

Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais
Laboratório Nacional de Nanotecnologia
Nanotoxicologia e Nanobiotecnologia

PIBIC/CNPq - 2020

Projeto de Pesquisa – Iniciação Científica

Toxicidade de Materiais baseados em Grafeno

Dr. Diego Stéfani Teodoro Martinez
Pesquisador
LNNano/CNPEM

Campinas-SP

Resumo

Materiais baseados em grafeno (GBMs) são alvo de grande interesse científico e tecnológico, devido suas exclusivas propriedades físico-químicas e potencial para inovação em diferentes setores industriais, como: eletrônica, energia, saúde, agricultura, e ambiente. Contudo, existe uma crescente preocupação quanto aos potenciais riscos destes materiais em nanoescala para a saúde humana e ambiental. Estudos recentes têm demonstrado que no ambiente biológico os nanomateriais sofrerão processos imediatos de biotransformação (i.e. formação de biocorona) com implicações críticas na nanobiointerface e interação com sistemas celulares. Neste contexto, este projeto tem como objetivo principal estudar a toxicidade de grafenos funcionalizados. Em especial, através do emprego de metodologias integradas, avançar no entendimento da relação entre as modificações na superfície química de grafenos e a formação de biocoronas e seus impactos na toxicidade celular. Este projeto visa contribuir com tomadores de decisão em questões envolvendo a segurança e regulação de GBMs e derivados funcionalizados.

Palavras-chave: grafeno, nanobiotecnologia, nanotoxicologia e nanosseguurança.

1. Introdução

Os materiais baseados em grafeno (GBMs, do inglês, *graphene-based materials*) são promissores nanomateriais de carbono e considerados estratégicos para inovação tecnológica. Todavia, aspectos de segurança destes materiais para saúde humana e ambiental precisam ser estudados de maneira proativa e na direção do conceito *safe-by-design* (Fadeel et al., 2018). A nanotoxicologia tem como missão estudar os efeitos adversos de nanomateriais sobre sistemas biológicos e ambiente. E, a determinação precisa e inequívoca da toxicidade é um ponto chave durante a avaliação dos riscos toxicológicos de nanomateriais. Nanomateriais apresentam propriedades físico-químicas exclusivas (e.g. morfologia, tamanho, carga, grupos superfícies, pureza etc.) que são determinantes durante a manifestação da sua toxicidade e comportamento no ambiente.

Assim, entender a influência destas propriedades físico-químicas na nanobiointerface, toxicidade e dinâmica no ambiente será fundamental para o desenvolvimento de nanomateriais em bases seguras e sustentáveis (Martinez et al., 2013; Hu et al., 2016).

Com a crescente produção industrial de nanomateriais, incluindo GBMs, há uma expectativa de aumento do contato e exposição a estes novos materiais e seus potenciais impactos sobre a saúde e ambiente, assim, agências e órgãos regulamentadores tem solicitado atenção e cautela com durante o manuseio e uso de nanomateriais (Hansen et al., 2017). Por exemplo, estudos recentes demonstraram que GBMs podem desencadear efeitos danosos para células, como estresse oxidativo, inflamação, danos genéticos, inibição da divisão celular e indução da morte celular. Entretanto, devido à enorme diversidade estrutural-composicional destes materiais, são necessários estudos integrados para a avaliação da nanotoxicidade de maneira precisa e inequívoca (Clemente et al., 2017; Fadeel et al., 2018).

Após a interação com ambiente biológico, os nanomateriais rapidamente entram em contato com biomoléculas, como a matéria orgânica solúvel, polissacarídeos e proteínas. Como resultado, ocorrerá a formação de um revestimento/camada biomolecular sobre a superfície dos nanomateriais (biocorona) alterando sua identidade e a maneira como irão interagir com o ambiente e os organismos presentes neste meio (Monopoli et al., 2012; Docter et al., 2015). A composição e estrutura da biocorona é muito complexa e depende de vários fatores como as propriedades físico-químicas do nanomaterial (e.g. forma, tamanho, composição, grupos funcionais e carga na superfície), da natureza e composição do meio biológico e da duração da exposição (Lin et al., 2017). De fato, a biocorona é a primeira superfície que entra em contato com a célula e determina a internalização celular bem como a interação dos nanomateriais com os componentes subcelulares, podendo impactar fortemente na resposta biológica dos nanomateriais em testes nanotoxicológicos. Neste contexto, trabalhos desenvolvidos no LNNano/CNPEM têm focado no entendimento da formação de biocoronas em nanomateriais, incluindo GBMs, e seus impactos sobre a toxicidade e inovação nanotecnológica (Martinez et al., 2017; Khan et al., 2018; Franqui et al., 2019).

2. Objetivos

Este projeto tem como objetivo principal estudar a toxicidade de materiais baseados em grafenos (GBMs), e em especial, os impactos da formação de biocoronas na superfície destes materiais.

Objetivos específicos:

- a) Obtenção, funcionalização e caracterização integrada de GBMs;
- b) Caracterização das dispersões coloidais de GBMs e a formação de biocoronas após interação com meio de cultura;
- c) Avaliação da toxicidade celular de GBMs, mecanismos bioquímicos e genotoxicidade.

4. Metodologias

4.1. Preparação, funcionalização e caracterização dos grafenos

Os GBMs utilizados neste projeto serão produzidos no LNNano/CNPEM, obtidos comercialmente e/ou fornecidos pelos parceiros nacionais e internacionais. Em seguida, os GBMs selecionados serão caracterizados através das seguintes técnicas: (a) microscopia de força atômica (AFM); (b) espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), (c) espectroscopia ultravioleta-visível (UV-Vis); e (d) análise termogravimétrica (TGA). Todos estes equipamentos estão à disposição nas instalações abertas do LNNano/CNPEM.

4.2. Caracterização dos nanomateriais em meio de cultivo celular

Serão desenvolvidos protocolos de dispersão coloidal dos GBMs em meios de cultivo de células, na presença e ausência de soro de fetal bovino (SFB), utilizando equipamentos clássicos de agitação mecânica, sonicadores e incubadores de alta precisão para controle de temperatura (Thermomixer - Eppendorf). Também serão estudados os comportamentos das dispersões por meio das seguintes técnicas: (a) centrifugação e espectroscopia UV-vis; e (b) espalhamento de luz dinâmico e eletroforético (DLS/ELS).

4.3. Caracterização de biocoronas (protein corona)

A formação da biocorona será caracterizada através das seguintes técnicas: (a) eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE); (b) microscopia de força atômica (AFM); (c) espectroscopia FTIR, (d) espalhamento de luz dinâmico e eletroforético (DLS/ELS) e (e) análise termogravimétrica (TGA).

4.4. Avaliação da toxicidade celular

Será avaliado a toxicidade dos grafenos funcionalizados sobre cultura de células *in vitro*. Serão realizados bioensaios para avaliação da viabilidade celular, estresse oxidativo e genotoxicidade após exposição aos nanomateriais. A interação dos nanomateriais com a superfície celular será avaliado através de microscopia hiperespectral (Cyto-Viva) e espectroscopia Raman.

5. Resultados esperados

Este projeto irá contribuir para o entendimento das nanobiointerface e os aspectos envolvidos na superfície química de nanomateriais (i.e. geração de biocoronas), modulação da toxicidade. Contudo, este projeto também contribuirá para geração de resultados técnico-científicos para suportar o desenvolvimento seguro de GBMs, em especial, através do emprego de métodos alternativos em nanotoxicologia (sistemas *in vivo*).

7. Referências

Clemente, Z.; Castro, V.L.; Franqui, L.S.; Silva, C.A.; Martinez, D.S.T. (2017). Nanotoxicity of graphene oxide: Assessing the influence of oxidation debris in the presence of humic acid. *Environmental Pollution*, 225: 118-128.

Docter, D., Westmeier, D., Markiewicz, M., Stolte, S., Knauer, S.K., Stauber, R.H., 2015. The nanoparticle biomolecule corona: lessons learned – challenge accepted ? *Chemical Society Review* 44: 6094–6121.

Fadeel, B et al., (2018). Safety Assessment of Graphene-Based Materials: Focus on Human Health and the Environment, *ACS Nano*, 12:11 10582-10620.

Franqui, L.S.; De Farias, M.A.; Portugal, R.V.; Costa, C.A.R.; Domingues, R.; Souza Filho, A.G., Coluci, V.R.; Leme, A.F.P.; Martinez, D.S.T. (2019). Interaction of graphene oxide with cell culture medium: Evaluating the fetal bovine serum protein corona formation towards in vitro nanotoxicity assessment and nanobiointeractions. *Materials Science and Engineering C*, 100: 363-377.

Hansen, S.F. (2017). React now regarding nanomaterial regulation. *Nature Nanotechnology*, 12: 714-716.

Hu, X.G. Li, D.D., Gao, Y., Um, L. Zhou, Q.X. (2016). Knowledge gaps between nanotoxicological research and nanomaterial safety. *Environmental International*, 94: 8-23.

Khan, L.U.; Petry, R. Paula, A.J.; Knobel, M.; Martinez, D.S.T. (2018). Protein Corona Formation on Magnetic Nanoparticles Conjugated with Luminescent Europium Complexes. *ChemNano-Mat*, 4:112 1202-1208.

Lin, S.; Mortimer, M.; Chen, R.; Kakinien, A.; Rivieri, J.E.; Davis, T.P.; Din, F.; Ke, P.C. (2017). NanoEHS beyond toxicity – focusing on biocorona. *Environmental Science: Nano*. 4: 1433-1454.

Martinez, D.S.T.; Alves, O.L. (2013). Interação de nanomateriais com biosistemas e a nanotoxicologia: na direção de uma regulamentação. *Ciência e Cultura*, 65: 32-36

Martinez, D.S.T.; Damasceno, J.P.; Franqui, L.S.; Bettini, J.; Mazali, I.O.; Strauss, M. (2017). Structural aspects of graphitic carbon modified SBA-15 mesoporous silica and biological interactions with red blood cells and plasma proteins. *Materials Science and Engineering C*, 78: 141-150.

Monopoli, M.P. Aberg, C.; Salvati, A.; Dawson, K.A. (2012). Biomolecular coronas provide the biological identity of nanosized materials. *Nature Nanotechnology*, 7: 779-786.