n. 4, p. 504-513, 2018. DOI: 10.1002/jat.3557

SRIRAM, G. et al. Recent progress using graphene oxide and its composites for supercapacitor applications: A review. **Inorganics**, v. 12, n. 6, p. 145, 2024. DOI: 10.3390/inorganics12060145

- STEPANENKO, A. A.; DMITRENKO, V. V. Pitfalls of the MTT assay: Direct and off-target effects of inhibitors can result in over/underestimation of cell viability. **Gene**, v. 574, n. 2, p. 193-203, 2015. DOI: 10.1016/j.gene.2015.08.009
- SUVARNAPHAET, P.; PECHPRASARN, S. Graphene-based materials for biosensors: A review. **Sensors**, v. 17, n. 10, p. 2161, 2017. DOI: 10.3390/s17102161
- SYDLIK, S. A. et al. In vivo compatibility of graphene oxide with differing oxidation states. **ACS Nano**, v. 9, n. 4, p. 3866-3874, 2015. DOI: 10.1021/acsnano.5b01290
- TADYSZAK, K.; WYCHOWANIEC, J. K.; LITOWCZENKO, J. Biomedical applications of graphene-based structures. **Nanomaterials**, v. 8, n. 11, 2018. DOI: 10.3390/nano8110944
- TARCAN, R. et al. Reduced graphene oxide today. **Journal of Materials Chemistry C**, v. 8, p. 1198-1224, 2020. DOI: 10.1039/C9TC04916A
- TU, Y. et al. Destructive extraction of phospholipids from *Escherichia coli* membranes by graphene nanosheets. **Nature Nanotechnology**, v. 8, p. 594-601, 2013. DOI: 10.1038/nnano.2013.125
- VASCONCELOS, C. K. B. et al. Nanofluids based on hydrolyzed polyacrylamide and aminated graphene oxide for enhanced oil recovery in different reservoir conditions. **Fuel**, v. 310, n. 1, p. 122299, 2022. DOI: 10.1016/j.fuel.2021.122299
- WANG, X. et al. Reduced graphene oxide composites and its real-life application potential for in situ crude oil removal. **Chemosphere**, v. 249, p. 126141, 2020. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2020.126141
- WANG, Y. et al. Environmental remediation applications of carbon nanotubes and graphene oxide: adsorption and catalysis. **Nanomaterials**, v. 9, n. 3, p. 439, 2019. DOI: 10.3390/nano9030439
- WATANABE, H. et al. Innate immune response in Th1- and Th2-dominant mouse strains. **Shock**, v. 22, n. 5, p. 460-466, 2004. DOI: 10.1097/01.shk.0000142249.08135.e9
- WEN, K. P. et al. Accumulation and toxicity of intravenously injected functionalized graphene oxide in mice. **Journal of Applied Toxicology**, v. 35, n. 10, p. 1211-1218, 2015. DOI: 10.1002/jat.3187
- XIAOLI, F. et al. Graphene oxide disrupted mitochondrial homeostasis through inducing intracellular redox deviation and autophagy-lysosomal network dysfunction in SH-SY5Y cells. **Journal of Hazardous Materials**, v. 416, p. 126158, 2021. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.126158
- YANG, K. et al. In vivo biodistribution and toxicology of functionalized nano-graphene oxide in mice after oral and intraperitoneal administration. **Biomaterials**, v. 34, n. 11, p. 2787-2795, 2013. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.001
- YANG, X. et al. Developmental neurotoxicity and immunotoxicity induced by graphene oxide in zebrafish embryos. **Environmental Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 415-423, 2019. DOI: 10.1002/tox.22695

ZARBIN, A. J. G. Química de (nano)materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469-1479, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000600016

ZARE, P. et al. Graphene oxide: Opportunities and challenges in biomedicine. **Nanomaterials**, v. 11, n. 5, p. 1083, 2021. DOI: 10.3390/nano11051083

ZEIGER, M. et al. Carbon onions for electrochemical energy storage. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 4, n. 9, p. 3172-3196, 2016. DOI: 10.1039/c5ta08295a

ZIELIŃSKA, A. et al. Nanotoxicology and nanosafety: Safety-by-design and testing at a glance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, p. 4657, 2020. DOI: 10.3390/ijerph17134657

ANEXO A – Artigo publicado



Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A
Current Issues



ISSN: 1528-7394 (Print) 1087-2620 (Online) Journal homepage: www.tandfonline.com/journals/uteh20

Toxicological evaluation of industrially relevant graphene oxide using human hepatocytes and a murine model

Yulli Roxenne Albuquerque, Ricardo de Oliveira Correia, Karina Alves Feitosa, Ana Carolina Maragno Fattori, Krissia Franco de Godoy, Joice Margareth de Almeida Rodolpho, Patrícia Brassolatti, Mayara Caroline Rosolem, Cynthia Aparecida de Castro, Carlos Speglich & Fernanda de Freitas Anibal

To cite this article: Yulli Roxenne Albuquerque, Ricardo de Oliveira Correia, Karina Alves Feitosa, Ana Carolina Maragno Fattori, Krissia Franco de Godoy, Joice Margareth de Almeida Rodolpho, Patrícia Brassolatti, Mayara Caroline Rosolem, Cynthia Aparecida de Castro, Carlos Speglich & Fernanda de Freitas Anibal (01 Jan 2026): Toxicological evaluation of industrially relevant graphene oxide using human hepatocytes and a murine model, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, DOI: [10.1080/15287394.2025.2607462](https://doi.org/10.1080/15287394.2025.2607462)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15287394.2025.2607462>



Published online: 01 Jan 2026.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 42



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=uteh20>

ANEXO B – Certificado CEUA



Universidade Federal de São Carlos
Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Determinação do efeito citotóxico e de toxicidade sistêmica do nanomaterial de óxido de grafeno (GO) de interesse para a indústria petrolífera", protocolada sob o CEUA nº 1443040320 (ID 001404), sob a responsabilidade de **Yulli Roxenne Albuquerque** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 12/03/2020.

We certify that the proposal "Determination of the cytotoxic effect and systemic toxicity of graphene oxide nanomaterial (GO) of interest to the oil industry", utilizing 200 Isogenics mice (200 females), protocol number CEUA 1443040320 (ID 001404), under the responsibility of **Yulli Roxenne Albuquerque** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **APPROVED** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 03/12/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 03/2020 a 09/2023 Área: **Centro de Ciências Biológicas E da Saúde**

Origem: **Biotério Externo**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

idade: **4 a 6 semanas**

Quantidade: **200**

Linhagem: **Balb/c**

Peso: **15 a 18 g**

São Carlos, 12 de janeiro de 2026

Prof. Dr. Luiz Fernando Takase
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

