



Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM

Laboratório Nacional de Nanotecnologia – LNNano

Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC

Projeto de Pesquisa

**Nanobiotecnologia - Interação do óxido de grafeno com saliva humana e
caracterização avançada da *protein corona***

Orientador: Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez

LNNano/CNPEM

RESUMO

O óxido de grafeno é um novo e promissor nanomaterial de carbono, com potenciais aplicações em eletrônica, materiais, remediação ambiental, alimentos e medicina. Desse modo, a exposição ao óxido de grafeno pela via oral deve ser considerada como uma importante via de entrada destes materiais no organismo humano, acidental ou intencionalmente. Todavia, quando expostos a biofluidos (e.g. saliva), a superfície dos nanomateriais interage com as biomoléculas presentes nestes meios, dando origem à formação de um revestimento biomolecular denominado *protein corona*, com impactos sobre a reatividade química e biológica (e.g. toxicidade) dos nanomateriais. Dentro deste contexto, o objetivo deste projeto é estudar a interação do nanomaterial óxido de grafeno com a saliva humana, visando cenários de exposição pela via oral. Este será o primeiro estudo na literatura envolvendo a interação do óxido de grafeno com saliva e caracterização avançada *protein corona*. A realização deste projeto fornecerá informações importantes para futuras aplicações nanobiotecnológicas do óxido de grafeno (e.g. *drug delivery systems*), bem como subsídios para a emergente área da nanotoxicologia.

Palavras-chave: nanobiotecnologia, nanotoxicologia, nanopartículas, protein corona.

1. INTRODUÇÃO E ESTADO DA ARTE

Estudos de interação de materiais nanoestruturados com sistemas biológicos são fundamentais para o desenvolvimento responsável e sustentável da nanotecnologia. Contudo, os efeitos biológicos de nanomateriais estão diretamente relacionados com as vias de exposição - humana e ambiental (e.g. oral, dérmica, nasal, intravenosa, solo, água, ar e etc) (Faibrother & Faibrother, 2009; Martinez & Alves, 2013).

O contato com agentes químicos (i.e. nanomateriais) pode acontecer de forma acidental através do ar, água e alimentos contaminados, ou intencionalmente após administração de medicamentos e contato com produtos industrializados. A via oral é uma importante via de exposição, uma vez que é a principal via utilizada para administração de medicamentos, alimentos e exposição em ambiente ocupacional (Oga, S. *et al.*, 2008). Desse modo, a exposição de nanomateriais pela via oral deve ser considerada para entrada destes materiais no organismo humano, acidental ou intencionalmente. Todavia, após entrada pela via oral, os nanomateriais irão imediatamente interagir com a saliva, sendo este um fluido aquoso, hipotônico e transparente, formada por 99% de água e 1% de sais e proteínas. A saliva é um fluido responsável por diversas atividades, tais como atividades antimicrobianas, neutralização do ácido oral, componente crucial na fase inicial da digestão de alimentos, facilitador da mastigação e deglutição (Pedersen, A. *et al.*, 2002; Santos, P. *et al.*, 2007; Besinis, A. *et al.*, 2015). O uso da saliva para testes tecnológicos tem-se crescido nos últimos anos, pois é possível fazer melhores monitoramentos para uma ampla variedade de drogas, hormônios, anticorpos e detecção de patologias de forma não invasiva, seguras e com menores custos (Santos, P. *et al.*, 2007; Kiess, W. & Pfaeffle, R., 2007). Após o contato de nanomateriais com biofluidos (e.g. saliva, plasma, urina, etc), as superfícies dos nanomateriais interagem com as proteínas presentes nestes fluidos, formando um revestimento estável chamado de *protein corona*, o qual influencia nas suas aplicações biomédicas, bem como na avaliação dos efeitos tóxicos (Tenzer, S. *et al.*, 2013; Docter, D. *et al.*, 2014; Ge, C. *et al.*, 2015).

O óxido de grafeno (GO) é um tipo de nanomaterial de carbono, possuindo alguns grupos oxigenados, com estruturas hibridizadas de $sp^2 - sp^3$ dispostos em uma estrutura hexagonal (Coluci, V.R. *et al.*, 2014). Esse nanomaterial vem sendo muito estudado devido seu potencial para inovações tecnológicas em diversas áreas, como: eletrônica, materiais, remediação ambiental e medicina. O óxido de grafeno apresenta

promissoras aplicações em diagnósticos e terapias antitumorais, devido as suas exclusivas propriedades físico-químicas e biofuncionalidades (Durán, N. *et al.*, 2015). Todavia, apesar do crescente interesse nas aplicações tecnológicas do GO, não existem estudos na literatura relatando a interação com proteínas de saliva humana (Besinis, A. *et al.*, 2015).

2. OBJETIVOS

Estudar a interação do nanomaterial óxido de grafeno com a saliva humana e realizar uma caracterização avançada da *protein corona* através do emprego de técnicas integradas de bioquímica e materiais, visando futuros cenários de exposição pela via oral.

3. METODOLOGIAS

3.1. Óxido de grafeno

Óxido de grafeno (GO) será obtido comercialmente da Sigma-Aldrich (763713-1G, MKBS7669V), produzido através da esfoliação química do grafite.

3.2. Obtenção do biofluido (saliva humana)

Será utilizado metodologia clássica para obtenção de saliva humana de 30 voluntários no CNPEM, com auxílio de coletor de saliva comercial (Nunes, L. *et al.*, 2015). Este projeto será submetido ao Comitê de Ética em pesquisa do LNBio/CNPEM e o “pool” de saliva coletado dos voluntários será armazenado em Biofreezer (-20 °C) em alíquotas de 1 mL.

3.3. Interação do óxido de grafeno com saliva e caracterização da *protein corona*

Dispersões de óxido de grafeno (GO) serão incubados com saliva humana em tampão fosfato salino (PBS, pH 7.4) utilizando microtubos do tipo Eppendorf por 1 hora a 37°C (Thermomixer C, Eppendorf). Em seguida, os microtubos serão submetidos a etapas de centrifugação e lavagem para obtenção dos GO revestidos com proteínas e biomoléculas da saliva (*protein corona*). O óxido de grafeno após dispersão em meio tamponado contendo saliva em diferentes concentrações serão caracterizadas pelas seguintes técnicas: (a) ultracentrifugação; (b) espalhamento de luz dinâmico (DLS); (c) espectroscopia UV-Vis; (d) rastreamento de nanopartículas (NTA); Para a caracterização das proteínas da saliva após interação com o GO (*protein corona*), serão empregadas técnicas bioquímicas: (a) eletroforese em gel (SDS-PAGE), (b) espectrometria de massas (LC-MS/MS) e (c) Imunoblot; e técnicas de caracterização de

materiais: (a) análise termogravimétrica (TGA); (b) espectroscopia XPS; (c) análise elementar CHN e (d) microscopia de força atômica (AFM).

Os experimentos de LC-MS/MS e NTA serão realizados no Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) do CNPEM, em colaboração da Dra. Adriana Paes Leme.

4. REFERÊNCIAS

BESINIS, A.; PERALTA, T.; TREDWIN, C. J.; HANDY R. D. Review of nanomaterials in dentistry: interactions with the oral microenvironment, clinical applications, hazards, and benefits. **ACS Nano**, v.9, n.3, p.2255-2289, 2015.

COLUCI, VITOR R., MARTINEZ, D.S.T.; et al. Noncovalent interaction with graphene oxide: the crucial role of oxidative debris. **Journal of Physical Chemistry C**. v. 118.4, p. 2187-2193, 2014.

DOCTER, D.; DISTLER, U.; STORCK, W.; KUHAREV, J.; WUNSCH, D. Quantitative profiling of the protein coronas that form around nanoparticles. **Nature Protocols**, v.9, n.9, p.2031-2044, 2014.

DÚRAN, N.; MARTINEZ, D.S.T.; SILVEIRA, C.P.; DÚRAN, M.; MORAES, A.C.M.; SIMÕES, M.B.; ALVES, O.L.; FÁVARO, W.J. Graphene Oxide: A carrier for pharmaceuticals and a scaffold for cell interactions. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.15, p.309-327, 2015.

FAIRBROTHER, A.; FAIRBROTHER, JR. Are environmental regulations keeping up with innovation? A case study of the nanotechnology study. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72, p.1327-1330, 2009.

GE, C.; TIAN, J.; ZHAO, Y.; CHEN, C.; ZHOU, R.; CHAI, Z. Towards understanding of nanoparticle-protein corona. **Archives of Toxicology**, n.89, p.519-539, 2015.

KIESS, W. & PFAEFFLE, R. Steroid analysis in saliva: a noninvasive tool for pediatric research and clinical practice. **Jornal de Pediatria**, v.2, n.83, p.97-99, 2007.

MARTINEZ, D.S.T.; ALVES, O.L. Interação de nanomateriais com biosistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação. **Ciência e Cultura**, v.65 p. 32-36, 2013.

MELO, P.S.; MARCATO, P.D.; ARAÚJO, D.R.; DURÁN, N. In vitro cytotoxicity assays of nanoparticles on different cell lines. Chapter 5, p. 111-123. In: **Nanotoxicology – Materials, Methodologies, and Assessments**, Durán, N.; Guterres, S.S.; Alves, O.L. (Eds). Springer, 2013.

NUNES, L. A. S.; MUSSAVIRA, S.; BINDHU, O. S. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. **Biochemia Medica**, v.2, n.25, p.177-192, 2015.

OGA, SEIZE *et al.* **Fundamentos de Toxicologia**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2008.

PEDERSEN, A. M.; BARDOW, A.; JENSEN, S. B.; NAUNTOFTE, B. Saliva and gastrointestinal functions of taste, mastication, swallowing and digestion. **Oral Diseases**, v.8, p.117-129, 2002.

SANTOS, P. P. A.; IGLESIAS, D. P. P.; SOUZA, E. L.; FREITAS, R. A.; GALVÃO, H. C. Saliva: Métodos atuais para coleta e obtenção da amostra. **Revista da Faculdade de Odontologia**, v.48, n.1/3, p.95-98, 2007.

TENZER, S.; DOCTER, D.; KUHAREV, J.; MUSYANOVYCH, A.; FETZ, V. *et al.* Rapid formation of plasma protein corona critically affects nanoparticle pathophysiology. **Nature Nanotechnology**, v.8, p.772-781, 2013.