# AVALIAÇÃO DA POSSÍVEL TOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE GRAFENO EM *Drosophila melanogaster*

Gabriela Brandalise da Luz (PROVIC), Rodolfo Thiago Ferreira, Jarem Raul Garcia, Edmar Miyoshi (Orientador), e-mail: edmiyoshi@gmail.com.

Universidade Estadual de Ponta Grossa/Departamento do Ciências Farmacêuticas.

**Ciências Biológicas, Farmacologia.**

**Palavras-chave:** mortalidade, bioacumulação, estresse oxidativo.

**Resumo**

O óxido de grafeno é material promissor em diversos campos devido a sua alta estabilidade e caráter hidrofílico. No entanto, há poucos estudos acerca de sua toxicidade em modelos biológicos. Um modelo biológico amplamente utilizado para estudos *in vivo* é a mosca da fruta *Drosophila melanogaster* devido ao seu fácil manuseio e baixo custo. O presente estudo avaliou a toxicidade de três diferentes tamanhos de partícula de óxido de grafeno, as quais foram incorporadas na dieta padrão das moscas. Constatou-se efeito tóxico acentuado nas moscas submetidas ao tratamento com partículas de maior tamanho, indicado pelo alto índice de mortalidade e certa deficiência na atividade locomotora, o que pode ser devido ao estresse oxidativo ou à presença de fragmentos oxidativos aderidos na superfície.

## Introdução

O óxido de grafeno tem estrutura bidimensional cuja espessura é monoatômica e possui algumas funções orgânicas oxigenadas como hidróxi e carbonila presentes em sua superfície, as quais fazem do óxido de grafeno um material promissor em diversas áreas devido a conferirem grande dispersabilidade e perfil hidrofílico, o que se dá pela atuação de tais grupos como surfactantes [1-3]. A rota mais utilizada para sua obtenção é a esfoliação eletroquímica, que pode ser dividida em anôdica ou catódica [4,5]. Um mecanismo proposto para a esfoliação eletroquímica anôdica se dá via formação de radicais livres [4,5] os quais potencialmente podem desencadear reações radicalares subsequentes. Aderido à superfície da estrutura há ainda fragmentos oxidativos gerados durante processo de oxidação do grafeno ao seu óxido, que são adsorvidos fortemente em sua superfície por meio de interações não covalentes π-π, e se caracterizam como fragmentos poliaromáticos reativos [1]. Tais fragmentos aderidos podem ainda apresentar efeitos tóxicos a modelos biológicos. No entanto, apesar de suas várias propriedades favoráveis e vasta aplicação, há poucos estudos acerca de sua toxicidade em modelos biológicos. Desta forma, um modelo já conhecido na literatura para estudos *in vivo* é a mosca da fruta *Drosophila melanogaster*. Seu manuseio e reprodução são simples, possuem ciclo de vida relativamente curto (10-12 dias) e são de baixo custo [6].

## Material e Métodos

*Obtenção e caracterização do óxido de grafeno*

O óxido de grafeno foi fornecido pelo grupo do Prof. Dr. Jarem R. Garcia (GGAETS/UEPG) e preparado via rota de esfoliação eletroquímica utilizando-se o parâmetro otimizado de 2 mA $cm^{-2}$ cujo dispersante é $MgSO_4.7\ H_2O$ em uma

concentração de $1{,}0.10^{-3}$ mol $L^{-1}$. A metodologia encontra-se patenteada sob o número BR 10 2013 019478 6. Foi preparado três dispersões de óxido de grafeno cuja concentração foi igualada. Os tamanhos médios das partículas foram estimados por meio da análise de espalhamento dinâmico de luz (DLS) (modelo Nano ZS90) e a suas morfologias por análise em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (modelo Vega 3 / Tescan).

*Drosophila melanogaster - meio de cultura, exposição aos tratamentos e estudo de sobrevivência*

O meio de cultura das moscas foi mantido em ambiente climatizado a 25ºC, ciclo claro/escuro de 12 horas, umidade de 60% e alimentadas com dieta padrão (farinha de milho, açúcar, sal, leite em pó, gérmen de trigo, levedura e ágar). Os tratamentos foram realizados em triplicata e foram divididos em grupos de 3 frascos contendo 50 moscas adultas, com idade de até 3 dias. Foi incorporado 1,0 mL de cada dispersão de óxido de grafeno de diferente tamanho em 30 gramas da alimentação padrão, assim como para a incorporação do veículo ($MgSO_4.7H_2O$) e do grupo controle, o qual foi preparado e adicionado 1,0 mL de água apenas. Para o estudo de sobrevivência, o número de moscas mortas durante 7 dias foi contabilizado.

*Análise da habilidade locomotora*

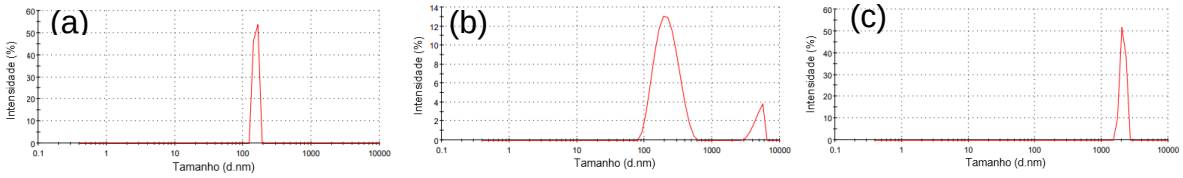
A análise da atividade locomotora foi realizada no sétimo dia de exposição e foi avaliada através de dois testes: o de geotaxia negativa e o teste de campo aberto. No de geotaxia 20 moscas de cada grupo foram posicionadas ao fundo de um tubo Falcon e o tempo até atingirem a marca de 8 cm foi contabilizado. Já o do campo aberto, 20 moscas de cada grupo foram colocadas, individualmente, em um papel milimetrado (1 cm x 1 cm) e cobertas por uma placa de Petri e avaliou-se o tempo de imobilidade (tempo gasto sem locomoção) e distância percorrida (número de cruzamentos - quadrados) durante o período de 1 minuto.

**Resultados e Discussão**.

*Obtenção e caracterização do óxido de grafeno*

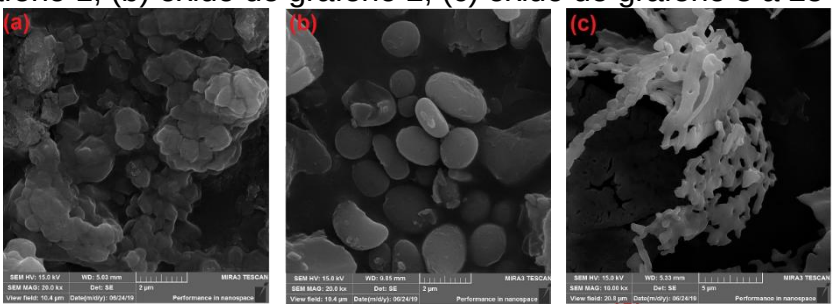
A concentração das dispersões foi igualada a $5{,}1564.10^{-4}$ mol $L^{-1}$. Os tamanhos médios obtidos foram de: 153,8 nm (óxido de grafeno 1), 223,9 nm (óxido de grafeno 2) e 2,083 µm (óxido de grafeno 3) – figura 1.

**Figura 1 -** Distribuição de tamanho obtida por DLS para: (a) óxido de grafeno 1; (b) óxido de grafeno 2; (c) óxido de grafeno 3 a 25 °C.




A morfologia obtida por MEV das partículas do óxido de grafeno 1 indica que há um efeito de aglomeração entre as partículas, já a do óxido de grafeno 2 se assemelha a partículas com volume esférico melhor definido e apresenta ainda menor aglomeração. O óxido de grafeno 3 apresenta morfologia condizente a lamelas, cujo aglomerado de partículas a origina. As imagens são vistas na figura 2.

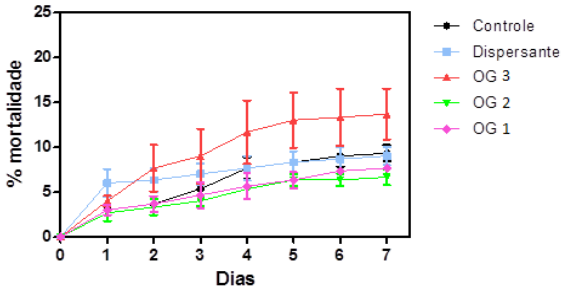
**Figura 2 -** Imagens de MEV para as partículas de oxido de grafeno: (a) óxido de grafeno 1; (b) óxido de grafeno 2; (c) óxido de grafeno 3 a 25 °C.




*Estudo de sobrevivência*

Na figura 3 é mostrado os índices de mortalidade por dia. Tomando-se por referência o grupo controle, percebe-se que o efeito mais significativo se mostra no grupo OG 3, de maior tamanho (2,083 µm), enquanto que nos grupos de menor tamanho OG 1 e OG 2, este não foi tão acentuado. Tal fenômeno podem estar relacionado a sua menor superfície de contato, e, portanto, maior dificuldade e tempo para que as partículas sejam excretas, uma vez que a observação do organismo das mocas submetidas ao tratamento no quinto exposição indica que não há bioacumulação visível, o que seria indicado por resquícios pretos no interior do corpo das moscas [6].

**Figura 3 -** Índice de mortalidade por dia de tratamento em *Drosophila melanogaster*




*Análise da habilidade locomotora: geotaxia negativa*

A média do tempo de escala em segundos por grupo foi de: controle: 9,46; dispersante: 6,41, OG 1: 7,85 OG 2: 6,50 OG 3: 13,39. Dessa forma, percebe-se que o grupo de óxido de grafeno 3 apresenta o maior atraso no tempo de escalada em relação às moscas expostas ao controle e os demais grupos, indicando que exerce uma maior influência sobre capacidade de escalada das moscas, ou seja, pode induzir um efeito toxicológico superior que as demais.

*Análise da habilidade locomotora: teste do campo aberto*

Percebe-se que houve maior tempo de imobilidade das moscas após a ingestão do óxido de grafeno 3, de maior tamanho, apresentando ainda a menor distância percorrida. O efeito de maior tempo de imobilidade observado nos grupos 1 e 2 do óxido de grafeno são semelhantes, devido as partículas terem tamanhos parecidos.

Nota-se dessa forma que as partículas de maior tamanho induzem maior efeito tóxico às moscas e este fato pode estar associado à sua menor superfície de contato, o que leva a uma maior dificuldade de excreção, visto que não foi constatado bioacumulação visível. Quanto a análise da atividade locomotora, a maior média no tempo de escalada também se mostra para o terceiro grupo, assim como o maior tempo de imobilidade e menor distância percorrida no teste do campo aberto, indicando disfunção neurológica [7]. Devido ao tamanho semelhante de partícula dos grupos 1

e 2 os efeitos, tanto na mortalidade quanto na análise locomotora, se mostram parecidos, indicando que não há efeito toxicológico acentuado em tais exposições. As causas apontadas do efeito toxicológico observado pode se dar por meio do estresse oxidativo cuja geração de radicais livres em excesso pode ser iniciada devido ao possível mecanismo de esfoliação grafítica usada ser dada via formação de radicais livres o qual pode resultar em dano celular das moscas [4,5,8], ou também à presença de fragmentos oxidativos derivados de compostos aromáticos aderidos à superfície do óxido de grafeno que podem ser originados da estrutura grafítica, e podem ainda se ligar às moléculas dos tecidos do fígado e outras regiões de animais, e ainda inibir a respiração mitocondrial, o que contribui mais ainda para sua toxicidade [3,7,8]

**Conclusões**

A partir dos resultados, percebe-se que partículas de óxido de grafeno de maiores tamanhos podem ser tóxicas quando ingeridas pelas moscas, o que é indicado pelo maior índice de mortalidade, maior atraso no teste de escalada e tempo de imobilidade maior e menor distância percorrida no teste do campo aberto. Tal efeito tóxico pode ser induzido por estresse oxidativo, gerado pelo mecanismo radicar do óxido de grafeno ou pelos fragmentos oxidativos aderidos à sua superfície.

**Agradecimentos**

À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG) pelo espaço concedido, ao Rodolfo Thiago Ferreira pela co-orientação e o fornecimento das partículas de óxido de grafeno, ao laboratório M 21, ao Complexo de Laboratórios Multiusuários da UEPG (C-LABMU) pelas análises realizadas e a todos que me ajudaram.

**Referências**

[1] FARIA, A. F., et al. Unveiling the role of oxidation debris on surface chemistry of graphene through the anchoring of Ag nanoparticles. **Chemistry of Materials**, v. 24, p. 4080–4087, 2012.

[2] GAO, W. The chemistry of graphene oxide. In:**Graphene oxide**. Springer, Cham, p. 61-95, 2015

[3] COLUCI, V. R., et al. Noncovalente Interection wih Graphene Oxide: The Crucial Role of Oxidative Debris. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 118, p. 2187-2193, 2014.

[4] FERREIRA, R. T. **Investigação do preparo de óxido de grafeno via esfoliação eletroquímica anôdica.** Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2016.

[5] WEI, D.; et al. Graphene from electrochemical exfoliarion and its direct applications in enhanced energy storage devices. **Chemical Communication**, v. 48, p. 1239-1241, 2012.

[6] ZOU, H., et al. *In vivo* Toxicity Evaluation of Graphene Oxide in *Drosophila melanogaster* After Oral Administration. **Journal of Nanosciense and Nanotechnology**, v. 16, p. 7472-7478, 2016.

[7] MISHRA, M.; BARIK, B. K. Behavioral teratogenesis in *Drosophila melanogaster*. **Teratogenicity Testing**. v. 1797, p. 277-298, 2018.

[8] PRIYADARSINI, S. et al. Oral administration of graphene oxide nano-sheets induces oxidative stress, genotoxicity, and behavioral teratogenicity in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Science and Pollution Research**, p. 1-15, 2019.