

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

PRISCILA RODRIGUES DE SIQUEIRA

Efeitos dos nanomateriais Óxido de Grafeno e Óxido de Grafeno Reduzido sobre a linhagem  
celular de fígado de *Danio rerio*, ZFL

São Carlos - SP

2021

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E RECURSOS NATURAIS

PRISCILA RODRIGUES DE SIQUEIRA

Efeitos dos nanomateriais Óxido de Grafeno e Óxido de Grafeno Reduzido sobre a linhagem celular de fígado de *Danio rerio*, ZFL

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais, do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências, área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

**Orientadora:** Dra. Marisa Narciso Fernandes

**Coorientadora:** Dra. Jaqueline Pérola de Souza

São Carlos - SP

2021



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

---

**Folha de Aprovação**

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Priscila Rodrigues de Siqueira, realizada em 10/11/2021.

**Comissão Julgadora:**

Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes (UFSCar)

Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araujo (UFSCar)

Profa. Dra. Odete Rocha (UFSCar)

Profa. Dra. Raquel Aparecida Moreira (USP)

Profa. Dra. Angelica Ellen Graminha (FCFRP/USP)

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

## **Dedico**

A todas as meninas sonhadoras, que elas nunca  
deixem de sonhar e acreditar que o sonho é  
possível.

## **Agradecimentos**

Agradeço imensamente à Profa. Dra. Marisa Narciso Fernandes, por todas as oportunidades e infraestrutura proporcionadas por ela e pelo grupo de pesquisa LZBC (Laboratório de Zoofisiologia e Bioquímica Comparativa). Além disso, agradeço a orientação, incentivo, confiança e ensinamentos ao longo dessa jornada acadêmica que começou em 2012, durante meu estágio de iniciação científica e se estendeu para o mestrado e doutorado.

À Profa. Dra. Jaqueline Pérola de Souza, pela coorientação, incentivo, confiança e ensinamentos durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto, Dra. Bianca Martins Estevão, Dra. Bruna Juliana Moreira Dias e Dr. Fabrício Aparecido dos Santos do Grupo Nanomedicina e Nanotoxicologia da Universidade de São Paulo – USP, pelo fornecimento do óxido de grafeno e pelo suporte técnico durante as análises de caracterização.

À Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti e Dra. Angelina Maria Fuzer do Laboratório de Biologia do Envelhecimento (Laben) pelo suporte técnico nos ensaios de citometria de fluxo.

À Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo e Dra. Wanessa Fernanda Altei do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM) pela infraestrutura e suporte técnico disponibilizados.

À Profa. Dra. Márcia Regina Cominetti, Dra. Angélica Ellen Graminha e Dra. Francini Perri Venturini pelas sugestões apresentadas durante o exame de qualificação.

À Profa. Dra. Odete Rocha, Profa. Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo, Dra. Raquel Aparecida Moreira e Dra. Angélica Ellen Graminha pelas sugestões apresentadas durante a apresentação da tese/defesa de doutorado.

À Profa. Dra. Diana Amaral Monteiro pelas conversas, conselhos e incentivo.

Ao meu marido, amigo e companheiro de todas as horas, Ricardo, que está sempre ao meu lado me incentivando e apoiando em todos os momentos da minha vida.

Ao programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais (PPG-ERN) da Universidade Federal de São Carlos pelo curso de Doutorado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc 306818/2021-5) pelo apoio financeiro.

Aos colegas que se tornaram grandes amigos ao longo dessa jornada, Talita L. L. do Carmo, Vinícius Cavichioli Azevedo, Naiara Elizabeth de Souza, Francine Venturini, Frederico Delunardo e Driele Tavares.

E por último, mas não menos importante, aos meus pais que me criaram com simplicidade, mas me ensinaram a lutar, a não desistir, a ser responsável, honesta e ética. Sem esta base forte, eu jamais teria chegado aonde cheguei. Também Agradeço às minhas irmãs, Camila e Thayriny, aos meus sobrinhos Maria Eduarda e Bernardo, pela convivência e momentos extremamente divertidos que alegam a vida e ajudam a manter a sanidade mental.

"A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos  
outros dez"

**George Bernard Shaw** *apud* SCHMIDT (1987)

## RESUMO

O nanomaterial grafeno e suas variações como o óxido de grafeno (GO, *graphene oxide*) e o óxido de grafeno reduzido (rGO, *reduced graphene oxide*) têm sido amplamente estudados e poderão ser utilizados em várias áreas, tais como inibição bacteriana, administração de fármacos (*drug delivery*), terapia fototermal e biorremediação de ambientes aquáticos, entre outras. Desta forma, os resíduos desses materiais chegarão aos ambientes aquáticos e seus compartimentos, representando altos riscos para a biota aquática bem como para a saúde humana. Nesses ambientes, GO se mantém estável por longo tempo e rGO, que é instável quando suspenso em água ultrapura, se torna mais estável na presença de matéria orgânica natural (MON), sendo mais estável que GO, nessas condições. Estudos recentes mostram que o GO pode ser reduzido a rGO pela exposição à luz solar e pela degradação bacteriana, assim como pela presença de metais como alumínio (Al) e ferro (Fe) e por redutores inorgânicos à base de enxofre. A resposta de organismos aquáticos, decorrente da exposição a GO e rGO, ainda é pouco conhecida. No presente estudo, oito concentrações das nanomateriais GO e rGO foram testadas em células de fígado de peixe zebra (ZFL), numa escala de 0,001 até 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , com exposições de 24 e 72 horas. Foram analisadas a internalização de GO e rGO pelas células ZFL, a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*), viabilidade e morte celular, bem como a atividade das enzimas catalase (CAT) e glutatona S-transferase (GST), além do antioxidante não-enzimático glutatona (GSH). Também foi investigado acerca da peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total. GO e rGO apresentaram capacidade diferente para adsorver proteínas em sua superfície, sendo que GO adsorveu mais proteínas que rGO. As nanofolhas de rGO são menores que as nanofolhas de GO, e a característica hidrofóbica de rGO favorece sua interação com a membrana celular e, conseqüentemente, sua entrada nas células. A exposição ao rGO gerou maior produção de ROS do que o GO e causou mais danos, evidenciando maior toxicidade de rGO. As células ZFL foram capazes de combater os efeitos de GO mostrando recuperação após 72 horas de exposição, enquanto a exposição a rGO em altas concentrações impediu a replicação celular. Em baixas concentrações, rGO causou estresse oxidativo, perda da capacidade antioxidante e danos genotóxicos. A exposição ao rGO foi nociva às células ZFL tanto em 24 horas quanto em 72 horas de exposição.

**Palavras-chave:** apoptose, catalase, espécies reativas de oxigênio, estresse oxidativo, genotoxicidade, glutathione, glutathione-S-transferase, morte celular, necrose, peroxidação lipídica.

## ABSTRACT

Graphene nanomaterial and its variations such as graphene oxide (GO, graphene oxide) and reduced graphene oxide (rGO, reduced graphene oxide) have been widely studied and can be used in several areas, including bacterial inhibition, drug administration (drug delivery), photothermal therapy and bioremediation of aquatic environments, among other applications. Thus, aquatic environments and their compartments will be fatally affected by these nanomaterials, representing high risks for aquatic biota, as well as for human health. In these environments, GO remains stable for a long time and rGO, which is unstable when suspended in ultrapure water, becomes more stable in the presence of natural organic matter (NOM), being more stable than GO in these conditions. In addition, recent studies have shown that GO can be reduced to rGO by exposure to sunlight and bacterial degradation, as well as by the presence of metals such as aluminum (Al) and iron (Fe) and by sulfur-based inorganic reducers. The response of aquatic organisms, resulting from exposure to GO and rGO, is still poorly understood. In the present study, eight concentrations of the nanomaterials GO and rGO were tested in zebrafish liver cells (ZFL) on a scale of 0.001 to 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , with exposures of 24 and 72 hours. The absorption of GO and rGO cells by ZFL, the production of reactive oxygen species (ROS), cell viability and death, as well as catalase activity (CAT) and S-transferase glutathione (GST) enzymes, as well as non-enzymatic antioxidant glutathione (GSH), were investigated. Lipid peroxidation and total antioxidant capacity were also investigated. GO and rGO showed lower absorption of proteins on their surface and GO adsorption more proteins than rGO. rGO nanosheets are smaller than GO nanosheets, and their hydrophobic characteristic favors their interaction with the cell membrane and, consequently, their entry into cells. Exposure to rGO generated higher ROS production than GO and caused more damage, evidencing greater toxicity of rGO. ZFL cells were able to combat the effects of GO by showing recovery after 72 hours of exposure, while exposure to rGO stopped cell replication at high concentrations. The exposure to low concentrations of rGO caused oxidative stress, loss of antioxidant capacity, and genotoxic damage. Exposure to rGO was harmful to ZFL cells within 24 hours and 72 hours of exposure.

**Keywords:** apoptosis, catalase, reactive oxygen species, oxidative stress, genotoxicity, reduced glutathione, glutathione-S-transferase, cell death, necrosis, lipid peroxidation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Comparação de tamanho de nanopartículas com outros materiais de tamanho maior .....	3
<b>Figura 2</b> - Exemplos para nanoestruturas de carbono 0D, 1D, 2D e 3D.....	4
<b>Figura 3</b> - O papel da nanociência e da nanotecnologia na ciência e na engenharia.....	5
<b>Figura 4</b> - Vários nanomateriais de carbono, incluindo fulereno, nanotubo de carbono, grafeno, ponto de carbono e nanodiamante .....	6
<b>Figura 5</b> - Exemplos de nanomateriais à base de carbono – diferentes estados de hibridização .....	7
<b>Figura 6</b> - Diversos fulerenos, incluindo C70, C76, C80, C84 .....	8
<b>Figura 7</b> - Diagramas esquemáticos de nanotubo de carbono de parede única (SWCNT) e nanotubo de carbono de parede múltipla (MWCNT) .....	9
<b>Figura 8</b> - a Representação esquemática de uma estrutura de nanodiamantes, (b) Representação esquemática do alinhamento de moléculas nemáticas em uma superfície semelhante ao grafite devido ao empilhamento de elétrons $\pi\pi$ . (c) Representação esquemática de uma montagem anisotrópica de nanodiamantes ao longo do diretor nemático.....	10
<b>Figura 9</b> - Esquema exibindo a formação de fulereno e nanotubo a partir do grafeno.....	11
<b>Figura 10</b> - Esquema da estrutura de uma folha de grafeno. Circulos pretos são átomos de carbono e as linhas são as pontes moleculares. ....	13
<b>Figura 11</b> - Estruturas de grafeno (G), óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO).....	14
<b>Figura 12</b> - Mecanismos pelos quais GO podem causar toxicidade às células. Folhas menores de GO podem ser degradadas por lisossoma e excretadas da célula. Folhas maiores de GO podem danificar a membrana celular, por atrito de suas bordas com a membrana, ligando-se a proteínas ou interagindo eletrostaticamente com a fosfatidilcolina, levando à produção de ROS. ....	18
<b>Figura 13</b> – Ilustração representando indivíduos da espécie <i>D. rerio</i> (peixe-zebra) .....	21
<b>Figura 14</b> - Espectro FTIR de GO, rGO, GO-proteína, rGO-proteína e amostras de proteínas. O espectro GO apresenta bandas características com a banda de alongamento OH a $3410\text{ cm}^{-1}$ , alongamento do grupo carboxil ( $\text{C}=\text{O}$ ) a $1627\text{ cm}^{-1}$ , banda de deformação do grupo C-OH em $1267\text{ cm}^{-1}$ , e desenho do grupo CO em $1095\text{ cm}^{-1}$ enquanto rGO não apresentou as mesmas bandas. As bandas de $1627\text{ cm}^{-1}$ em GO-proteína, rGO-proteína e proteína pura correspondem a amida I, II e III. ....	38

**Figura 15** – Potencial zeta e estabilidade de suspensão de 1 (A), 50 (B) e, 100 (C)  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de GO e rGO suspensos em meio de cultura após 0, 24, 48 e, 72 h indicando maior estabilidade de rGO em comparação com GO. D e E mostram dispersão de luz de diâmetro (DSL) de GO e rGO suspensas em meio de cultura após 0, 24 e 72 h, respectivamente. DSL de proteínas no meio de cultura foi medido como controle..... 39

**Figura 16 A.** Imagens das células ZFL fluorescentes após a incubação com 1, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de GO-BSA-F por 24 e 72 h mostrando GO-BSA-F (verde) e os núcleos (azul). Barra de escala: 25  $\mu\text{m}$ . **B.** Endocitose de GO-BSA-F pelas células ZFL mostrando perfil dependente da concentração após exposição de 24 horas; **C.** Endocitose de GO-BSA-F pelas células ZFL após exposição de 72 h; **B e C:** Múltiplos testes T, \*\* e \*\*\*\* indicam diferença significativa de BSA-F/DAPI,  $p < 0,005$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente, ns – sem significância; **D.** Comparação da intensidade da fluorescência verde entre 24 e 72 h. \* Indica diferença significativa entre 24 e 72 h..... 41

**Figura 17** Produção de ROS por células hepáticas de peixe zebra (ZFL) após exposição a 0 (CN), 1, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  GO (A) e rGO (B) após exposição de 24 e 72 h. Foram utilizados os testes Kruskal-Wallis e Dunn, \* indica uma diferença significativa em relação ao controle negativo (0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $p < 0,05$ . ..... 42

**Figura 18** ZFL população celular exposta a 0 (controle negativo, CN), 1, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  GO e rGO por 24 e 72 h. **A, B.** Comparação entre os nanomateriais; **C, D.** Comparação entre os tempos de exposição. \* Indica uma diferença significativa em comparação com o respectivo CN (teste de Kruskal-Wallis e Dunn;  $p < 0,05$ ), # indica diferença significativa entre GO e rGO ou entre 24 e 72 h (Teste T do Student;  $p < 0,05$ ). ..... 44

**Figura 19** - Células totais e viáveis de fígado de peixe zebra (ZFL) após exposição a 0 (controle negativo, NC), 1, 25, 50, 75, e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de GO e rGO por 24 h (**A, B**) e 72 h (**C, D**). \* indica uma diferença significativa de células viáveis de GO e rGO em comparação com o respectivo CN (Kruskal-Wallis e Dunn;  $p < 0,05$ ), # indica diferença significativa entre duas amostras de mesma concentração (Teste T do Student;  $p < 0,05$ ). ..... 46

**Figura 20** Percentual de morte celular por necrose e apoptose de células hepáticas de zebrafish (ZFL) expostas a GO e rGO por 24 h (A, B) e 72 h (C, D). ANOVA ou Kruskal-Wallis de mão única foram empregados para comparar grupos com NC (0), indicado por (\*), ( $p < 0,05$ ). .... 47

**Figura 21** - Espectros de absorvância (A) e emissão (B) de GO e rGO (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em água; exc. 350 nm. .... 63

**Figura 22** - Atividade metabólica das células ZFL após 24h (A) e 72h (B) expostas a GO e rGO. O CN consiste em células expostas apenas ao meio de cultura completo. Comparações entre o CN e os tratamentos, mesma substância e tempo (\*); diferenças entre substâncias, mesmas concentrações e tempo (#), os valores são médios  $\pm$  o desvio padrão. Os dados foram testados aplicando-se o teste ANOVA de duas vias e Tukey..... 64

<b>Figura 23</b> - Geração de ROS após exposição a GO e rGO por 24h (A) e 72h (A). Comparações entre o CN e os tratamentos, mesma substância e tempo (*); diferenças entre as substâncias, nas mesmas concentrações e tempo (#), os valores são média ± o desvio padrão. Os dados foram testados aplicando-se o teste ANOVA de duas vias e Tukey.....	65
<b>Figura 24</b> – Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos de células ZFL expostas a GO e rGO a 0,001; 0,01; 0,1 e 1 µg mL <sup>-1</sup> por 24h e 72h. A atividade da CAT é mostrada nas figuras 4 A e B, foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e Dunn, os valores são a mediana mais o interquartil. A análise da atividade da GST (Fig. 4 C e D) e dos níveis de GSH (Fig. 4 E e F) foi feita utilizando-se o teste ANOVA de duas vias e Tukey, os valores são média ± o desvio padrão. Comparações entre o CN e os tratamentos, mesma substância e tempo (letras maiúsculas e minúsculas) e entre as substâncias, nas mesmas concentrações e tempo (#). ....	66
<b>Figura 25</b> - Peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total medida após 24h e 72h de exposição a GO e rGO (0,001; 0,01; 0,1 e 1 µg mL <sup>-1</sup> ). A análise estatística foi feita utilizando-se os testes de Kruskal-Wallis e Dunn, os valores são a mediana e o interquartil. Comparações entre o CN e os tratamentos, mesma substância e tempo (letras maiúsculas e minúsculas) e entre as substâncias, nas mesmas concentrações e tempo (*). .....	67
<b>Figura 26</b> - Escores de fragmentação das fitas de DNA após exposição a GO e rGO por 24h e 72h. Os valores são percentuais dos escores 0 (nenhuma fragmentação), escore 1 (até 25%), escore 2 (entre 25 e 50%), escore 3 (entre 50 e 75%) e escore 4 (fragmentação acima de 75%). .....	68
<b>Figura 27</b> – Câmara de Neubauer com indicação das câmaras superiores e inferiores .....	84
<b>Figura 28</b> – Contador automático de células (A), aplicação da suspensão celular na lâmina (B) e inserção da lâmina no contador automático (C). .....	85
<b>Figura 29</b> – Ilustração representando a malha da câmara de Neubauer (A) e sentido contínuo de observação e contagem (B).....	86
<b>Figura 30</b> – Exemplo de curva de proteína (BSA) .....	96

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução e justificativa</b> .....	2
<b>1.1. Nanomateriais</b> .....	2
<b>1.2. Nanomateriais baseados em carbono</b> .....	5
<b>1.2.1. Fullerenos</b> .....	7
<b>1.2.2. Nanotubos de carbono</b> .....	8
<b>1.2.3. Nanodiamantes</b> .....	9
<b>1.2.4. Grafeno</b> .....	11
<b>1.2.5. Óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido: Síntese, aplicações e toxicidade</b> .....	13
<b>1.3. Ecotoxicologia <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i></b> .....	19
<b>1.4. <i>Danio rerio</i> e a linhagem celular ZFL</b> .....	21
<b>1.5. Justificativa</b> .....	22
Referências Bibliográficas .....	23
<b>2. Objetivos Gerais</b> .....	29
<b>3. Objetivos Específicos</b> .....	29
<b>Capítulo 1 – Uma abordagem toxicodinâmica para investigar a toxicidade de nanofolhas de óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO) sobre linha celular de fígado de peixe-zebra (ZFL).</b> .....	31
Resumo .....	31
<b>1. Introdução</b> .....	31
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	33
<b>2.1. Síntese de GO e rGO</b> .....	33
<b>2.2. Caracterização de GO e rGO</b> .....	34
<b>2.3. Conjugação de GO e rGO com o fluoróforo NHS-fluoresceína</b> .....	34
<b>2.4. Aquisição, manutenção e exposição das células ZFL</b> .....	35
<b>2.5. Avaliação da endocitose de GO e rGO pelas células ZFL</b> .....	35
<b>2.6. Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS)</b> .....	36
<b>2.7. Crescimento da população celular, viabilidade e morte</b> .....	36
<b>2.8. Determinação de necrose e apoptose</b> .....	36
<b>2.9. Análise Estatística</b> .....	37

<b>3.</b>	<b>Resultados</b> .....	37
<b>3.1.</b>	<b>Caracterização de GO e rGO</b> .....	37
<b>3.2.</b>	<b>Endocitose de GO e rGO por células ZFL</b> .....	40
<b>3.3.</b>	<b>Produção Intracelular de ROS</b> .....	42
<b>3.4.</b>	<b>Efeitos de GO e rGO na população de células e na viabilidade celular</b> .....	43
<b>4.</b>	<b>Discussão</b> .....	47
	Conclusões.....	50
	Referências .....	51
	Capítulo 2 - Estresse oxidativo e genotoxicidade na linhagem de células hepáticas de zebrafish - diferenças entre GO e rGO em concentrações ambientalmente relevantes .....	56
	Destaques.....	57
<b>1.</b>	<b>Introdução</b> .....	58
<b>2.</b>	<b>Materiais e Métodos</b> .....	59
<b>2.1.</b>	<b>Síntese e Caracterização do Óxido de Grafeno e do Óxido de Grafeno Reduzido</b> 59	
<b>2.2.</b>	<b>Aquisição e Cultivo da linhagem ZFL e Design Experimental</b> .....	60
<b>2.3.</b>	<b>Ensaio de redução de resazurina</b> .....	60
<b>2.4.</b>	<b>Geração de Espécies de Oxigênio</b> .....	61
<b>2.5.</b>	<b>Defesas antioxidantes e estresse oxidativo</b> .....	61
<b>2.6.</b>	<b>Avaliação de genotoxicidade</b> .....	62
<b>2.7.</b>	<b>Estatística</b> .....	62
<b>3.</b>	<b>Resultados</b> .....	63
<b>3.1.</b>	<b>Síntese e Caracterização do Óxido de Grafeno e Óxido de Grafeno Reduzido</b> .	63
<b>3.2.</b>	<b>Ensaio de redução de resazurina</b> .....	63
<b>3.3.</b>	<b>Geração de Espécies de Oxigênio</b> .....	64
<b>3.4.</b>	<b>Defesas antioxidantes e estresse oxidativo</b> .....	65
<b>3.5.</b>	<b>Avaliação de genotoxicidade</b> .....	67
<b>4.</b>	<b>Discussão</b> .....	68
	Conclusão .....	74
	Referências .....	75
<b>5.</b>	<b>Considerações finais</b> .....	80
<b>6.</b>	<b>Apêndice</b> .....	81

## **Estrutura da Tese**

Visando facilitar a publicação dos resultados, esta tese foi estruturada na forma de capítulos, os quais contemplam os itens Resumo, Introdução, Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Conclusões e Referências Bibliográficas. Previamente aos capítulos, foi incluído uma Introdução Geral e a Justificativa do trabalho. A Introdução Geral discorre sobre nanomateriais em geral e os baseados em carbono, em especial os nanomateriais de que trata esta tese, o Óxido de Grafeno e Óxido de Grafeno Reduzido (aplicações e efeitos tóxicos), ecotoxicologia *in vivo* e *in vitro*, o peixe zebra (*Danio rerio*) e a linhagem celular de fígado de peixe zebra (ZFL) como modelos experimentais. Além disso, dois capítulos comparando os efeitos das nanomateriais óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido sobre a linhagem celular ZFL. Os capítulos são ordenados de acordo com as diferentes etapas da pesquisa, conforme descrito abaixo:

### **Capítulo 1 - Tempo-dependência e dose-reposta das nanofolhas de óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO) sobre a linhagem celular de fígado de peixe zebra -**

Neste capítulo, células da linhagem ZFL foram expostas a 5 concentrações (1, 25, 50, 75 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido, por 24 e 72 horas. Após a exposição, foram avaliadas a letalidade dos nanomateriais, bem como sua dependência em relação ao tempo e às concentrações testadas. Foram avaliados a taxa e dois tipos de morte celular (apoptose e necrose), bem como a endocitose dos nanomateriais pelas células e a geração de espécies reativas de oxigênio.

### **Capítulo 2 - Estresse oxidativo e efeitos genotóxicos sobre a linhagem celular de fígado de peixe zebra. Diferenças entre GO e rGO em concentrações ambientalmente relevantes -**

Neste capítulo, as células ZFL foram expostas a concentrações sub-letais (0,001; 0,01; 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido, por 24 e 72 horas. Foram avaliadas a geração de espécies reativas de oxigênio, a atividade de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante total. Também foram avaliados os danos genotóxicos, tais como quebras nas fitas de DNA.

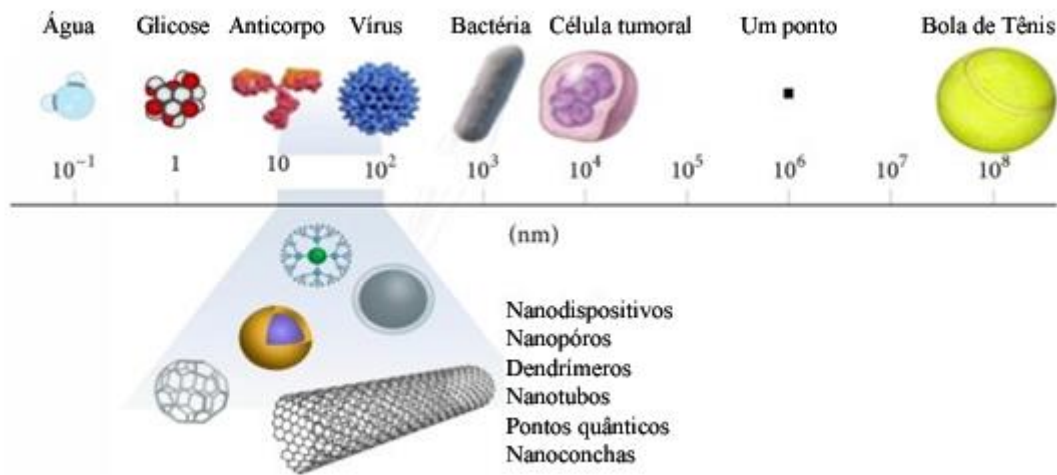
## 1. Introdução e justificativa

### 1.1. Nanomateriais

Em 1959, o físico Richard Feynman palestrou durante uma Reunião da Sociedade Física Americana, na Caltech. O título da palestra era “*There’s Plenty of Room at the Bottom*”, em português "Há muito espaço no fundo". O palestra de Feynman se tornou o ponto central da nanotecnologia, antes mesmo do termo "nano" surgir. Somente em 1974 é que surgiu o termo nanotecnologia, primeiramente mencionado por Norio Taniguchi. Feynman e Taniguchi discutiram sobre uma abordagem de cima para baixo (*top-down*), mas em 1981 K. E. Drexler sugeriu o posto, a abordagem ascendente (*bottom-up*) aplicaria engenharia molecular para construir máquinas moleculares e dispositivos moleculares com precisão atômica. Na abordagem *top-down* inicia-se a partir de grandes partículas que são reduzidas em partículas menores, enquanto na abordagem *bottom-up* o processo se inicia a partir de átomos ou moléculas, que se acumulam para formar estruturas maiores. Em 1986, Drexler publicou seu livro, "*Motores da Criação*", popularizando a termo nanotecnologia (ASHBY; FERREIRA; SCHODEK, 2009).

Embora o termo nanotecnologia seja novo, nanomateriais ocorrem naturalmente ou são acidentalmente fabricados há muito tempo. Por exemplo, nanopartículas de carbono foram usadas para o reforço de pneus por mais de 100 anos, assim como proteínas em nanoescala fazem parte das vacinas desde o início do século 20. Mas apenas no final do século 20 percebeu-se que o comportamento dos materiais dependia da escala e que essa dependência era mais evidente quando a escala era nanométrica. Materiais com ao menos uma de suas dimensões com tamanho entre 1 e 100 nanômetros (nm) são considerados como nanomateriais. Essa escala de 1 a 100 nm tem influência enorme sobre propriedades mecânicas, térmicas, elétricas, magnéticas, ópticas e estéticas dos nanomateriais (ASHBY; FERREIRA; SCHODEK, 2009; KOLAHALAM et al., 2019). A figura 1 fornece uma perspectiva da escala nanométrica em comparação com escalas maiores.

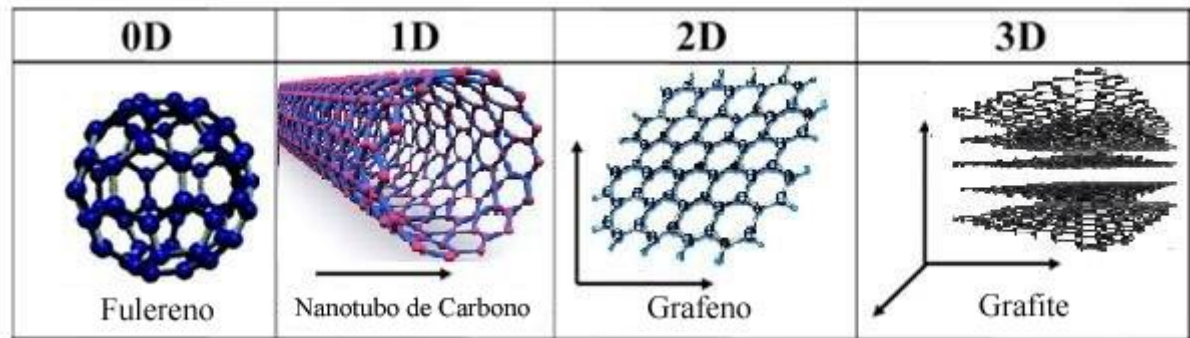
**Figura 1** - Comparação de tamanho de nanopartículas com outros materiais de tamanho maior



**Fonte:** AMIN; ALAZBA; MANZOOR (2014), licença CC BY 3.0

Os nanomateriais podem ser classificados por suas diferentes formas como nanobastões, nanopartículas, nanofolhas que são caracterizadas com base em sua dimensionalidade: dimensão zero (0-D), unidimensional (1-D), bidimensional (2-D) e tridimensional (3-D) (Figura 2). Eles também diferem quanto a morfologia, tamanho, propriedades e seus constituintes, podendo ser baseado em carbono, nanopartículas de metal, nanomateriais semicondutores, nanomateriais poliméricos, nanomateriais à base de lipídios. Nanomateriais tem área maior de superfície em relação ao volume, essa característica tem grande impacto nas propriedades desses materiais. Assim, o formato de um nanomaterial também é extremamente importante, pois formas diferentes produzem proporções superfície-volume distintas e, portanto, propriedades e comportamentos diferenciados. Matrizes de metal, cerâmica ou polímeros podem ser incorporadas a nanomateriais para formar nanocompósitos com o intuito de obter novas propriedades. A caracterização deve ser adequada para estabelecer uma correlação entre a estrutura, forma e composição química dos nanomateriais com suas propriedades. De forma geral, técnicas analíticas e de imagem são bastantes utilizadas na caracterização desses materiais (ASHBY; FERREIRA; SCHODEK, 2009; KOLAHALAM et al., 2019).

**Figura 2** - Exemplos para nanoestruturas de carbono 0D, 1D, 2D e 3D



**Fonte:** MOHAMED (2017), licença CC BY 4.0

A nanotecnologia é um campo interdisciplinar que requer conhecimentos em física, química, engenharias de materiais, mecânica e elétrica, biologia e medicina (Figura 3). Quanto às muitas aplicações, nanomateriais são empregados na fabricação de sensores e biosensores, dispositivos de micro-ondas, dispositivos de armazenamento de energia, baterias e supercondensadores, mídias de gravação, isolantes, deslocadores e circuladores, no tratamento de águas residuais e na indústria de tingimento. Além dessas aplicações, a nanotecnologia é aplicada na medicina desde 1965, na engenharia de tecidos, biosensores e *entrega de medicamentos* (KOLAHALAM et al., 2019).

**Figura 3** - O papel da nanociência e da nanotecnologia na ciência e na engenharia

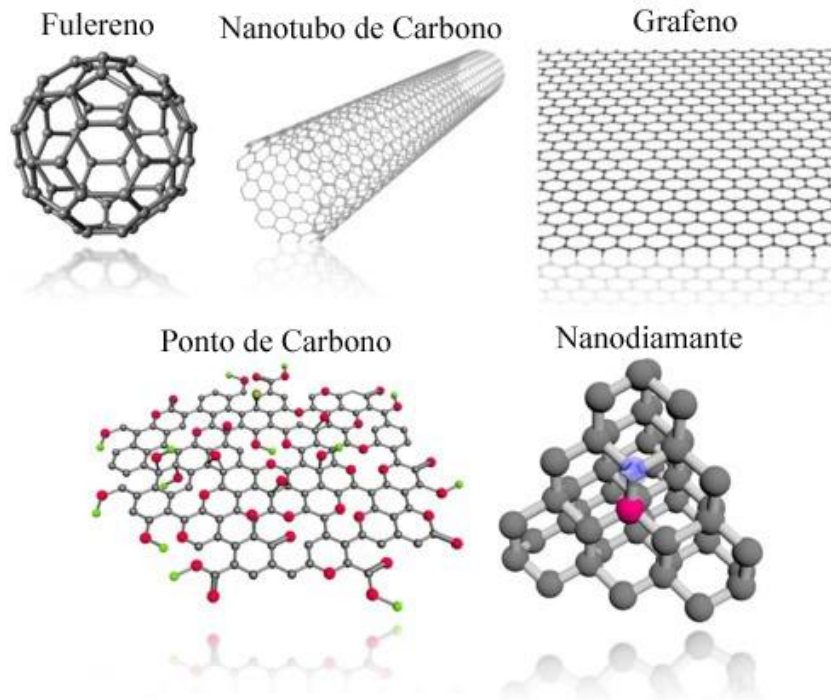


**Fonte:** KOLAHALAM et al. (2019)

### 1.2. Nanomateriais baseados em carbono

O carbono é um elemento abundante no universo, é um material alotrópico e a partir de dele podem se formar outros compostos com propriedades completamente diferentes, dependendo da disposição dos átomos de carbono adjacentes. O diamante, por exemplo, é conhecido por sua dureza, enquanto o grafite é frágil e quebradiço. Nanomateriais de carbono estão entre os mais promissores na nanotecnologia devido à sua ampla gama de aplicações. Além disso, eles também podem ser conjugados com outras matrizes para formar nanocompósitos com propriedades melhoradas. Dentre as muitas aplicações desses nanomateriais, também podemos citar as aplicações farmacêuticas e biomédicas. Fullerenos, nanotubos de carbono e grafeno são alguns dos nanomateriais baseados em carbono (SIQUEIRA; OLIVEIRA, 2017).

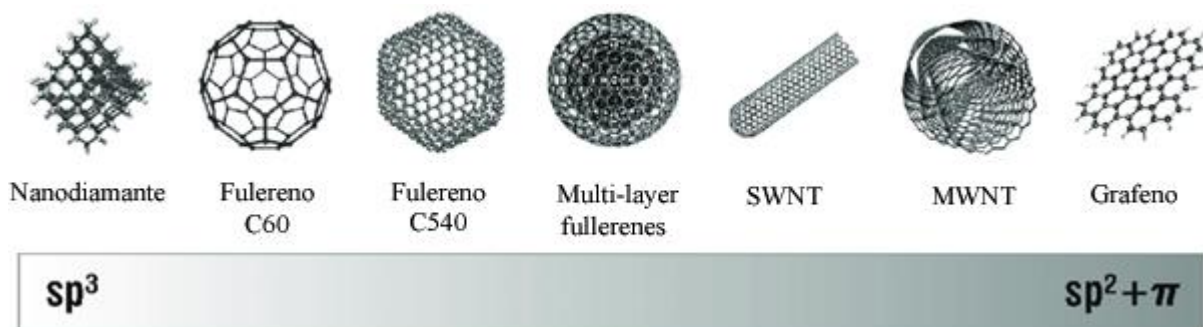
**Figura 4** - Vários nanomateriais de carbono, incluindo fulereno, nanotubo de carbono, grafeno, ponto de carbono e nanodiamante



**Fonte:** HONG et al. (2015)

A conformação estrutural do carbono e seu estado de hibridização também influenciam propriedades físicas, químicas e eletrônicas dos nanomateriais de carbono. As relações de ligação com os átomos vizinhos determinam se o carbono vai se hibridizar em uma configuração  $sp^2$  ou  $sp^3$ . Esses estados de hibridização mutáveis são responsáveis pela diversidade de compostos orgânicos, bem como pelas diferenças consideráveis entre as configurações em massa do carbono. Em altas temperaturas ou pressões, o carbono assume a configuração trigonométrica  $sp^3$  termodinamicamente favorável do diamante. Porém, quando formados em temperaturas mais baixas o carbono adota a conformação planar  $sp^2$  e forma folhas de monocamada ligadas por três ligações covalentes sigma e uma única ligação  $\pi$  (Figura 5) (MAUTER; ELIMELECH, 2008).

**Figura 5** - Exemplos de nanomateriais à base de carbono – diferentes estados de hibridização

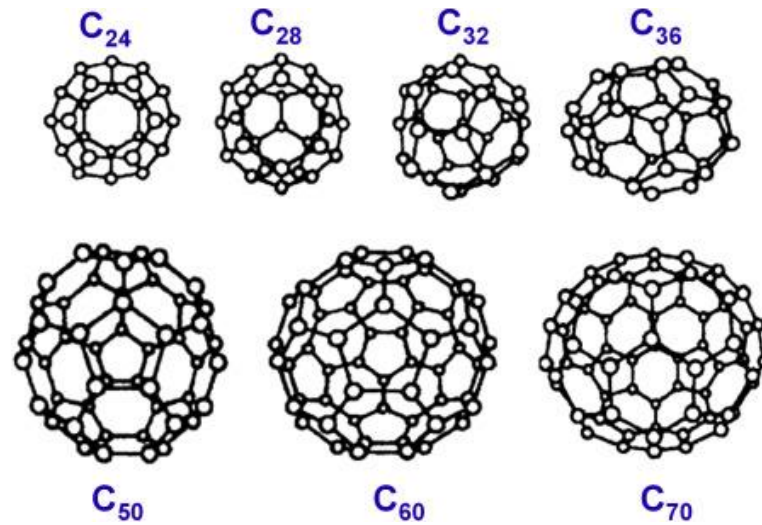


Fonte: MAUTER; ELIMELECH (2008)

### 1.2.1. Fullerenos

Os fullerenos estão entre os nanomateriais de carbono mais amplamente estudados. O fulereno mais investigado é o *Buckminsterfullereno* (C60), que contém 60 átomos de carbono e é um icosaedro truncado com 20 hexágonos e pentágonos, semelhante a uma bola de futebol. Além da molécula C60, o fulereno pode ter estruturas maiores, como C70, C76 e C78, e estruturas menores, como C28 e C36. Na década de 1990, o C60 e outros fullerenos começaram a ser produzidos em grandes quantidades pelo meio da condensação da fuligem que é gerada na vaporização do grafite. Os fullerenos também podem ocorrer naturalmente em materiais afetados por eventos de alta energia, como raios e meteoros, e em amostras geológicas. O diâmetro de uma molécula de fulereno C60 é de aproximadamente 1 nm. A síntese de fullerenos inclui principalmente duas abordagens, o método de cima para baixo (por laser ou evaporação induzida por calor de grafite) e o método de baixo para cima (síntese química direta de precursores aromáticos menores). Devido ao seu tamanho ultrapequeno, dispersão uniforme e modificações químicas ajustáveis, os fullerenos são muito estudados em pesquisas biomédicas, com destaque para a terapêutica, diagnóstico e bio-imagem. Ao contrário dos cristais de grafite ou diamante, que tem arranjos de átomos, o fulereno forma cristais moleculares e pode ser considerado uma estrutura de carbono com dimensão zero (Figura 6) (KAI-HUA CHOW; GU; XU, 2020; SIQUEIRA; OLIVEIRA, 2017).

**Figura 6** - Diversos fulerenos, incluindo C70, C76, C80, C84

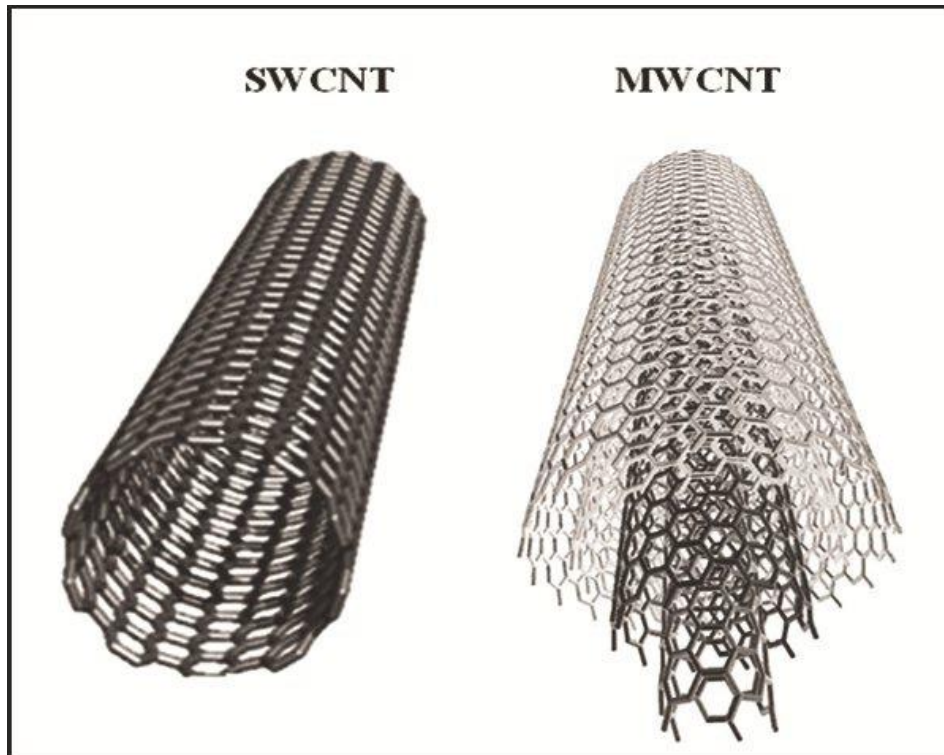


**Fonte:** MALHOTRA; ALI (2018)

### 1.2.2. Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono são macromoléculas unidimensionais bem ordenadas, compostos de tubos coaxiais únicos ou múltiplos de folhas gráficas. Eles podem ser classificados principalmente em dois tipos: nanotubos de carbono de parede única (*single walled carbon nanotubes*, SWCNTs), construídos por uma única camada gráficas coaxiais e os nanotubos de carbono de múltiplas paredes (*multiwalled carbon nanotubes*, MWCNTs). Existem três técnicas principais usadas para a produção de nanotubos de carbono: o método de descarga com arco de carbono, o método de ablação a laser e o método de deposição química a vapor. Os nanotubos de carbono também são amplamente estudados na pesquisa biomédica devido à química de superfície multifuncional que culmina em uma alta capacidade de entrega de drogas (*drug delivery*), eles também podem ser aplicados na terapia fototérmica e fotodinâmica. Além de biocompatíveis, os nanotubos de carbono também são extremamente flexíveis e resistentes. Estes materiais são hidrofóbicos, mas pode ser modificado para melhorar sua dispersão em água, aumentando assim a sua biocompatibilidade e diminuindo sua toxicidade (Figura 7) (KAI-HUA CHOW; GU; XU, 2020).

**Figura 7** - Diagramas esquemáticos de nanotubo de carbono de parede única (SWCNT) e nanotubo de carbono de parede múltipla (MWCNT)



**Fonte:** CHOUDHARY; GUPTA (2011)

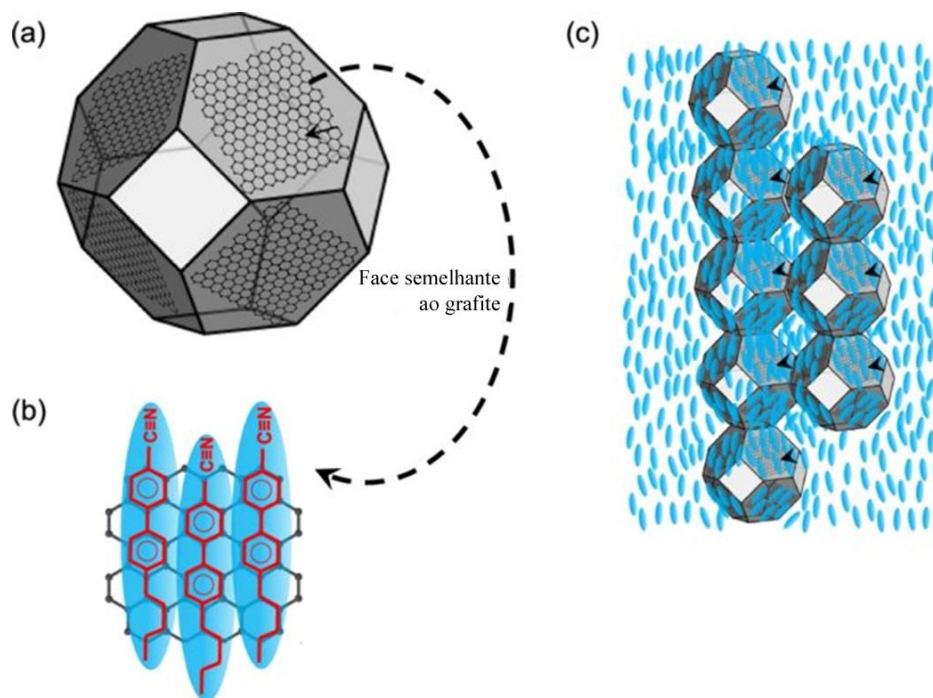
### 1.2.3. Nanodiamantes

Nanodiamantes são partículas de carbono com diâmetro de 2-8 nm, apresentam uma arquitetura octaédrica truncada facetada. São compostos principalmente de hibridização de carbono  $sp^3$  no núcleo, com hibridização de  $sp^2$  e carbonos de desordem/defeito na superfície. O método de síntese determina a sua classificação, que pode ser de detonação, de alta pressão e alta temperatura. Os nanodiamantes de detonação são uma mistura de partículas de diamante e outros alótropos de carbono. Os nanodiamantes têm uma grande quantidade de espécies de oxigênio na superfície (principalmente grupos carboxila), formando assim potenciais de superfície elevados e dispersões aquosas estáveis (KAI-HUA CHOW; GU; XU, 2020).

Nanodiamantes possuem muitas vantagens em relação a outros nanomateriais de carbono. Eles são versáteis e podem ser modificados com uma variedade de grupos funcionais, como grupo carboxila, grupo amino e grupo hidroxila, sem muitas alterações em seu núcleo de diamante. Além disso, os nanodiamantes possuem fortes campos eletrostáticos em cada um de suas facetas, atraindo moléculas de água e criando uma camada de hidratação na interface nanodiamante-solvente e, que medeia sua ligação com íons e moléculas de água. Esta

capacidade reversível e potente de ligação ao fármaco resulta na liberação sustentada à medida que as moléculas do fármaco são trocadas na superfície dos nanodiamantes. Mais importante ainda, ao contrário de outros nanomateriais de carbono (por exemplo, fulerenos e nanotubos de carbono), os nanodiamantes foram relatados como possuidores de biocompatibilidade mais alta e rápida eliminação do organismo (Figura 8) (KAI-HUA CHOW; GU; XU, 2020).

**Figura 8** - a Representação esquemática de uma estrutura de nanodiamantes, (b) Representação esquemática do alinhamento de moléculas nemáticas em uma superfície semelhante ao grafite devido ao empilhamento de elétrons  $\pi\pi$ . (c) Representação esquemática de uma montagem anisotrópica de nanodiamantes ao longo do diretor nemático.

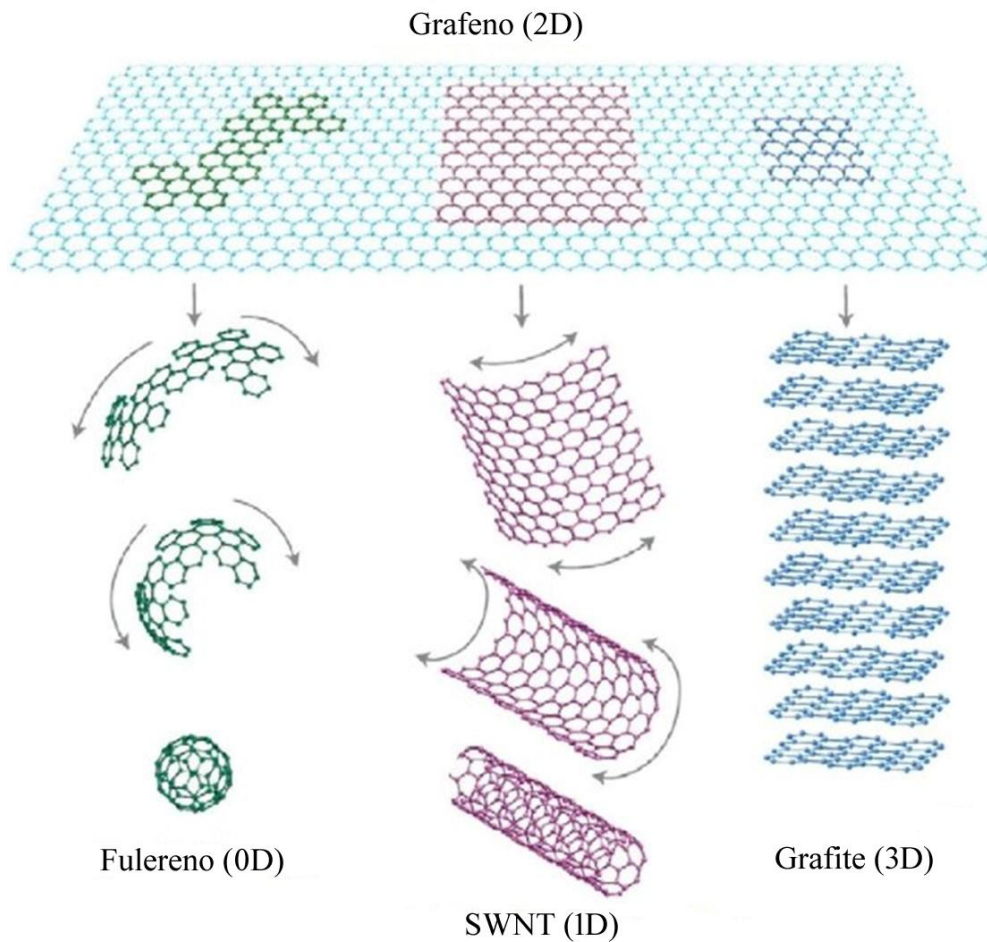


**Fonte:** BASU et al. (2017), licença CC BY 4.0

### 1.2.4. Grafeno

Entre muitos nanomateriais engenheirados, o grafeno (2D, hibridização  $sp^2$ ) ocupa um papel de destaque (RAO et al., 2009). Este nanomaterial com a espessura de 1 nanômetro, é flexível (ZHU et al., 2010), porém muito resistente e capaz de conduzir eletricidade e calor de forma extremamente eficiente e única (CASTRO NETO et al., 2009; GEIM, 2009). Apesar de ser um material relativamente novo, o grafeno é considerado o pai de todos os materiais grafiticos (RAO et al., 2009), isso porque a partir dele podem ser formadas outras estruturas, como os fulerenos 0D e os nanotubos de carbono 1D (Figura 9) (GEIM; NOVOSELOV, 2007; IJIMA, 1991; KROTO et al., 1985).

**Figura 9** - Esquema exibindo a formação de fulereno e nanotubo a partir do grafeno.



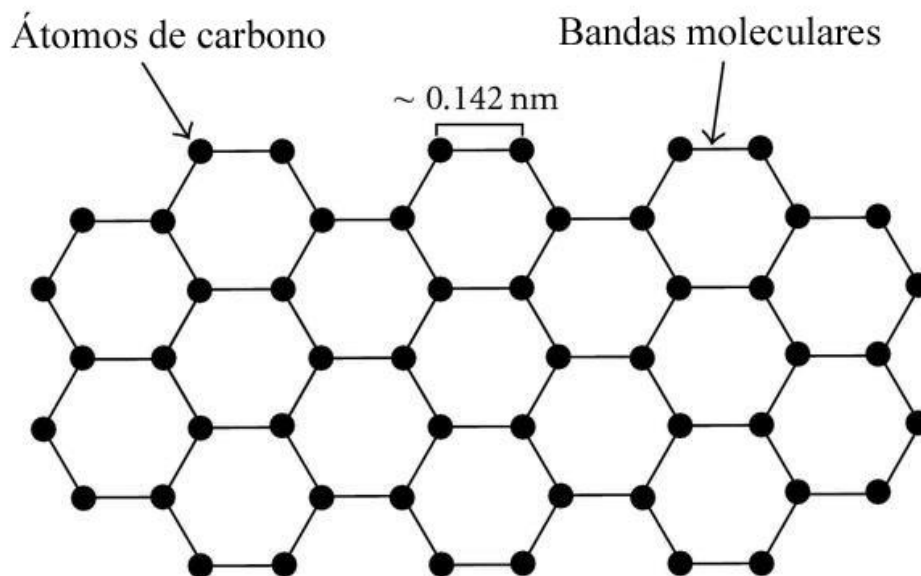
**Fonte:** AMABYE; HAGOS; BEYENE (2018)

O grafeno começou a ser estudado 40 anos atrás, porém, era considerado um material teórico e impossível de existir em estado livre (GEIM; NOVOSELOV, 2007), até que, em 2004, Konstantin Novoselov e André Geim juntamente com sua equipe conseguiram isolá-lo e caracterizá-lo. Este feito rendeu-lhes o prêmio Nobel de Física em 2010 ("O Prêmio Nobel de Física de 2010 - Press Release", [s.d.]).

A posição espacial dos átomos de carbono no grafeno forma uma rede hexagonal resultando em uma estrutura próxima a uma folha de papel (Figura 10), com uma ligação  $\sigma$  cada carbono de apresentação de uma distância aproximada de 1,42 Å dos seus três átomos vizinhos. A quarta ligação, é uma ligação  $\pi$ , que é orientada para a do plano com um par de lobos simétricos orientados ao longo do z eixo e centrados no núcleo. A maioria das características do grafeno é resultante da formação de bandas  $\pi$  e  $\pi^*$ , provenientes da ligação  $\pi$  (ALLEN; TUNG; KANER, 2010; SIQUEIRA; OLIVEIRA, 2017).

Quanto às aplicações do grafeno, ele pode atuar tanto como receptor quanto doador de elétrons. Mais especificamente, ele pode ser empregado em fontes de energia renováveis e como eletrodos transparentes em células solares sensibilizadas por corante. Baterias de íon-lítio de última geração e cátodos com alta condutividade elétrica também estão entre os produtos com grafeno em sua composição. O grafeno também pode ser usado em fotônica, fotodetectores, moduladores ópticos, controladores de polarização óptica, lasers de estado sólido com bloqueio de modo e isoladores. Sua estrutura bidimensional facilita a funcionalidade para a incorporação de biomoléculas e nanopartículas, podendo assim ser empregado também em biosensores e entrega de drogas (CHOI et al., 2010; SIQUEIRA; OLIVEIRA, 2017).

**Figura 10** - Esquema da estrutura de uma folha de grafeno. Circulos pretos são átomos de carbono e as linhas são as pontes moleculares.

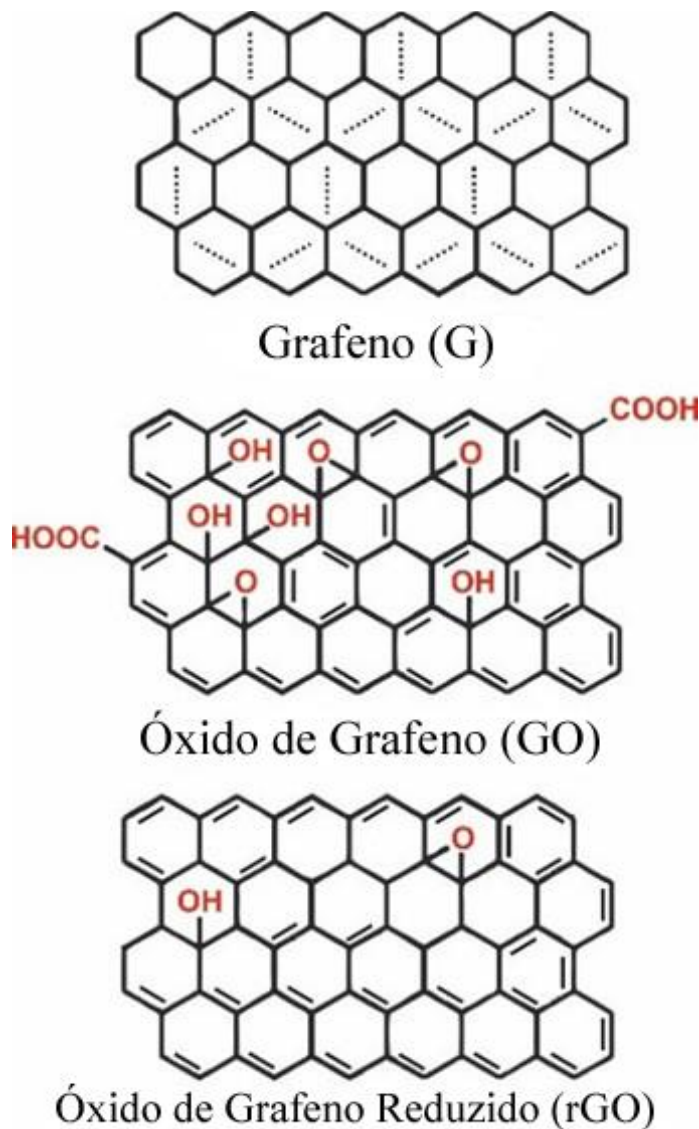


Fonte: ROBERTS et al. (2010), licença CC BY 3.0

### 1.2.5. Óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido: Síntese, aplicações e toxicidade

O óxido de grafeno (GO, *graphene oxide*) foi descoberto pela primeira vez por (BRODIE, 1859), que desenvolveu um método oxidativo utilizando grafite. Posteriormente, o método foi modificado por HUMMERS; OFFEMAN (1958) (DASMAHAPATRA; DASARI; TCHOUNWOU, 2018). O GO é constituído basicamente de uma folha de grafeno adicionada de grupos epóxi, hidroxila e carboxila que o tornam extremamente hidrofílico, características que facilitam a sua dispersão na água (GAO et al., 2012; LIAO et al., 2011). Em contrapartida, após ser reduzido, como funcionalidades do oxigênio são removidas tornando o material mais hidrofóbico. A transformação de GO em óxido de grafeno reduzido (rGO, *óxido de grafeno reduzido*) também pode ser observada pela mudança de cor (GO) para preto (rGO), um aumento na relação C/O, além de um aumento na condutividade do material (Figura 11) (CHUA; PUMERA, 2014).

**Figura 11** - Estruturas de grafeno (G), óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO)



**Fonte:** TADYSZAK; WYCHOWANIEC; LITOWCZENKO (2018)

Entre muitas outras funcionalidades, o óxido de grafeno pode ser reduzido para obtenção do grafeno (DREYER et al., 2010). A redução de GO produz um material muito semelhante ao grafeno puro (*pristine*), o rGO. Contudo, o rGO pode apresentar ainda alguns grupos funcionais e defeitos residuais que alteram a estrutura do plano de carbono "C" (Figura 11). O rGO pode ser produzido por redução térmica (por exemplo, recozimento térmico, micro-ondas e fotoredução); redução química (por exemplo, adição de reagentes químicos, reações fotoquímicas, remoção eletroquímica de grupos funcionais do oxigênio, redução solvotermal) ou ainda por redução multi-passos (combinação de técnicas de redução) (PEI; CHENG, 2012).

GO e rGO podem ser aplicados em muitos campos, tais como dispositivos nanoeletrônicos, condutores transparentes e materiais nanocompósitos. Também são estudadas aplicações em biotecnologia e biomedicina, dentre as quais encontram-se a inibição bacteriana, administração de fármacos (*drug delivery*), terapia fototermal e biorremediação de ambientes aquáticos (FENG; WU; QU, 2013; SHARMA et al., 2016; WANG et al., 2011).

Com tantas possibilidades de aplicação, em tantas áreas diferentes, é fato que esses nanomateriais baseados em grafeno serão liberados no meio ambiente. E uma vez inseridos no ecossistema, pode representar uma ameaça para toda a biota, inclusive aos humanos (DASMAHAPATRA; DASARI; TCHOUNWOU, 2018).

Desta forma, avaliar a biocompatibilidade e a toxicidade de novos nanomateriais é tão importante quanto avaliar suas propriedades e possíveis aplicações (SEABRA et al., 2014). Entretanto, se comparamos a produção de estudos que avaliam os efeitos de nanomateriais à biota aquática com estudos de síntese/caracterização ou aplicação de nanomateriais, fica explícito que os estudos ecotoxicológicos ainda são escassos (CHEN et al., 2012; CHOWDHURY et al., 2013; PRETTI et al., 2014; MONTAGNER et al., 2016, FADEEL et al., 2018).

Estudos importantes foram realizados *in vitro* e *in vivo* para investigar a toxicidade de GO e outros materiais baseados em carbono, em especial aqueles que investigam os efeitos neurotóxicos causados após a exposição a esses nanomateriais. Por exemplo, um estudo com células neuronais humanas (PC12) expostas ao grafeno e à nanotubos de carbono de parede única (SWCNT) gerou um aumento na ativação da caspase-3, liberação de lactato desidrogenase e geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, *reactive oxygen species*) (ZHANG et al., 2010). SWCNT também causaram efeitos neurotóxicos em culturas de células neuronais e gliais derivadas do córtex frontal e estriado de ratos (BUSSY et al., 2015). Outro estudo, também utilizando SWCNT, demonstrou causar déficit de habilidades cognitivas em ratos, além de função motora diminuída, plasticidade sináptica diminuída e potencial pós-sináptico excitatório diminuído no hipocampo (GAO et al., 2015). Altas doses de nanofibras de GO induziram a geração de ROS, edema mitocondrial, formação de autofagossomos e alta taxa de necrose em cultura de células de neuroblastoma (MARI et al., 2016).

Uma revisão da literatura, escrita por CHEN et al., (2020) destaca os principais efeitos do GO, *in vivo* e *in vitro*. Segundo eles, existem quatro vias pelas quais os materiais baseados

em grafeno podem entrar no corpo de um organismo: ingestão, penetração dérmica e implantação ou implantação para aplicações biomédicas.

Para humanos e outros mamíferos, a inalação é principal rota de exposição a nanomateriais (PELIN et al., 2018). Pacientes clínicos são mais suscetíveis à exposição oral, podendo haver acumulação no intestino dos pacientes, como foi demonstrado em estudos realizados com camundongos (DUCH et al., 2011). Os olhos e a derme também são expostos a nanomateriais baseados em carbono devido ao contato com dispositivos eletrônicos vestíveis e lentes de contato inteligentes. A exposição cutânea pode ocorrer durante a esfoliação térmica do grafite e o seu processamento na forma de pó seco. Outra forma de exposição cutânea é pelo contato com meios antimicrobianos tópicos na forma de bandagens, pomadas ou tecido de algodão. Infelizmente, há pouca informação disponível sobre este assunto e as informações existentes são fragmentadas, com falta de estudos substanciais (CHEN et al., 2020).

O sistema circulatório é a primeira interface biológica para nanomateriais que entram no corpo. Devido à alta atividade de superfície dos nanomateriais, as interações dos nanomateriais com os componentes bioquímicos no sangue são inevitáveis. A presença dos grupos funcionais de oxigênio na superfície de GO confere a ele uma atividade hemolítica, que pode ser atenuada com um revestimento de quitosana. Assim como a quitosana, outros revestimentos de superfície como albumina sérica bovina, heparina e membranas lipídicas aumentam a biocompatibilidade de GO com o sangue (CHEN et al., 2020).

Peixes zebra adultos foram expostos ao GO, sua prole foi avaliada e foram observados efeitos neurotóxicos, incluindo perda de neurônios dopaminérgicos, autofagia, diminuição da ubiquitina e  $\beta$ -galactosidase aumentada (HU; WEI; MU, 2017). Tais efeitos neurotóxicos têm sido associados a alterações no comportamento como, por exemplo alterações na locomoção em termos de aumento do ângulo de virada, sugerindo sintomas motores semelhantes ao Parkinson. Outros efeitos tais como alterações cardíacas e dopaminérgicas, bem como alterações na expressão gênica neuronal e modificações morfológicas surgiram após a exposição de larvas de peixe zebra ao GO durante seis dias (SOARES et al., 2017). Ainda, experimentos *in vivo* demonstraram que este nanomaterial pode translocar do ambiente para o cérebro de larvas de *D. rerio*, causando danos mitocondriais, geração de ROS e metilação do DNA (CHEN et al., 2015).

Os estudos realizados até o momento, sejam *in vivo* ou *in vitro*, apontam os principais mecanismos de toxicidade de GO. O primeiro deles é a interação de GO com as membranas

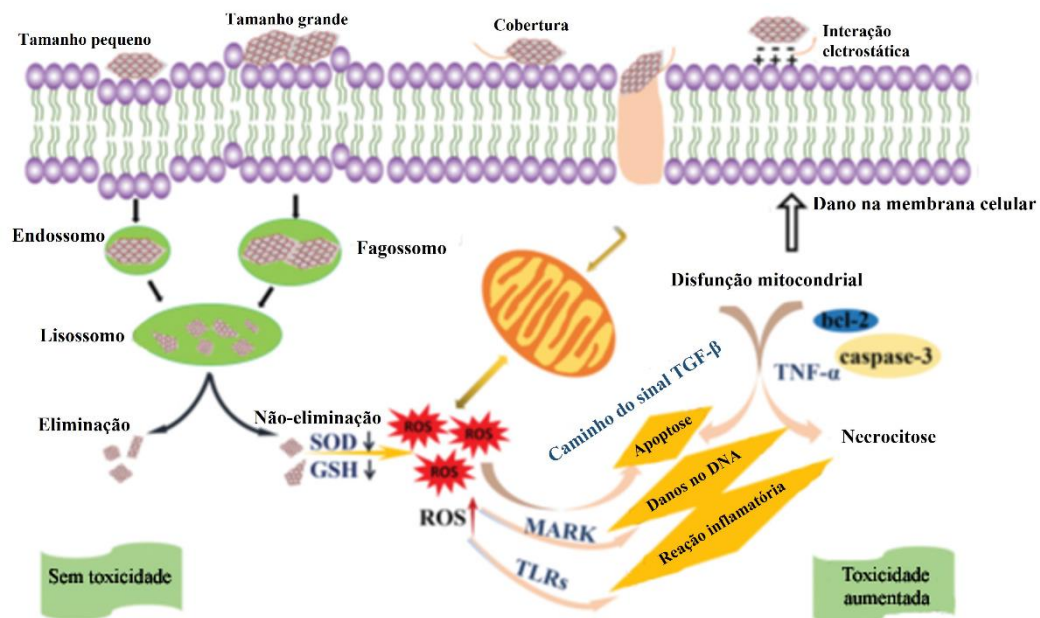
celulares que podem ou não causar toxicidade, dependendo de fatores como a quantidade de grupos funcionais de oxigênio e da presença de proteínas e lipídios que venham a revestir o nanomaterial. Em meio de cultura sem soro fetal bovino (SFB), o GO interagiu diretamente com as células, danificando a membrana, levando à morte celular. Na ausência de SFB e, conseqüentemente de proteínas revestindo o nanomaterial, as bordas afiadas do GO causam danos mecânicos às membranas. Os danos mecânicos causados por GO podem ocorrer pela interação eletrostática do GO carregado negativamente e a fosfatidilcolina da membrana celular, que tem carga positiva. Quando as nanofolhas de GO se inserem na membrana lipídica das células, elas ocupam o lugar de moléculas de fosfolipídios que foram extraídas. Devido à grande área de superfície específica e aos seus grupos funcionais, as proteínas presentes no SFB adsorvem na superfície do GO, impedindo a interação direta entre a membrana celular e o GO. Da mesma forma, quando inaladas, as nanofolhas de GO podem interagir com as proteínas do plasma e ser aprisionadas e retidas nos pulmões (CHEN et al., 2020).

A entrada dos nanomateriais baseados em grafeno na célula também pode ocorrer por fagocitose, macropinocitose e endocitose mediada por receptores. GO pode ser retido em vesículas de macrófagos e células A549, e o processo de captação por citofagia ativa e / ou macropinocitose. Em meio de cultivo, o diâmetro hidrodinâmico do GO é alterado devido à agregação, e isso está diretamente relacionado à sua via de entrada. Geralmente, quanto menor o tamanho lateral, mais facilmente ele pode ser captado pelas células, nanofolhas de GO com diâmetro < 500 nm entram nas células através principalmente de pacotes de pseudópodes filamentosos e endocitose mediada por clatrina. Já as nanofolhas com diâmetro entre 1 e 2  $\mu\text{m}$  entram nas células principalmente por fagocitose. Além do tamanho da partícula, a carga superficial dos nanomateriais também influencia a absorção celular. Em células fagocíticas, a fagocitose ativa é forte o suficiente para superar a barreira de repulsão eletrostática, levando a um aumento da capacidade de captação celular (CHEN et al., 2020).

Em embriões de *D. rerio*, nanomateriais podem entrar através do córion, uma membrana acelular transparente, composta de proteínas glicosiladas, organizadas em estruturas de três camadas e perfuradas por canais de poros em forma de cone que tem aproximadamente 500-700 nm de diâmetro e área de superfície média com aproximadamente  $0,17 \mu\text{m}^2$ . Em adultos, a absorção principalmente ocorre através das guelras e pode acumular no fígado, cérebro, intestino e outros órgãos do corpo (DASMAHAPATRA; DASARI; TCHOUNWOU, 2018).

O estresse oxidativo é um dos principais efeitos tóxicos de materiais baseados em grafeno, podendo causar danos diretos às membranas celulares (JAWORSKI et al., 2019) ou indiretos (WU; ZHOU; OUYANG, 2021), por exemplo danos no DNA. Após exposição ao GO por 10 dias, algas da espécie *Euglena gracilis* tiveram o crescimento inibido inclusive com uma diminuição no conteúdo de pigmento fotossintético e um aumento no nível de ROS. Em camundongos que foram administrados por via oral com rGO, a exposição ocasionou o aceleramento do processo de envelhecimento com uma diminuição na atividade de enzimas antioxidantes. O contato de agregados de GO com a membrana pode perturbar o arranjo da fibrina celular e induzir aumento da produção de espécies reativas de oxigênio e causar estresse oxidativo. GO também pode interferir em mecanismos de reparo de danos ao DNA, em decorrência do estresse oxidativo. Os mecanismos de toxicidade do GO estão exemplificados na Figura 12 (CHEN et al., 2020).

**Figura 12** - Mecanismos pelos quais GO podem causar toxicidade às células. Folhas menores de GO podem ser degradadas por lisossoma e excretadas da célula. Folhas maiores de GO podem danificar a membrana celular, por atrito de suas bordas com a membrana, ligando-se a proteínas ou interagindo eletrostaticamente com a fosfatidilcolina, levando à produção de ROS.



Fonte: MU et al. (2012)

### 1.3. Ecotoxicologia *in vivo* e *in vitro*

A termo "ecotoxicologia" foi introduzido por René Truhaut em 1969 e deriva das palavras "ecologia" e "toxicologia". Esse termo foi criado como consequência da crescente preocupação acerca dos efeitos de xenobióticos presentes no meio ambiente. Para além de levantamentos qualitativos e/ou quantitativos de xenobióticos presentes no solo, água ou ar, a ecotoxicologia se concentra em estabelecer os efeitos a nível de indivíduo, população e comunidade (WALKER, 2001).

Os métodos aplicados na ecotoxicologia regulatória derivam da toxicologia clássica, na qual mamíferos são expostos a medicamentos e outras substâncias químicas para estabelecer a toxicodinâmica dessas substâncias. Contudo, a toxicologia de mamíferos difere da ecotoxicologia, uma vez que a toxicologia de mamíferos se concentra principalmente no indivíduo e a ecotoxicologia tem implicações regulatórias, focadas em proteger comunidades inteiras de organismos e ecossistemas associados (BIDWELL, 2020). Desta forma, a ecotoxicologia tem o importante papel de identificar e avaliar os efeitos de xenobióticos estranhos ambientalmente relevantes que são liberados antropogenicamente sobre os ecossistemas para, assim, prever a carga desses xenobióticos que uma comunidade específica pode carregar sem ser alterada (LÓPEZ-BAREA, 1995).

Em meados da década de 60, bioensaios com peixes possibilitaram a confirmação do prejuízo enorme causado por efluentes industriais à vida aquática. Foi então que muitos países industrializados consideraram a criação de agências ambientais para lidar com a contaminação aquática durante a década de 1970 (MAGYARY, 2018).

Um método bastante comum para avaliar os efeitos dos xenobióticos em ecotoxicologia é o estudo de biomarcadores, que são indicadores no nível suborganismo e incluem parâmetros bioquímicos, fisiológicos ou histológicos (BIDWELL, 2020). Por definição, biomarcadores são: "*Medidas de fluidos corporais, células, tecidos ou animais inteiros que indicam em termos bioquímicos, celulares, fisiológicos, comportamentais ou energéticos a presença de contaminantes ou a extensão da resposta do hospedeiro*" (LÓPEZ-BAREA, 1995).

A ecotoxicologia avalia os processos físico-químicos, fisiológicos, moleculares, toxicológicos e ecológicos, de forma holística e multidisciplinar. Além disso, aborda as interações entre os xenobióticos presentes no ambiente e a biota, focando nos efeitos adversos

em diferentes níveis de organização biológica, desde o nível molecular, celular, tecido, órgão e organismo, até populações e ecossistemas (FENT, 2001).

Atualmente, a maioria dos métodos regulatórios em ecotoxicologia ainda usa animais vertebrados (principalmente peixes) e letalidade como um parâmetro para avaliar a toxicidade de produtos químicos. O teste clássico de toxicidade aguda, DL50 (Dose Letal 50%), é utilizado para determinar a dose necessária para matar metade de uma população testada após uma duração de teste específico. Este é um método de execução e interpretação fáceis, mas não gera informações acerca do modo de ação tóxica da substância (SCOTT; MINGHETTI, 2020).

Peixes diferem de outros vertebrados e da maioria dos invertebrados, principalmente com relação ao seu metabolismo e biotransformação de alguns químicos. Peixes estão expostos à poluição química direta que, por diversas vezes, já causou a mortalidade em massa de peixes. Os testes que utilizam peixes como modelo experimental foram aplicados tradicionalmente em procedimentos de verificação da qualidade dos recursos hídricos da água potável. Dada a relevância dos peixes no monitoramento da contaminação da água, eles foram intensamente utilizados em testes de toxicidade aquática (MAGYARY, 2018).

Uma quantidade enorme de ratos, peixes e outros vertebrados são usados em todo o mundo para fins experimentais. O uso de animais em pesquisas científicas contribuiu imensamente e ainda contribui para o avanço da pesquisa científica. Contudo, devido às questões éticas relativas ao bem-estar animal, nas últimas décadas, comunidades acadêmicas, regulatórias e do setor privado tem buscado por alternativas que substituem animais em testes de laboratório. Entre as alternativas estão o cultivo de células *in vitro*, testes bioquímicos e modelagens computacionais (SCOTT; MINGHETTI, 2020).

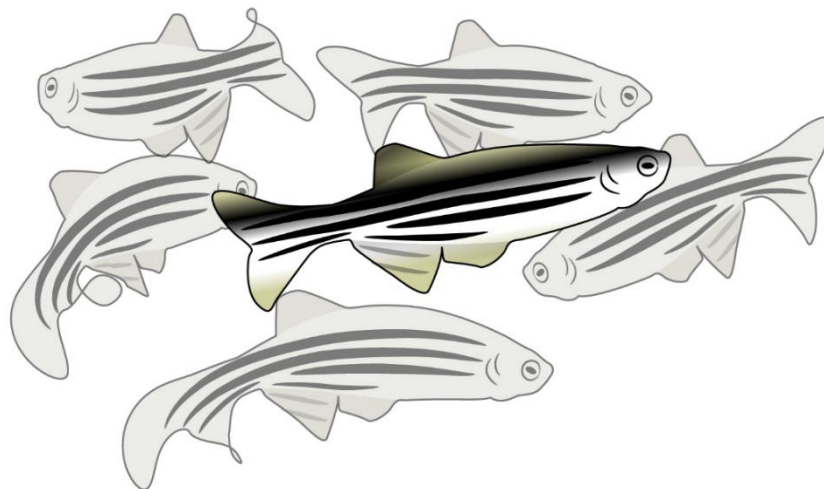
A avaliação das respostas celulares, em frente à exposição a um xenobiótico, nos permite detectar precocemente os efeitos da toxicidade, uma vez que alterações celulares podem influenciar no crescimento, desenvolvimento, saúde e, conseqüentemente, na reprodução de indivíduos (FENT, 2001). Sistemas *in vitro* desempenham um papel importante em avaliações de toxicidade, pois permitem avaliar os efeitos de xenobióticos de forma controlada, mais eficiente e com melhor custo, beneficiando melhorias no delineamento de estudos *in vivo* (ARORA; RAJWADE; PAKNIKAR, 2012; BOLS et al., 2005; FENT, 2007; HUANG; WU; ARONSTAM, 2010).

#### 1.4. *Danio rerio* e a linhagem celular ZFL

Em 1981, George Streisinger e colaboradores relataram uma metodologia para produzir peixe-zebra (*D. rerio*, Hamilton, 1822), diploide homocigoto usando pressão hidrostática ou choque térmico. Desde então, o desenvolvimento de análises genéticas em peixes-zebras apenas aumentou, diversas metodologias foram desenvolvidas e o peixe-zebra tornou-se uma espécie modelo ideal para ecotoxicologia aquática (MAGYARY, 2018).

O peixe-zebra (Figura 13) muitas vezes tem vantagens como organismo modelo, como tamanho pequeno, ciclo rápido de reprodução, desenvolvimento precoce, embriões transparentes e o genoma sequenciado e disponível publicamente. O peixe-zebra compartilha um alto grau de homologia com o genoma humano (cerca de 70%). Assim, o peixe-zebra está se tornando um poderoso organismo modelo para estudar genética, desenvolvimento, toxicologia ambiental, farmacologia, reparo de danos ao DNA, câncer e outras doenças. O peixe-zebra pode ser usado para estudos de monitoramento ecotoxicológico e inúmeras avaliações de poluentes, como metais pesados tóxicos, desreguladores endócrinos e poluentes orgânicos. Além disso, com o desenvolvimento da tecnologia transgênica, especialmente as aplicações dos repórteres da luciferase (LUC) e da proteína fluorescente verde (GFP) neste campo, a eficiência e a sensibilidade do monitoramento foram melhoradas (BARBAZUK, 2000; DAI et al., 2014; EIDE et al., 2014; MAGYARY, 2018).

**Figura 13** – Ilustração representando indivíduos da espécie *D. rerio* (peixe-zebra)



**Fonte:** [genome.gov/sites/default/files/tg/en/illustration/zebrafish.jpg](http://genome.gov/sites/default/files/tg/en/illustration/zebrafish.jpg)

Atualmente, como alternativa aos ensaios *in vivo*, foram desenvolvidas técnicas que permitem o cultivo de células de peixe (*in vitro*), reforçando ainda mais o crescente papel do peixe-zebra como modelo experimental (BOLS; LEE, 1991).

Os métodos *in vitro* permitem a geração de uma quantidade considerável de informação, seja para determinar as concentrações apropriadas de uma substância a ser aplicada em ensaios *in vivo*, seja para caracterizar mecanismos de ação tóxica ou para aplicar diretamente na avaliação de risco evitando alguns testes em animais. O Regulamento da UE para o *Registro, Avaliação, Autorização e Restrição de Produtos Químicos* (REACH) incentiva o uso de abordagens *in vitro* em testes de toxicidade (BERMEJO-NOGALES); FERNÁNDEZ-CRUZ; NAVAS, 2017).

A linhagem celular estabelecida ZFL é derivada de um grupo de cerca de 10 fígados peixe-zebra adultos. Essa linhagem apresenta morfologia típica de células epiteliais, são aderentes e devem ser mantidas a 28 °C com CO<sub>2</sub> atmosférico. Em geral, a duplicação celular ocorre a cada 72 horas, sendo que o seu crescimento é altamente dependente da densidade celular (HE, 2010). Células ZFL exibem um cariótipo hipodiplóide com o número modal de cromossomos de 46 ( $2n = 50$ ). Células ZFL também apresentam enzimas de tecido hepático, como a alanina aminotransferase, o aspartato transaminase, a glicose-6-fosfatase e a fosfatase alcalina, além de síntese de albumina sérica (GHOSH; ZHOU; COLLODI, 1994; MIRANDA et al., 1993).

### **1.5. Justificativa**

A potencial toxicidade dos novos nanomateriais utilizados em sistemas biológicos é motivo de grande preocupação e deve ser avaliada de forma aprofundada em sistemas controlados, incluindo os estudos *in vitro*. Além disso, é necessário focar na biocompatibilidade e segurança desses novos nanomateriais (WANG et al., 2010). GO e rGO podem ser aplicados em uma infinidade de áreas (D. CHEN et al., 2012; GAO et al., 2012; LOH et al., 2010; SUN et al., 2008; WANG et al., 2011), e os efeitos adversos foram estudados principalmente em roedores e células de mamíferos (CHANG et al., 2011; LIAO et al., 2011).

Um outro fato importante a se considerar é a escassez de dados sobre a toxicidade de rGO, comparando-se com GO, por exemplo. Avaliações *in vitro* utilizando células de organismos representativos dos ecossistemas aquáticos são de grande importância, pois podem caracterizar-se de forma controlada os principais efeitos decorrentes da exposição à

nanomateriais, bem como os principais mecanismos de toxicidade envolvida. Portanto, avaliações *in vitro* são fundamentais para melhor entendimento de aspectos fisiológicos relevantes incluindo determinações moleculares, atividade enzimática, citotoxicidade e genotoxicidade.

Assim, tornam-se imprescindíveis os estudos que investiguem os efeitos da exposição a a GO e rGO. Essa investigação pode ser realizada *in vitro*, utilizando, por exemplo, células epiteliais de fígado do peixe zebra (células ZF-L, fígado de zebrafish) (espécie *D. rerio*), considerado um modelo experimental em estudos de ecotoxicologia (Barbazuk, 2000; Eide et al., 2014). Essa abordagem *in vitro* permite a observação dos efeitos sem a interferência do controle sistêmico, presente em estudos *in vivo*, além de proporcionar uma economia em termos de investimento financeiro e minimizar a utilização de organismos vivos (Arora et al., 2012; Fent, 2001, 2007).

### Referências Bibliográficas

ALLEN, M.J.; TUNG, V.C.; KANER, R.B. Honeycomb Carbon: A Review of Graphene. **Avaliações Químicas**, v. 110, n. 1, p. 132-145, 2010.

AMABYE, T.G.; HAGOS, M.; BEYENE, H.D. Uma revisão crítica sobre caracterização espectroscópica de nanocompactos sustentáveis contendo preenchimentos nano de carbono. **Fórum de Pesquisa de Materiais**, 20 de novembro. 2018. Disponível em: <<https://www.mrforum.com/product/9781945291975-10/>>. Acesso em: 12 out. 2021

AMIN, M.T.; ALAZBA, A. A.; MANZOOR, U. Uma revisão da remoção de poluentes de água/águas residuais usando diferentes tipos de nanomateriais. **Avanços em Ciência e Engenharia de Materiais**, v. 2014, p. 1-24, 2014.

ARORA, S.; RAJWADE, J.M.; PAKNIKAR, K.M. Nanotoxicologia e estudos *in vitro*: A necessidade da hora. **Toxicologia e Farmacologia Aplicada**, v. 258, n. 2, p. 151-165, 2012.

ASHBY, M.F.; FERREIRA, P. J.; SCHODEK, D. Nanomateriais, nanotecnologias e design: uma introdução para engenheiros e arquitetos. Amsterdã: **Elsevier/Butterworth Heinemann**, 2009.

BARBAZUK, W.B. A relação sintênica dos zebrafish e genomas humanos. **Pesquisa de Genoma**, v. 10, n. 9, p. 1351-1358, 2000.

BASU, R. et al. Evidência de nanodiamant-auto-montagem em um cristal líquido, e os consequentes impactos sobre as propriedades de cristal líquido. **AIP Advances**, v. 7, n. 7, p. 075008, 2017.

BERMEJO-NOGALES, A.; FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; Navas, J.M. Linhas celulares de peixe como ferramenta para a avaliação da ecotoxicidade e classificação de nanomateriais projetados. **Toxicologia Regulatória e Farmacologia**, v. 90, p. 297-307, 2017.

BIDWELL, J. R. Capítulo 36 - *Modelos de ecotoxicologia in vivo*. In: POPE, C. N.; LIU, J. (Eds.). Uma introdução à toxicologia interdisciplinar. [S.L.] **Imprensa Acadêmica**, 2020. p. 507-523.

BOLS, N.C. et al. Capítulo 2 Uso de linhas de células de peixe na toxicologia e ecotoxicologia dos peixes. Linhas celulares piscinas em toxicologia ambiental. In: **Bioquímica e Biologia Molecular dos Peixes**. [S.L.] Elsevier, 2005. v. 6p. 43-84.

BOLS, N.C.; LEE, L. E. Tecnologia e usos de culturas celulares dos tecidos e órgãos de peixes ósseos. **Cytotecnologia**, v. 6, n. 3, p. 163-187, 1991.

BRODIE, B.C. Sobre o peso atômico do grafite. **Transações Filosóficas da Sociedade Real de Londres**, v. 149, p. 249-259, 1859.

BUSSY, C. et al. Microglia determina respostas neurotóxicas específicas da região cerebral a nanotubos de carbono quimicamente funcionados. **ACS Nano**, v. 9, n. 8, p. 7815-7830, 2015.

CASTRO NETO, A. H. et al. As propriedades eletrônicas do grafeno. **Resenhas de Física Moderna**, v. 81, n. 1, p. 109-162, 2009.

CHEN, L. et al. Toxicidade do óxido de grafeno e nanotubos de carbono multi-paredes contra células humanas e zebrafish. **Science China Chemistry**, v. 55, n. 10, p. 2209-2216, 2012.

CHEN, L. et al. Avaliação toxicológica de nanomateriais da família grafeno. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 20, n. 4, p. 1993-2006, 2020.

CHEN, Y. et al. Nanotoxicidade específica de óxido de grafeno durante a embriogênese de zebrafish. **Nanotoxicologia**, p. 1-11, 2015.

CHOI, W. et al. Síntese de Grafeno e suas Aplicações: Uma Revisão. **Críticas em Ciências de Estado Sólido e Materiais**, v. 35, n. 1, p. 52-71, 2010.

CHOUHDARY, V.; Gupta, A. Nanocompositos de nanotubo de polímero/carbono | **Intechopen**. Disponível em: <<https://www.intechopen.com/chapters/16990>>. Acesso em: 12 fora. 2021.

CHOWDHURY, I. et al. Propriedades coloidais e estabilidade de nanomateriais de óxido de grafeno no ambiente aquático. **Ciência Ambiental & Tecnologia**, v. 47, n. 12, p. 6288-6296, 2013.

CHUA, C.K.; PUMERA, M. Redução química do óxido de grafeno: um ponto de vista químico sintético. **Chem. Soc. Rev.**, v. 43, n. 1, p. 291-312, 2014.

- DAI, Y.-J. et al. Zebrafish como um sistema modelo para estudar toxicologia: monitoramento toxicológico de zebrafish. **Toxicologia e Química Ambiental**, v. 33, n. 1, p. 11-17, 2014.
- DASMAHAPATRA, A. K.; DASARI, T. P. S.; TCHOUNWOU, P.B. Nanomateriais à base de grafeno em peixes. In: DE VOOGT, P. (Ed.). Revisões de Contaminação Ambiental e Toxicologia, v 247. Cham: **Springer International Publishing**, 2018. v. 247p. 1-58.
- DREYER, D. R. et al. A química do óxido de grafeno. **Soc. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 228-240, 2010.
- DUCH, M.C. et al. Minimizando a oxidação e a dispersão estável de nanoescala melhora a biocompatibilidade do grafeno no pulmão. **Nano Letters**, v. 11, n. 12, p. 5201-5207, 2011.
- EIDE, M. et al. Uma caracterização da linha celular ZFL e hepatócitos primários como modelos *in vitro* de células hepáticas para o zebrafish (*Danio rerio*). **Toxicologia Aquática**, v. 147, p. 7-17, 2014.
- FADEEL, B. et al. Avaliação de Segurança de Materiais Baseados em Grafeno: Foco em Saúde Humana e Meio Ambiente. **ACS Nano**, v. 12, n. 11, p. 10582-10620, 2018.
- FENG, L.; WU, L.; QU, X. Novos horizontes para diagnósticos e aplicações terapêuticas de grafeno e óxido de grafeno. **Materiais Avançados**, v. 25, n. 2, p. 168-186, 2013.
- FENT, K. Linhas celulares de peixe como ferramentas versáteis em ecotoxicologia: avaliação da citotoxicidade, potencial de indução citocromome P4501A e atividade estrogênica de produtos químicos e amostras ambientais. **Toxicologia in vitro: revista internacional publicada em associação com BIBRA**, v. 15, n. 4-5, p. 477-488, 2001.
- FENT, K. Culturas permanentes de células de peixe como importantes ferramentas na ecotoxicologia. **ALTEX**, v. 24 Spec No, p. 26-28, 2007.
- GAO, J. et al. Déficits cognitivos induzidos por nanotubos de carbono multi-paredes através da via autofágica. **Toxicologia**, v. 337, p. 21-29, 2015.
- GAO, Y. et al. Adsorção e remoção de antibióticos tetraciclinas de solução aquosa por óxido de grafeno. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 368, n. 1, p. 540-546, 2012.
- GEIM, A. K. Grafeno: status e perspectivas. **Ciência**, v. 324, n. 5934, p. 1530-1534, 2009.
- GEIM, A.K.; NOVOSELOV, K.S. A ascensão do grafeno. **Materiais da Natureza**, v. 6, n. 3, p. 183-191, 2007.
- GHOSH, C.; ZHOU, Y. L.; COLLODI, P. Derivação e caracterização de uma linha de células hepáticas de zebrafish. **Biologia Celular e Toxicologia**, v. 10, n. 3, p. 167-176, 1994.
- He, S. Cancer e estudos de inflamação usando linhas de células de zebrafish. [S.L.] Universidade de Leiden, 27 de maio de 2010.

HONG, G. et al. Nanomateriais de Carbono para Imagem Biológica e Terapia Nanomedicinal. **Revisões Químicas**, v. 115, n. 19, p. 10816-10906, 2015.

HUANG, Y.-W.; WU, C.; ARONSTAM, R. S. Toxicidade das nanopartículas de óxido de metal de transição: insights recentes de estudos *in vitro*. **Materiais**, v. 3, n. 10, p. 4842-4859, 2010.

HUMMERS, W.S.; OFFEMAN, R.E. Preparação de óxido grafítico. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 6, p. 1339-1339, 1958.

HU, X.; WEI, Z.; Mu, L. Nanofolhas de óxido de grafeno em concentrações de traços provocam neurotoxicidade na prole de zebrafish. **Carbono**, v. 117, p. 182-191, 2017.

IJIMA, S. Microtúbulos helicoidais de carbono grafítico. **Natureza**, v. 354, n. 6348, p. 56-58, 1991.

JAWORSKI, S. et al. Degradação das Mitocôndrias e Estresse Oxidativo como o principal mecanismo de toxicidade do grafeno imaculado em Células e Tumores glioblastoma U87 e Células HS-5. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 650, 2019.

KAI-HUA CHOW, E.; GU, M.; XU, J. Capítulo 14 - Nanomateriais de carbono: conceitos fundamentais, interações biológicas e aplicações clínicas. In: CHUNG, E.J.; LEON, L.; RINALDI, C. (Eds.). **Nanopartículas para Aplicações Biomédicas. Micro e Nano Tecnologias**. [S.L.] Elsevier, 2020. p. 223-242.

KOLAHALAM, L. A. et al. Revisão sobre nanomateriais: Síntese e aplicações. **Materiais Hoje: Proceedings, 2ª Conferência Internacional de Ciências Aplicadas e Tecnologia (ICAST-2019): Ciência material**. v. 18, p. 2182-2190, 1 de janeiro. 2019.

KROTO, H. W. et al. C60: Buckminsterfullerene. **Natureza**, v. 318, n. 6042, p. 162-163, 1985.

KRUGER, N.J. O método Bradford para quantificação de proteínas. **Metanfetamina. Mol. Biol.**, v. 32, p. 9-15, 1994.

LIAO, K.-H. et al. Citotoxicidade de óxido de grafeno e grafeno em eritrócitos humanos e fibroblastos de pele. **ACS Materiais Aplicados & Interfaces**, v. 3, n. 7, p. 2607-2615, 2011.

LÓPEZ-BAREA, J. Biomarcadores em ecotoxicologia: uma visão geral. (G. H. Degen, J. P. Seiler, P. Bentley, Eds.) **Toxicologia em Transição. Anais: Arquivos de Toxicologia**. Berlin, Heidelberg: Springer, 1995.

MAGYARY, EU. Avanços recentes e tendências futuras em bioensaios de zebrafish para ecotoxicologia aquática. **Ecociclos**, v. 4, n. 2, p. 12-18, 2018.

MALHOTRA, B.D.; ALI, MD. A. Capítulo 2 - Nanomateriais de carbono funcionalizados para biosensores. In: MALHOTRA, B.D.; ALI, MD. A. (Eds.). **Nanomateriais para Biosensores. Micro e Nano Tecnologias**. [S.L.] William Andrew Publishing, 2018. p. 75-103.

MARI, E. et al. As nanobonas de óxido de grafeno induzem vacuoles autofágicos em linhas celulares neuroblastoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1995, 2016.

MAUTER, M.S.; ELIMELECH, M. Aplicações ambientais de nanomateriais à base de carbono. **Ciência Ambiental & Tecnologia**, v. 42, n. 16, p. 5843-5859, 2008.

MIRANDA, C. L. et al. Regulação da expressão citocromo P450 em uma nova linha de células hepáticas de zebrafish (*Brachydanio rerio*). **Arquivos de Bioquímica e Biofísica**, v. 305, n. 2, p. 320-327, 1993.

MOHAMED, E. F. Nanotecnologia: futuro do controle ambiental da poluição atmosférica. **Gestão Ambiental e Desenvolvimento Sustentável**, v. 6, n. 2, p. 429, 2017.

MONTAGNER, A. et al. Efeitos ecotoxicológicos de materiais à base de grafeno. **Materiais 2D**, v. 4, n. 1, p. 012001, 2016.

MU, Q. et al. Absorção celular dependente do tamanho de nanofolhas de óxido de grafeno revestidos de proteína. **ACS Materiais Aplicados & Interfaces**, v. 4, n. 4, p. 2259-2266, 2012.

PEI, S.; CHENG, H.-M. A redução do óxido de grafeno. **Carbono**, v. 50, n. 9, p. 3210-3228, 2012.

PELIN, M. et al. Exposição ocupacional a nanomateriais à base de grafeno: avaliação de risco. **Nanoescala**, v. 10, n. 34, p. 15894-15903, 2018.

PRETTI, C. et al. Ecotoxicidade do grafeno intocado para organismos marinhos. **Ecotoxicologia e Segurança Ambiental**, v. 101, p. 138-145, 2014.

RAO, C. N. R. et al. Grafeno: O novo nanomaterial bidimensional. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 42, p. 7752-7777, 2009.

ROBERTS, M. W. et al. Teoria da placa contínua e modelagem atômica para encontrar a rigidez flexural de uma folha de grafeno interagindo com um substrato. **Journal of Nanotechnology**, v. 2010, p. e868492, 2010.

SCHMIDT, A.M. Science vs. regulação de drogas alimentares. **Clínica Research Practices and Drug Regulatory Affairs**, v. 5, n. 5-6, p. 319-325, 1987.

SCOTT, J.; MINGHETTI, M. Toxicidade testando: modelos *in vitro* em ecotoxicologia. In: **Uma Introdução à Toxicologia Interdisciplinar**. [S.L.] Elsevier, 2020. p. 477-486.

SEABRA, A.B. et al. Nanotoxicidade de grafeno e óxido de grafeno. **Pesquisa Química em Toxicologia**, v. 27, n. 2, p. 159-168, 2014.

SHARMA, D. et al. Insight sobre a biosensagem do óxido de grafeno: Perspectivas atuais e futuras. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 238-261, 2016.

SIQUEIRA, JR; OLIVEIRA, O. N. 9 - Nanomateriais à base de carbono. In: DA RÓZ, A. L. et al. (Eds.). **Nanoestruturas**. [S.L.] William Andrew Publishing, 2017. p. 233-249.

SOARES, J. et al. Efeitos neurotóxicos do desenvolvimento da exposição ao óxido de grafeno em larvas de zebrafish (*Danio rerio*). *Coloides e Superfícies B: Biointerfaces*, v. 157, p. 335-346, 2017.

TADYSZAK, K.; WYCHOWANIEC, J.; LITOWCZENKO, J. Aplicações Biomédicas de Estruturas Baseadas em Grafeno. **Nanomateriais**, v. 8, n. 11, p. 944, 2018.

O Prêmio Nobel de Física de 2010 - **Comunicado à Imprensa**. Disponível em: <[https://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/physics/laureates/2010/press.html](https://www.nobelprize.org/nobel_prizes/physics/laureates/2010/press.html)>. Acesso em: 6 fev. 2017.

WALKER, C. H. (ED.). Princípios da ecotoxicologia. 2ª ed. Londres; Nova Iorque: **Taylor & Francis**, 2001.

WANG, Y. et al. Óxido de grafeno e grafeno: biofuncionalização e aplicações em biotecnologia. **Tendências em Biotecnologia**, v. 29, n. 5, p. 205-212, 2011.

WU, K.; ZHOU, Q.; OUYANG, Genotoxicidade Direta e Indireta de Nanomateriais da Família Grafeno no DNA — uma revisão. **Nanomateriais**, v. 11, n. 11, p. 2889, 2021.

ZHANG, Y. et al. Efeitos citotoxicidade do grafeno e nanotubos de carbono de parede única em células pc12 derivadas da feocromocitoma neural. **ACS Nano**, v. 4, n. 6, p. 3181-3186, 2010.

zebrafish.jpg (1600×959). Disponível em: <<https://www.genome.gov/sites/default/files/tg/en/illustration/zebrafish.jpg>>. Acesso em: 28 fora. 2021.

ZHU, Y. et al. Óxido de grafeno e grafeno: síntese, propriedades e aplicações. **Materiais Avançados**, v. 22, n. 35, p. 3906-3924, 2010.

## 2. Objetivos Gerais

2.1. Capítulo 1 - Investigar a ocorrência de efeitos letais sobre as células ZFL após exposição a GO e rGO em diferentes concentrações e tempos de exposição.

2.2. Capítulo 2 - Investigar a ocorrência de efeitos subletais sobre as células ZFL após a exposição a GO e rGO em concentrações ambientalmente relevantes.

## 3. Objetivos Específicos

### 3.1. Capítulo 1

- Investigar se os nanomateriais GO e rGO entram nas células ZFL por meio de bioensaio de "captação" utilizando marcação dos nanomateriais pelo fluoróforo fluoresceína seguido da captura de imagens;
- Determinar as doses que causam letalidade às células ZFL por meio do bioensaio de viabilidade e proliferação celular "Ensaio Azul Trypan";
- Determinar a frequência e distinguir a morte celular entre apoptose e necrose utilizando citometria de fluxo;
- Avaliar se os efeitos são dependentes das concentrações e/ou dos tempos de exposição;
- Investigar se a exposição aos nanomateriais GO e rGO induz a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) nas células ZFL por meio do ensaio de redução do composto H<sub>2</sub>DCF-DA;
- Determinar se há diferença de toxicidade entre os nanomateriais GO e rGO.

### 3.2. Capítulo 2

- Investigar se a exposição a concentrações ambientalmente relevantes de GO e rGO induz a geração de ROS nas células ZFL por meio do ensaio de redução do composto H<sub>2</sub>DCF-DA;
- Investigar a ocorrência de efeitos estimulatórios ou inibitórios sobre antioxidantes enzimáticos (Catalase, Glutathione S-Transferase) e não enzimático (Glutathione);
- Investigar a ocorrência de peroxidação dos lipídios das membranas celulares;
- Investigar a ocorrência de efeitos sobre a capacidade antioxidante total das células ZFL após exposição a GO e rGO;

- Investigar se a exposição a baixas concentrações de GO e rGO causam danos ao DNA das células ZFL por meio do ensaio do "cometa".

**Capítulo 1** – Uma abordagem toxicodinâmica para investigar a toxicidade de nanofolhas de óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO) sobre linha celular de fígado de peixe-zebra (ZFL).

## **Resumo**

O óxido de grafeno (GO) e o óxido de grafeno reduzido (rGO) são nanomateriais baseados em carbono e possuem uma ampla gama de aplicações. Desta forma, é esperado que seus resíduos atinjam os ambientes aquáticos, acumulem, e interajam com seus diferentes compartimentos e com a biota. A dependência do tempo de exposição e das concentrações de GO e rGO em organismos aquáticos ainda é pouco conhecida. No presente estudo, foram investigados os efeitos de GO e rGO para a linhagem celular proveniente de hepatócitos de peixe-zebra, ZFL. Nanofolhas de GO e rGO foram aplicadas sobre células ZFL em concentrações de 1 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  durante 24 e 72 horas. Foram avaliadas, a internalização das nanofolhas de GO e rGO, bem como a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), a viabilidade celular, e morte celular. Os resultados indicaram que GO foi internalizado pelas células, mas não foi observada internalização significativa de rGO. rGO é hidrofóbico e suas nanofolhas são menores que as nanofolhas de GO, contudo, sua hidrofobicidade favorece sua interação com as membranas das células. A exposição ao rGO induziu alta geração de ROS, principalmente em 24 horas de exposição, impedindo a duplicação celular após 72 horas de exposição. Os resultados indicaram maior toxicidade de rGO em relação a GO, dependente do tempo e da concentração.

**Palavras-chave:** internalização celular, morte celular, viabilidade celular, duplicação celular, geração de ROS, toxicodinâmica.

## **1. Introdução**

Os nanomateriais à base de carbono, como óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO), são materiais valiosos devido ao aumento de suas propriedades químicas, eletrônicas e mecânicas aumentadas (COMPTON; NGUYEN, 2010; RAY, 2015). GO e rGO apresentam uma estrutura na forma de nanofolhas, na qual GO contém mais grupos funcionais de oxigênio em ambas as superfícies e bordas das folhas, em comparação com o rGO (HIDAYAH et al., 2017). As aplicações industriais de GO e seus derivados incluem dispositivos nanoeletrônicos, condutores transparentes e materiais nanocompósitos (PARK;

YOON; KWON, 2016; ZHENG; KIM, 2015). Aplicações em biotecnologia e biomedicina incluem inibição bacteriana (JIANG et al., 2019; MOGHAYEDI et al., 2017), entrega de drogas, terapia contra o câncer (LIU et al., 2018a), e biorremediação de ambientes aquáticos (CALZA et al., 2016; GAO et al., 2012).

Considerando o aumento contínuo da fabricação desses nanomateriais à base de carbono, espera-se que seus resíduos cheguem ao ecossistema aquático, acumulem e interajam com diferentes compartimentos ambientais, bem como com a biota (GOODWIN et al., 2018). Nesse cenário, é imprescindível investigar o potencial tóxico desses nanomateriais para a biota aquática.

Estudos recentes mostram que a exposição ao GO, rGO e multicamadas de grafeno induziu estresse oxidativo, danos à membrana e esgotamento de nutrientes em algas *Chlorella pyrenoidosa* (ZHAO et al., 2017). Além disso, os nanocompósitos rGO e rGO foram altamente tóxicos para crustáceos planctônicos *Daphnia magna* (Liu et al., 2017). GO sozinho causou alta inibição de crescimento e reprodução em *D. magna* em comparação com GO-carboxil, GO-imidazole e GO-polietileno glicol (LIU et al., 2018b). Além disso, o GO induziu alterações na atividade de glutationa-S-transferase e estresse oxidativo no bivalve marinho *Crassostrea virginica* (KHAN et al., 2019).

Em relação aos vertebrados aquáticos, grafeno *pristine* causou mortalidade embrionária, eclosão retardada, mudou o batimento cardíaco e causou vários defeitos morfológicos em embriões de peixe-zebra (*D. rerio*) (MANJUNATHA et al., 2018). Adicionalmente, GO induziu a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em peixes-zebra adultos, danificando as brânquias e o fígado (SOUZA et al., 2017). Em geral, a exposição a nanomateriais à base de grafeno induziu distúrbios respiratórios, neurais, inflamatórios e metabólicos em todas as fases da vida dos peixes-zebra (DASMAHAPATRA; DASARI; TCHOUNWOU, 2018).

Apesar dos estudos realizados, informações sobre a toxicodinâmica desses nanomateriais ainda são escassas. A interação dos contaminantes com sistemas biológicos e as condições específicas de exposição que causam efeitos adversos na estrutura ou função das células é um estudo-chave na ecotoxicologia (NORDBERG; FOWLER, 2015). Sem dúvida, a determinação da concentração e do tempo de resposta são essenciais para entender a ação dos contaminantes (ROZMAN; DOULL; HAYES, 2010).

Estudos *in vitro* fornecem informações importantes sobre a ação direta do contaminante nas células, como captação celular (FALTERMANN et al., 2016), metabolismo (CAVALCANTE et al., 2014; LACHNER; OLIVEIRA; MARTINEZ, 2015), viabilidade, e morte celular (MOROZESK et al., 2018), reduzindo significativamente o uso de animais em ensaios experimentais (BERMEJO-NOGALES; FERNÁNDEZ-CRUZ; NAVAS, 2017; SCOTT; MINGHETTI, 2020; TAJU et al., 2014, 2017). O peixe-zebra é um excelente modelo, tanto para avaliações *in vivo* (MAGYARY, 2018; TRIGUEIRO et al., 2020) quanto *in vitro* (LUNGU-MITEA, 2020; MOROZESK et al., 2018, 2020), e a linhagem de células hepáticas de peixe-zebra (ZFL) tem um grande potencial para estudos sobre biologia celular. A linhagem celular ZFL apresenta a morfologia geral do hepatócito e tem sido usada em estudos toxicológicos (BONOMO et al., 2020, 2021; GHOSH; ZHOU; COLLODI, 1994; ELE, 2010). Com base nas informações descritas aqui, este estudo foi realizado utilizando as células ZFL para avaliar a toxicidade das nanofolhas GO e rGO abordando três questões principais: 1) As nanofolhas GO e rGO são potencialmente tóxicas para as células ZFL? 2) A toxicidade de GO e rGO depende da concentração e/ou tempo de exposição? 3) Há diferenças na resposta celular à exposição de GO e rGO?

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Síntese de GO e rGO**

GO foi sintetizado no grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia da Universidade de São Paulo, utilizando o método modificado de Hummer (TUNG et al., 2009), como descrito em detalhes por SOUZA et al. (2017). O grafite expandido foi fornecido pelo Nacional Grafite® (Brasil), e todos os reagentes usados na síntese foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O GO sintetizado exibiu morfologia de nanofolha típica, com 95% das folhas em monocamadas com espessura de 1,0 nm, e uma área média de 0,58  $\mu\text{m}^2$  (SOUZA et al., 2017).

O procedimento para obter rGO foi baseado no método descrito por SANDOVAL et al. (2016) com modificações. Resumidamente, GO foi diluído em água ultrapura (concentração final de 480  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) com a subsequente adição de 0,5 % (volume final) de uma solução de hidróxido de amônia e dispersão em um banho ultrassônico por 15 minutos (Elmasonic P30H; 37 kHz). GO-NH<sub>4</sub>OH foi transferido para microtubos (2 mL) e mantido em um banho seco "thermo-shaker" (BIOMTC100, Agimaxx) a 90 °C, 1000 rpm, por 8 h. rGO-NH<sub>4</sub>OH foi dializado (*cut off* de 10 KDa) por três dias em água ultrapura com duas trocas ao dia com o objetivo de remover o NH<sub>4</sub>OH (SANTOS, 2018).

## 2.2. Caracterização de GO e rGO

O Potencial Zeta (*Zeta Potential*, ZP) de GO e rGO foi medido ao longo do tempo (0, 24, 48 e 72 h) em meio de cultura (RPMI 50%, Leibovitz L-15 50%, suplementado com 10% de soro fetal bovino, SFB) contendo 1, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As mesmas amostras também foram utilizadas para a medição da dispersão dinâmica de luz (*Diameter Light Scattering*, DLS) após 0, 24, e 72 h, em triplicata. As medidas de ZP e DLS foram realizadas usando um espectrofotômetro Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Reino Unido). Além disso, a estabilidade de GO e rGO suspensa em meio de cultura foi verificada por imagens. Os espectros infravermelhos foram obtidos por espectrofotometria transformada de Fourier (*Fourier-transform infrared spectroscopy*, FTIR) (Termo Científico – Nicolet iS50, EUA) em uma faixa de 400-4000  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 128 leituras. Para esta análise, as amostras foram preparadas utilizando brometo de potássio (KBr), adicionando soluções de GO e rGO (em água ultrapura) no KBr (80 mg), e deixando secar em um forno (60 °C) para posterior medição. As amostras de GO e rGO também foram analisadas combinadas com SFB, incubadas por 1 h seguido de centrifugação e ressuspensão para investigar a interação de GO e rGO com as proteínas presentes no SFB.

## 2.3. Conjugação de GO e rGO com o fluoróforo NHS-fluoresceína

A conjugação de GO e rGO com o fluoróforo NHS-fluoresceína (5(6)-carboxifluoresceína N-hidroxisuccinimida éster) foi realizada conforme descrito por HEISTER et al. (2009), com modificações. Primeiro, o NHS-Fluoresceína foi diluído em 10  $\text{mg mL}^{-1}$  de dimetilsulfoxido (DMSO), e uma alíquota de 0,3 mL foi misturado com 150 mg de albumina sérica (*bovine serum albumin*, BSA) diluído em tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 8.5). As amostras foram incubadas por 2h, no escuro, em temperatura ambiente e em agitação. Na sequência, a mistura foi filtrada e lavada repetidamente usando um dispositivo de filtragem por centrifugação, Amicon Ultra 30 kDa (Millipore) até que o eluato ficasse claro. Os conjugados de BSA + NHS-Fluoresceína (BSA-F) foram ressuspensos em 30 mL de tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 7.4). Depois, 150  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de GO e rGO foram dispersos em 10 mL de tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 8.5). O pH desta mistura foi ajustado para 8,5 usando uma solução de fosfato trissódico a 20 mM. Em seguida, 1 mL de 1-etil-3-(3-dimetil cloridrato de carbodimídeo aminopropílico (EDC, 20 mM) foi adicionado, seguido da adição de 1 mL de sulfo-NHS (50 mM), a mistura então foi incubada por 5 min, em temperatura ambiente. O excesso de EDC foi neutralizado, adicionando 70  $\mu\text{l}$  de 2-mercaptoetanol para chegar a uma

concentração final de 20 mM. A reação de acoplamento começou adicionando 10 mL de BSA-F (5 mg mL<sup>-1</sup> de BSA) e a reação prosseguiu por 2 h, em temperatura ambiente. Finalmente, 1 mL de cloridrato de etanolamina (250 mM) foi adicionado para parar a reação. Os complexos GO/rGO foram lavados por filtração à vácuo usando filtros de polycarbonato, malha de 0,2 µm (Whatman) e ressuspensos em 10 mL de tampão fosfato de sódio (20 mM, pH 7.4).

#### **2.4. Aquisição, manutenção e exposição das células ZFL**

As células ZFL (06/10/2004-BCRJ N°: 0256/303) foram adquiridas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ, Duque de Caxias, RJ) e cultivadas usando um meio de crescimento contendo 50% Leibovitz (L-15); 50% RPMI 1640; 0,1% antibiótico/antimicótico (10.000 unidades de penicilina; 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B mL<sup>-1</sup>) e suplementado com 10% com SFB, incubadas a 28°C, sem adição de CO<sub>2</sub>. O tempo de duplicação dessas células é cerca de 72 horas.

Para os experimentos toxicodinâmicos, diferentes densidades de células foram aplicadas de acordo com o tamanho das placas ou frascos (sempre entre 80 e 90% de confluência) para evitar o estresse celular devido à superpopulação. Depois de 24 horas de estabilização para alcançar a adesão completa, as células foram expostas a GO e rGO (1, 25, 50, 75 e 100 µg mL<sup>-1</sup>) por 24 e 72 horas. O controle negativo consistiu em nenhuma exposição a GO ou rGO (0 µg mL<sup>-1</sup>). Todos os experimentos foram realizados três vezes com, pelo menos, três réplicas cada.

#### **2.5. Avaliação da endocitose de GO e rGO pelas células ZFL**

Para o ensaio de endocitose, as células foram semeadas (3x10<sup>4</sup> células por poço) em placas de 96 poços, pretas com fundo transparente, e incubadas a 28°C de um dia para o outro ou até atingir adesão completa. GO e rGO complexados com BSA-F (1; 10; 25; 50; 75; 100 µg mL<sup>-1</sup>) foram adicionados às células que foram incubadas por 24 e 72 h. BSA-F foi usado como um controle. Ao final da exposição, as células foram fixadas usando paraformaldeído a 4% (10 min), marcadas com um corante DAPI (4',6-diamidino-2-fenil-indol) (0,7 ng µl<sup>-1</sup>, 10 min), e lavada duas vezes com tampão fosfato salino (*phosphate tampão salino*, PBS) entre cada uma das etapas.

As imagens foram adquiridas em um sistema ImageXpress XLS utilizando lente plana de flúor 40X/0,60 com filtro FITC (500 ms) para NHS-Fluoresceína e um filtro para DAPI (150 ms). Foram adquiridas 25 imagens para cada réplica. A intensidade da fluorescência foi obtida

utilizando o módulo *Multi-Wavelength Cell Scoring* com aplicação de pontuações positivas/negativas para células rotuladas com FITC. Foram utilizados valores de intensidade integradas para a plotagem de dados.

## **2.6. Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ROS)**

A produção intracelular de ROS foi avaliada de acordo com SOHAEBUDDIN et al. (2010). As células ZFL foram semeadas em placas pretas de 96 poços ( $8 \times 10^4$  células por poço), incubadas por 24 horas ou até aderir completamente à superfície da placa, e expostas a GO e rGO por 24 e 72 horas. Após a exposição, o meio foi descartado, e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Na sequência,  $10 \mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína) diluído em PBS foi adicionado a cada poço e a placa foi incubada por 30 min. Depois disso, a solução de  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  foi removida, e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Então, foram adicionados  $100 \mu\text{l}$  de PBS, e as células foram mecanicamente suspensas com o auxílio de uma micropipeta multicanal. Foram utilizados "brancos" para descontar a influência das nanofolhas. A leitura final da fluorescência foi detectada usando um leitor de microplaca (SpectraMax® M5 Multi-Mode, Molecular Devices, CA, USA) com excitação/emissão em 494/518 nm.

## **2.7. Crescimento da população celular, viabilidade e morte**

Para quantificar o crescimento populacional celular, viabilidade e morte celular, foram semeadas aproximadamente  $4 \times 10^5$  células por poço em placas de 24 poços. A seguir, como células foram expostas a GO e rGO por 24 e 72 h e lavadas duas vezes com PBS. Como células foram removidas da placa, marcadas com corante azul de tripano (1:1, v/v) e, contabilizadas usando um contador automático (TC20<sup>tm</sup> Cell Counter, Bio-Rad, EUA). A população total e as células viáveis foram avaliadas quanto ao crescimento populacional celular, viabilidade e morte.

## **2.8. Determinação de necrose e apoptose**

Aproximadamente  $4 \times 10^5$  células por poço foram semeadas em placas de 24 poços e expostas a GO e rGO por 24 e 72 h. Após a exposição, as células foram lavadas duas vezes com PBS e marcadas utilizando um kit de detecção para Apoptose/Necrose com PE Anexina-V (Cat. no. 559763, BD Biosciences, EUA) de acordo com as instruções do fabricante (BD Accuri TM C6, Becton & Dickson, EUA) e os dados foram reportados em percentual.

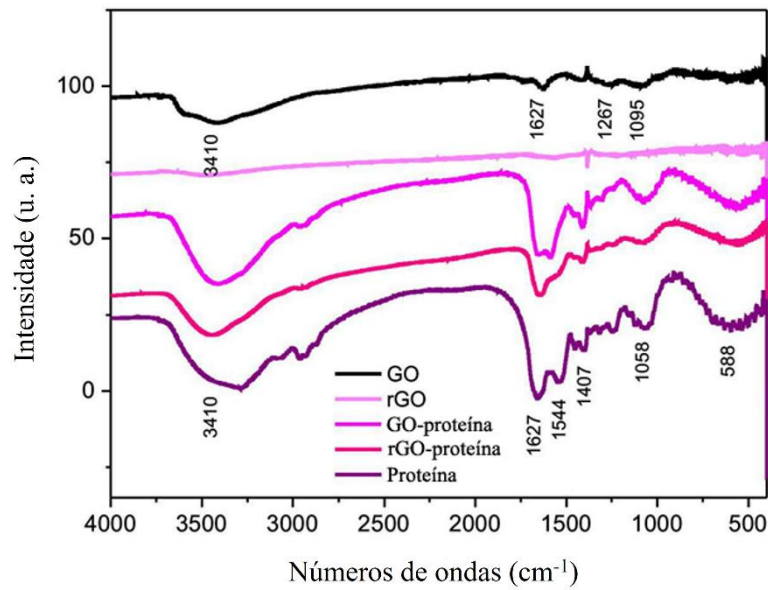
## 2.9. Análise Estatística

A normalidade dos dados foi verificada utilizando o teste de Shapiro-Wilk e a homogeneidade das variâncias foi verificada utilizando o teste de Bartlett ou teste F. O teste de múltiplas comparações “One-way ANOVA” com pós teste de Dunnett, ou Kruskal-Wallis com pós teste de Dunn, foram aplicados para cada tratamento, incluindo o controle negativo (CN). O teste T de Student foi aplicado para comparar dois grupos (GO e rGO). Todas as análises foram feitas usando o software GraphPad Prisma (versão 7.04) com 95% de intervalo de confiança e  $p < 0,05$ .

## 3. Resultados

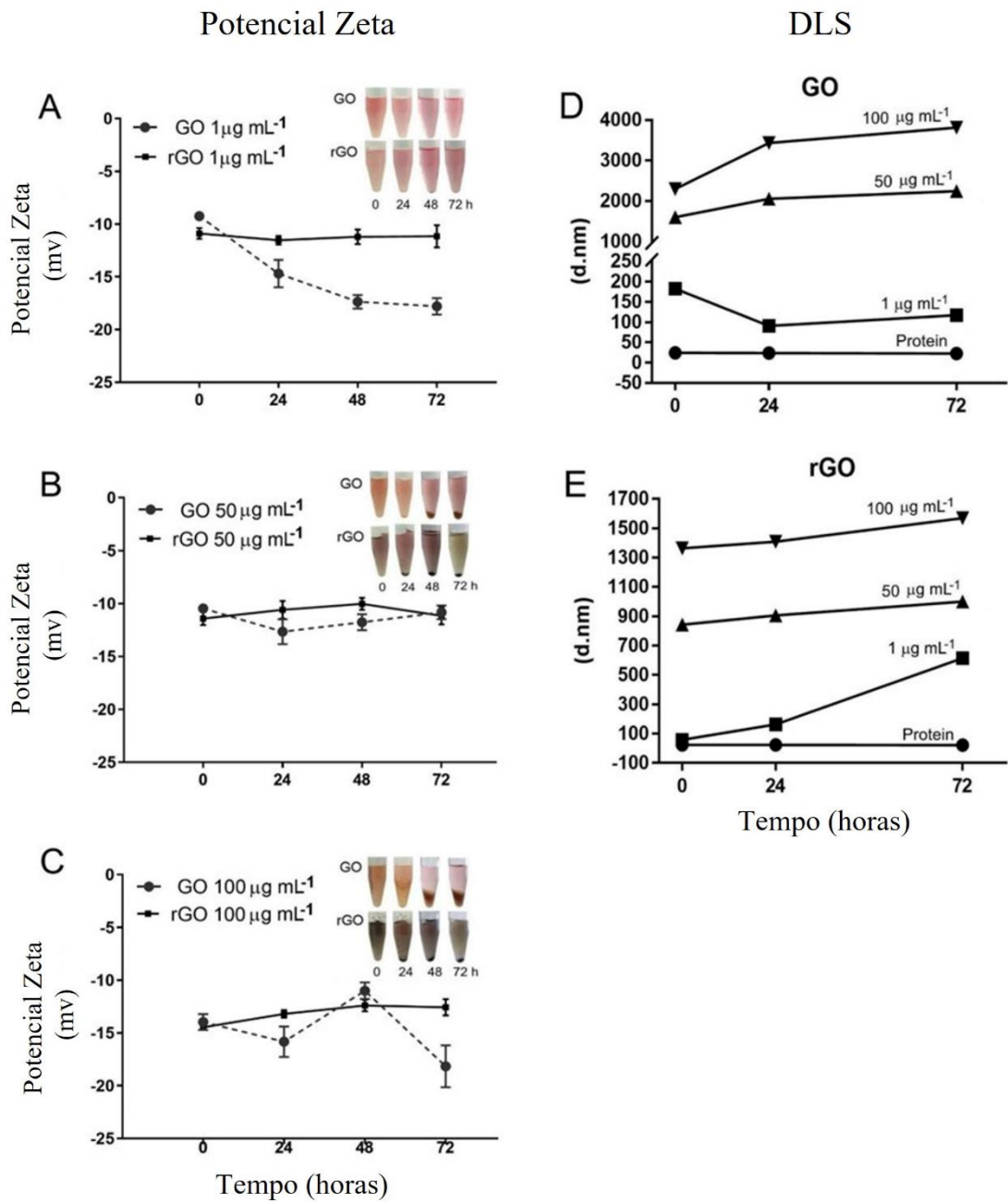
### 3.1. Caracterização de GO e rGO

O espectro de GO apresentou bandas características devido à sua forma oxidada, com uma forte banda OH alongada em  $3410\text{ cm}^{-1}$ , alongamento do grupo carboxil ( $\text{C} = \text{O}$ ) a  $1627\text{ cm}^{-1}$ , C-OH banda de deformação de grupo em  $1267\text{ cm}^{-1}$ , e desenho do grupo CO em  $1095\text{ cm}^{-1}$ . Para rGO, onde grupos carboxílicos são removidos, há uma abrupta diminuição das bandas rGO, mostrando poucos grupos ácidos restantes (Figura 14). Por outro lado, a análise FTIR mostrou adsorção de proteína em superfícies GO mostrando que na mesma faixa de espectros proteicos: as bandas esticadas em amida I ( $1627\text{ cm}^{-1}$ ), bandas em  $1544\text{ cm}^{-1}$  foram designadas para amida II, e bandas para amida III ( $1407\text{ cm}^{-1}$ ). A quantidade de proteína adsorvida na superfície GO e rGO está relacionada com seus grupos carboxílicos (Figura 14); então, no rGO, quase não houve adsorção de proteína.



**Figura 14** - Espectro FTIR de GO, rGO, GO-proteína, rGO-proteína e amostras de proteínas. O espectro GO apresenta bandas características com a banda de alongamento oh a  $3410\text{ cm}^{-1}$ , alongamento do grupo carboxil ( $\text{C}=\text{O}$ ) a  $1627\text{ cm}^{-1}$ , banda de deformação do grupo C-OH em  $1267\text{ cm}^{-1}$ , e desenho do grupo CO em  $1095\text{ cm}^{-1}$  enquanto rGO não apresentou as mesmas bandas. As bandas de  $1627\text{ cm}^{-1}$  em GO-proteína, rGO-proteína e proteína pura correspondem a amida I, II e III.

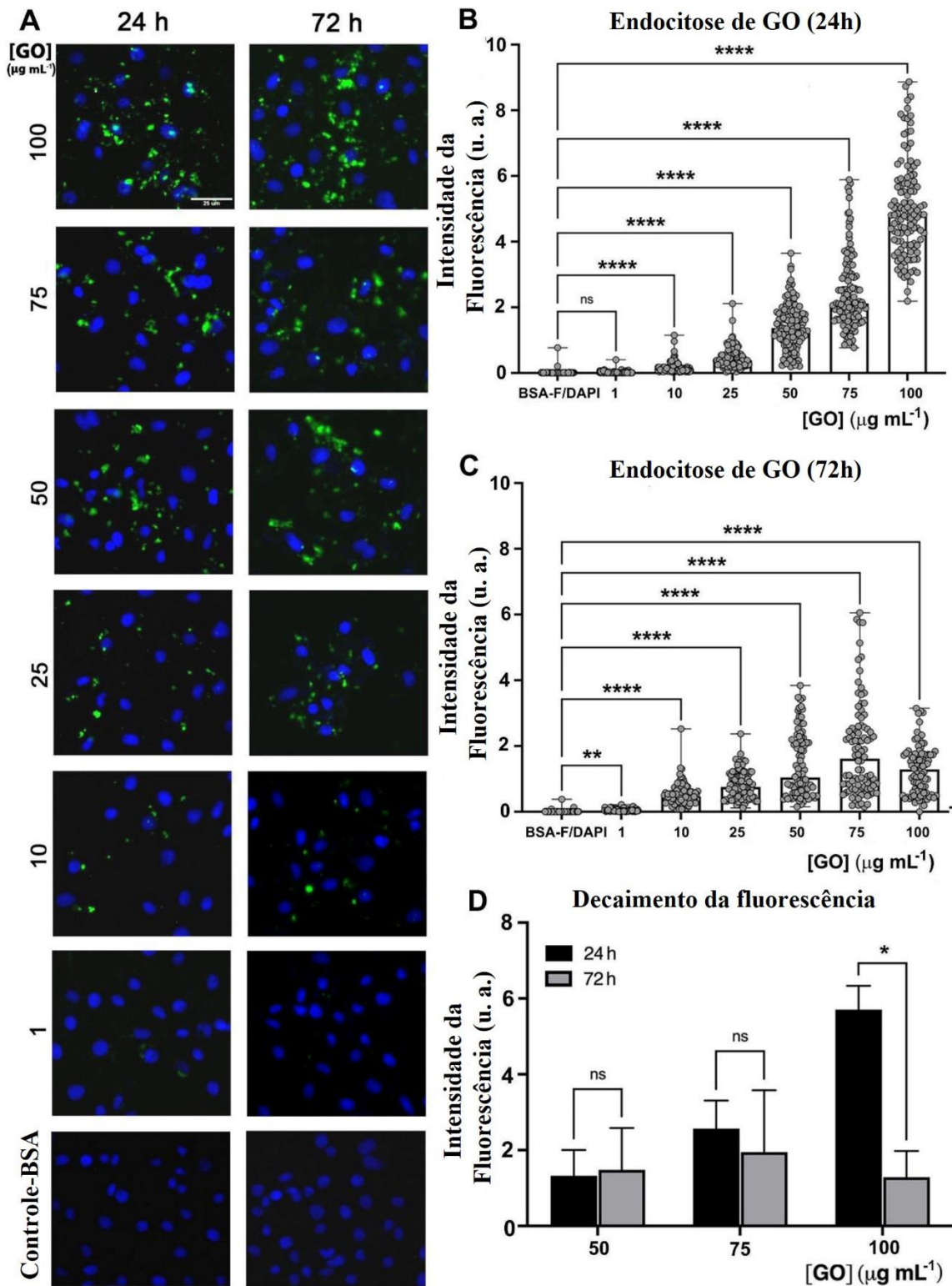
As medidas ZP e DSL de GO e rGO são mostradas na Figura 15. Os valores de carga superficial das nanofolhas de GO suspensas em meio de cultura em diferentes concentrações variaram de  $-10$  a  $-20\text{ mV}$ , em função do tempo. rGO é mais estável do que GO e decantou menos, mantendo algumas partículas em suspensão (Figura 15A-C). O maior tamanho hidrodinâmico de GO foi  $3813,67\text{ nm}$  em  $100\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ , após  $72\text{ h}$  de incubação, enquanto o maior tamanho médio de rGO foi de  $1569,33\text{ nm}$  nas mesmas condições (Figura 15D-E).



**Figura 15** – Potencial zeta e estabilidade de suspensão de 1 (A), 50 (B) e, 100 (C)  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de GO e rGO suspensos em meio de cultura após 0, 24, 48 e, 72 h indicando maior estabilidade de rGO em comparação com GO. D e E mostram dispersão de luz de diâmetro (DSL) de GO e rGO suspensas em meio de cultura após 0, 24 e 72 h, respectivamente. DSL de proteínas no meio de cultura foi medido como controle.

### **3.2. Endocitose de GO e rGO por células ZFL**

A fluorescência verde foi detectada em células tratadas GO-BSA-F indicando absorção desses complexos pelas células ZFL. As nanofolhas GO-BSA-F foram distribuídas por toda o citoplasma e próximo ou no núcleo (Figura 16A). As células expostas a apenas BSA-F não mostraram fluorescência verde (Figura 16A). A absorção de GO-BSA-F pelas células ZFL foi dependente da concentração após exposição de 24 horas de exposição (Figura 16A, B), mas a fluorescência diminuiu após a exposição de 72 h (Figura 16A, C, D). Ao contrário do GO, o rGO-BSA-F não apresentou a mesma intensidade de fluorescência.

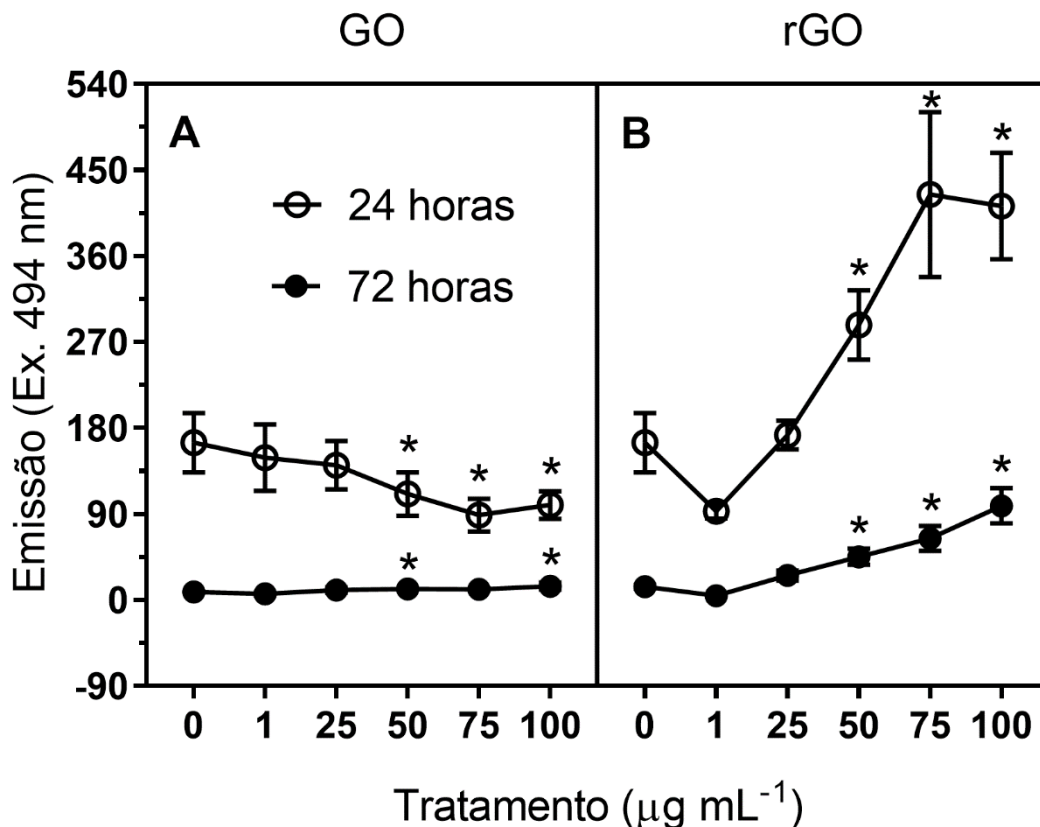


**Figura 16 A.** Imagens das células ZFL fluorescentes após a incubação com 1, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de GO-BSA-F por 24 e 72 h mostrando GO-BSA-F (verde) e os núcleos (azul). Barra de escala: 25  $\mu\text{m}$ . **B.** Endocitose de GO-BSA-F pelas células ZFL mostrando perfil dependente da concentração após exposição de 24 horas; **C.** Endocitose de GO-BSA-F pelas células ZFL após exposição de 72 h; **B e C:** Múltiplos testes T, \*\* e \*\*\*\* indicam diferença significativa

de BSA-F/DAPI,  $p < 0,005$  e  $p < 0,0001$ , respectivamente, ns – sem significância; **D.** Comparação da intensidade da fluorescência verde entre 24 e 72 h. \* Indica diferença significativa entre 24 e 72 h.

### 3.3. Produção Intracelular de ROS

Os dados sobre a produção de ROS intracelular após exposição de 24 e 72 horas a 0 (CN), 1, 25, 50, 75 e, 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de GO e rGO são mostradas na Figura 17A, B. A produção de ROS foi maior em 24 h do que em 72 h, e foi maior após a exposição ao rGO em comparação a GO. Após 24 horas, a produção de ROS diminuiu nas concentrações de 50 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de GO comparando-se com o CN. Após 72 h, a produção de ROS aumentou em células expostas a 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , mas os níveis foram mantidos próximos ao CN (Figura 17A). Nas células tratadas com rGO, após 24 h, a produção de ROS aumentou nas concentrações de 50 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e depois de 72 h os níveis de produção de ROS foram menores, mas foram significativamente maiores que o CN em concentrações de 50 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Figura 17B).

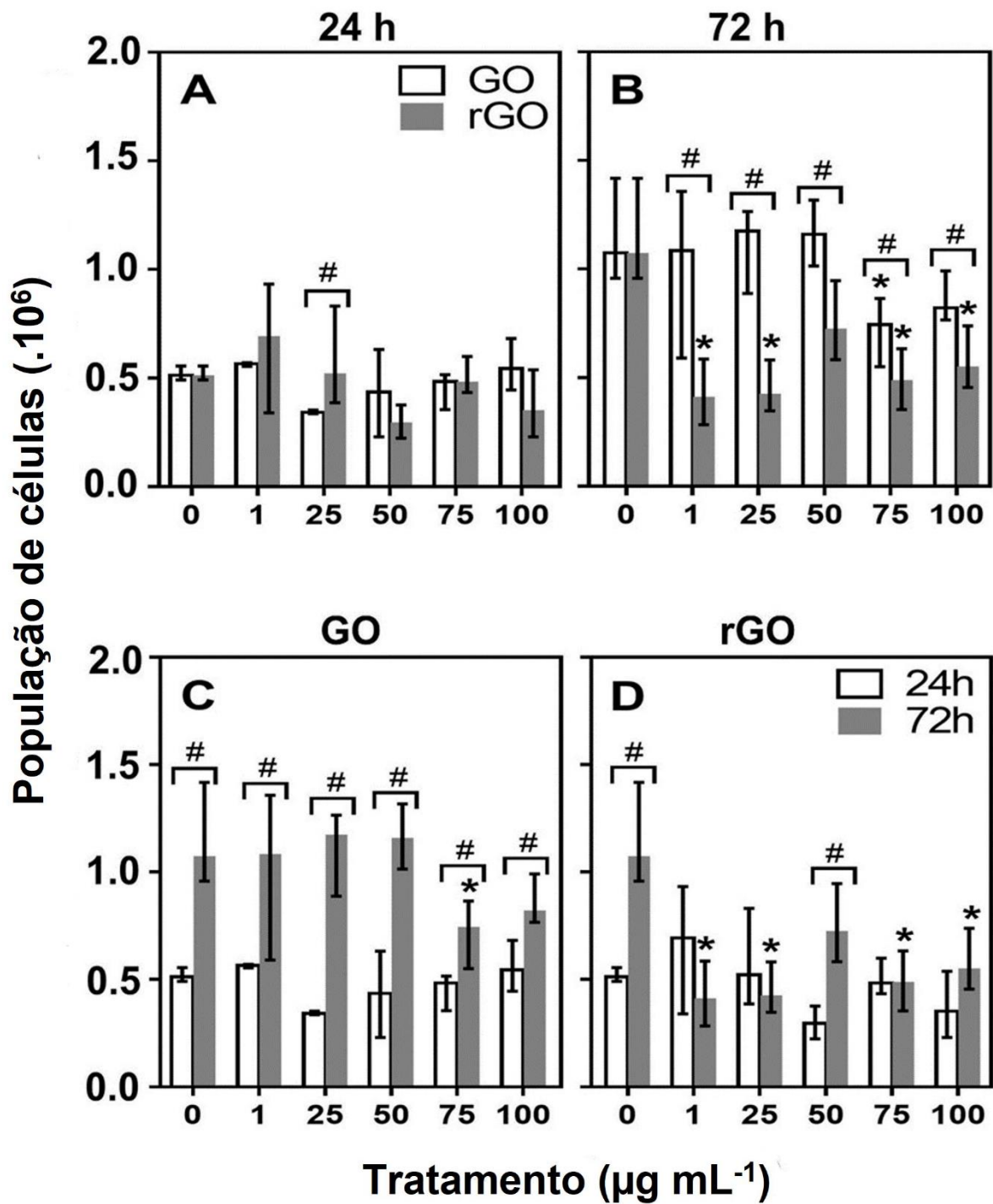


**Figura 17** Produção de ROS por células hepáticas de peixe zebra (ZFL) após exposição a 0 (CN), 1, 10, 25, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  GO (A) e rGO (B) após exposição de 24 e 72 h. Foram utilizados os testes Kruskal-Wallis e Dunn, \* indica uma diferença significativa em relação ao controle negativo (0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ),  $p < 0,05$ .

### 3.4. Efeitos de GO e rGO na população de células e na viabilidade celular

A população de ZFL após 24 e 72 h de exposição a diferentes concentrações de GO e rGO é mostrada na Figura 18A-D. Após 24 h de exposição, a população do rGO foi superior à população de GO em  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ , Teste T do Estudante) (Figura 18A). Após 72 h, a população celular exposta ao rGO reduziu significativamente nas concentrações de 1, 25, 75 e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis e Dunn) quando comparada com o CN (Figura 18B).

Para as células ZFL, espera-se que a população dobre após 72h, como foi encontrado para o CN ( $p < 0,05$ , Teste T de Student) (Figura 18C). As células expostas a GO (1 a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 72h, também dobraram a população, exceto em  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis e Dunn) (Figura 18C), mas a população ainda foi maior que a apresentada por células expostas a rGO, em todas as concentrações ( $p < 0,05$ , Teste T do Student) (Figura 18B). Quanto às células expostas ao rGO por 72h, sua população só foi maior do que as células expostas ao rGO por 24h na concentração de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ , Teste T de Student) (Figura 18D).

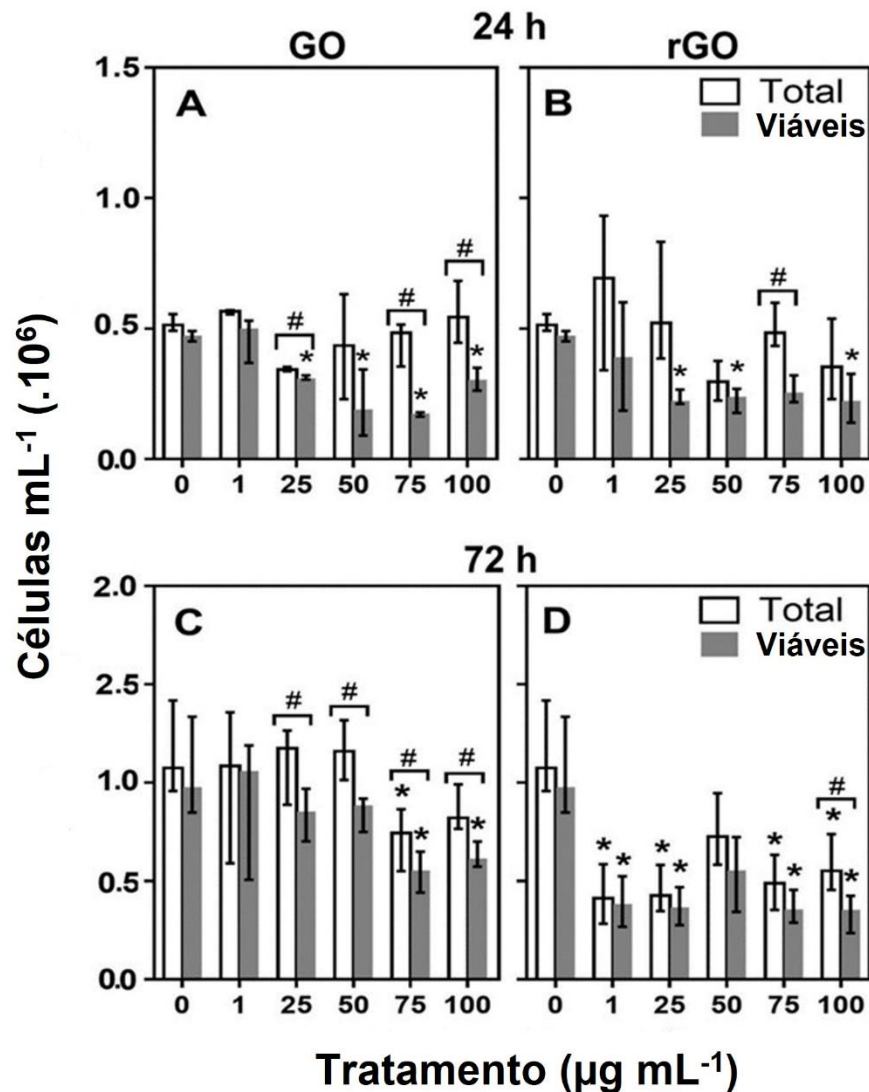


**Figura18** ZFL população celular exposta a 0 (controle negativo, CN), 1, 25, 50, 75 e 100 µg mL<sup>-1</sup> GO e rGO por 24 e 72 h. **A, B.** Comparação entre os nanomateriais; **C, D.** Comparação entre os tempos de exposição. \* Indica uma diferença significativa em comparação com o respectivo CN (teste de Kruskal-Wallis e Dunn;  $p < 0,05$ ), # indica diferença significativa entre GO e rGO ou entre 24 e 72 h (Teste T do Student;  $p < 0,05$ ).

A viabilidade celular foi afetada negativamente em células expostas ao GO por 24h nas concentrações de 25 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ , ANOVA e Dunnett), em comparação com o CN. Além disso, o número de células viáveis foi significativamente menor do que a população total nas concentrações 25, 75 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ , Teste T de Student) (Figura 19A). As células expostas ao rGO por 24h também tiveram a viabilidade reduzida nas concentrações de 25, 50 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ , ANOVA e Dunnett), em comparação com o CN, e na concentração 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ , Teste T de Student), comparando-se com a população total (Figura 19B).

A viabilidade das células expostas ao GO por 72h foi significativamente reduzida em concentrações de 75 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ , Teste de Kruskal-Wallis e Dunn) em comparação com o CN, e nas concentrações de 25 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $p < 0,05$ , Teste T de Student) quando comparada com sua respectiva população total (Figura 19C).

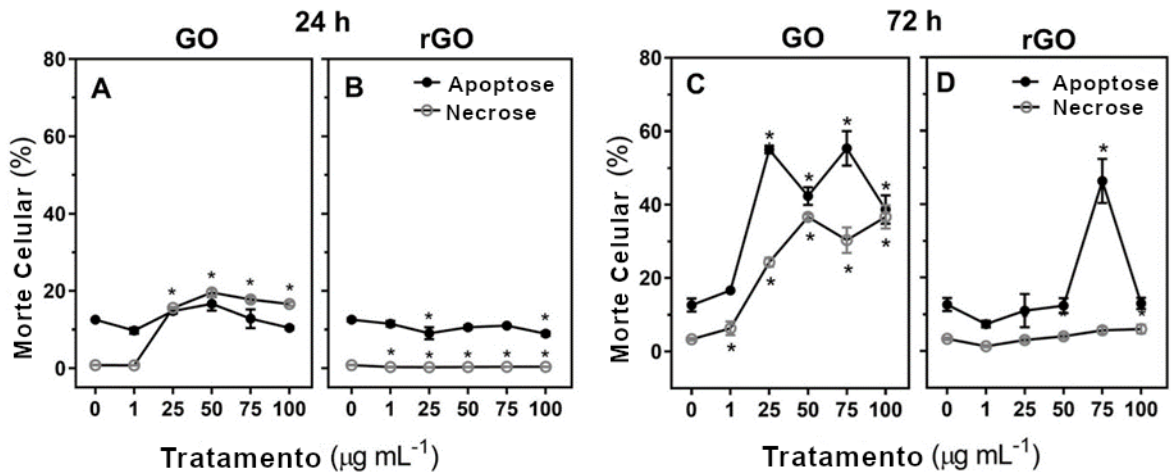
Para exposição ao rGO durante 72h, o número de células viáveis reduziu em todas as concentrações ( $p < 0,05$ , teste de Kruskal-Wallis e Dunn) com exceção de 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , quando comparado ao CN. Células expostas ao rGO (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) também tiveram sua viabilidade reduzida comparando-se com a população total ( $p < 0,05$ , teste T de Student) (Figura 19D).



**Figura 19** - Células totais e viáveis de fígado de peixe zebra (ZFL) após exposição a 0 (controle negativo, NC), 1, 25, 50, 75, e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de GO e rGO por 24 h (A, B) e 72 h (C, D). \* indica uma diferença significativa de células viáveis de GO e rGO em comparação com o respectivo CN (Kruskal-Wallis e Dunn;  $p < 0,05$ ), # indica diferença significativa entre duas amostras de mesma concentração (Teste T do Student;  $p < 0,05$ ).

A morte celular por necrose foi de cerca de 2-3% e a apoptose foi de cerca de 12-15% em CN ao longo dos experimentos (24 e 72 h). Após 24 h de exposição ao GO, a morte celular por necrose aumentou para 10-15% em concentrações iguais e superiores a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sem apoptose significativa em comparação com o CN (ANOVA e Dunnett;  $p < 0,05$ ) (Figura 20A). As células expostas ao rGO por 24h (1 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentaram uma taxa de necrose menor do que aquelas expostas ao CN; a taxa de apoptose também foi menor do que para o CN nas concentrações 25 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (teste de ANOVA e Dunnett;  $p < 0,05$ ) (Figura 20B). Após 72 h, a exposição ao GO induziu apoptose em concentrações iguais e superiores a 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e

induziu necrose em todas as concentrações testadas (teste de ANOVA e Dunnett;  $p < 0,05$ ). Por outro lado, os níveis de morte celular foram mantidos após a exposição ao rGO, exceto em  $75 \mu\text{g mL}^{-1}$  em que a apoptose celular aumentou (teste de ANOVA e Dunnett;  $p < 0,05$ ).



**Figura 20** Percentual de morte celular por necrose e apoptose de células hepáticas de zebrafish (ZFL) expostas a GO e rGO por 24 h (A, B) e 72 h (C, D). ANOVA ou Kruskal-Wallis de mão única foram empregados para comparar grupos com NC (0), indicado por (\*), ( $p < 0,05$ ).

#### 4. Discussão

Devido à intensa aplicação de GO e rGO em muitos setores industriais, biomedicina e bioremediação, espera-se um descarte proporcional desses nanomateriais no ambiente aquático e sua interação com organismos aquáticos, incluindo peixes (GOODWIN et al., 2018). Os nanomateriais GO e rGO podem ser absorvidos pelos animais, alcançar as células e afetar suas funções. Este estudo, utilizando células ZFL, *in vitro*, mostrou que a GO e a rGO afetaram a população celular e que o rGO também afetou o crescimento celular de forma dependente da concentração e do tempo.

A caracterização das nanofolhas de GO e rGO foi realizada por meio da avaliação da estabilidade utilizando medidas das cargas de superfície e imagens, além disso, os grupos funcionais foram confirmados. A adsorção de proteínas foi maior para as nanofolhas de GO do que para rGO (análise FTI-R, Figura 14), provavelmente devido aos poucos grupos ácidos presentes em rGO (SHARMA et al., 2016). Por causa disso, o rGO foi mais estável do que o GO em meio de cultura, bem como em matéria orgânica natural, na qual os íons  $\text{Ca}^{2+}$  desempenham um papel importante na estabilidade de rGO (CHOWDHURY et al., 2015b).

As nanofolhas de rGO também podem adsorver proteínas por interação hidrofóbica, força eletrostática e  $\pi - \pi$  empilhamento (Huang et al., 2019), mas não foi encontrado no presente estudo. De maneira geral, quando nanomateriais adsorvem proteínas, ocorre formação de corona na superfície desses nanomateriais, podendo minimizar a aglomeração (SCHÄFFLER et al., 2013). Considerando que GO e rGO tem forma de folhas, e não de esferas, a análise de DSL mostrou que as folhas de rGO eram menores que as de GO e permaneceram menores após 72 h, o que pode contribuir para a manutenção da suspensão do rGO no meio da cultura.

A internalização do grafeno e outros nanomateriais nas células é fortemente influenciada pelo tamanho das partículas e química da superfície (SAWOSZ et al., 2015; SRIKANTH et al., 2018b; YANG et al., 2013). Então, espera-se que algumas nanopartículas entrem nas células e outras permaneçam aderidas à membrana celular. Em geral, a internalização pode ocorrer por endocitose mediada por clatrina, endocitose mediada por caveolina, macropinocitose e fagocitose (ZHANG et al., 2016). Características como tamanho, presença de bordas afiadas e/ou superfícies ásperas influenciam na internalização e deslocamento desses materiais dentro das células, por exemplo, folhas menores podem se mover por todo o citosol (JAWORSKI et al., 2019; SASIDHARAN et al., 2011). SASIDHARAN et al., 2011 descobriram que o grafeno puro se acumula em membranas celulares, enquanto o grafeno hidrofílico funcionalizado de carboxil foi internalizado. Em nosso estudo, as nanofolhas GO foram internalizadas pelas células ZFL de forma dependente da concentração e identificadas após 24 e 72 h de exposição, distribuídas principalmente ao longo do citoplasma e, em alguns casos, dentro do núcleo celular. As nanofolhas de rGO tiveram pouca adsorção de BSA-F, provavelmente devido a ausência de grupos ácidos e, portanto, não foram visualizadas no ensaio de internalização (QI et al., 2019). No entanto, os efeitos do rGO nas células ZFL indicam que o nanomaterial pode ter sido internalizado ou interagiu com células ZFL. As interações hidrofóbicas entre a rGO e as células são uma ferramenta estudada por S. DONSKYI et al., 2019, onde nanofolhas de rGO podem ser empregadas no combate a patógenos como vírus e bactérias. Por exemplo, aumentar a hidrofobicidade dos ácidos nucleicos é uma estratégia comum na entrega eficiente do DNA, característica com alto potencial de aplicação em biomedicina (HUO et al., 2019).

A viabilidade das células ZFL foi afetada negativamente, como foi demonstrado pelo aumento dos níveis de ROS e das taxas de morte celular após a exposição das células a GO e rGO em concentrações iguais ou superiores a  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Muitos estudos têm demonstrado que

nanomateriais induzem aumento da produção de ROS, tanto em exposições *in vivo*, quanto *in vitro* (WEN et al., 2020). ROS tem um papel importante na sinalização celular para diversos processos celulares, e o aumento ou diminuição do nível ROS implica em disfunção celular. Além disso, o equilíbrio das concentrações de ROS celular é vital para a função fisiológica adequada das células (Morrel, 2008). No presente estudo, os níveis de ROS foram mais elevados em células expostas por 24 h do que aquelas expostas por 72 h a GO e rGO. As células expostas ao rGO apresentaram níveis muito altos de ROS em concentrações de 50 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Isso pode estar relacionado à interação do nanomaterial com as mitocôndrias, que tem um papel central na regulação de várias formas de morte celular, incluindo apoptose e necrose (VAKIFAHMETOGLU-NORBERG; OUCHIDA; NORBERG, 2017; ZHANG et al., 2016). A produção de ROS pode causar alterações em proteínas, lipídios e DNA, o que pode levar ao estresse oxidativo e morte celular. No entanto, após 72 horas de exposição ao rGO, a diminuição dos níveis de ROS pode estar relacionada à redução da população celular total, que também foi menor em relação à população celular exposta ao GO.

O ensaio de exclusão do corante azul de tripano e o ensaio de citometria de fluxo forneceram uma visão geral do crescimento populacional e do equilíbrio entre divisão celular e morte celular após exposição a GO e rGO. A exposição a GO e rGO por 24 h não alterou a população celular total em relação ao CN; após 72 h (ciclo celular da ZFL), esperava-se uma duplicação da população celular, proporcional à encontrada para o CN. Células expostas ao GO até 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  não apresentaram alterações na divisão celular. No entanto, as concentrações de GO iguais e superiores a 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$  causaram redução da população celular total e das células viáveis. ZFL expostas ao rGO não duplicaram; a população celular total foi mantida no nível de 24 h em todas as concentrações de rGO. Assim, os resultados indicam que a exposição ao rGO, mesmo em baixas concentrações, afetou a replicação celular, juntamente com o elevado nível de produção de ROS que pode ter desencadeado a morte celular (SALIM et al., 2020).

Após 24h de exposição ao GO, a redução no número de células viáveis, em comparação com a população celular total, pode estar relacionada ao dano da membrana celular durante a internalização, como aponta ZHANG et al., 2016, e à morte celular por necrose. Por outro lado, após 72h de exposição a 25 e a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , o aumento da morte celular por apoptose e necrose sugeriu a ação direta de GO nas células, uma vez que cerca de 60% das células mortas ocorreram por apoptose e 40% por necrose. Inversamente, após 24h de exposição ao rGO, a morte celular por necrose foi muito baixa, e a taxa de apoptose foi de cerca de 10-15%. Após

72 h de exposição, a morte celular por necrose foi mantida baixa e apoptose aumentou apenas na concentração de 75  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Ainda, é possível que as células tenham ativado outros processos, tais como a autofagia, que foi descrita como um dos principais tipos de morte em células expostas a materiais à base de grafeno (OU et al., 2017).

Nossos achados indicam que rGO foi mais tóxico para as células ZFL, do que GO. Esses resultados são ambientalmente relevantes, especialmente considerando que GO no ambiente aquático pode ser reduzido pela exposição à luz solar e degradação bacteriana, bem como por outros agentes redutores, disponíveis no meio ambiente (CHOWDHURY et al., 2015a). Assim, ainda que o consumo e descarte de GO ou rGO sejam maiores para um ou outro, o rGO pode estar presente em maior quantidade devido à ação dos agentes redutores.

## **Conclusões**

Em conclusão, nossos resultados demonstraram que as nanofolhas de GO foram internalizadas pelas células ZFL, interagindo com organelas e possivelmente com o núcleo; quanto a rGO, suas nanofolhas provavelmente se ligaram às membranas celulares, levando à alta produção de ROS. A exposição a GO causou altas taxas de morte celular por processos apoptóticos e necróticos, sendo que a exposição a rGO apresentou mecanismos diferentes de toxicidade. As células expostas ao rGO não duplicaram, mas as taxas de morte foram baixas em comparação ao GO, é possível que o nanomaterial tenha induzido outros tipos de morte celular que precisam ser investigados. Mesmo assim, os efeitos de GO e rGO na população celular foram dependentes da concentração e do tempo de exposição, e o rGO foi mais tóxico do que o GO para as células ZFL.

## **Agradecimentos**

Agradeço à Coordenação para Aperfeiçoamento Pessoal da Educação Superior (CAPES) pela bolsa. Agradeço também a Márcia Regina Cominetti (Professora) e Angelina Maria Fuzer (Ph.D.) do LABEN (Laboratório de Biologia do Envelhecimento, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar) pelo apoio técnico.

Apoio financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc 306818/2021-5) e Coordenação para Aperfeiçoamento de Pessoal da Educação Superior (CAPES)

## Referências

- BERMEJO-NOGALES, A.; FERNÁNDEZ-CRUZ, M. L.; NAVAS, J. M. Fish cell lines as a tool for the ecotoxicity assessment and ranking of engineered nanomaterials. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 90, p. 297–307, nov. 2017.
- BONOMO, M. M. et al. Biochemical and genotoxic biomarkers and cell cycle assessment in the zebrafish liver (ZF-L) cell line exposed to the novel metal-insecticide magnesium-hesperidin complex. **Chemosphere**, v. 250, p. 126416, 1 jul. 2020.
- BONOMO, M. M. et al. Multi-biomarkers approach to access the impact of novel metal-insecticide based on flavonoid hesperidin on fish. **Environmental Pollution**, v. 268, p. 115758, 1 jan. 2021.
- CALZA, P. et al. Photocatalytic transformation of the antipsychotic drug risperidone in aqueous media on reduced graphene oxide—TiO<sub>2</sub> composites. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 183, p. 96–106, abr. 2016.
- CAVALCANTE, D. G. S. M. et al. Cytotoxic, biochemical and genotoxic effects of biodiesel produced by different routes on ZFL cell line. **Toxicology in Vitro**, v. 28, n. 6, p. 1117–1125, set. 2014.
- CHOWDHURY, I. et al. Sunlight affects aggregation and deposition of graphene oxide in the aquatic environment. **Water Research**, v. 78, p. 37–46, 1 jul. 2015.
- COMPTON, O. C.; NGUYEN, S. T. Graphene oxide, highly reduced graphene oxide, and graphene: versatile building blocks for carbon-based materials. **Small**, v. 6, n. 6, p. 711–723, 22 mar. 2010.
- DASMAHAPATRA, A. K.; DASARI, T. P. S.; TCHOUNWOU, P. B. Graphene-based nanomaterials toxicity in fish. In: DE VOOGT, P. (Ed.). **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 247**. Cham: Springer International Publishing, 2018. v. 247p. 1–58.
- DONSKYI, I. S. et al. Functionalized nanographene sheets with high antiviral activity through synergistic electrostatic and hydrophobic interactions. **Nanoscale**, v. 11, n. 34, p. 15804–15809, 2019.
- FALTERMANN, S. et al. Comparative effects of nodularin and microcystin-LR in zebrafish: 1. Uptake by organic anion transporting polypeptide Oatp1d1 (Slco1d1). **Aquatic Toxicology**, v. 171, p. 69–76, fev. 2016.
- GAO, Y. et al. Adsorption and removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by graphene oxide. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 368, n. 1, p. 540–546, fev. 2012.
- GHOSH, C.; ZHOU, Y. L.; COLLODI, P. Derivation and characterization of a zebrafish liver cell line. **Cell Biology and Toxicology**, v. 10, n. 3, p. 167–176, jun. 1994.

GOODWIN, D. G. et al. Detection and quantification of graphene-family nanomaterials in the environment. **Environmental Science & Technology**, v. 52, n. 8, p. 4491–4513, 17 abr. 2018.

HE. Cancer and inflammation studies using zebrafish cells. S.l.: **Leiden University**, 2010.

HEISTER, E. et al. Triple functionalization of single-walled carbon nanotubes with doxorubicin, a monoclonal antibody, and a fluorescent marker for targeted cancer therapy. **Carbon**, v. 47, n. 9, p. 2152–2160, ago. 2009.

HIDAYAH, N. M. S. et al. Comparison on graphite, graphene oxide and reduced graphene oxide: Synthesis and characterization. **AIP Conference Proceedings**, v. 1892, n. 1, p. 150002, 16 out. 2017.

HUO, S. et al. DNA nanotechnology enters cell membranes. **Advanced Science**, v. 6, n. 10, p. 1900043, 2019.

JAWORSKI, S. et al. Degradation of mitochondria and oxidative stress as the main mechanism of toxicity of pristine graphene on U87 glioblastoma cells and tumors and HS-5 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 650, 2 fev. 2019.

JIANG, L. et al. Facile construction of functionalized GO nanocomposites with enhanced antibacterial activity. **Nanomaterials**, v. 9, n. 7, p. 913, 26 jun. 2019.

KHAN, B. et al. Effects of graphene oxide nanomaterial exposures on the marine bivalve, *Crassostrea virginica*. **Aquatic Toxicology**, v. 216, p. 105297, nov. 2019.

LACHNER, D.; OLIVEIRA, L. F.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of the water soluble fraction of gasoline on ZFL cell line: Cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress. **Toxicology in Vitro**, v. 30, n. 1, p. 225–230, dez. 2015.

LIU, J. et al. Graphene-based nanomaterials and their potentials in advanced drug delivery and cancer therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 286, p. 64–73, set. 2018a.

LIU, Y. et al. Comparative toxicity of pristine graphene oxide and its carboxyl, imidazole or polyethylene glycol functionalized products to *Daphnia magna*: A two generation study. **Environmental Pollution**, v. 237, p. 218–227, jun. 2018b.

LUNGU-MITEA, S. **Toxicity pathways in zebrafish cell lines: an ecotoxicological perspective on "toxicity testing in the 21st century"**. Doctoral thesis. Disponível em: <<https://pub.epsilon.slu.se/18700/>>. Acesso em: 16 jun. 2021.

MAGYARY, I. Recent advances and future trends in zebrafish bioassays for aquatic ecotoxicology. **Ecocycles**, v. 4, n. 2, p. 12–18, 2018.

MANJUNATHA, B. et al. Pristine graphene induces cardiovascular defects in zebrafish (*Danio rerio*) embryogenesis. **Environmental Pollution**, v. 243, p. 246–254, 1 dez. 2018.

MOGHAYEDI, M. et al. Kinetics and mechanism of antibacterial activity and cytotoxicity of Ag-RGO nanocomposite. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 159, p. 366–374, nov. 2017.

MOROZESK, M. et al. Interactions of oxidized multiwalled carbon nanotube with cadmium on zebrafish cell line: The influence of two co-exposure protocols on in vitro toxicity tests. **Aquatic Toxicology**, v. 200, p. 136–147, 1 jul. 2018.

MOROZESK, M. et al. Effects of multiwalled carbon nanotubes co-exposure with cadmium on zebrafish cell line: Metal uptake and accumulation, oxidative stress, genotoxicity and cell cycle. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 202, p. 110892, out. 2020.

NORDBERG, G. F.; FOWLER, B. A. Risk Assessment. In: **Handbook on the Toxicology of Metals**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 461–486.

OU, L. et al. The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 6633–6646, set. 2017.

PARK, C. S.; YOON, H.; KWON, O. S. Graphene-based nanoelectronic biosensors. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 38, p. 13–22, jun. 2016.

QI, Y. et al. Aggregation morphology is a key factor determining protein adsorption on graphene oxide and reduced graphene oxide nanomaterials. **Environmental Science: Nano**, v. 6, n. 5, p. 1303–1309, 2019.

RAY, S. C. **Applications of graphene and graphene-oxide based nanomaterials**. Amsterdam: Elsevier, 2015.

ROZMAN, K. K.; DOULL, J.; HAYES, W. J. Chapter 1 - Dose and time determining, and other factors influencing, toxicity. In: KRIEGER, R. (Ed.). **Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology (Third Edition)**. New York: Academic Press, 2010. p. 3–101.

SALIM, E. I. et al. Synthesis, characterization and enhanced apoptotic effect of gemcitabine-loaded albumin nanoparticles coating with chitosan. **Archives of Physiology and Biochemistry**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 26 mar. 2020.

SANDOVAL, S. et al. Tuning the nature of nitrogen atoms in N-containing reduced graphene oxide. **Carbon**, v. 96, p. 594–602, 1 jan. 2016.

SANTOS, F. A. DOS. **Caracterização de grafeno quimicamente esfoliado para aplicações em nanomedicina**. Doutorado em Física Aplicada—São Carlos: Universidade de São Paulo, 31 jan. 2018.

SASIDHARAN, A. et al. Differential nano-bio interactions and toxicity effects of pristine versus functionalized graphene. **Nanoscale**, v. 3, n. 6, p. 2461, 2011.

- SAWOSZ, E. et al. Graphene functionalized with arginine decreases the development of glioblastoma multiforme tumor in a gene-dependent manner. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 25214–25233, 23 out. 2015.
- SCHÄFFLER, M. et al. Serum protein identification and quantification of the corona of 5, 15 and 80 nm gold nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 24, n. 26, p. 265103, 5 jul. 2013.
- SCOTT, J.; MINGHETTI, M. Toxicity testing: in vitro models in ecotoxicology. In: **An Introduction to Interdisciplinary Toxicology**. [s.l.] Elsevier, 2020. p. 477–486.
- SHARMA, D. et al. Insight into the biosensing of graphene oxide: present and future prospects. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 9, n. 2, p. 238–261, mar. 2016.
- SOHAEBUDDIN, S. K. et al. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 22, 2010.
- SOUZA, J. P. et al. Toxicological effects of graphene oxide on adult zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 186, p. 11–18, maio 2017.
- SRIKANTH, K. et al. Graphene oxide induces cytotoxicity and oxidative stress in bluegill sunfish cells: graphene oxide cytotoxic to blue gill sunfish cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, n. 4, p. 504–513, abr. 2018.
- TAJU, G. et al. In vitro cytotoxic, genotoxic and oxidative stress of cypermethrin on five fish cell lines. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 113, p. 15–24, jul. 2014.
- TAJU, G. et al. Application of fish cell lines for evaluating the chromium induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress. **Chemosphere**, v. 184, p. 1–12, out. 2017.
- TRIGUEIRO, N. S. DE S. et al. Zebrafish as an emerging model system in the global south: two decades of research in Brazil. **Zebrafish**, v. 17, n. 6, p. 412–425, 1 dez. 2020.
- TUNG, V. C. et al. High-throughput solution processing of large-scale graphene. **Nature Nanotechnology**, v. 4, n. 1, p. 25–29, jan. 2009.
- VAKIFAHMETOGLU-NORBERG, H.; OUCHIDA, A. T.; NORBERG, E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 426–431, jan. 2017.
- WEN, T. et al. Nanomaterials and reactive oxygen species (ROS). In: XU, H.; GU, N. (Eds.). **Nanotechnology in Regenerative Medicine and Drug Delivery Therapy**. Singapore: Springer, 2020. p. 361–387.
- YANG, K. et al. Behavior and toxicity of graphene and its functionalized derivatives in biological systems. **Small**, v. 9, n. 9–10, p. 1492–1503, 27 maio 2013.
- ZHANG, B. et al. Interactions of graphene with mammalian cells: molecular mechanisms and biomedical insights. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Graphene-based materials in nanomedicine. v. 105, p. 145–162, 1 out. 2016.

ZHAO, J. et al. Mechanistic understanding toward the toxicity of graphene-family materials to freshwater algae. **Water Research**, v. 111, p. 18–27, mar. 2017.

ZHENG, Q.; KIM, J.-K. Application of graphene-based transparent conductors (TCs). In: ZHENG, Q.; KIM, J.-K. (Eds.). **Graphene for Transparent Conductors: Synthesis, Properties and Applications**. New York, NY: Springer New York, 2015. p. 179–203.

## Capítulo 2 - Estresse oxidativo e genotoxicidade na linhagem de células hepáticas de zebrafish - diferenças entre GO e rGO em concentrações ambientalmente relevantes

### Resumo

Neste estudo, foram investigadas a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e suas consequências para a atividade metabólica, defesas antioxidantes, capacidade antioxidante total (*total antioxidant capacity*, TAC), estresse oxidativo e integridade do DNA das células hepáticas de zebrafish (ZFL) após exposição a concentrações ambientalmente relevantes (0,001, 0,01, 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de óxido de grafeno (GO) e óxido de grafeno reduzido (rGO) em dois tempos de exposição (24 h e 72 h). O rGO é hidrofóbico e, portanto, interage facilmente com as membranas celulares, induzindo a produção não balanceada de ROS após 72 horas de exposição, nas duas concentrações mais altas. A alta produção de ROS levou a uma diminuição da atividade metabólica e da viabilidade celular em todas as concentrações testadas. Nas células expostas ao rGO, as defesas antioxidantes falharam, e a atividade da catalase (CAT) diminuiu na menor concentração após 24 horas de exposição. Não houve alteração nos níveis da glutatona S-transferase (GST) e da glutatona (GSH) após 72 horas, mas as células perderam sua capacidade antioxidante nas duas concentrações mais altas. A exposição de 24 horas ao rGO culminou em peroxidação lipídica nas três concentrações mais elevadas. A exposição ao GO induziu o aumento da atividade da CAT e da GST e as células sustentaram sua TAC e não tiveram peroxidação lipídica em nenhuma concentração ou tempo testados. Tanto GO quanto rGO causaram quebras nas fitas de DNA após 24 horas de exposição, entretanto, apenas o rGO causou danos no DNA após 72 horas. A exposição ao rGO foi significativamente mais prejudicial do que a exposição a GO para as células ZFL, mesmo em concentrações muito baixas. Por meio de suas defesas antioxidantes, as células apresentaram alta capacidade de neutralizar as ROS induzidas pela exposição ao GO, prevenindo efeitos genotóxicos e alterações metabólicas, sustentando assim a viabilidade celular. O tempo de exposição teve impactos diferentes para os dois nanomateriais, GO causou mais alterações em 24 horas, mostrando recuperação após 72 horas. Enquanto as células expostas ao rGO tiveram efeitos nocivos em ambos os tempos de exposição.

**Palavras-chave:** defesas antioxidantes, genotoxicidade, peroxidação lipídica, atividade metabólica, mitocôndrias, estresse oxidativo, espécies reativas de oxigênio, capacidade antioxidante total.

## **Destaques**

- rGO induziu aumento da produção de ROS em níveis que o sistema antioxidante das células ZFL não pode neutralizar.
- rGO causou peroxidação lipídica, perda da capacidade antioxidante total e dano genotóxico.
- GO induziu aumento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, assim ativou a atividade da CAT e da GST, mantendo as funções e a viabilidade celular.
- GO causou danos genotóxicos em 24 horas, mas as células danificadas foram reparadas ou eliminadas após 72 horas.

## 1. Introdução

Os nanomateriais de carbono como o óxido de grafeno (GO) e o óxido de grafeno reduzido (rGO) são nanofolhas que podem ser tão grandes quanto 500 nm de tamanho ou mais e têm uma espessura tão pequena quanto 1 nm (SZABO; MARONI; SZILAGYI, 2020). Sua forma e estrutura química lhes conferem muitas propriedades magníficas (SHARMA et al., 2017), mas também podem acarretar problemas ao interagir com organismos biológicos (BATLEY; KIRBY; MCLAUGHLIN, 2013).

GO e rGO são amplamente aplicáveis em dispositivos eletrônicos como no transistor de efeito de campo (FET); no armazenamento de energia como baterias, capacitores, em células de combustível e células solares; em biosensores para detecção de doenças e até mesmo na detecção de moléculas biologicamente relevantes; e em aplicações biomédicas como a entrega de medicamentos; e em dispositivos de purificação de água (RAY, 2015).

Além disso, alguns produtos de mercado como revestimentos têxteis, pneus, ferramentas esportivas, telas flexíveis, baterias e cimentos podem ter cerca de 0,01 a 1% de materiais de grafeno em sua composição. De fato, já existem mais de 200 produtores de grafeno, um mercado avaliado em cerca de US \$ 1,95 bilhão em 2018 e com a perspectiva de atingir a marca de US \$ 1,3 trilhão até 2023 (MARKOVIC et al., 2018).

Devido a essa produção massiva, a entrada de resíduos de materiais baseados em grafeno no ambiente aquático é inevitável (ZHAO et al., 2021), o que aumenta sua presença no ambiente e as implicações dessa presença. Existem muitas rotas pelas quais GO e rGO podem chegar aos ambientes aquáticos, seja durante a produção, transporte ou descarte de produtos de grafeno, ou mesmo por meio de aplicação ambiental direta (por exemplo, fertilizantes e remediação) e em estações de tratamento de águas residuais (MARKOVIC et al., 2018). Assim, torna-se extremamente importante investigar seus efeitos sobre organismos aquáticos para determinar em que condições pode ser tóxico ou não.

Sob condições controladas, os nanomateriais de carbono podem ser degradados pela luz UV, reagentes químicos, bactérias e alguns tipos de células como neutrófilos e células fagocíticas. No entanto, os nanomateriais de carbono estão entre os materiais sintéticos mais recalcitrantes (PENG et al., 2020). Por ter alta atração por adsorver outras substâncias, incluindo poluentes, os nanomateriais de carbono não são facilmente degradados em condições

naturais, por isso são susceptíveis a se espalhar e se acumular na cadeia alimentar (PENG et al., 2020).

A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) tem sido descrita como um dos efeitos biológicos mais frequentes dos nanomateriais (MENDOZA; BROWN, 2019; PASTRANA et al., 2019). As ROS incluem o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidroxílico (forma neutra do íon hidróxido,  $\bullet OH$ ) e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) (TRIPATHY; MOHANTY, 2017). A produção excessiva de ROS pode levar ao estresse oxidativo e, conseqüentemente, à peroxidação lipídica e à ruptura da membrana, disfunção mitocondrial, oxidação de proteínas, danos no DNA e, finalmente, morte celular (LEE et al., 2019).

Alguns estudos mencionam que GO e rGO, puros ou combinados com outros materiais, têm atividade antioxidante (BAALI et al., 2019; QIU et al., 2014), especialmente rGO, mitigando os efeitos do estresse oxidativo causado pelo cádmio em células de HEPG2 (AHAMED et al., 2020). No entanto, há também vários estudos que demonstraram estresse oxidativo causado por GO e/ou rGO em camundongos (DU et al., 2021), peixes (PAITAL et al., 2019), *Daphnia magna* (LV et al., 2018), *Chlorella pyrenoidosa* (WANG et al., 2021) e várias linhagens de células (SRIKANTH et al., 2018a; STYGAR et al., 2021; ZHANG et al., 2021).

Esses resultados podem parecer conflitantes, mas já se sabe que a toxicidade dos nanomateriais é fortemente influenciada por suas características, como composição química, tamanho de partículas, estrutura cristalina, área de superfície, superfície eletroquímica e, certamente, por transformações físicas e químicas no ambiente (MARKOVIC et al., 2018).

Para fornecer informações que permitam o uso seguro de GO e rGO, este trabalho analisou a produção de ROS, a atividade metabólica, a ocorrência de danos no DNA e de peroxidação lipídica, a perda da capacidade antioxidante total e alterações na atividade de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Para tanto, foi utilizada a linhagem de células hepáticas de peixe zebra (ZFL) como modelo experimental e foram realizadas análises em concentrações ambientalmente relevantes e dois tempos de exposição.

## **2. Materiais e Métodos**

### **2.1. Síntese e Caracterização do Óxido de Grafeno e do Óxido de Grafeno Reduzido**

O óxido de grafeno (GO) foi sintetizado a partir de grafite expandido (Nacional de Grafite<sup>®</sup>, Brasil), utilizando o método de HUMMERS; OFFEMAN, (1958), modificado por

TUNG et al. (2009). A metodologia detalhada da síntese de GO foi descrita por SOUZA et al., (2017). O óxido de grafeno reduzido (rGO) foi obtido pela diluição de GO em água ultrapura com adição de hidróxido de amônia (28 - 30%), a solução foi dispersada em um banho ultrassônico (Elmasonic P30H; 37 kHz). O procedimento está descrito em detalhes no Capítulo 1 desta tese. Foram realizadas medidas de Potential Zeta (*zeta potential*, ZP), dispersão de luz dinâmica (*dynamic light scattering*, DLS) (Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments), Espectrofotometria de Infravermelho com Transformada de Fourier (*Fourier Transform Infrared Spectrophotometry*, FTIR) (Thermo Scientific – Nicolet iS50) para caracterizar ambos os nanomateriais, também descrito detalhadamente no Capítulo 1. Os espectros de fluorescência de GO e rGO foram realizados no equipamento SpectraMax® M3 Multi-Mode Microplate Reader. As amostras foram preparadas a uma concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  na água e lidas de 200 a 800 nm. Os espectros de emissões foram adquiridos em um comprimento de 350 nm.

## **2.2. Aquisição e Cultivo da linhagem ZFL e Design Experimental**

As células da linhagem ZFL foram obtidas do banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ, Duque de Caxias, RJ) (06/10/2004-BCRJ No: 0256/303) e cultivadas a  $28^{\circ}\text{C}$ , sem adição de  $\text{CO}_2$ , em um meio de crescimento contendo 50% Leibovitz L-15; 50% RPMI 1640; 0,1% antibiótico/antimicótico (10.000 unidades de penicilina; 10 mg de estreptomicina e 25  $\mu\text{g}$  de anfotericina B  $\text{mL}^{-1}$ ), suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%. A viabilidade e a confluência foram monitoradas usando corante azul de tripano e um contador automático de células. As subculturas foram feitas três vezes por semana e os experimentos foram realizados utilizando-se os repiques de número 18 a 30. Foram utilizadas diferentes densidades de semeadura de acordo com a área das placas ou frascos para evitar o estresse células devido ao excesso de população (máximo de 90% de confluência). Após GO e rGO serem aplicados nas concentrações 0,001, 0,01, 0,1 e  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ , a exposição ocorreu em 2 tempos: 24 e 72 horas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, com ao menos três réplicas.

## **2.3. Ensaio de redução de resazurina**

A citotoxicidade de GO e rGO foi avaliada pela realização do ensaio de redução de resazurina, que mede a atividade metabólica das células. O corante resazurina é azul e fica rosa quando reduzido. As leituras podem ser colorimétricas (570 e 600 nm ou 540 e 630 nm) e/ou fluorométricas (comprimento de onda de excitação a 530-560 nm e comprimento de onda de emissão a 590 nm) (RAMPERSAD, 2012). Como os espectros de GO mostraram que ele tem

sua própria fluorescência e poderia interferir com os resultados do ensaio de redução da resazurina, medimos a absorbância em 570nm, em vez de medir a fluorescência.

Foram semeadas cerca de  $8 \times 10^4$  células por poço, em placas de 96 poços. Após aderirem completamente na placa, as células foram expostas a GO e rGO por 24 e 72 horas. Ao final da exposição, o meio de cultivo contendo os nanomateriais foi removido, e as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (*phosphate buffer saline*, PBS). Em seguida, o corante resazurina foi adicionado ( $82 \mu\text{g mL}^{-1}$ , em meio de cultura), a placa foi incubada por 3 horas e, em seguida, a absorbância foi medida em 570nm utilizando um leitor de microplaca (SpectraMax® M5 Multi-Mode, Molecular Devices, CA, USA).

#### **2.4. Geração de Espécies de Oxigênio**

As células ZFL foram semeadas em placas pretas de 96 poços, incubadas por 24 horas para aderir e depois expostas a GO e rGO por 24 e 72 horas. A geração de espécies de oxigênio foi medida de acordo com Sohaebuddin et al. (2010). Após a exposição, o meio foi descartado, e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, uma solução de H<sub>2</sub>DCF-DA em PBS foi adicionada aos poços em uma concentração final de  $10 \mu\text{M}$  e a placa foi novamente incubada, por 30 minutos. Depois disso, a solução contendo H<sub>2</sub>DCF-DA foi removida, e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, o PBS foi cuidadosamente removido e  $100 \mu\text{l}$  de um novo PBS foi adicionado e as células foram rompidas utilizando uma micropipeta multicanal. A leitura do ponto final foi detectada (ex: 494 nm; em: 518 nm) usando um leitor de microplacas (SpectraMax® M5 Multi-Mode, Molecular Devices, CA, USA). Os brancos contendo apenas os nanomateriais foram usados para descontar a influência da fluorescência natural de GO.

#### **2.5. Defesas antioxidantes e estresse oxidativo**

Aproximadamente  $1,8 \times 10^7$  células foram semeadas em três frascos de  $75 \text{ cm}^2$ , incubadas por 24 horas para aderir e, em seguida, expostas a GO e rGO por 24 e 72 horas. Após a exposição, as células foram lavadas duas vezes com PBS e tripsinizadas. Após neutralizar a tripsina com SFB, as células foram centrifugadas ( $125 \text{ g}$ , temperatura ambiente, 5 min), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em PBS, centrifugadas novamente descartando o sobrenadante. Em seguida, as células foram transferidas para criotubos, ressuspensas em PBS contendo fluoreto de fenilmetilsulfonil ( $1 \text{ mM}$ ), e congelado em nitrogênio líquido onde foram mantidas até a análise. Antes da análise bioquímica, as células

foram submetidas a um disruptor de células ultrassônico por 3 vezes durante 5 minutos, com pausas de 3 minutos no gelo. Em seguida, as amostras foram centrifugadas (10 min a 10.640 g, 4 °C) e o sobrenadante foi coletado e armazenado a -80 °C até que as análises bioquímicas fossem realizadas. Para as análises bioquímicas, foram utilizados 5 a 20µl de amostra em cada ensaio. Para determinar a concentração proteica das amostras, o método de BRADFORD (1976) foi aplicado utilizando albumina de soro bovino como padrão, com leituras da absorbância a 595 nm. A atividade da catalase (CAT) foi medida conforme descrito por BEUTLER (1975); a atividade da glutathione S-transferase (GST) foi avaliada de acordo com o método descrito pelo HABIG; PABST; JAKOBY (1974). A glutathione reduzida (GSH) foi quantificada de acordo com WILHELM FILHO et al. (2005). O hidropéroxido lipídico (LPO) foi quantificado usando o método FOX de acordo com JIANG; WOOLLARD; WOLFF (1991). A TAC avaliada de acordo com Amado et al. (2009). Todas as análises foram adaptadas para um leitor de microplacas (SpectraMax M5, Molecular Devices, CA, USA).

## **2.6. Avaliação de genotoxicidade**

A genotoxicidade foi avaliada utilizando o ensaio do cometa (Singh et al., 1988). As células foram semeadas em frascos de 25 cm<sup>2</sup>, incubadas até aderir e em seguida foram expostas ao GO e rGO por 24h e 72h. Após a exposição, a suspensão de células foi homogeneizada com gel de agarose de baixo ponto de fusão e aplicada em lâminas de vidro gelatinizadas. As lâminas contendo as células foram incubadas em solução de lise (etilenodiamino tetra-acético, EDTA 100 mM; cloreto de sódio 2,5 M, base Trizma 10 mM, 1% Triton X-100, 20% dimetilsulfóxido, DMSO; pH 10) por 1 hora. Após a incubação, foi realizada uma eletroforese a 25 V e 300 mA por 20 min, no escuro. No final da eletroforese, as lâminas foram lavadas com água deionizada a 4° C por três vezes de 5 min, fixadas com etanol absoluto e secas à temperatura ambiente. Cada experimento produziu duas lâminas, totalizando 6 lâminas por tratamento. As lâminas foram coradas com 20 µl de solução Gel Red (15 µL Gel Red 10.000X em 5 mL 1M NaCl e 45 mL de água deionizada) e 20 vinte campos aleatórios foram fotografados, as imagens foram capturadas utilizando um microscópio Olympus BX-61 (Olympus, PA, EUA) com ampliação de 200x, filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm. Os danos de DNA foram medidos utilizando o software Open Comet (versão 1.3); a migração de fragmentos de DNA (DNA da cauda) foi dada como uma porcentagem do DNA total.

## **2.7. Estatística**

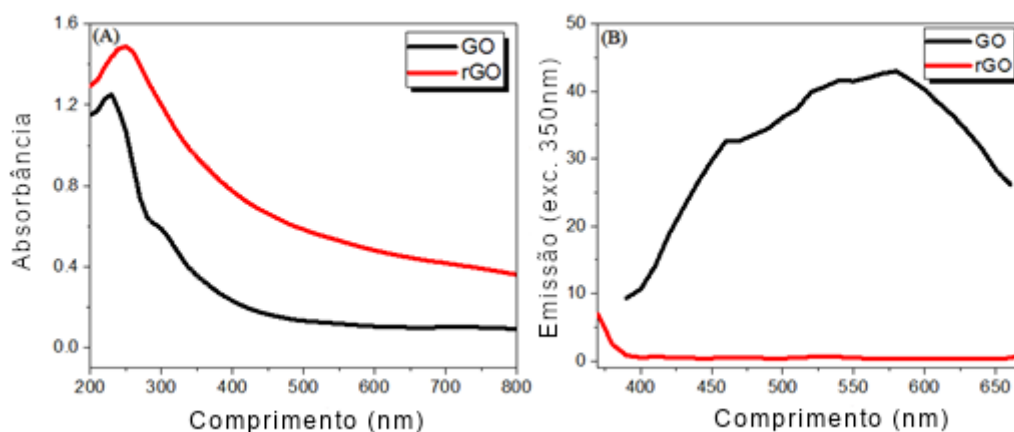
Os dados foram testados para distribuição normal (teste de Shapiro-Wilk) e homoscedasticidade de variâncias (teste de Bartlett). Dados paramétricos foram analisados aplicando ANOVA bidirecional seguido do teste de comparação múltipla de Tukey ( $p < 0,05$ ). Dados não paramétricos foram analisados aplicando o teste kruskal-wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn ( $p < 0,05$ ).

### 3. Resultados

#### 3.1. Síntese e Caracterização do Óxido de Grafeno e Óxido de Grafeno Reduzido

As amostras de GO apresentaram morfologia típica de nanofolha e grupos epóxi, hidroxil e carboxil, enquanto o rGO apresentou poucos grupos ácidos remanescentes. A análise FTIR mostrou que houve alta adsorção de proteínas nas superfícies de GO, mas pouca adsorção na superfície de rGO. As medidas de ZP e DSL de GO e rGO suspensas em meio de cultura variaram de -10 a -20 mV; O tamanho hidrodinâmico de GO foi superior ao do rGO, como descrito no capítulo 1.

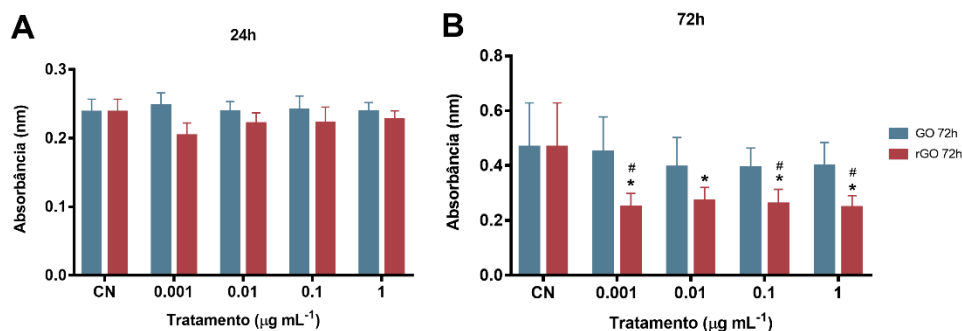
Os espectros de absorção e emissão de GO e rGO obtidos a partir de suas dispersões na água são mostrados nas Figuras 21 A e B. GO tem um pico de 230 nm e um ombro entre 290-310 nm, enquanto o rGO tem um pico único de 250 nm (Figura 21A). A Figura 21B mostra a emissão de GO e rGO na água com excitação a 350 nm.



**Figura21** - Espectros de absorbância (A) e emissão (B) de GO e rGO ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em água; exc. 350 nm.

#### 3.2. Ensaio de redução de resazurina

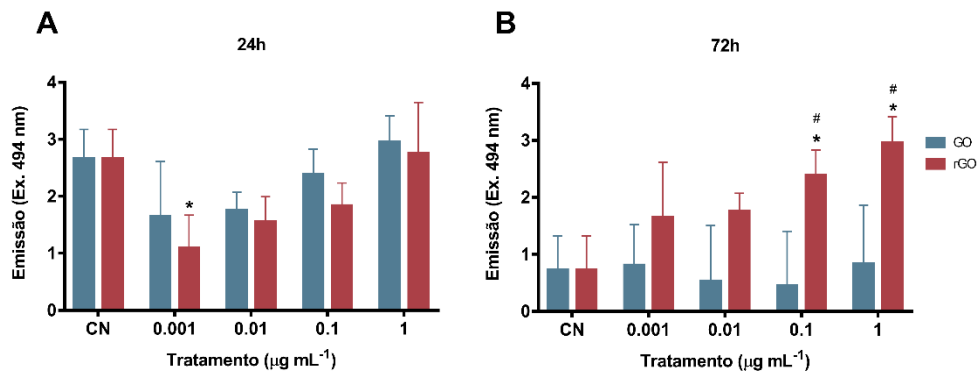
A atividade metabólica e, conseqüentemente, a viabilidade celular avaliada pela redução do corante de resazurina foram mostradas nas figuras 22 A e B. A exposição a GO e rGO por 24h não apresentou alterações em comparação ao CN ou entre os tratamentos. Após 72h de exposição ao rGO, a atividade metabólica das células diminuiu em todas as concentrações, comparando-se com o CN ( $p < 0,001$ ). A exposição por 72h foi mais prejudicial do que a exposição por 24h e rGO (0,001, 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) foi claramente mais prejudicial para as células do que GO (#) ( $p < 0,01$ ).



**Figura 22** - Atividade metabólica das células ZFL após 24h (A) e 72h (B) expostas a GO e rGO. O CN consiste em células expostas apenas ao meio de cultura completo. Comparações entre o CN e os tratamentos, mesma substância e tempo (\*); diferenças entre substâncias, mesmas concentrações e tempo (#), os valores são médios  $\pm$  o desvio padrão. Os dados foram testados aplicando-se o teste ANOVA de duas vias e Tukey.

### 3.3. Geração de Espécies de Oxigênio

A exposição ao GO por 24h e 72h não causou alterações na geração de ROS, comparando-se com o CN (Figura 23). Para as células expostas ao rGO a uma concentração de 0,001  $\mu\text{g mL}^{-1}$  por 24h, a geração de ROS foi menor do que para as células do CN ( $p < 0,01$ ). Após 72h de exposição a 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de rGO, houve aumento significativo na geração de ROS ( $p < 0,01$ ). Para as células expostas ao GO, a geração de ROS foi menor após 72h de exposição do que para o tempo de 24h (CN, 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ( $p < 0,0001$ ); O CN negativo de rGO também teve menor geração de ROS após 72h do que em 24h ( $p < 0,0001$ ), mas as células expostas ao rGO produziram mais ROS do que as expostas ao GO em 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $p < 0,0001$ ).



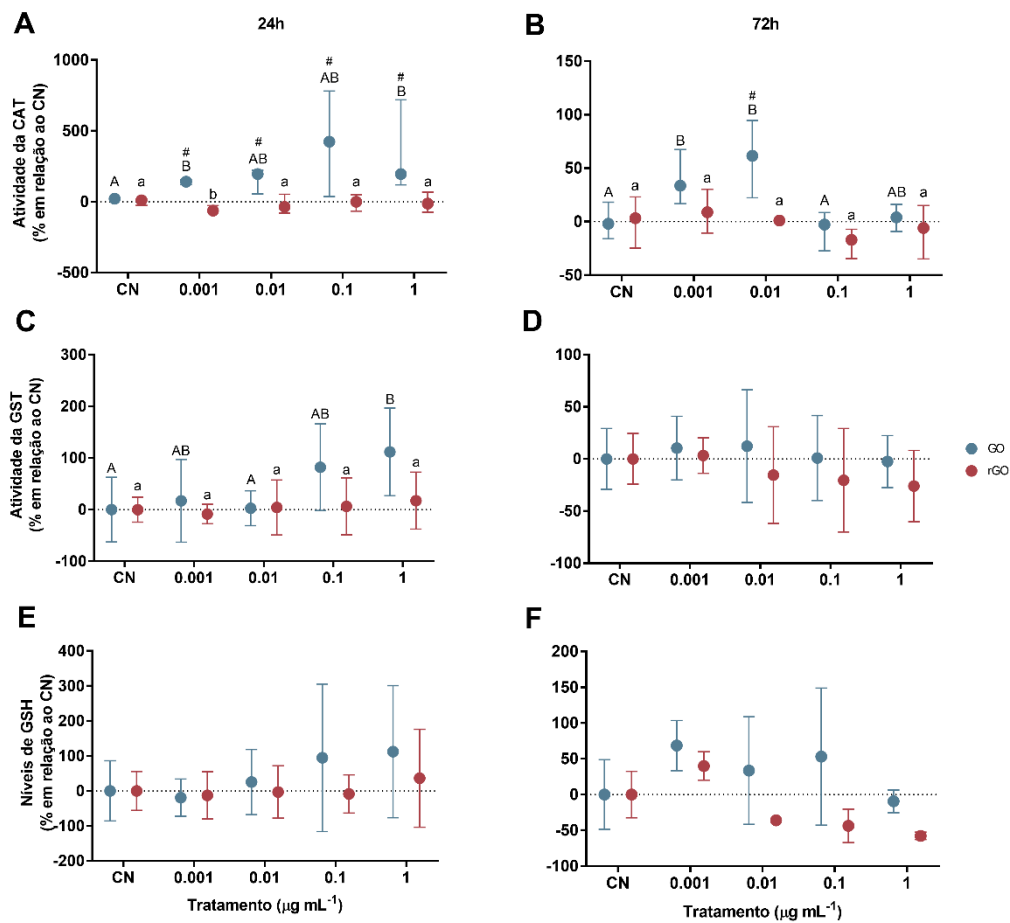
**Figura23** - Geração de ROS após exposição a GO e rGO por 24h (A) e 72h (A). Comparações entre o CN e os tratamentos, mesma substância e tempo (\*); diferenças entre as substâncias, nas mesmas concentrações e tempo (#), os valores são média  $\pm$  o desvio padrão. Os dados foram testados aplicando-se o teste ANOVA de duas vias e Tukey.

### 3.4. Defesas antioxidantes e estresse oxidativo

A atividade da CAT foi aumentada nas células expostas a GO por 24h, nas concentrações 0,001 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 24A) e após 72h nas concentrações 0,001  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 24B). Para as células expostas ao rGO por 24h, a atividade da CAT foi inibida na concentração 0,001  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig. 24A) e a exposição por 72h não causou alterações na atividade da CAT (Fig. 24B) (teste de Kruskal-Wallis e Dunn).

A atividade da GST foi aumentada após exposição a 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de GO por 24h e não mudou após exposição ao rGO no mesmo tempo. A exposição a ambos os materiais por 72h não causou alterações na atividade da GST (Fig. 24, C e D) (ANOVA de duas vias e Tukey).

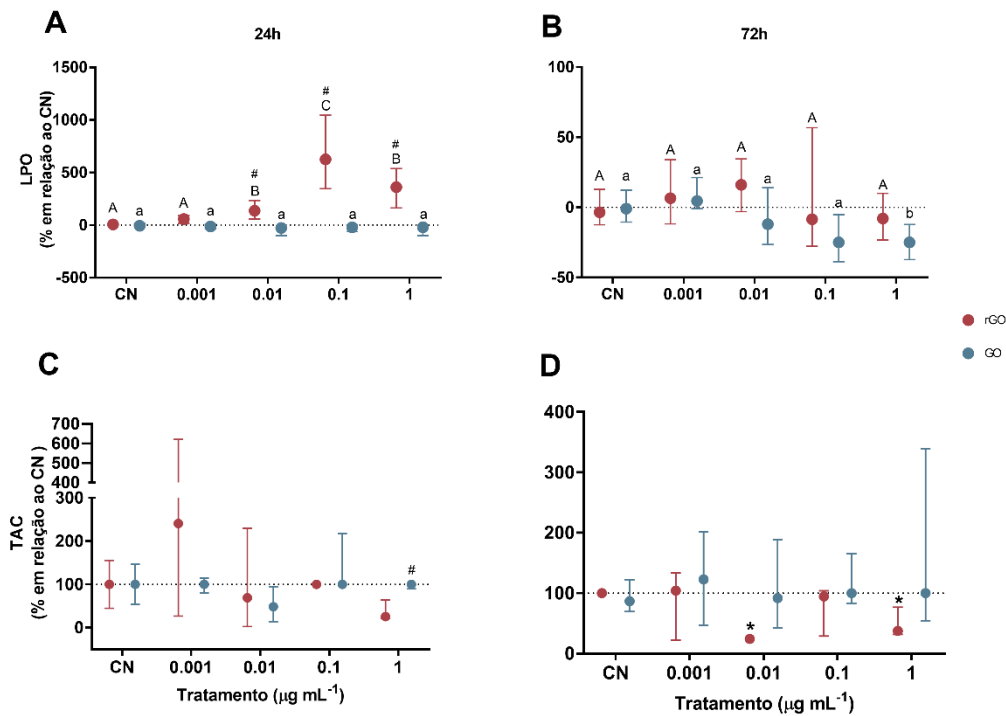
A atividade da GSH não foi afetada pela exposição a GO e rGO em qualquer concentração ou tempo (Fig. 24, E e F) (ANOVA de duas vias e Tukey).



**Figura24** – Antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos de células ZFL expostas a GO e rGO a 0,001; 0,01; 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  por 24h e 72h. A atividade da CAT é mostrada nas figuras 4 A e B, foram aplicados os testes de Kruskal-Wallis e Dunn, os valores são a mediana mais o interquartil. A análise da atividade da GST (Fig. 4 C e D) e dos níveis de GSH (Fig. 4 E e F) foi feita utilizando-se o teste ANOVA de duas vias e Tukey, os valores são média  $\pm$  o desvio padrão. Comparações entre o CN e os tratamentos, mesma substância e tempo (letras maiúsculas e minúsculas) e entre as substâncias, nas mesmas concentrações e tempo (#).

As células expostas ao rGO por 24h (0,01 a 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) apresentaram peroxidação lipídica (Fig. 25A), mas diminuíram significativamente em 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  após 72h de exposição (Fig. 25B). GO não causou peroxidação lipídica em nenhuma concentração ou tempo (Fig. 25 A, B).

A capacidade antioxidante total não foi afetada pela exposição a GO e rGO por 24h, apesar de haver diferença entre GO e rGO na concentração 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (Fig 25C). A exposição ao rGO por 72h, causou redução da TAC nas concentrações 0,01 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , comparando-se ao CN (Fig. 25D). A exposição ao GO por 72h não causou alterações da TAC das células ZFL (Fig. 25D).



**Figura25** - Peroxidação lipídica e capacidade antioxidante total medida após 24h e 72h de exposição a GO e rGO (0,001; 0,01; 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A análise estatística foi feita utilizando-se os testes de Kruskal-Wallis e Dunn, os valores são a mediana e o interquartil. Comparações entre o CN e os tratamentos, mesma substância e tempo (letras maiúsculas e minúsculas) e entre as substâncias, nas mesmas concentrações e tempo (\*).

### 3.5. Avaliação de genotoxicidade

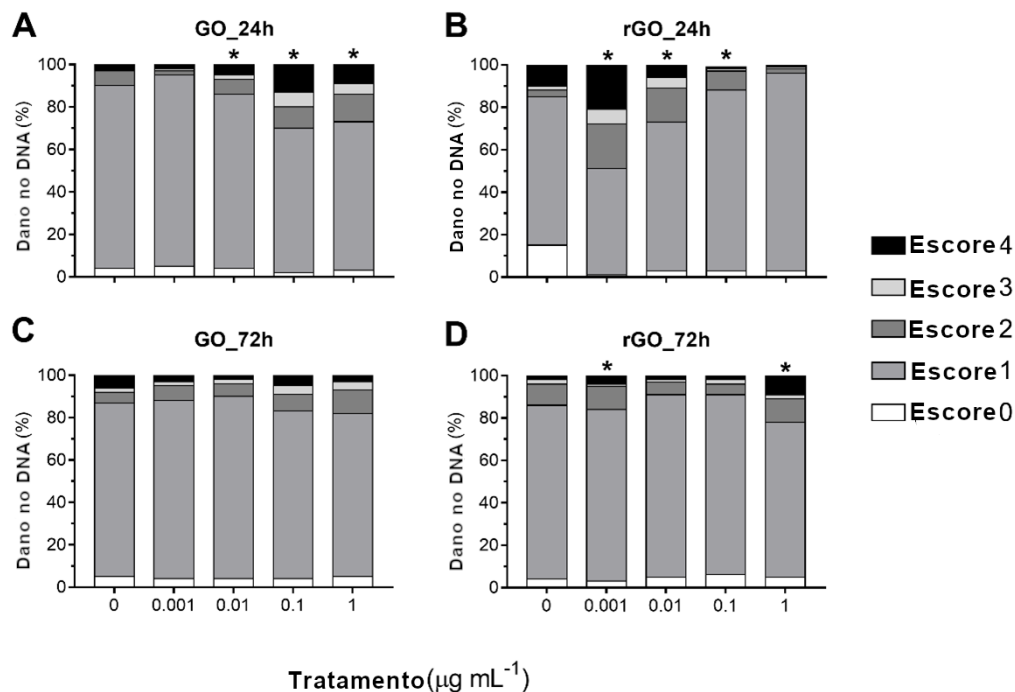
O ensaio do cometa na versão alcalina foi usado para detectar quebras nas fitas de DNA das células ZFL após 24h e 72h de exposição a GO e rGO nas concentrações 0,001; 0,01; 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A figura 26 classifica os danos de DNA em cinco escores, sendo o escore 0 (nenhuma fragmentação), escore 1 (até 25% de fragmentação do DNA), escore 2 (entre 25 e 50%), escore 3 (entre 50 e 75%) e escore 4 (acima de 75% de fragmentação do DNA).

Após 24h de exposição, GO (0,01, 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) causou danos genotóxicos significativos, e nestas concentrações o escore 1 foi predominante (82%, 68% e 70%, respectivamente). O escore 2 foi de 7 a 13%, o escore 3 foi de 2 a 7% e o escore 4 foi de 5 a 14% (Fig. 26A). Não houve dano significativo após exposição ao GO por 72h (Fig. 26C).

Os escores apresentados pelas células expostas ao rGO por 24h foram os seguintes: 0,001  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (escore 0 – 1%, escore 1 – 50%, escore 2 – 21%, escore 3 – 7% e escore – 2 2%),

para  $0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  (escore 0 – 3%, escore 1 – 85%, escore 2 – 9%, escore 3 – 1% e escore 4 – 1%), para  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (escore 0 – 3%, escore 1 – 93%, escore 2 – 2%, escore 3 – 1% e escore 4 – 1%) (Fig. 26B).

Após 72h de exposição ao rGO, as células apresentaram os seguintes escores:  $0,001 \mu\text{g mL}^{-1}$  (escore 0 – 3%, escore 1 – 81%, escore 2 – 11%, escore 3 – 1% e escore 4 – 4%) e para  $1 \mu\text{g mL}^{-1}$  (pontuação 0 – 5%, pontuação 1 – 73%, pontuação 2 – 11%, pontuação 3 – 2% e pontuação 4 – 9%) (Fig. 26D).



**Figura 26** - Escores de fragmentação das fitas de DNA após exposição a GO e rGO por 24h e 72h. Os valores são percentuais dos escores 0 (nenhuma fragmentação), escore 1 (até 25%), escore 2 (entre 25 e 50%), escore 3 (entre 50 e 75%) e escore 4 (fragmentação acima de 75%).

#### 4. Discussão

GO é um material 2D no qual os átomos de carbono estão estruturados em rede hexagonal, seus grupos carboxil, hidroxil, carbonil e epóxi tornam GO extremamente dispersível e estável em soluções de água e outros solventes orgânicos, tornando-o muito útil para aplicações biomédicas (DREYER et al., 2010; SHARMA et al., 2017; ZHAO et al., 2021). A redução de GO (remoção dos grupos de oxigênio) é uma rota comum para a preparação do

grafeno puro, esse procedimento acarreta o aumento da condutividade elétrica e altera outras propriedades do material, por exemplo a sua estabilidade e dispersão na água (DREYER et al., 2010; RAY, 2015; YUSOFF, 2015). Essas características físico-químicas influenciam fortemente a toxicidade desses materiais (MARKOVIC et al., 2018).

Nossos resultados anteriores mostraram que GO apresentou grupos típicos de epóxi, hidroxil e carboxil e sua redução foi bem-sucedida, deixando poucos grupos ácidos no rGO. Embora, o empilhamento  $\pi$ - $\pi$  e interações hidrofóbicas sejam mecanismos conhecidos por facilitarem a ligação entre rGO e proteínas (QI et al., 2019), a análise de FTIR mostrou que a GO adsorveu mais proteínas do que rGO, ambos os materiais apresentaram tamanho hidrodinâmico aumentado e alteração do potencial zeta e da estabilidade, sendo que GO apresentou diâmetro maior que rGO (dados já descritos em detalhe no Capítulo 1). WEI et al. (2015) investigaram a interação de GO e rGO com proteínas séricas e os impactos da adsorção de proteínas em suas propriedades físico-químicas, eles descobriram que GO e rGO têm seletividade diferente em relação às proteínas e que a interação com elas pode causar alterações no tamanho, potencial zeta e morfologia. Da mesma forma, YANG et al. (2021) investigaram a endocitose e a citotoxicidade de GO sobre a linhagem celular A549 em diferentes concentrações de SFB. Eles descobriram que a formação de corona proteica reduziu a afinidade de ligação entre as nanofolhas de GO e as membranas das células por meio de repulsão estérica, consequentemente inibindo a endocitose e reduzindo a toxicidade de GO; corroborando os achados de DUAN et al. (2015).

Quanto aos espectros de absorção e emissão de dispersões de GO e rGO na água, os principais picos na absorção de GO e rGO estão relacionados com as transições  $\pi - \pi^*$  das ligações C = C. Enquanto o ombro encontrado apenas no GO está relacionado com a transição  $\eta - \pi^*$  devido à presença do grupo epóxi (C-O-C) e peróxidos (C-O-O-C) na superfície de GO (SAXENA et al., 2011). Além disso, rGO apresentou uma mudança para a faixa do vermelho no pico principal e maior espalhamento na região visível. Isso se deve à mudança na cor da amostra, do marrom claro de GO para o preto de rGO, associado à formação de aglomerados na água, além de uma maior restauração parcial da conjugação do sistema eletrônico, rede p, dentro das folhas de grafeno após redução do GO (HAGHIGHI; AMOUZADEH TABRIZI, 2013). rGO não apresentou espectro de emissões devido à sua agregação na água, causando uma supressão de fluorescência. Enquanto GO, que é hidrofílico, tem uma emissão no vermelho perto de 600 nm. Isso porque a estrutura de GO possui carbonos de hibridização em

sp<sup>2</sup> e sp<sup>3</sup> devido à oxidação, e esses carbonos em sp<sup>3</sup> distorcem a estrutura do grafeno e introduzem defeitos causando desordem no sistema. Esses estados induzidos por desordem têm menos energia do que a diferença de  $\pi$ - $\pi^*$  (derivada do grafeno puro) e uma ampla distribuição de energia e são responsáveis pelo grande pico na faixa do vermelho (MEI et al., 2019). As informações sobre o espectro de absorção e emissão devem ser consideradas ao realizar ensaios colorimétricos/fluorométricos, a fim de selecionar os melhores ensaios e metodologias a serem utilizados.

O estresse oxidativo é o principal mecanismo de toxicidade dos nanomateriais e afeta plantas e animais (MENDOZA; BROWN, 2019; PASTRANA et al., 2019). Começa com a formação de ROS, que pode ser tanto benéfica quanto prejudicial, depende de onde, quando e quanto ROS é gerado (TRIPATHY; MOHANTY, 2017). Indivíduos como plantas e animais têm defesas antioxidantes que neutralizam as ROS para evitar o estresse oxidativo (HOSEINIFAR et al., 2021; TRIPATIA; MOHANTY, 2017; XIE et al., 2019). No entanto, se as defesas antioxidantes não funcionarem, o excesso de ROS pode alterar a estrutura das membranas celulares, suas organelas e até mesmo de proteínas e DNA (TRIPATHY; MOHANTY, 2017). Em humanos, o estresse oxidativo está relacionado a doenças como câncer, aterosclerose, síndrome da fadiga crônica, doença de Alzheimer, doença de Parkinson e outras (TRIPATHY; MOHANTY, 2017).

Anteriormente, avaliamos a geração de ROS após exposição a altas concentrações (1 a 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de GO e rGO após 24 e 72 horas, também utilizando células da linhagem ZFL. Descobrimos que o rGO causou mais ROS do que GO na concentrações 50, 75 e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , especialmente após 24h de exposição (Capítulo 1). No capítulo 2, também investigamos a geração de ROS, mas desta vez em concentrações muito baixas. Os resultados mostraram a exposição ao rGO induziu a produção de ROS somente após 72h, nas duas maiores concentrações testadas e causou mais ROS do que GO. Por ser hidrofóbico, rGO tem afinidade com a membrana das células, o que facilita sua endocitose (HUO et al., 2019; QI et al., 2019), suas bordas afiadas causam danos mecânicos às membranas e induzem a produção de ROS iniciando a cascata que pode levar ao estresse oxidativo (GURUNATHAN et al., 2013; SENGUPTA et al., 2019).

De acordo com MENDOZA; BROWN (2019), nanomateriais em concentrações baixas ou não citotóxicas, podem levar a alterações no estado redox intracelular, o que poderia impactar a sinalização redox e a função celular. As ROS estão envolvidas na regulação de várias

proteínas e na proliferação celular, estresse oxidativo mitocondrial, apoptose e danos de DNA (TRIPATHY; MOHANTY, 2017). Então, como primeiro passo para verificar este ponto, começamos a investigar a atividade metabólica das células ZFL. Usamos o corante de resazurina, que pode ser reduzido por NADPH, FADH, FMNH, NADH, bem como por citocromos, redutases mitocondriais e outras enzimas como diaforases (dihidrolipoamina desidrogenase), NAD(P)H: oxidoredutase quinona e redutase flavina situadas no citoplasma e na mitocôndria (RAMPERSAD, 2012).

A exposição ao GO não causou alterações na atividade metabólica das células, em nenhum dos tempos testados; rGO também não causou alterações em 24 horas. No entanto, após 72 horas de exposição ao rGO, a atividade metabólica das células ZFL diminuiu significativamente em todas as concentrações (0,001; 0,01; 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), comparando-se com o CN e comparando com as células expostas ao GO (0,001; 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A diminuição da atividade metabólica influencia diretamente na viabilidade das células e pode acarretar a diminuição da população celular por morte celular programada (Ou et al., 2017). A razão para essa diminuição na atividade metabólica das células pode ser devida a danos mecânicos causados pela interação das membranas com as bordas afiadas do rGO (DZIEWIĘCKA et al., 2018; SENGUPTA et al., 2019). As ROS também podem causar perturbação do potencial da membrana mitocondrial e, conseqüentemente, induzir a produção de mais ROS (JAWORSKI et al., 2019).

As mitocôndrias desempenham um papel fundamental não apenas no metabolismo energético (VAKIFAHMETOGLU-NORBERG; OUCHIDA; NORBERG, 2017), mas também no equilíbrio celular redox, na regulação de vias biosintéticas e atuam como amplificadoras de danos celulares (ZHANG et al., 2016). Adicionalmente, desempenham um papel central na regulação de várias formas de morte celular, incluindo apoptose e necrose. A interrupção das funções metabólicas compromete a sinalização mitocondrial e, conseqüentemente, compromete processos de desenvolvimento e homeostase tecidual (VAKIFAHMETOGLU-NORBERG; OUCHIDA; NORBERG, 2017; ZHANG et al., 2016). Além disso, os transtornos da homeostase são um dos vários efeitos da ROS, como alterações em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (FLASZ et al., 2020). No presente estudo, investigamos a atividade da enzima antioxidante catalase (CAT), do antioxidante não enzimático glutathiona reduzida (GSH) e da enzima de desintoxicação glutathiona S-transferase (GST), também avaliamos a capacidade antioxidante total (TAC) e a ocorrência de peroxidação lipídica (LPO). A atividade da CAT foi

aumentada pela exposição a GO (0,001 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) após 24 horas e (0,001 e 0,01  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) após 72 horas. Ao contrário, rGO inibiu a atividade da CAT na concentração 0,001  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , no tempo 24 horas.

A CAT responde rapidamente e neutraliza cerca de 50% das moléculas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (SEPASI TEHRANI; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2018). Os maiores níveis de CAT em camundongos transgênicos de laboratório foram relatados em mitocôndrias, que também é o principal local de produção de peróxido de hidrogênio. No entanto, a CAT exerce seu efeito em altos níveis, enquanto as concentrações mais baixas de  $\text{H}_2\text{O}_2$  ativam outros doadores de hidrogênio, como álcoois, fenóis, hormônios, metais pesados e nitrito, que atuam como segunda molécula e são oxidados (SEPASI TEERANI; MOOSAVI-MOVAHEDI, 2018). Considerando a atividade metabólica normal das células ZFL expostas a GO, é possível supor que a exposição causou alta produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , induzindo a atividade da CAT.

Comparando-se com o CN, GO também induziu um aumento da atividade da GST na concentração 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , no tempo 24 horas. No entanto, após 72 horas de exposição, a atividade da GST foi normal. A exposição ao rGO não causou nenhuma alteração na atividade da GST, em qualquer concentração ou tempo. Em relação ao sistema antioxidante, a GST complementa a ação da glutathione peroxidase (GPx) reduzindo os hidroperóxidos, protegendo assim a célula contra a peroxidação lipídica (SHARMA et al., 2004). Além disso, a isoenzima GST desempenha um papel fundamental no mecanismo de desintoxicação, promovendo a conjugação da GSH aos xenobióticos (VENTURINI et al., 2019). Além disso, a GST tem funções peroxidáticas que contribuem para o acúmulo de glutathione oxidada (GSSG) em condições de estresse (RAHANTANIAINA et al., 2017).

Os níveis de GSH não aumentaram, nem diminuíram após a exposição ao GO e rGO, em nenhuma concentração ou tempo. Os níveis normais de GSH não significam que ela não estava atuando, considerando que a atividade da GST depende da concentração de GSH para excreção de moléculas nocivas. Além disso, os níveis de CAT também indicam uma alta concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , outra molécula oxidante na qual a GSH participa da redução e transformação em outros compostos (GUVEN; SOYDAN, 2021; RAHANTANIAINA et al., 2017). A ação da CAT e da GST nas células ZFL expostas ao GO mostrou que o nanomaterial induziu a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que foi controlada, evitando o estresse oxidativo, uma vez que não houve peroxidação lipídica, e a capacidade antioxidante total permaneceu normal.

A LPO é um marcador para estresse oxidativo (ITO; SONO; ITO, 2019) e a TAC estima a capacidade antioxidante da célula (TAENE et al., 2020). Uma vez que as células expostas ao rGO não apresentaram atividade antioxidante aumentada por CAT, GST ou GSH, mesmo diante dos altos níveis de ROS observados, esperava-se que houvesse peroxidação lipídica, o que ocorreu nas concentrações 0,01; 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , no tempo 24 horas. A TAC também foi afetada em 0,01 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de rGO, comprometendo a estrutura celular, a função e a viabilidade, provavelmente levando à morte celular.

A geração de ROS pode levar a vários efeitos nocivos, incluindo danos ao DNA (LEE et al., 2019; TRIPATIA; MOHANTY, 2017), nosso passo final foi avaliar a genotoxicidade de GO e rGO, realizando o ensaio do cometa. As quebras das fitas de DNA ocorreram principalmente após 24 horas de exposição, tanto para as células expostas ao GO (0,01; 0,1 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) quanto para células expostas ao rGO (0,001; 0,01 e 0,1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). No entanto, o rGO (0,001 e 1  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) também causou danos no DNA em 72 horas. Categorizamos a fragmentação do DNA em 5 escores, sendo 0 igual a nenhum dano e 4 igual a mais de 75% do DNA danificado. GO causou mais danos de escore 2, 3 e 4 nas concentrações mais altas, enquanto o rGO causou fragmentação do DNA desde as concentrações mais baixas. Após 72 horas de exposição, a maior concentração de rGO causou o maior dano.

Sabe-se que a formação de aglomerados por nanomateriais interfere nos resultados dos bioensaios, aumentando ou diminuindo a toxicidade desses materiais (LOWRY et al., 2012). GO foi maior que o rGO em diâmetro hidrodinâmico e menos disperso após suspensão no meio de cultura com SFB, mesmo assim, em nossos estudos anteriores observamos GO interagindo com o núcleo de algumas células (Capítulo 1). Embora GO não tenha causado estresse oxidativo, há evidências de alta produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , que pode ter contribuído para causar os danos no DNA. Atribuímos a fragmentação do DNA causada pela exposição ao rGO aos altos níveis de ROS e à ineficiência do sistema antioxidante em combater essas moléculas tóxicas, além de possíveis danos mecânicos causados pela interação do rGO com o DNA.

Para prevenir mutações de DNA, existem várias vias de reparação de DNA, esses pontos de verificação ocorrem antes da divisão celular, impedindo a progressão da fase G1 para S e da fase G2 para M, além de um ponto de verificação de fase intra-S que regula a progressão do garfo ou o disparo de origem. Se o mecanismo de reparo falhar, a apoptose e/ou autofagia é iniciada para evitar a proliferação de células danificadas (CROESSMANN et al., 2015; JEGGO;

PÉROLA; CARR, 2016; OU et al., 2017), o que pode explicar taxas de danos mais altas em 24 horas do que em 72 horas.

### **Conclusão**

No geral, este estudo confirmou que o rGO pode causar maior geração de ROS do que GO. Essa geração de ROS nas células expostas ao rGO acarretou o estresse oxidativo que causou peroxidação lipídica, redução da viabilidade celular e da capacidade metabólica, culminando na perda da capacidade antioxidante total e em danos genotóxicos, mesmo na concentração mais baixa ( $0,001 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e após 72 horas. A exposição ao GO provavelmente aumentou a formação de  $\text{H}_2\text{O}_2$  levando ao aumento da atividade da CAT e da GST para combater essas moléculas nocivas. Mesmo assim, houve danos genotóxicos após 24 horas de exposição, mas não após 72 horas, o que indica que o sistema antioxidante neutralizou as ROS e significa também que os sistemas de reparação de DNA agiram impedindo danos genotóxicos de persistir e se tornarem mutações.

## Agradecimento

Agradecemos à Coordenação para Aperfeiçoamento Pessoal da Educação Superior (CAPES) pela bolsa de estudos. Agradecemos também a Valtencir Zucolotto, do Gnano (Grupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia, Instituto de Física da Universidade de São Paulo, IFSC-USP) pelas instalações e suporte técnico laboratorial.

## Suporte Financeiro

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Proc 306818/2021-5) e Coordenação para Pessoal da Educação Superior (CAPES)

## Referências

AHAMED, M. et al. Reduced graphene oxide mitigates cadmium-induced cytotoxicity and oxidative stress in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 143, p. 111515, 1 set. 2020.

AMADO, L. L. et al. A method to measure total antioxidant capacity against peroxy radicals in aquatic organisms: Application to evaluate microcystins toxicity. **Science of The Total Environment**, v. 407, n. 6, p. 2115–2123, 1 mar. 2009.

BAALI, N. et al. Assessment of antioxidant activity of pure graphene oxide (GO) and ZnO-decorated reduced graphene oxide (rGO) using DPPH radical and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> scavenging assays. **C**, v. 5, n. 4, p. 75, dez. 2019.

BATLEY, G. E.; KIRBY, J. K.; MCLAUGHLIN, M. J. Fate and risks of nanomaterials in aquatic and terrestrial environments. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 854–862, 19 mar. 2013.

BEUTLER, E. **Red cell metabolism: a manual of biochemical methods**. 2d ed. New York: Grune & Stratton, 1975.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1–2, p. 248–254, maio 1976.

CROESSMANN, S. et al. *NDRG1* links p53 with proliferation-mediated centrosome homeostasis and genome stability. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 112, n. 37, p. 11583–11588, 15 set. 2015.

DREYER, D. R. et al. The chemistry of graphene oxide. **Chem. Soc. Rev.**, v. 39, n. 1, p. 228–240, 2010.

DU, C. et al. Effect of montelukast sodium and graphene oxide nanomaterials on mouse asthma model. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 21, n. 2, p. 1161–1168, 1 fev. 2021.

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.

DZIEWIEĆKA, M. et al. Reduced fecundity and cellular changes in *Acheta domesticus* after multigenerational exposure to graphene oxide nanoparticles in food. **Science of The Total Environment**, v. 635, p. 947–955, 1 set. 2018.

FLASZ, B. et al. Vitellogenin expression, DNA damage, health status of cells and catalase activity in *Acheta domesticus* selected according to their longevity after graphene oxide treatment. **Science of The Total Environment**, v. 737, p. 140274, 1 out. 2020.

GURUNATHAN, S. et al. Antibacterial activity of dithiothreitol reduced graphene oxide. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 19, n. 4, p. 1280–1288, 25 jul. 2013.

GUVEN, N.; SOYDAN, E. Characterization of glutathione S-transferase enzyme from brown meagre (*Sciaena umbra*) and inhibitory effects of heavy metals. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, p. bab.2090, 7 jan. 2021.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, nov. 1974.

HAGHIGHI, B.; AMOUZADEH TABRIZI, M. Green-synthesis of reduced graphene oxide nanosheets using rose water and a survey on their characteristics and applications. **RSC Advances**, v. 3, n. 32, p. 13365–13371, 2013.

HOSEINIFAR, S. H. et al. Oxidative stress and antioxidant defense in fish: the implications of probiotic, prebiotic, and synbiotics. **Reviews in Fisheries Science & Aquaculture**, v. 29, n. 2, p. 198–217, 3 abr. 2021.

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

HUO, S. et al. DNA nanotechnology enters cell membranes. **Advanced Science**, v. 6, n. 10, p. 1900043, 2019.

ITO, F.; SONO, Y.; ITO, T. Measurement and clinical significance of lipid peroxidation as a biomarker of oxidative stress: oxidative stress in diabetes, atherosclerosis, and chronic inflammation. **Antioxidants**, v. 8, n. 3, p. 72, mar. 2019.

JAWORSKI, S. et al. Degradation of mitochondria and oxidative stress as the main mechanism of toxicity of pristine graphene on u87 glioblastoma cells and tumors and HS-5 cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 3, p. 650, 2 fev. 2019.

JEGGO, P. A.; PEARL, L. H.; CARR, A. M. DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. **Nature Reviews Cancer**, v. 16, n. 1, p. 35–42, jan. 2016.

JIANG, Z.-Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of  $\text{Fe}^{2+}$  in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, n. 10, p. 853–856, out. 1991.

LEE, K.-C. et al. Carboxylated carbon nanomaterials in cell cycle and apoptotic cell death regulation. **Journal of Biotechnology**, v. 296, p. 14–21, 20 abr. 2019.

LOWRY, G. V. et al. Transformations of nanomaterials in the environment. **Environmental Science & Technology**, v. 46, n. 13, p. 6893–6899, 3 jul. 2012.

LV, X. et al. A mechanism study on toxicity of graphene oxide to *Daphnia magna*: direct link between bioaccumulation and oxidative stress. **Environmental Pollution**, v. 234, p. 953–959, 1 mar. 2018.

MARKOVIC, M. et al. Ecotoxicology of manufactured graphene oxide nanomaterials and derivation of preliminary guideline values for freshwater environments. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1340–1348, 2018.

MEI, Q. et al. Graphene oxide: from tunable structures to diverse luminescence behaviors. **Advanced Science**, v. 6, n. 14, p. 1900855, 2019.

MENDOZA, R. P.; BROWN, J. M. Engineered nanomaterials and oxidative stress: current understanding and future challenges. **Current Opinion in Toxicology**, Oxidative Toxicology: From molecules, to cells, to tissues, edited by Demetrios (Dimitris) Kouretas & James Roede & Aristides Tsatsakis. v. 13, p. 74–80, 1 fev. 2019.

OU, L. et al. The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 6633–6646, set. 2017.

PAITAL, B. et al. Ecotoxic impact assessment of graphene oxide on lipid peroxidation at mitochondrial level and redox modulation in fresh water fish *Anabas testudineus*. **Chemosphere**, v. 224, p. 796–804, 1 jun. 2019.

PASTRANA, H. F. et al. Evaluation of the elastic Young's modulus and cytotoxicity variations in fibroblasts exposed to carbon-based nanomaterials. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 17, n. 1, p. 32, dez. 2019.

PENG, Z. et al. Advances in the application, toxicity and degradation of carbon nanomaterials in environment: a review. **Environment International**, v. 134, p. 105298, 1 jan. 2020.

QI, Y. et al. Aggregation morphology is a key factor determining protein adsorption on graphene oxide and reduced graphene oxide nanomaterials. **Environmental Science: Nano**, v. 6, n. 5, p. 1303–1309, 2019.

- QIU, Y. et al. Antioxidant chemistry of graphene-based materials and its role in oxidation protection technology. **Nanoscale**, v. 6, n. 20, p. 11744–11755, 2014.
- RAHANTANIAINA, M.-S. et al. Glutathione oxidation in response to intracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: key but overlapping roles for dehydroascorbate reductases. **Plant Signaling & Behavior**, v. 12, n. 8, p. e1356531, 3 ago. 2017.
- RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of alamar blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347–12360, 10 set. 2012.
- RAY, S. C. **Applications of graphene and graphene-oxide based nanomaterials**. Amsterdam: Elsevier, 2015.
- SAXENA, S. et al. Investigation of structural and electronic properties of graphene oxide. **Applied Physics Letters**, v. 99, n. 1, p. 013104, 4 jul. 2011.
- SENGUPTA, I. et al. Bactericidal effect of graphene oxide and reduced graphene oxide: influence of shape of bacteria. **Colloid and Interface Science Communications**, v. 28, p. 60–68, 1 jan. 2019.
- SEPASI TEHRANI, H.; MOOSAVI-MOVAHEDI, A. A. Catalase and its mysteries. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 140, p. 5–12, dez. 2018.
- 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.
- SHARMA, R. et al. Antioxidant role of glutathione S-transferases: protection against oxidant toxicity and regulation of stress-mediated apoptosis. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 6, n. 2, p. 289–300, 1 abr. 2004.
- SOUZA, J. P. et al. Toxicological effects of graphene oxide on adult zebrafish (*Danio rerio*). **Aquatic Toxicology**, v. 186, p. 11–18, maio 2017.
- SRIKANTH, K. et al. Graphene oxide induces cytotoxicity and oxidative stress in bluegill sunfish cells: graphene oxide cytotoxic to blue gill sunfish cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 38, n. 4, p. 504–513, abr. 2018.
- STYGAR, D. et al. Graphene oxide normal (GO + Mn<sup>2+</sup>) and ultrapure: short-term impact on selected antioxidant stress markers and cytokines in NHDF and A549 cell lines. **Antioxidants**, v. 10, n. 5, p. 765, maio 2021.
- SZABO, T.; MARONI, P.; SZILAGYI, I. Size-dependent aggregation of graphene oxide. **Carbon**, v. 160, p. 145–155, 30 abr. 2020.
- TAENE, A. et al. The association of major depressive disorder with activation of NLRP3 inflammasome, lipid peroxidation, and total antioxidant capacity. **Journal of Molecular Neuroscience**, v. 70, n. 1, p. 65–70, 1 jan. 2020.

- TRIPATHY, S.; MOHANTY, P. K. Reactive oxygen species (ROS) are boon or bane. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 8, p. 1–16, 1 jan. 2017.
- TUNG, V. C. et al. High-throughput solution processing of large-scale graphene. **Nature Nanotechnology**, v. 4, n. 1, p. 25–29, jan. 2009.
- VAKIFAHMETOGLU-NORBERG, H.; OUCHIDA, A. T.; NORBERG, E. The role of mitochondria in metabolism and cell death. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 482, n. 3, p. 426–431, jan. 2017.
- VENTURINI, F. P. et al. A multi-biomarker approach to lambda-cyhalothrin effects on the freshwater teleost matrinxã *Brycon amazonicus*: single-pulse exposure and recovery. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 1, p. 341–353, fev. 2019.
- WANG, Z. et al. Graphene nanoplatelets and reduced graphene oxide elevate the microalgal cytotoxicity of nano-zirconium oxide. **Chemosphere**, v. 276, p. 130015, 1 ago. 2021.
- WEI, X.-Q. et al. Insight into the interaction of graphene oxide with serum proteins and the impact of the degree of reduction and concentration. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 24, p. 13367–13374, 24 jun. 2015.
- WILHELM FILHO, D. et al. Effect of different oxygen tensions on weight gain, feed conversion, and antioxidant status in piapara, *Leporinus elongatus* (Valenciennes, 1847). **Aquaculture**, v. 244, n. 1–4, p. 349–357, fev. 2005.
- XIE, X. et al. The roles of environmental factors in regulation of oxidative stress in plant. **BioMed Research International**, v. 2019, p. e9732325, 8 maio 2019.
- YANG, Y. et al. Protein corona reduced graphene oxide cytotoxicity by inhibiting endocytosis. **Colloid and Interface Science Communications**, v. 45, p. 100514, nov. 2021.
- YUSOFF, A. R. BIN M. **Graphene-based Energy Devices**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2015.
- ZHANG, B. et al. Interactions of graphene with mammalian cells: molecular mechanisms and biomedical insights. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Graphene-based materials in nanomedicine. v. 105, p. 145–162, 1 out. 2016.
- ZHANG, J. et al. Graphene oxide and reduced graphene oxide exhibit cardiotoxicity through the regulation of lipid peroxidation, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 616888, 18 mar. 2021.
- ZHAO, Y. et al. Environmental transformation of graphene oxide in the aquatic environment. **Chemosphere**, v. 262, p. 127885, 1 jan. 2021.

## 5. Considerações finais

Os resultados obtidos permitiram concluir que ambos os nanomateriais podem causar efeitos nocivos a hepatócitos de *D. rerio in vitro* (células ZFL). Entretanto, tais efeitos são mais pronunciados para o nanomaterial rGO, mesmo em concentrações muito baixas.

Os grupos de O<sub>2</sub> presentes na superfície de GO o tornam extremamente disperso e estável em água, porém, quando em meio de cultivo completo, GO se liga às proteínas do soro fetal bovino. Isso faz com que seu tamanho hidrodinâmico aumente, o potencial zeta diminua e assim também diminua sua dispersão e estabilidade. Todavia, a formação de corona por proteínas, facilita sua entrada na célula, mas diminuiu sua toxicidade.

Em altas concentrações, GO induz morte por apoptose e necrose. Contudo, não afeta o crescimento populacional de ZFL. Após 72 horas, as células se dividem e reestabelecem a população de células ao nível inicial. Baixas concentrações de GO podem induzir a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas não causam estresse oxidativo ou perda da capacidade antioxidante. Danos genotóxicos podem ocorrer em 24 horas de exposição, mas as células são reparadas ou eliminadas após 72 horas.

rGO, devido à sua hidrofobicidade, tem forte interação com a membrana causando danos tanto mecânicos quanto desencadeando um efeito cascata de geração de espécies reativas de oxigênio. Em altas concentrações, rGO causa morte celular em altos níveis, provavelmente por autofagia, enquanto baixas concentrações acarretam perda da capacidade antioxidante, estresse oxidativo e danos genotóxicos.

GO e outros nanomateriais baseados em carbono podem ser transformados no ambiente aquático, inclusive sendo reduzidos por exposição à luz solar e pela degradação bacteriana, assim como por metais como Al e Fe e por redutores inorgânicos à base de enxofre. Assim, é extremamente importante que medidas sejam tomadas para o controle e remoção desses nanomateriais do ambiente aquático. Especialmente considerando que sua forma reduzida pode oferecer maior risco de efeitos nocivos aos organismos presentes neste ambiente.

## 6. Apêndice

### 1. Protocolos e técnicas experimentais com comentários

#### 1.1. Cultivo da linhagem celular ZFL

A linhagem ZFL (código 0256) pode ser adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), o envio é feito pelos Correios. Ao receber o frasco contendo as células, higienize o frasco com etanol 70% e observe em microscópio de luz invertida para verificar se as células estão aderidas ao fundo do frasco. Caso muitas células não estejam aderidas, incube o frasco em estufa a 28 °C, sem CO<sub>2</sub>, observando em microscópio a cada duas horas para verificar se houve adesão ao fundo do frasco. Se a adesão não ocorrer em 24 horas, entre em contato com o banco de células e solicite a 2ª via (contraprova).

Se tudo estiver bem, remova o meio de cultivo com o auxílio de um pipetador automático com pipeta sorológica descartável, lave gentilmente com tampão fosfato salino estéril (PBS), livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup> (2,7 mM KCL; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 136,9 mM NaCl; 8,1 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), descartando o tampão em seguida. Adicione novo meio de cultivo e incube em estufa a 28 °C até o dia seguinte. Após 24 horas, remova as células por tripsinização (tripsina-EDTA 0,125%) ou com o auxílio de um *raspador*, transfira para um tubo falcon e centrifugue em baixa rotação (2000 rpm) por 5 minutos, em temperatura ambiente. Descarte o sobrenadante e transfira as células para um frasco maior (75 cm<sup>2</sup>), adicione novo meio de cultivo e o soro fetal bovino (10%). Utilize frascos com filtro, preferencialmente.

A ficha técnica do BCRJ sugere a seguinte composição de meio de cultivo: 50% Leibovitz (L-15); 35% DMEM de alta glicose, 15% F12 de Ham. Suplementar com: 0,15 g L<sup>-1</sup> de bicarbonato de sódio, HEPES 15 mM, 0,01 mg mL<sup>-1</sup> de insulina bovina, 50 ng mL<sup>-1</sup> de EGF de camundongo, 5% de soro bovino fetal.

Entretanto, no nosso grupo de pesquisa padronizamos o uso de meio de cultivo com a seguinte composição: 50% Leibovitz (L-15), 50% RPMI 1640 + 10% soro fetal bovino (SFB). Meios de cultivo em pó, soro fetal bovino, solução antimicótica, tripsina e outros insumos podem ser adquiridos com a Cultilab Materiais para Cultura de Células Ltda.

Os meios de cultivos podem ser adquiridos prontos (líquidos) e já estéreis. Neste caso, a mistura do RPMI com o L-15 deve ser feita em condições estéreis, dentro do fluxo laminar.

O meio de cultivo em pó deve ser diluído em água deionizada autoclavada, com o auxílio de um agitador magnético: 2 litros de água para 1 sachê de RPMI + 1 sachê de L-15. Após solubilizado, filtrar em condições estéreis utilizando membrana filtrante de nylon com porosidade de 0,2 µm; armazenar em geladeira. O SFB é adicionado na hora do uso.

A troca do meio de cultivo deve ser feita 2 a 3 vezes por semana e o repique de 1:4 a 1:6 frascos quando atingir entre 80 e 90% de confluência. A dissociação das células pode ser feita com o auxílio de um *raspador* ou solução de tripsina-EDTA (0,125), de 5 a 15 minutos em temperatura ambiente, ou 3 minutos em estufa a 37 °C. É muito importante anotar a progressão dos repiques, assim terá controle sobre quando descongelar uma nova alíquota ou adquirir novas células do banco de células. As quantidades são descritas no quadro 1.

**Quadro1** – Proporções dos insumos de cultivo de acordo com o tamanho do frasco.

Tamanho do Frasco	Meio de Cultivo	Soro Fetal Bovino	Tripsina
Frasco de 25 cm <sup>2</sup>	10 mL	1 mL	500 µl
Frasco de 75 cm <sup>2</sup>	30 mL	3 mL	1,5 mL
Frasco de 150 cm <sup>2</sup>	60 mL	6 mL	3 mL

O congelamento deve ser feito em repiques baixos para manter o estoque e evitar o uso de células senescentes. Para isso descarte o meio de cultivo, lave as células com PBS estéril, removendo-o em seguida. Aplique a tripsina e incube por 3 minutos a 37 °C, após 3 minutos, observe em microscópio de luz invertida verificando se todas as células se desprenderam do frasco. Em seguida, inative a tripsina adicionando meio de cultivo com SFB (aprox. 2,5 mL), homogeneíze. Para remover a solução de tripsina-EDTA, transfira a suspensão de células para um tubo falcon e centrifugue a aproximadamente 125 x g por 5 minutos. Para cada frasco de 75 cm<sup>2</sup>, prepare 4 alíquotas, adicione 3,8 mL de soro fetal bovino e 200 µl de dimetilsulfóxido (DMSO), homogeneíze e distribua a suspensão celular em ampolas de congelamento (1 mL por ampola). Identifique as ampolas com o lote; o tipo celular; dados do congelamento; repique; nome do responsável.

O congelamento deve ser lento para não romper as membranas celulares. Desta forma, coloque as ampolas com as células na geladeira por 2 a 4 horas, passe para o freezer comum (-20 °C) também por 2 a 4 horas, depois passe para o ultrafreezer (-80 °C) e deixe até o dia

seguinte. Finalmente transfira as ampolas devidamente fechadas e identificadas para o tanque de nitrogênio líquido.

Ao contrário do congelamento, o descongelamento deve ser rápido. Assim, quando remover como alíquotas do N<sub>2</sub> líquido, descongele rapidamente com o auxílio de um banho-Maria. Transfira as células para um tubo falcon estéril, adicione 5 mL de meio de cultivo, homogeneíze. Centrifugue por 5 minutos a 125 x g, em temperatura ambiente. Descarte o sobrenadante, ressuspensa as células e transfira para o frasco de cultura contendo meio de cultivo completo. Identifique o frasco com o tipo celular, a data de descongelamento, o lote do congelamento e o repique. Cultivar em estufa sem CO<sub>2</sub> a 28 °C.

### **1.2. Preparação das diluições de GO e rGO para aplicação nas células**

Antes de preparar o experimento, é necessário fazer os cálculos das diluições para obter as concentrações de exposição à nanomateriais. A suspensão estoque de óxido de grafeno (GO) tem concentração de 2,42 mg mL<sup>-1</sup> e rGO tem concentração de 450 µg mL<sup>-1</sup>. Calcule quanto da solução estoque será necessário: Para cada poço de uma placa de 96 poços são necessários 200 µl de meio de cultivo. Utilizando 3 poços para cada concentração, serão necessários 600 µl de meio de cultivo.

Entretanto, como nanomateriais não são materiais solúveis, não é aconselhável trabalhar com volumes muito pequenos. Desta forma, é importante fazer uma programação que permita a execução de diferentes exposições, para diferentes análises, ao mesmo tempo, afim de preparar volumes razoavelmente grandes de suspensão de nanomateriais, sem desperdiçar meio de cultivo e nanopartículas.

GO e rGO devem ser dispersados em banho ultrassom por 10 minutos antes de ser diluídos em meio de cultivo.

O cálculo para diluição dos nanomateriais é feito aplicando-se a fórmula  $C1.V1 = C2.V2$ , no qual C1 é a concentração inicial e V1 é o volume inicial, C2 é a concentração final e V2 é o volume final. Assim, para preparar 10 mL de uma suspensão de GO com concentração de 100 µg mL<sup>-1</sup> temos o seguinte: 2420 µg mL<sup>-1</sup>.  $V1 = 0,1 \mu\text{g mL}^{-1} \cdot 10 \text{ mL}$ , assim o volume inicial (V1) é igual a 413 µl da suspensão estoque de GO. Esta alíquota de 413 µl deve ser diluída em meio de cultivo com SFB (9.587 mL), a suspensão deve ser homogênea.

### 1.3. Contagem de células para montagem dos experimentos

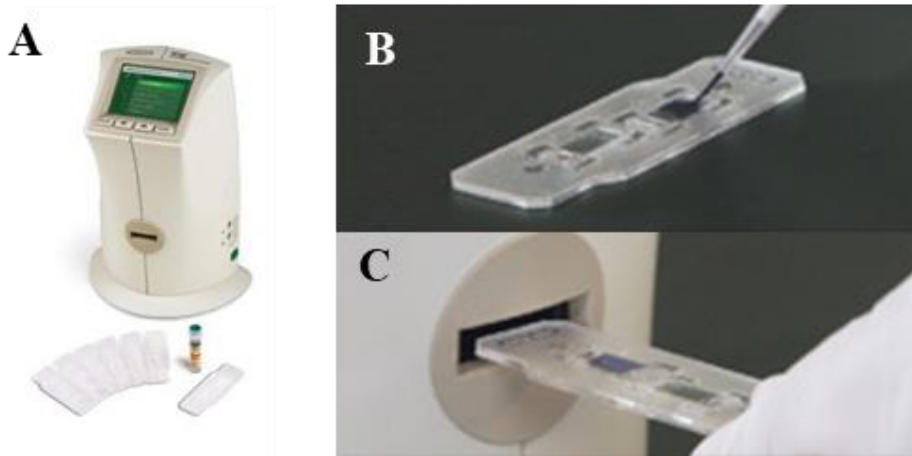
Após a tripsinização, inativar, centrifugar e ressuspender as células em meio de cultivo completo. Coletar uma alíquota de 10  $\mu\text{l}$  e homogeneizar com 10  $\mu\text{l}$  de corante azul de tripano (*trypan blue*). A contagem pode ser feita utilizando uma câmara de Neubauer (Figura 27) ou contador automático (Figura 28). Aplicar 10  $\mu\text{l}$  da suspensão celular na câmara de Neubauer ou lâmina própria do contador automático.

**Figura 27** – Câmara de Neubauer com indicação das câmaras superiores



**Fonte:** [biomedicinapadrao.com.br/](http://biomedicinapadrao.com.br/)

**Figura 28** – Contador automático de células (A), aplicação da suspensão celular na lâmina (B) e inserção da lâmina no contador automático (C).



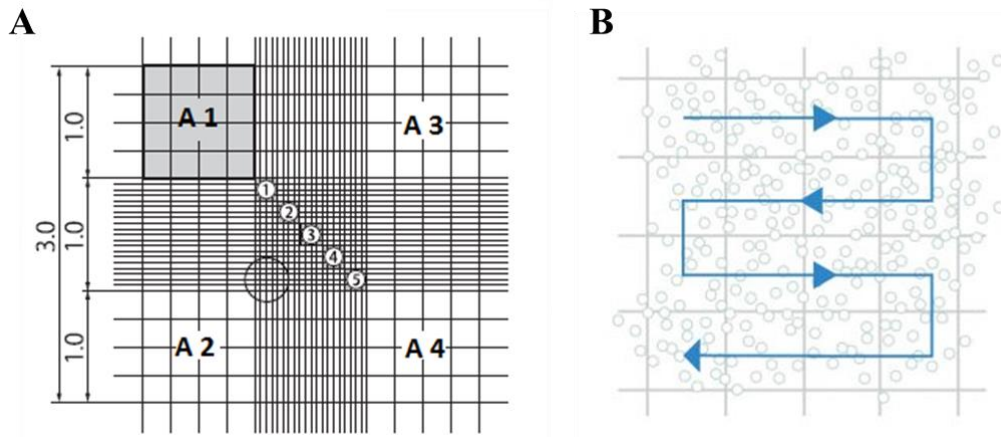
**Fonte:** [bio-rad.com/pt-br/product/tc20-automated-cell-counter](http://bio-rad.com/pt-br/product/tc20-automated-cell-counter)

O contador automático identifica o corante azul de tripano e fornece o total de células na amostra, além do percentual de células viáveis e não viáveis.

Para a contagem em câmara de Neubauer, posicione-a em um microscópio de luz e conte os compartimentos A1, A2, A3 e A4, conforme a Figura 29-A. Conte as células que tocam na parte superior e à esquerda para evitar contar a mesma célula mais de uma vez. Já as células que tocam os limites inferiores e a direita, não devem ser contadas. Siga um padrão, contando sempre de baixo para cima ou o contrário (Figura 29-B).

É muito fácil perder a contagem, anote ou use um contador numérico manual. Quanto maior o número de células contadas, maior a precisão da contagem.

**Figura 29** – Ilustração representando a malha da câmara de Neubauer (A) e sentido contínuo de observação e contagem (B)



**Fonte:** kasvi.com.br/

Utilize a seguinte fórmula para obter o número de células por mL de suspensão:

$$\sum Q / 4 \times 10^4 = 1 \text{ mL}$$

$$10^6 = y$$

Para uma placa de 96 poços inteira faça o cálculo para 100 poços, multiplicando a densidade de células desejada para cada poço, pela quantidade de poços. Então,  $8 \times 10^4 \times 100$  poços =  $8 \times 10^6$  células em um volume final de 20 mL ( $200 \mu\text{l} \times 100$  poços).

De forma geral, para a exposição aos nanomateriais, as células são semeadas de acordo com o quadro 2. Corantes e outros compostos utilizados nos ensaios podem ser aplicados em volumes diferentes, devidamente descritos em cada um dos protocolos.

**Quadro2** – Proporção entre a densidade de células, o volume de aplicação e o tamanho/tipo frasco ou placa utilizada.

Tamanho de placa ou frasco	Densidade celular	Volume de aplicação
Placa de 24 poços	$4 \times 10^5$ células por poço	1 mL por poço
Placa de 96 poços	$8 \times 10^4$ células por poço	200 $\mu\text{l}$ por poço
Frasco de $25 \text{ cm}^2$	$2 \times 10^6$ células por frasco	5 mL por frasco
Frasco de $75 \text{ cm}^2$	$6 \times 10^6$ células por frasco	15 mL por frasco

#### **1.4. Ensaio de exclusão do corante azul de tripano**

O ensaio foi realizado de acordo com Strober (1997), com algumas modificações. As células foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas para estabilização. Em seguida, as células foram expostas aos nanomateriais. Após 24 horas de exposição, as células foram lavadas 2 vezes com PBS e tripsinizadas. Em eppendorf, alíquotas de 20 µl de suspensão celular de cada tratamento foram homogeneizadas com 20 µl de corante azul de tripano. Dessa mistura, 10 µl foram coletados e depositados em uma câmara específica, utilizada para fazer a contagem de células viáveis em um contador automático (TC20tm Cell Counter, Bio-Rad, São Paulo-SP, Brasil), realizada em triplicata. A porcentagem de células viáveis (não coradas) e não-viáveis (coradas em azul) foi calculada de acordo com a Equação: Células viáveis = (Total de células viáveis / Total de células contadas) \* 100. O experimento foi realizado em triplicata (em diferentes períodos).

#### **1.5. Ensaio de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS)**

Neste ensaio, a geração de ROS é determinada usando a oxidação de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína-diacetato (H<sub>2</sub>DCFDA). As células ZFL foram semeadas a uma densidade de 8x10<sup>4</sup> células por poço e a placa foi incubada em estufa nas condições adequadas (28 °C, sem adição de CO<sub>2</sub>) até o momento da exposição.

A exposição foi feita após 24 horas do plaqueamento, verificando antes se as células estavam aderidas, bem distribuídas e com a densidade adequada para o ensaio. Com o auxílio de uma micropipeta multicanal, aplicou-se 200 µl de meio de cultivo contendo as nanomateriais nas concentrações desejadas, em cada poço. Incubou-se a placa novamente em estufa a 28 °C, sem adição de CO<sub>2</sub> por 24 ou 72 horas.

O tempo de 24 horas foi selecionado para representar uma exposição aguda, já o tempo de 72 horas foi selecionado para simular uma exposição crônica, considerando que essas células se duplicam em 72 horas, permitindo a observação dos efeitos sobre o crescimento populacional das células.

Após a exposição, o meio de cultura contendo as nanomateriais foi removido, seguido de duas lavagens com PBS. As células foram então incubadas com 100 µl de H<sub>2</sub>DCFDA (5 µM em PBS) a 28 °C por 30 min. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com PBS para remover o excesso de corante e 200 µl de PBS adicionado foi o cada poço. A fluorescência foi

medida com excitação a 485 nm e emissão a 530 nm usando um leitor de microplacas (SpectraMax<sup>®</sup> M5 Multi-Mode, Molecular Devices, CA, USA).

### **1.6. Ensaio de redução do corante Resazurina (<sup>®</sup>Resazurina, cód. Sigma R7017)**

#### **Indicações de uso e descrição do produto**

O ensaio é concebido para medir a proliferação de várias linhagens de células animais e humanas, bactérias e fungos. O bioensaio também pode ser utilizado para estabelecer a citotoxicidade de agentes dentro de várias classes químicas.

O ensaio é simples de realizar, uma vez que a Resazurina é solúvel em água, eliminando assim etapas de lavagem, fixação e extração necessária em outros ensaios de proliferação celular comumente usados.

O ensaio incorpora um indicador de crescimento fluorimétrico/colorimétrico baseado em detecção de atividade metabólica. Especificamente, o sistema incorpora o indicador de redução por oxidação (REDOX), que muda de cor e fluoresce quando reduzido.

À medida que as células testadas crescem, a atividade metabólica inata resulta em uma redução química da resazurina. O crescimento contínuo mantém um ambiente reduzido enquanto um crescimento inibido mantém um ambiente oxidado. A redução relacionada ao crescimento faz com que o indicador REDOX mude da forma oxidada (não fluorescente, azul) à forma reduzida (fluorescente, vermelha).

#### **Condições de armazenamento**

A resazurina deve ser armazenada no escuro, uma vez que o composto é sensível à luz. O produto pode ser armazenado por 12 meses em temperatura ambiente. Os dados de validade são dados no rótulo do produto. Para aumentar a vida útil do composto para até 20 meses, armazene a -20 °C. A resazurina também pode ser congelada a -70°C por tempo indeterminado. Porque o indicador é uma solução multicomponente, recomenda-se que a resazurina congelada seja aquecida a 37°C e agitada para garantir que todos os componentes estejam completamente em solução.

## **Diluição da Resazurina**

### **Solução estoque 1 (não estéril)**

Em um Becker, coloque 100 ml de água destilada + 1 grama de resazurina. Para solubilizar, deixe agitando overnight. O Becker deve estar tampado com parafilme e protegido da luz (no escuro). Divida a solução estoque 1 em 3 falcons (50 ml, não estéril) e armazene dois deles a -20 °C.

### **Solução estoque 2 (não estéril)**

Colete 2 ml da solução estoque 1 e deposite num novo falcon (50 ml, não estéril), acrescente 20 ml de H<sub>2</sub>O MiliQ e homogeneíze. Este solubilizado é a solução estoque 2 (não estéril).

### **Solução estoque 2 (estéril)**

Filtre a solução estoque não-estéril (filtro de 0,22 µm), utilize um novo falcon (50ml, estéril). Esta é a solução estoque 2 (estéril).

### **Solução estoque 3 (estéril)**

Colete 1 ml da solução estoque 2 (estéril) e deposite em um novo falcon (12 ml, estéril), acrescente 10 ml de H<sub>2</sub>O MiliQ autoclavada (20min, 121°C) e homogeneíze. Esta é a solução estoque 3 (estéril). Para obter uma solução mais concentrada, faça uma diluição 1:5 vezes, ou seja, utilize 1 ml da solução estoque 2 (estéril) e 5 ml de H<sub>2</sub>O ultrapura autoclavada.

## **Exposição das células aos nanomateriais**

Colher células por tripsinização e subsequente inibidor de tripsina (ou utilizar scraper). Centrifugar, ressuspender em meio de crescimento e contar. Calcular o número total de células e ajustar à densidade desejada. Semear as células em placa de 96 poços e incubar nas condições adequadas para ZFL.

Em seguida, aspire o meio de crescimento usado dos poços. Prepare as diluições dos nanomateriais e aplique nas células. Incube novamente a placa pelo tempo que deseja expor.

Após a exposição, lavar as células duas vezes com PBS e adicionar 100 µl da solução estoque 3 (estéril) de resazurina, diluída em meio de cultivo sem soro (1:10). Incube novamente a placa por cerca de 2-4 horas (para ZFL, 2 horas são suficientes). Fazer a leitura (absorbância

entre 570 nm e 600 nm) ou espectrofluorométricamente (excitação, 530-560 nm, emissão, 590 nm). É aconselhável utilizar controles (brancos, sem células) para confiabilidade do ensaio.

**Observação:** Para determinar a absorbância/fluorescência a esperar da forma reduzida (vermelha) para um experimento específico, sugere-se que a resazurina seja diluído no meio a ser usado em um recipiente autolavável. Reduza esta preparação por autoclave por 15 minutos. Retire da autoclave e deixe esfriar até a temperatura ambiente. Homogeneíze a solução várias vezes e pipete 100µl nos poços de uma placa. Meça a absorbância ou fluorescência no comprimento de onda apropriado. Os valores servirão como base para inferir sobre a máxima redução possível do composto.

### **1.7. Ensaio de apoptose e necrose em citômetro de fluxo**

#### **Reagentes:**

- PBS gelado em um falcon de 50 ml;
- Kit Anexina V – Apoptose FITC, COD. 559763, BD Biosciences;
- Tampão de ligação diluído e gelado (1:10 em água) - 10 ml para 24 poços.

#### **Procedimentos:**

- Após a exposição, observar a placa para ver se há muitas células desaderidas de acordo com os tratamentos;

**Observação:** separar uma caixa de isopor com gelo, pois tudo que for utilizado nos passos a seguir devem ficar sempre no gelo.

- Centrifugar a placa à 4 °C na rotação e tempo específicos de cada, se ainda tiver células boiando é necessário centrifugar novamente;
- Após centrifugar, remover o meio com muito cuidado e lavar com PBS gelado (500 µl/poço);
- Centrifugar novamente a placa à 4 °C;
- Após centrifugar, remover com uma micropipeta o PBS com muito cuidado;
- Adicionar 200 µl de tampão de ligação em cada poço (diluir o tampão do kit de 1:10 em água e fazer a quantidade necessária para todos os poços);
- Preparar os controles de compensação;
- Remover as células de dois poços controles com o scraper;

- Passar as células de cada poço para dois eppendorfs de 1,5 ml;
- Aquecer os eppendorfs com as células à 80 °C por 4 minutos;

**Observação:** ao retirar os eppendorfs esperar reduzir a temperatura com a mão e depois inserir em gelo.

- Depois que os eppendorfs controles estiverem frios, corar com 2,5 µl de 7AAD um eppendorf e 2,5 µl de PE;
- Adicionar aos poços da placa 2,5 µl de 7aad e 2,5 µl de pe; exceto no poço de células não marcadas sem tratamento;
- Incubar por 15 minutos no escuro após inserir os corantes em todos os poços;
- Após a incubação, centrifugar a placa e os eppendorfs à 4 °C na rotação e tempo de cada tipo celular;
- Remover o sobrenadante e adicionar 200 µl de tampão de ligação em todos os poços e eppendorfs;
- Remover as células de cada poço com o scraper (lavar o scraper com PBS sempre que for passar em outro poço) e transferir para os tubos da citometria ou para eppendorfs dependendo do citômetro que será utilizado.

**Observação:** No citômetro, configurar para:

- 15.000 eventos;
- Slow;
- 390uL;
- Threshold 700.000.

### **1.8. Ensaio Cometa em células in vitro**

Este teste avalia a formação de quebras em fitas simples de DNA, que são reveladas através de uma microeletroforese, em lâmina, das células que sofreram o tratamento. Desta forma quanto maior a lesão do material genético maior será o número de fragmentos que irão migrar em relação ao núcleo.

#### **Pré-gelatinização das lâminas**

Derreter novamente a solução de agarose comum, levar para banho-maria 60 °C em frasco com altura suficiente para um lâmina. Mergulhar a lâmina na agarose e remover o

excesso de agarose no lado de trás da lâmina com o auxílio de papel higiênico. Depositar a lâmina em uma superfície reta para secagem. Aguardar a secagem overnight das lâminas antes de armazenar em geladeira.

### **Procedimentos gerais antes do início do preparo das amostras**

- Remover as lâminas pré-gelatinizadas da geladeira (ver pré-gelatinização das lâminas);
- Derreter a agarose LMP e levar para banho-maria 37 °C; preparar a solução de lise final e colocar em caixas de vidro para lâminas, cobertas com papel alumínio, levar para a geladeira.

### **Preparo das amostras**

Após o tratamento das células:

- Descartar o meio de cultura com o tratamento;
- Lavar as células 2 vezes com 2,5 ml de PBS em temperatura ambiente e desprezar o excesso com pipeta Pasteur;
- Adicionar 200µL de tripsina na concentração adequada;
- Aguardar o desprendimento das células e inativar com 2,5 ml de meio de cultivo novo;
- Centrifugar por 5 minutos a 2000 rpm;
- Desprezar o sobrenadante deixando cerca de 0,5 ml de meio de cultura;
- Em microtubo colocar 35µL de suspensão de células com 210µL de agarose LMP e homogeneizar 2 vezes;
- Depositar 100µL da mistura em cada lâmina pré-gelatinizada (fazer 2 lâminas para cada frasco) e cobrir com lamínula limpa;
- Levar à geladeira por 20 minutos;
- Remover a lamínula e encaminhar a lâmina para a solução de lise gelada por pelo menos 1 hora.

### **Procedimentos para a eletroforese**

- Colocar 1000 ml de água destilada na geladeira para a preparação do tampão;
- Preparar o tampão no momento do uso com a água destilada refrigerada a 4 °C;
- Medir o pH, que deverá ser maior que 13;
- Colocar gelo na bacia da cuba de eletroforese;

- Dispor a cuba com o polo negativo voltado para a direita;
- Depositar as lâminas na cuba com o lado fosco voltado em direção ao pólo negativo;
- Cobrir as lâminas com o tampão;
- Ajustar o aparelho (Set: 25V e 300mA);
- Deixar as lâminas no escuro por 25 minutos para o processo de denaturação do DNA;
- Após os 25 minutos de denaturação teclar Run e verificar a voltagem. Caso a voltagem ou a amperagem esteja incorreta, ajustar conforme descrição abaixo:
- Voltagem >25V Amperagem <300mA ..... Retirar tampão de eletroforese
- Voltagem <25V Amperagem >300mA ..... Adicionar tampão de eletroforese
- Uma vez ajustada a voltagem e a corrente elétrica deixar 25 minutos de corrida eletroforética na ausência de luz;
- Terminada a corrida retirar as lâminas do tampão e encaminhar para neutralização;
- Em grade neutralizar as lâminas cobrindo-se com 5 ml de tampão de neutralização por 5 minutos;
- Repetir este processo mais duas vezes, totalizando 15 minutos de neutralização;
- Deixar as lâminas escorrendo por cerca de 15 minutos;
- Mergulhar as lâminas em etanol absoluto para fixação por 10 minutos;
- Retirar as lâminas, aguardar a secagem e guardar em caixa de vidro na geladeira.

### **Coloração**

No momento da leitura, depositar 20 $\mu$ L de GelRed uso sobre a lâmina e cobrir com lamínula. Terminada a leitura descartar a lamínula, deixar a lâmina secar e guardar.

Capturar imagens em microscópio de fluorescência (Olympus BX-UCB, PA-USA) em um aumento de 200 vezes, com filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm. Realizar o experimento em triplicata (2 lâminas por experimento), totalizando 6 lâminas por tratamento. Aqui, os danos no DNA foram analisados utilizando um software OpenComet (versão 1.3), a partir da migração dos fragmentos de DNA (percentual do comprimento da cauda e percentual de DNA contido na cauda). O danos foram classificados em scores de 0 a 4, sendo 0 = nenhum dano; 1 = até 25% de dano; 2 = de 25% a 50% de dano; 3 = de 50% a 75% de dano; 4 = acima de 75% de dano.

## 1.9. Ensaios Bioquímicos

### Preparação das amostras

Para os ensaios bioquímicos é necessário reunir uma grande quantidade de células. Os controles negativos + as 4 concentrações testadas de GO e rGO em 2 tempos de exposição totalizaram 140 amostras ( $n$ ). Para produzir cada  $n$ , foram utilizados 3 frascos de 75 cm<sup>2</sup> contendo  $6 \times 10^6$  células, totalizando  $1,8 \times 10^7$  células por  $n$  produzido. Foram produzidos 7  $n$  por concentração testada. Os detalhes podem ser observados no quadro 3.

**Quadro 3** – Detalhamento das exposições para as análises bioquímicas

Período	Substância	Exposição	(n)	Amostras	Qtd Frascos
Semana 1	GO/rGO	24h	$n1$	CN + 4 concentrações	30 frascos
Semana 2	GO/rGO	72h	$n1$	CN + 4 concentrações	30 frascos
Semana 3	GO/rGO	24h	$n2$	CN + 4 concentrações	30 frascos
Semana 4	GO/rGO	72h	$n2$	CN + 4 concentrações	30 frascos
Semana 5	GO/rGO	24h	$n3$	CN + 4 concentrações	30 frascos
Semana 6	GO/rGO	72h	$n3$	CN + 4 concentrações	30 frascos
Semana 7	GO/rGO	24h	$n4$	CN + 4 concentrações	30 frascos
Semana 8	GO/rGO	72h	$n4$	CN + 4 concentrações	30 frascos
Semana 9	GO/rGO	24h	$n5$	CN + 4 concentrações	30 frascos
Semana 10	GO/rGO	72h	$n5$	CN + 4 concentrações	30 frascos
Semana 11	GO/rGO	24h	$n6$	CN + 4 concentrações	30 frascos
Semana 12	GO/rGO	72h	$n6$	CN + 4 concentrações	30 frascos
Semana 13	GO/rGO	24h	$n7$	CN + 4 concentrações	30 frascos
Semana 14	GO/rGO	72h	$n7$	CN + 4 concentrações	30 frascos

Após a exposição, as células foram lavadas duas vezes com PBS e tripsinizadas. A tripsina foi neutralizada com meio de cultivo completo e as células foram centrifugadas (125 g, temperatura ambiente, 5 min), o sobrenadante foi descartado. Então, as células foram ressuspensas em PBS, homogeneizando delicadamente, sendo centrifugadas novamente, descartando o sobrenadante. Em seguida, as células foram ressuspensas em PBS contendo fluoreto de fenilmetilsulfonila (1mM), transferidas para criotubos e congeladas em nitrogênio líquido onde foram mantidas até a análise. Antes da análise bioquímica, as células foram

sonicadas 3 vezes por 5 min, com pausas de 3 min no gelo (desmembrador ultrassônico). As amostras foram então centrifugadas (10 min a 10.640 g, 4 ° C) e o sobrenadante foi removido e armazenado a -80 ° C até a realização das análises bioquímicas.

**Observação:** todos os protocolos descritos a seguir foram adaptados para serem empregados em ensaios com células. Nos ensaios com células não há necessidade de utilização de tampão de homogeneização, pois não há tecido para homogeneizar.

### **Primeiro passo: Quantificação de proteína pelo método de Bradford**

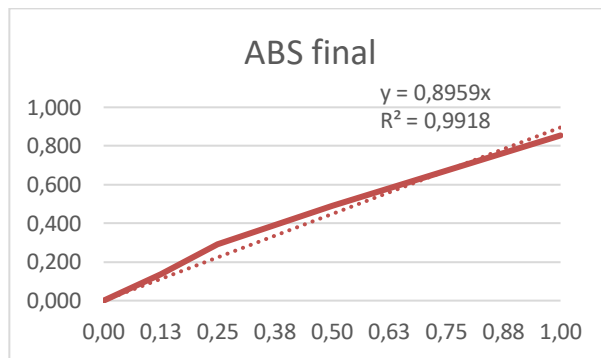
O teor de proteína total das células foi determinado utilizando a metodologia de Bradford (BRADFORD, 1976), adaptado por KRUGER (1964) para leitura em microplaca. A albumina sérica bovina (BSA) é utilizada como padrão. Os valores de proteína total foram utilizados para expressar as atividades específicas das enzimas. A absorvância das amostras é medida a 595 nm.

BSA a uma concentração de 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  em água destilada é usada como solução estoque. Determinar a concentração precisa de proteína na solução padrão medindo a absorvância a 280 nm. Armazenar congelado a -20 °C.

**Observação:** Plástico e vidraria usados no ensaio devem estar absolutamente limpos e sem detergentes.

Pipete amostras em duplicata contendo entre 1-10  $\mu\text{g}$  em um volume total de 100  $\mu\text{l}$  em placa de 96 poços. Se a concentração aproximada da amostra for desconhecida, analise uma faixa de diluições (1, 1:10, 1:100, 1:1000).

Para a curva de calibração, pipete volumes duplicados de 10, 20, 40, 60, 80 e 100  $\mu\text{l}$  de solução padrão de BSA 100  $\mu\text{g ml}^{-1}$  em tubos de microcentrífuga e ajuste o volume para 100  $\mu\text{l}$  com água. Pipete 100  $\mu\text{l}$  de água destilada em um tubo para o branco do reagente.

**Figura 30** – Exemplo de curva de proteína (BSA)

O volume total do ensaio com as amostras é limitado a 210  $\mu\text{l}$ , reduzindo o volume de cada componente. Assegure a mistura eficaz dos componentes do ensaio pipetando até 10  $\mu\text{l}$  da amostra de proteína em cada poço antes de adicionar 200  $\mu\text{l}$  do reagente corante.

O conteúdo de proteína das amostras é calculado multiplicando a absorvância final da amostra pelo fator de diluição e dividindo pelo valor de 'a', obtido na equação da curva padrão de BSA ( $y = a \cdot x$ ). A figura 30 apresenta um exemplo de curva de concentração de proteína, cujo valor de  $a = 0,8959$ .

### Solução de Bradford

Em uma proveta de vidro (seca e limpa), adicione:

- Comassie brilliant blue G.250 – 100 mg
- Etanol 95% - 50 ml
- Ácido fosfórico 85% - 100 ml
- Acrescentar com  $\text{H}_2\text{O}$  deionizada até completar 1 L;
- Filtrar com papel filtro comum;
- Armazenar em geladeira.

#### 1.9.1. Peroxidação lipídica – Método FOX - (JIANG et al., 1992)

- Pipetar a amostra em placa com fundo cônico;
- Aplicar o TCA 12% na proporção de 1:1 (100  $\mu\text{l}$  de amostra para 100  $\mu\text{l}$  de TCA 12%);
- Centrifugar a 4500 rpm por 10 min a 4°C, coletar o sobrenadante;
- Em placa de 96 poços comum, pipetar 30  $\mu\text{l}$  do sobrenadante coletado + 270  $\mu\text{l}$  de meio de reação;
- Branco = 30  $\mu\text{l}$  de metanol a 90%;

- Incubar a temperatura ambiente por 30 min em local escuro (cobrir para evitar evaporação);
- Proceder com as leituras a 560 nm;
- Determinar a concentração de proteína da amostra

**Observação:** Caso precise diluir a amostra após tratamento com TCA, fazer a diluição necessária no tampão de homogeneização e depois pipetar na placa os 30  $\mu$ l de amostra. Não altere os volumes, caso contrário terá que alterar e calcular o fator de correção para o volume no poço. Pode também fazer a diluição direto na placa. Ex.: se pipetar 10  $\mu$ l completar com 20  $\mu$ l de tampão de homogeneização = volume final 30  $\mu$ l.

A solução de reação deve ser preparada na hora – não pode ser armazenada. Misturar os reagentes na seguinte ordem:

1. Metanol (grau HPLC) 90% (~90% do volume final)
2. 100  $\mu$ M Xilenol Laranja
3. 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
4. 4 mM BHT (hidroxitolueno butilado)
5. 250  $\mu$ M FeSO<sub>4</sub>.NH<sub>4</sub> (sulfato ferroso amoniacal)
6. Completar com Metanol / H<sub>2</sub>O para acertar o volume na concentração final de metanol (90%)

**Pouco antes do uso:**

Em um erlenmeyer adicionar 45 ml de metanol PA + 5 ml de H<sub>2</sub>O (metanol ~90%)

1. Adicionar xilenol Orange e agitar
2. Adicionar BHT e agitar
3. Adicionar 125,1  $\mu$ l de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e agitar
4. Adicionar FeSO<sub>4</sub>.NH<sub>4</sub> e agitar

**Observação:** Coloração da solução final deve estar entre dourada e alaranjada

**Curva do cumeno:**

- Solução de CHP 1mM (SE1)
- Solução de CHP 0,04 mM (SE2)

A partir das soluções SE1 e SE2, fazer as diluições e pipetar 30 µl das concentrações crescentes na microplaca. Diluir a CHP em água destilada e pipetar 30 µl em cada poço da microplaca em duplicata, na ordem crescente a partir da duplicata do branco.

Fazer a curva com as seguintes concentrações: 0,0004; 0,004; 0,01; 0,02; 0,04; 0,06; 0,08 (mM).

### **Cálculos:**

$$[\text{Hidroperóxidos}] = \text{Abs. Diluição} \cdot 1000 / (\epsilon \cdot 0,9 \cdot [\text{proteínas}])$$

### **Onde:**

- $[\text{Hidroperóxidos}] = \text{nmol hidroperóxidos} \cdot \text{mg proteínas}^{-1}$
- Abs. = Absorbância a 560 nm já descontando o branco
- = coeficiente de extinção (para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Cumeno hidroperóxido ou butil hidroperóxido) =  $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ( $43 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{ml cm}^{-1}$ )

### **Diluição da amostra**

- 1000 = valor para conversão de µmol para nmol
- 0,9 = fator de correção do volume de solução no poço
- [proteínas] = concentração de proteínas em mg ml<sup>-1</sup>

### **1.9.2. Capacidade Antioxidante Total - ACAP (Amado et al., 2009)**

### **Princípio do método**

Para a detecção das espécies reativas de oxigênio (ROS), será utilizado o diacetato de 2',7'-diclorofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) que na presença de ROS gera um fluorocromo, que será detectado utilizando comprimentos de ondas de 488 e 525 nm para excitação e emissão, respectivamente. As leituras serão realizadas em fluorímetro com leitora de microplaca (SpectraMax® M5 Multi-Mode, Molecular Devices, CA, USA).

### **Soluções**

### **Tampão de homogeneização (Gallagher et al., 1992)**

Pode ser preparado antes e armazenado na geladeira ou freezer.

### **Reagentes:**

- Tris-HCl (100mM) (PM:157,6)
- EDTA (2mM) (PM:372,24)
- MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (5mM) (PM: 203,30)

Ajustar pH para 7,75 com NaOH ou com HCl.

### **Tampão de reação**

Pode ser preparado antes e armazenado na geladeira.

### **Reagentes:**

- HEPES (30mM) (PM:238,31)
- KCl (200mM) (PM:74,54)
- MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (1mM) (PM: 203,30)

Ajustar pH para 7,2 com Tris Base ou com Tris HCl

### **Solução de H<sub>2</sub>DCFDA**

Preparar no escuro e no dia e manter sempre no gelo, diluir em etanol 100%.

**Reagente** (5 ml = 1 placa):

- H<sub>2</sub>DCFDA (16μM) (PM: 487,29)

### **Solução de ABAP**

**Reagente** (5 ml):

- ABAP (4mM) (PM: 271,19)

Preparar no escuro, preparar no dia e manter sempre no gelo.

### **Procedimento**

- Preparar tampão de homogeneização e tampão de reação;
- Quantificar proteínas;
- Fixar concentração de proteína de acordo com um teste prévio para suas amostras;

Fazer um teste prévio fixando os valores de proteína em 1, 2, 3, 4, 5, 6 mg ml<sup>-1</sup> de proteína e verificar no final da análise qual concentração ficou no meio da curva padrão.

- Acrescentar 127,5 µl de tampão de reação em todos os poços (com a multicanal);
- 10 µl do extrato do tecido com a proteína fixada (conforme o teste);
- Acrescentar 7,5 µl de água destilada nos poços sem o P (com a multicanal);
- Acrescentar 7,5 µl da solução de ABAP nos poços com o P (com a multicanal);
- Acrescentar 10 µl da Solução de H<sub>2</sub>DCFDA (com a multicanal);
- Colocar para ler comprimentos de ondas de 488 e 525 nm para excitação e emissão, respectivamente. A cada 5 min durante 30 min.

É importante realizar um teste prévio com um tempo maior de leitura por exemplo 2 horas para ter certeza qual tempo irá gerar a melhor curva.

### **Cálculo**

O cálculo se baseia na área abaixo da curva gerada, ou seja, a integração da curva polinomial de segunda ordem gerada pelos dados de fluorescência e tempo dados pela leitura. Para se obter a ACAP se calcula uma área relativa entre o ensaio com ABAP e o ensaio sem o ABAP.

$$\text{Área} = (A/3 * \text{tempo}^3) + (B/2 * \text{tempo}^2) + (C * \text{tempo})$$

$$\text{A ACAP} = (\text{área com ABAP} - \text{área sem ABAP}) / \text{área sem ABAP}$$

### **1.9.3. Catalase (Beutler, 1975)**

#### **Princípio do método**

A alta velocidade de reação desta enzima, associada a uma baixa “afinidade”, permite a determinação de sua atividade com concentrações elevadas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 mM). A atividade é determinada pela velocidade de consumo da H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no primeiro minuto da reação a 240nm.

#### **Soluções**

#### **Tampão de reação**

Pode ser preparado antes e armazenado na geladeira

#### **Reagentes**

- Tris – Base (1 M) (PM: 121,14)

- EDTA (5 mM) (PM: 372,24, sal dissódico)
- Ajustar pH para 8 com NaOH ou com HCl

### Meio de Reação

Preparar no dia

- Solução 1 (100 mM): Colocar 50  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  em 50 ml de água destilada;
- Remover 5 ml da solução 1 e descartar;
- Adicionar no que restou da Solução 1: 2,5 ml do tampão de reação e 2 ml de água destilada.

### Procedimento

- Preparar tampão de reação;
- Pré-aquecer o tampão de reação a  $30^\circ\text{C}$  durante 15 min;
- Pipetar de 2 a 10  $\mu\text{L}$  de branco (PBS) e de amostra na placa conforme o esquema abaixo:

	1	2	3
A	Br	Br	Br
B	Am1	Am1	Am1
C	Am2	Am2	Am2
D	Am3	Am3	Am3
E	Am4	Am4	Am4
F	Am5	Am5	Am5
G	Am6	Am6	Am6
H	Am7	Am7	Am7

- Acrescentar 235  $\mu\text{L}$  do meio de reação em todos os poços (com a multicanal).
- Ler a absorbância a 240 nm durante 2 min com intervalos de 15 segundos.

**Observação:** A diluição e volume de amostra pode variar de acordo como o tipo de experimento, espécie e tecido ou célula.

### Cálculo

O cálculo segue a lei de Lambert-Beer:

$$Atv = \frac{\alpha \cdot V_{\text{rea}}}{\xi \cdot l \cdot V_{\text{am}}}$$

$\alpha$  = Inclinação da reta

$\xi$  = coeficiente de extinção molar

$l$  = distância que a luz atravessa pelo corpo (cm)

Atv = Atividade enzimática

$V_{\text{rea}}$  = Volume da reação (mL)

$V_{\text{am}}$  = Volume da amostra (mL)

Atividade enzimática =  $\left( \frac{(\Delta \text{Abs. Amostra/min} \cdot \text{diluição} \cdot \text{volume reação})}{(\text{volume da alíquota} \cdot \xi \cdot 0,78)} \right) \cdot 1.000 / [\text{proteína}]$

### Observações:

- [Proteínas] expresso em  $\text{mg ml}^{-1}$
- volume da alíquota expresso em ml
- $\epsilon$  (coeficiente de extinção) =  $36 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$
- volume de reação em ml = 0,235
- 0,78 ajuste do trajeto ótico

Veja que de esta forma as unidades ficam expressas em milimol por mg de proteína por minuto (se quiser para micromol multiplicar por 1000.000)

#### 1.9.4. Glutathione-S-Transferase (Habig & Jakobi, 1981)

### Princípio do método

A conjugação de GSH com o substrato clorodinitrobenzeno (CDNB) catalisada pela GST produz um composto que pode ser detectado em 340nm. A atividade enzimática é proporcional à velocidade de produção do composto conjugado.

## Soluções

### Tampão de reação

Pode ser preparado antes e armazenado na geladeira

### Reagentes:

Fosfato de potássio (0,1 M):

- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,05 M) (PM: 136,1)
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,05 M) (PM: 174,2)
- Ajustar pH para 7,0 com NaOH ou com HCl

### Solução de CDNB

Diluir em etanol no dia e manter sempre no gelo.

### Reagente:

- 1-cloro-2,4 di-nitrobenzene (CDNB) (0,05M) (PM: 202,6)

### Solução de GSH

Preparar no dia e manter sempre no gelo, diluir no Tampão de Reação

### Reagente:

- GSH (25mM) (PM: 307,3)

### Procedimento

- Preparar tampão de reação;
- Pré-aquecer o tampão de reação a 25°C durante 15 min;
- Preparar Tampão de Reação + CDNB;

### Reagentes:

- Tampão de reação
- Solução de CDNB

- Pipetar 15  $\mu\text{L}$  de branco (tampão de homogeneização) e de amostra na placa conforme o esquema abaixo:

	1	2	3
A	Br	Br	Br
B	Am1	Am1	Am1
C	Am2	Am2	Am2
D	Am3	Am3	Am3
E	Am4	Am4	Am4
F	Am5	Am5	Am5
G	Am6	Am6	Am6
H	Am7	Am7	Am7

- Acrescentar 235  $\mu\text{L}$  da solução (tampão de reação + CDNB) em todos os poços (com a multicanal);
- Acrescentar 10  $\mu\text{L}$  da Solução de GSH (com a multicanal);
- Colocar para ler com absorvância de 340 nm durante 4 min a cada 30 segundos;
- O volume de amostra a pipetar também pode variar de acordo com o tecido e espécie. Caso aumentar volume de amostras diminuir volume de tampão de reação e caso diminuir volume de amostrar aumentar volume tampão de reação sempre;
- O volume final em cada poço tem que ser 260  $\mu\text{L}$ ;

### Cálculo

Este cálculo também segue a lei de Lambert-Beer, já descrita anteriormente.