



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO - UFMT
CAMPUS UNIVERSITÁRIO DO ARAGUAIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO BACHAREL EM BIOMEDICINA

AILYS KAROLINE SERGIO

**ANÁLISE DOS EFEITOS TÓXICOS DA
ADMINISTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
GRAFENO DURANTE A PREENHEZ DE RATAS**

Barra do Garças-MT

2024

AILYS KAROLINE SERGIO

**ANÁLISE DOS EFEITOS TÓXICOS DA
ADMINISTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
GRAFENO DURANTE A PREENHEZ DE RATAS**

Monografia apresentada à banca examinadora do Curso de Biomedicina do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Campus Universitário do Araguaia – UFMT, como requisito parcial, para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato

Coorientadora: Profa. Dra. Rafaienne Queiroz Moraes-Souza

Barra do Garças-MT

2024

Dados Internacionais de Catalogação na Fonte.

S484a Sergio, Ailys Karoline.
ANÁLISE DOS EFEITOS TÓXICOS DA
ADMINISTRAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE
GRAFENO DURANTE A
PRENHEZ DE RATAS [recurso eletrônico] / Ailys Karoline
Sergio. -- Dados eletrônicos (1 arquivo : 31 f., il. color., pdf). --
2024.

Orientador: Gustavo Tadeu Volpato.
Coorientadora: Rafaienne Moraes-Souza.
TCC (graduação em Biomedicina) - Universidade Federal de
Mato Grosso, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Barra
do Garças, 2024.

Modo de acesso: World Wide Web:
<https://bdm.ufmt.br>. Inclui bibliografia.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a)
autor(a).

Permitida a reprodução parcial ou total, desde que citada a fonte.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe e minha vó, porque foi graças aos seus esforços que eu cheguei até aqui.

Agradecimentos

Agradeço, primeiramente, a minha mãe Lucimeire Sergio e a minha avó Odete Sergio, porque além de sempre me apoiarem e incentivarem, fizeram tudo que estava ao alcance para que eu pudesse ir atrás dos meus sonhos.

À minha família que sempre vibraram com as minhas conquistas e torcem pelo meu sucesso.

Ao meu padrasto Adriano Marques que foi o meu melhor professor, me deu aulas de português e me ensinou lições valiosas sobre o futuro.

Ao meu namorado Eros Bonafin, por sempre estar ao meu lado e me ajudar a ultrapassar os momentos difíceis fazendo faculdade longe de casa e da família.

Aos meus amigos, pela amizade e pelo apoio ao longo desse período de faculdade.

À UFMT e aos meus professores, pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal.

A todos os membros do FISIOTOX, por toda cumplicidade e auxílio desde o dia que entrei no laboratório.

Ao meu orientador Prof. Dr. Gustavo Tadeu Volpato, pelas oportunidades de aprendizado desde o dia que entrei no FISIOTOX e por ter sido meu orientador e ter desempenhado tal função com dedicação e paciência.

À minha coorientadora Profa. Dra. Rafaianne Queiroz Moraes-Souza, pelos conselhos, ajuda e paciência com a monografia.

À Profa. Dr. Maria Fernanda Spegiorin Salla Brune e o Prof. Dr. Paulo Fonseca por aceitarem o convite de ser minha banca examinadora.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

Ao Laboratório de química do estado sólido da UFMT, por ter nos concedido o óxido de grafeno para o estudo.

Aos animais que participaram deste experimento, visto que, sem eles esse trabalho não existiria.

A todos que participaram, direta ou indiretamente do desenvolvimento deste trabalho de pesquisa.

“Agradeço a todas as portas fechadas que não se abriram quando eu bati, se eu tivesse entrado em alguma delas, não seria o que sou hoje”.

Wesley D'Amico

RESUMO

O potencial das nanopartículas nas áreas biológicas e não-biológicas é vasto, com novas aplicações sendo constantemente descobertas. Um exemplo de nanopartícula com inúmeras aplicações é o óxido de grafeno (OG), que devido às suas propriedades físico-químicas tem demonstrado um enorme potencial para aplicações biomédicas multifuncionais. Apesar da exposição humana as nanopartículas terem crescido na mesma proporção que os avanços na área, as informações sobre a sua segurança não tem avançado na mesma velocidade. Portanto, o objetivo deste trabalho é avaliar a toxicidade materna da administração de OG durante a prenhez de ratas. Para a realização do experimento, ratas Wistar foram acasaladas e distribuídas aleatoriamente em três grupos experimentais (n=12 ratas/grupo). Grupo controle: ratas prenhes que receberam apenas água; Grupo Grafeno 2.5: ratas prenhes que receberam 2,5 mg/kg de OG; e Grupo grafeno 5.0: ratas que receberam 5 mg/kg de OG. A administração da nanopartícula e da água foi realizada durante toda a prenhez, por via intragástrica (gavage). Peso corpóreo, consumo de ração e ingestão hídrica foram medidos diariamente. No 21º dia de prenhez, as ratas foram anestesiadas e mortas por decapitação para obtenção do sangue para análises bioquímicas. Posteriormente, foi realizada a laparotomia para retirada e pesagem dos órgãos maternos. Como resultados, foi constatado que nenhum dos parâmetros analisados apresentou diferença entre os grupos experimentais. Em conclusão, a administração oral do OG durante a prenhez, nas doses de 2,5 e 5,0 mg/kg, não apresentou toxicidade materna. Isso indica que nessas condições seu uso foi seguro durante a gestação.

Palavras-Chave: Nanopartícula, Óxido de grafeno, Toxicidade, Modelo animal e Prenhez.

ABSTRACT

The potential of nanoparticles in biological and non-biological areas is vast, with new applications constantly being discovered. An example of a nanoparticle with numerous applications is graphene oxide (GO), which due to its physicochemical properties has demonstrated enormous potential for multifunctional biomedical applications. Although human exposure to nanoparticles has grown at the same rate as advances in the area, information about their safety has not advanced at the same velocity. Therefore, the objective of this work is to evaluate the maternal toxicity of GO administration during pregnancy in rats. To carry out the experiment, Wistar rats were mated and randomly distributed into three experimental groups (n=12 rats/group). Control group: pregnant rats that received only water; Graphene 2.5 Group: pregnant rats that received 2.5 mg/kg of GO; and Graphene 5.0 Group: rats that received 5 mg/kg of GO. The administration of the nanoparticle and water was carried out throughout the pregnancy, via the intragastric route (gavage). Body weight, feed consumption and water intake were measured daily. On the 21st day of pregnancy, the rats were anesthetized and killed by decapitation to obtain blood for biochemical analysis. Subsequently, a laparotomy was performed to remove and weigh the maternal organs. As a result, it was found that none of the analyzed parameters showed any difference between the experimental groups. In conclusion, oral administration of OG during pregnancy, at doses of 2.5 and 5.0 mg/kg, did not present maternal toxicity. This indicates that under these conditions its use was safe during pregnancy.

Keywords: Nanoparticle, Graphene oxide, Toxicity, Animal model and Pregnancy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do óxido de grafeno.....	12
Figura 2. Representação esquemática do processo de oxidação do grafite para formação do óxido de grafite, seguido da exfoliação para formação do óxido de grafeno.....	15
Figura 3. Sequência experimental.....	16
Figura 4. Peso corpóreo materno de ratas tratadas com nanopartículas de óxido de grafeno ou água durante a prenhez.....	19
Figura 5. Consumo de ração de ratas tratadas com nanopartículas de óxido de grafeno ou água durante a prenhez.....	20
Figura 6. Consumo de água de ratas tratadas com nanopartículas de óxido de grafeno ou água durante a prenhez.....	21
Figura 7. Peso relativo (g/100 g) do coração, fígado, baço e rins de ratas tratadas com nanopartículas de óxido de grafeno ou água durante a prenhez.....	22
Figura 8. Análises bioquímicas proteínas totais, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia e creatinina de ratas tratadas com nanopartículas de óxido de grafeno ou água durante a prenhez.....	23

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	Erro! Indicador não definido.0
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1 Obtenção do óxido de grafeno	15
3.2 Animais.....	16
3.3 Período de adaptação	16
3.4 Acasalamento.....	17
3.5 Grupos Experimentais	17
3.6 Período de prenhez e administração do óxido de grafeno	17
3.7 Obtenção dos dados toxicológicos maternos	18
3.8 Análise estatística	18
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSSÃO	24
6. CONCLUSÃO	27
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1. INTRODUÇÃO

As nanopartículas são definidas como objetos com variação de tamanho da ordem de 1 a 100 nanômetros. Devido a suas pequenas dimensões, suas propriedades se distinguem de outras partículas, conferindo a esses materiais uma área de superfície relativamente grande (MISSAOUIA *et al.*, 2018). As propriedades físicas e ópticas altamente ajustáveis e a capacidade de realizar muitas ligações são responsáveis pelo uso extensivo das nanopartículas em diversas áreas da pesquisa científica (YOHAN *et al.*, 2014).

Com o crescimento da nanotecnologia, as perspectivas de utilização de nanomateriais em aplicações industriais, imagens médicas, *drug delivery*, tratamento de câncer, terapia gênica e outras áreas cresceram rapidamente (GWINN *et al.*, 2006). Essa expansão da nanotecnologia gerou um impacto significativo na medicina contribuindo com o monitoramento, diagnóstico, prevenção, reparação ou cura de doenças e tecidos lesionados em sistemas biológicos (SOUMYA & RAGHU, 2023). A incorporação das nanopartículas nos medicamentos confere a eles diversas propriedades, como melhor solubilidade, biodisponibilidade, estabilidade, biodistribuição, farmacocinética e farmacodinâmica. Em alguns casos, pode diminuir a toxicidade do medicamento e aumentar a eficácia terapêutica. Além disso, outras funcionalidades, como exames de imagem, liberação desencadeada e entrega direcionada, podem ser incorporadas em nanomedicamentos e alcançar multifunções (LIU *et al.*, 2020; BOTELLA *et al.*, 2011; PURI *et al.*, 2009).

O potencial das nanopartículas nas áreas biológicas e não-biológicas é vasto, com novas aplicações sendo constantemente descobertas. Atrelado a isso, a exposição humana as nanopartículas têm crescido junto com os avanços na área. Entretanto, apesar do maior contato com nanopartículas, as informações sobre sua segurança não têm avançado na mesma proporção (MISSAOUI *et al.*, 2020; GWINN *et al.*, 2006). Apesar do potencial clínico, alguns estudos indicam que as nanopartículas são tóxicas. Estes estudos demonstraram a capacidade das nanopartículas se acumularem nas células e induzirem toxicidade em alguns órgãos. Além disso, com essa exposição humana crescente surge a necessidade de estudos em relação a segurança do uso e o desenvolvimento de testes de toxicidade com as nanopartículas (MISSAOUI *et al.*, 2020). O efeito tóxico das nanopartículas depende de alguns fatores como a via de exposição, dose, concentração, tempo e frequência (YANG *et al.*, 2021). Além disso, o tamanho dos nanomateriais também está correlacionado com a sua toxicidade, à medida que o tamanho das partículas diminui, a área superficial dos materiais aumenta e com isso,

possibilita sintomas de intoxicação (JOHNSTON *et al.*, 2012). Já a toxicidade específica de cada órgão, depende da via de administração e da sua distribuição sistêmica (MISSAOUI *et al.*, 2020). A exposição a nanopartícula pode ocorrer por ingestão (CORNU *et al.*, 2022), injeção (WILLHITE *et al.*, 2014), inalação (HADRUP *et al.*, 2020) e contato com a pele (DRÉNO *et al.*, 2019).

Ao atingirem a circulação sanguínea, as nanopartículas podem ser distribuídas e acumular-se em diversos órgãos como fígado, baço, pulmões e rins. No estudo de Missaoui (2020) foi observado que elas podem acumular-se no cérebro se forem suficientemente pequenas (<10 nm) e na barreira hematoencefálica se não estiver intacta. No entanto, embora os nanomateriais compartilhem o ponto em comum de serem pequenos, eles constituem uma população diversificada que pode variar em relação ao seu tamanho, composição, carga, área superficial, solubilidade, estrutura cristalina, química superficial e forma. Portanto, é fundamental identificar as propriedades físicas e químicas de cada nanomaterial para entender a toxicidade (JOHNSTON *et al.*, 2012).

As nanopartículas podem ser classificadas em orgânicas e inorgânicas, com base na sua composição química. As orgânicas incluem principalmente polímeros, exossomos, lipossomas e nanopartículas à base de proteínas. As inorgânicas consistem em nanopartículas de sílica, metálicas, à base de carbono, pontos quânticos e assim por diante (LIU *et al.*, 2021). As nanopartículas à base de carbono vêm ganhando destaque em aplicações biomédicas, como na entrega de medicamentos (LIU *et al.*, 2020).

Um exemplo de nanopartícula composta por ligações de carbono é o óxido de grafeno, que é proveniente de uma única folha de grafeno contendo a presença de grupamentos hidrofílicos, fenólicos e epóxidos no plano basal, e carboxílico nas bordas (DZIEWIECKA *et al.*, 2017) (Fig. 1). O óxido de grafeno surgiu nos últimos anos como um material versátil demonstrando um enorme potencial para aplicações biomédicas multifuncionais devido às suas propriedades físico-químicas (CHNG *et al.*, 2014). Dentre as propriedades físico-químicas que se destacam podemos citar a estrutura planar bidimensional controlável, grande área superficial, estabilidade química e mecânica, excelente condutividade e boa biocompatibilidade (MOUSAVI *et al.*, 2019). Além disso, ele possui grupos funcionais versáteis, regiões hidrofóbicas e periferias hidrofílicas (caráter anfifílico), produz dispersões estáveis em água, capacidade de atravessar facilmente as membranas celulares e pode ser produzido facilmente em larga escala (GRILLI *et al.*, 2022; DE MORAES *et al.*, 2015).

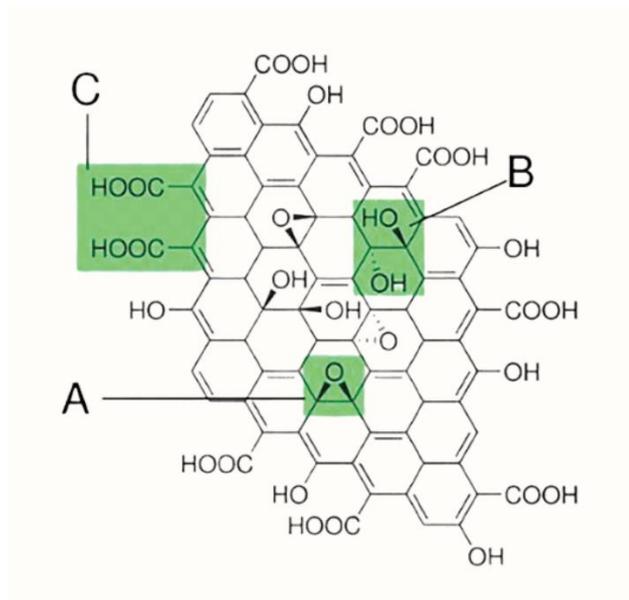


Figura 1: Estrutura molecular do óxido de grafeno (A: Grupo epoxílico, B: Grupo hidroxílico, C: Grupo carboxílico) (HORTA *et al.*, 2022).

Devido suas propriedades únicas, o óxido de grafeno atua bem como nanomedicamento e nanocarreador para biomoléculas (MOUSAVI *et al.*, 2019) e como nanocomposto com alto potencial antibacteriano quando sintetizado com a prata (DE MORAES *et al.*, 2015). Pode atuar também como agente fototérmico no tratamento de tumores, além disso, tem demonstrado sucesso na produção de imagens de fotoluminescência *in vitro* e *in vivo* em camundongos devido a sua excelente fotoestabilidade, sendo uma vantagem sobre os corantes moleculares (LI *et al.*, 2023).

O óxido de grafeno pode ser sintetizado por diferentes abordagens e fontes de carbono gerando grande variabilidade na produção. Essas variações produzem materiais com diferentes tamanhos e grupos funcionais de superfície, alterando suas propriedades físico-químicas e seu comportamento tóxico (CHNG *et al.*, 2014). O maior risco de exposição ao óxido de grafeno a várias espécies cresceu juntamente com a produção e sua utilização em diferentes campos. No entanto, a grande maioria dos estudos estão voltados as aplicações e poucos estão avaliando a segurança do uso do óxido de grafeno. Portanto, existe a necessidade da realização de mais estudos para compreender o impacto dessa exposição nos seres vivos (GUO *et al.*, 2022).

Em um dos poucos estudos encontrados na literatura, investigaram o efeito tóxico do óxido de grafeno injetado por via intraperitoneal em ratos da linhagem Wistar. Foi verificado que os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), fosfatase alcalina (ALP) e aspartato aminotransferase (AST) foram alterados significativamente em animais tratados com a dose de 10 mg/kg e nas doses de 0,4 e 2 mg/kg não houve alterações significativas (NIRMAL *et al.*,

2020). Já no estudo de Patlolla (2017), ratos da linhagem Sprague-Dawley receberam tratamento com óxido de grafeno por via oral. As doses de 20 e 40 mg/kg mostraram aumentos significativos na indução de espécies reativas de oxigênio (ERO), atividades de ALT, ALP, concentração de hidroperóxido lipídico (LHP) e alterações morfológicas do tecido hepático.

As pesquisas relatam que o uso indiscriminado desse nanomaterial pode apresentar impacto negativo no meio ambiente e na saúde humana, em especial ao sistema reprodutivo e a saúde fetal, já que devido ao seu pequeno tamanho há certa facilidade em atravessar a membrana placentária, e ainda, apresenta fácil penetração e biocompatibilidade (FADEEL *et al.*, 2018; BROHI *et al.*, 2017). Ao investigar a toxicidade do óxido de grafeno na prenhez foi constatado que a administração oral em camundongos nas doses de 10 e 40 mg/kg induziu reabsorção embrionária, morte fetal, baixo peso materno e fetal e alterações placentárias, enquanto na dose de 2 mg/kg não foi observado alterações significativas (LIU *et al.*, 2021). No estudo de Xu (2015), foram injetadas por via intravenosa nanofolhas de óxido de grafeno reduzido em camundongas ao final da gestação. Como resultado, os animais apresentaram abortos quando submetidas as doses de 6,25 e 12,50 mg/kg, e morte na dose de 25 mg/kg.

Apesar de estudos terem o objetivo de avaliar a toxicidade dos nanomateriais da família do grafeno, ainda não existe o consenso sobre a toxicidade, visto que alguns desses estudos não mostraram claramente riscos específicos, enquanto outros indicaram que eles podem oferecer riscos para a saúde (BIANCO, 2013). Dentre os estudos realizados, em geral não há um procedimento padrão para os testes em diferentes laboratórios e linhas de pesquisas, de modo que comparações diretas e conclusões definitivas ainda não podem ser feitas. Além disso, o amplo uso de nanomateriais tem levantado preocupações sobre o impacto negativo na saúde humana. Esses fatos justificam a realização de mais estudos deste nanomaterial no período gestacional para avaliar sua segurança e/ou possível ausência de efeitos tóxicos. Diante o exposto, a hipótese desse trabalho é que a administração oral de óxido de grafeno durante a prenhez de ratas não acarretará danos ao organismo materno, sendo seu uso seguro.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral:

Avaliar a toxicidade materna da administração de nanopartícula de óxido de grafeno durante o período de prenhez.

2.3 Objetivos específicos:

Comparar os efeitos da administração do óxido de grafeno frente ao:

- Peso corpóreo materno;
- Consumo de água e ração;
- Pesos relativos dos órgãos maternos (rins, baço, fígado, coração);
- Parâmetros bioquímicos (proteínas totais, enzimas transaminases hepáticas, creatinina e ureia).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do óxido de grafeno (OG)

O óxido de grafeno foi obtido através de uma parceria com o Laboratório de Química do Estado Sólido localizado na Universidade Federal de Mato Grosso. A nanopartícula foi sintetizada, em duas etapas, pelo método de Hummers modificado (JAURIS *et al.*, 2016) (Figura 2). Na primeira etapa, foi realizado a esfoliação, utilizando 500 mg de grafite, 235 mL de acetona e 45 mL de água deionizada, misturados em um balão volumétrico e deixados no ultrassom por 4 horas. Posteriormente, o material foi colocado em estufa à temperatura média de 80 °C durante 6 horas, para a evaporação da acetona e obtenção do grafite em pó.

A segunda etapa consistiu em intensa agitação magnética em banho de gelo com a adição de 250 mg de nitrito de sódio e 16 mL de ácido sulfúrico (1 hora). Em seguida foram adicionados 1,5 mg de permanganato de sódio e 50 mL de gelo na solução. Após a adição do permanganato de sódio, a solução foi para o banho-maria de glicerina à 30°C durante 12 horas, depois foram adicionados 50 mL de gelo, 200 mL de água deionizada e 3 mL de peróxido de hidrogênio. Por fim, a mistura ficou em repouso para decantação por 12 horas, para a obtenção do óxido de grafeno.

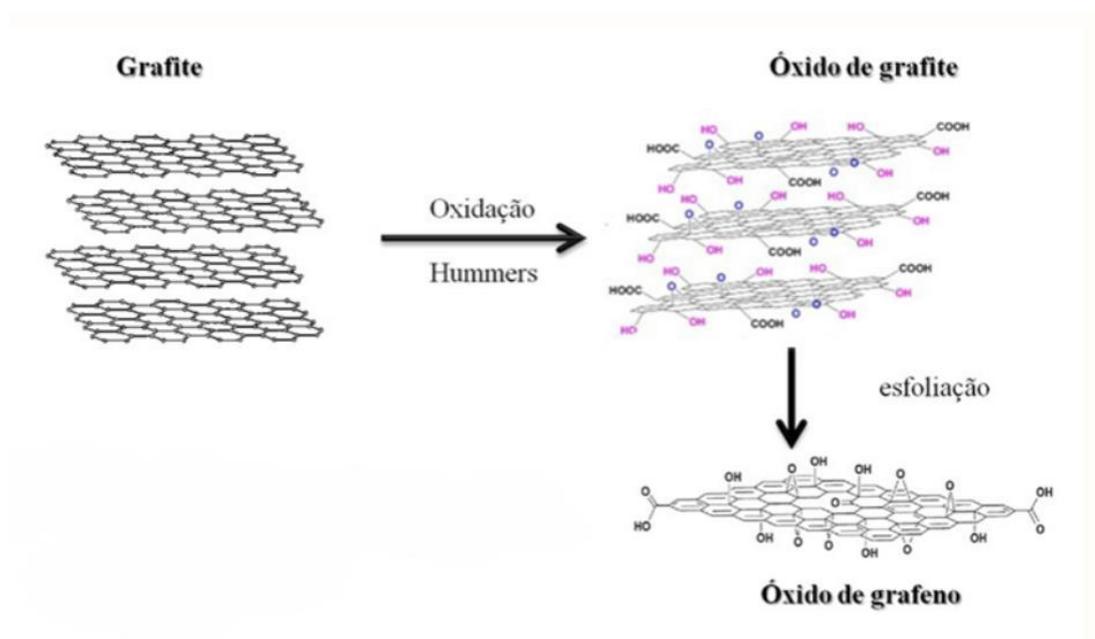


Figura 2: (adaptado) Representação esquemática do processo de oxidação do grafite para formação do óxido de grafite, seguido da exfoliação para formação do óxido de grafeno (OLIVEIRA & ZARDIN, 2013).

3.2 Animais

Foram utilizados ratos machos e fêmeas virgens da linhagem Wistar, em idade reprodutiva (três meses), com aproximadamente 220 gramas, adquiridos do Biotério da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

O manuseio dos animais e todos os procedimentos experimentais realizados nesse projeto foram conduzidos de acordo com as diretrizes estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovado pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA-Araguaia) da UFMT (Número do Protocolo: 23108.022228/2019-76). A sequência experimental está representada na Figura 3.



Figura 3: Sequência experimental.

3.3 Período de adaptação

Os ratos foram aclimatados durante o período de sete dias no biotério do Laboratório de Fisiologia de Sistemas e Toxicologia Reprodutiva (FISIOTOX), localizado no Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde no Campus Universitário do Araguaia da UFMT, sob temperatura ($22 \pm 5^\circ\text{C}$) e umidade ($50 \pm 10\%$) controladas, fotoperíodo ciclo claro/escuro de 12 horas e água e ração oferecidas à vontade. Neste período, eles permaneceram em caixas de polipropileno, forradas com maravalha e com capacidade máxima de quatro animais por caixa.

3.4 Acasalamento

Após o período de adaptação, as ratas foram separadas para acasalamento. Três ratas fêmeas e um rato macho foram distribuídos em gaiolas de polipropileno forradas com maravalha, durante o período noturno (após as 17 horas) todos os dias. Na manhã subsequente, os machos foram retirados das gaiolas e os esfregaços vaginais foram colhidos das fêmeas pela introdução de haste de algodão embebido em água destilada. Após a análise do material depositado nas lâminas em microscópio biológico, as confirmações de prenhez foram realizadas pela presença de espermatozoides e o diagnóstico da fase estro do ciclo estral, sendo este considerado o dia zero de prenhez (AFIUNE *et al.*, 2017).

A fase de acasalamento teve duração máxima de 15 dias, correspondendo a três ciclos estrais, tempo necessário até atingir o número de animais por grupo experimental. Os animais que não acasalaram neste período foram considerados estéreis e excluídos do experimento. As ratas prenhes foram incluídas nos grupos experimentais.

3.5 Grupos experimentais

As ratas prenhes foram distribuídas de maneira aleatória em três grupos experimentais, com 12 animais em cada grupo:

- **Controle:** Ratas prenhes receberam água filtrada, simulando o tratamento dos outros grupos;
- **Grafeno 2.5:** Ratas prenhes receberam doses de 2,5 mg/kg de nanopartículas de óxido de grafeno;
- **Grafeno 5.0:** Ratas prenhes receberam doses de 5,0 mg/kg de nanopartículas de óxido de grafeno.

3.6 Período de prenhez e administração do óxido de grafeno

Os animais receberam água ou óxido de grafeno por via oral (*gavage*) no período da manhã durante todo o período experimental, até o 21º de prenhez, sendo o volume ajustado diariamente conforme o peso corpóreo individual. Peso corpóreo, consumo alimentar e ingestão hídrica foram avaliados diariamente durante todo o experimento.

3.7 Obtenção dos dados toxicológicos maternos

No 21º dia de prenhez, as ratas foram anestesiadas com tiopental sódico (Thiopentax® - dose de 120 mg/kg de peso corporal) e mortas por decapitação para obtenção de sangue para análises bioquímicas. Em seguida, foi realizada a laparotomia para retirada e pesagem dos órgãos maternos.

Peso relativo de órgãos: No final do período experimental o coração, fígado, baço, rim direito e esquerdo foram retirados e pesados em balança analítica. O cálculo do peso relativo foi estabelecido pela relação do peso de cada órgão pelo peso corporal final menos o peso do útero gravídico da rata e multiplicado por 100. Os resultados foram expressos em gramas/100 gramas de peso vivo (g/100 g p.v.) (LEAL-SILVA *et al.*, 2023).

Parâmetros bioquímicos: Após a coleta do sangue total, uma alíquota deste material foi centrifugada a 3.500 rpm, 4°C e, desta forma, o soro foi coletado e armazenado a -20 °C. Posteriormente, o soro foi utilizado para dosagem das concentrações de proteínas totais pelo método colorimétrico e de ureia e creatinina pelo método cinético. As atividades de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram dosadas, também utilizando o soro, por método cinético enzimático (UV/otimizado). As dosagens bioquímicas foram realizadas utilizando *kits* comerciais.

3.8 Análise estatística

Para comparação dos valores médios foi realizada a Análise de Variância, seguida do pós-teste de Comparações Múltiplas de Tukey. Foi considerado como nível de significância estatística o limite de 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

A Figura 4 mostra o peso corpóreo materno durante o período experimental (dia 0 ao 21º de prenhez). As ratas de todos os grupos apresentaram aumento gradual no peso corpóreo durante a prenhez. No entanto, não houve diferença estatística entre os grupos experimentais em nenhum dos momentos analisados.

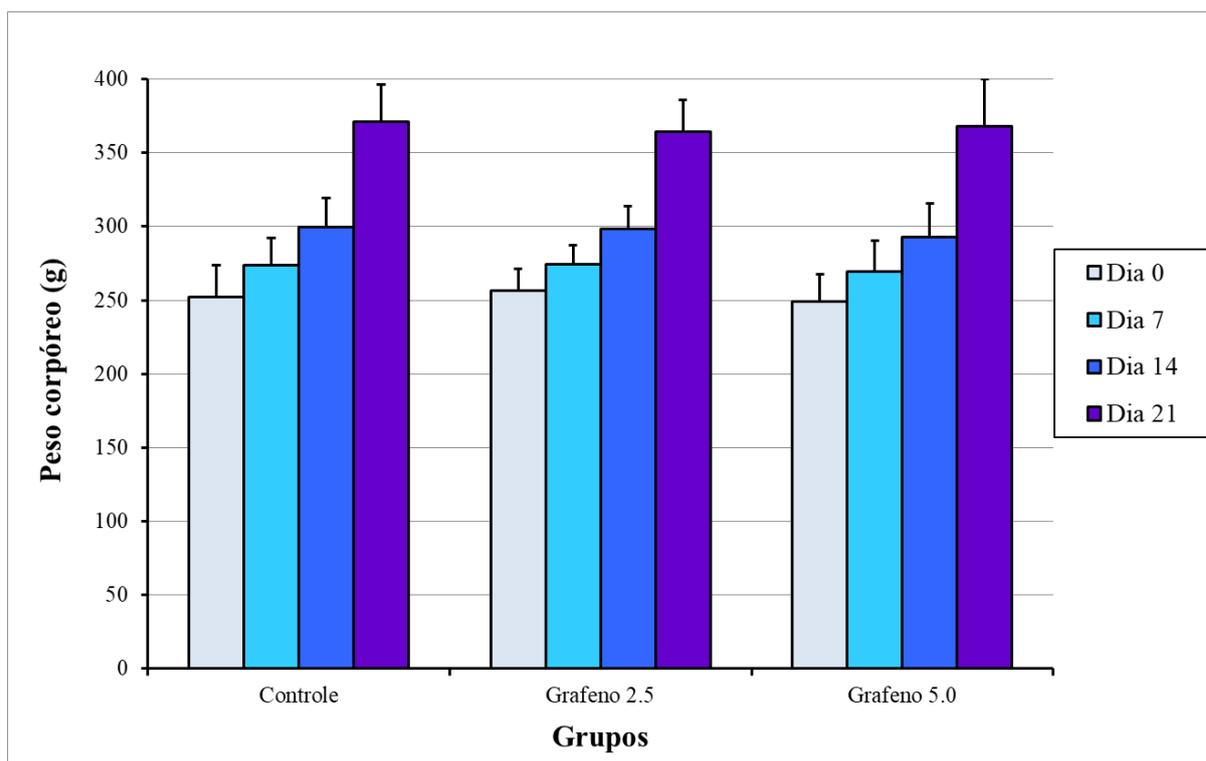


Figura 4: Peso corpóreo materno de ratas administradas com nanopartículas de óxido de grafeno ou água durante a prenhez.

Dados apresentados como média e desvio-padrão (n = 12 animais/grupo).

p > 0,05 – sem diferença estatística (ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey).

Na figura 5 observa-se o consumo de ração materno durante o tratamento (dia 0 ao 21º de prenhez). Apesar de uma diminuição do consumo alimentar nos dois grupos tratados com o óxido de grafeno no dia 21, não houve diferença significativa entre os grupos experimentais, em nenhum dos dias observados.

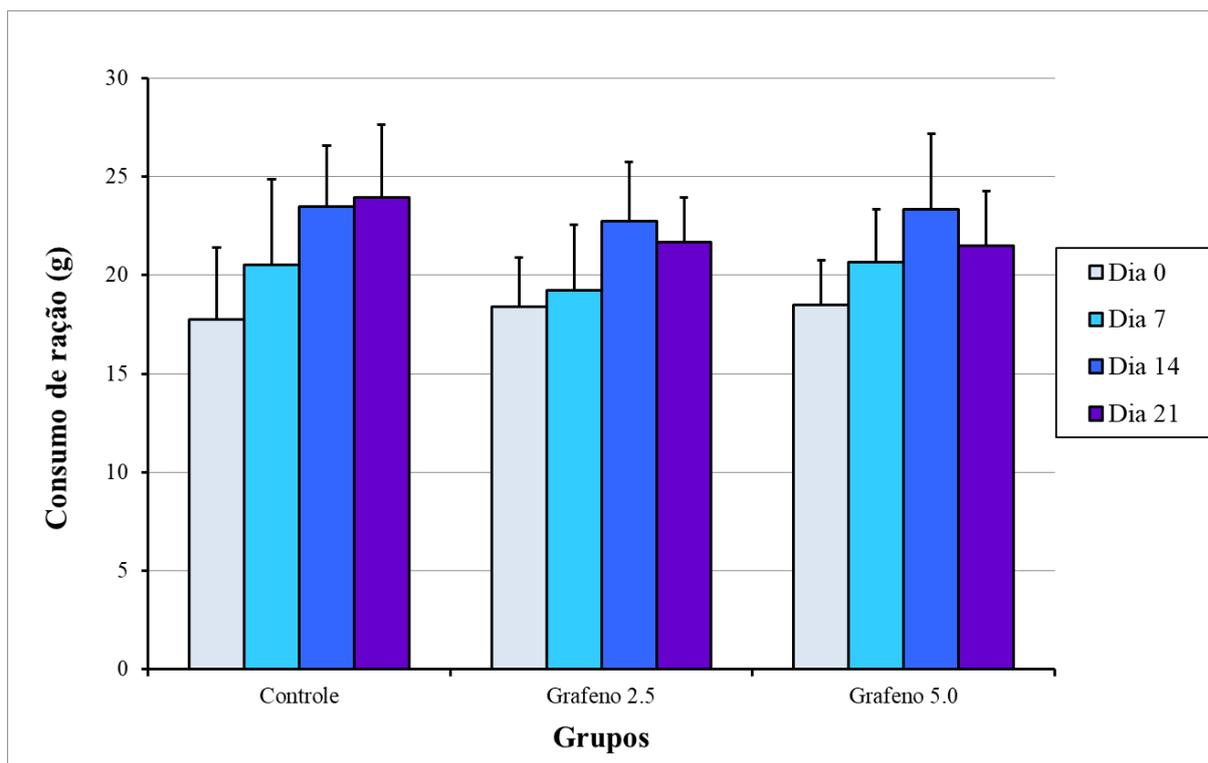


Figura 5: Consumo de ração de ratas administradas com nanopartículas de óxido de grafeno ou água durante a prenhez.

Dados apresentados como média e desvio-padrão ($n = 12$ animais/grupo).

$p > 0,05$ – sem diferença estatística (ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey).

Em relação a ingesta hídrica, a Figura 6 mostra o consumo das ratas prenhez durante os 21 dias de tratamento. Houve aumento na ingestão de água durante a avanço da gestação, porém, não houve diferença estatística entre os grupos nos diferentes momentos analisados.

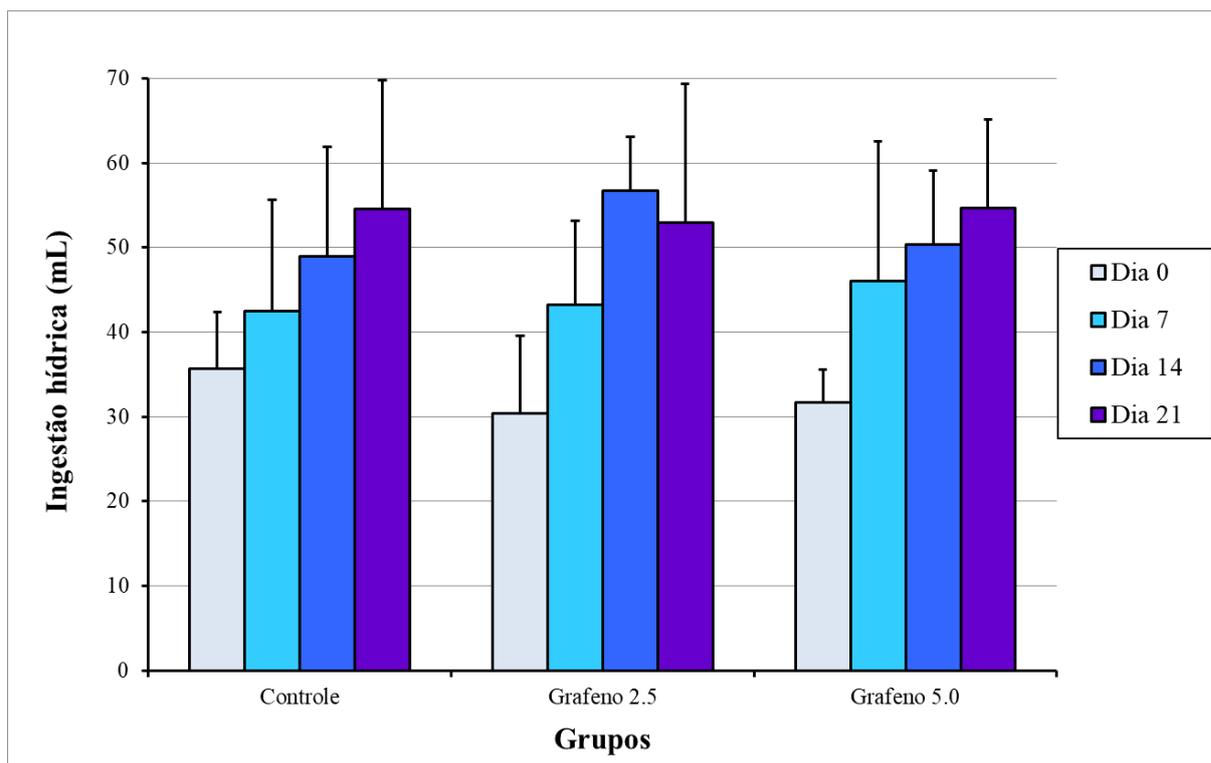


Figura 6: Consumo de água de ratas administradas com nanopartículas de óxido de grafeno ou água durante a prenhez.

Dados apresentados como média e desvio-padrão (n = 12 animais/grupo).

p > 0,05 – sem diferença estatística (ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey).

A Figura 7 mostra o peso relativo dos órgãos analisados (coração, fígado, baço e rins). A administração do óxido de grafeno, nas duas doses, não alterou o peso relativo de nenhum dos órgãos comparado ao grupo controle.

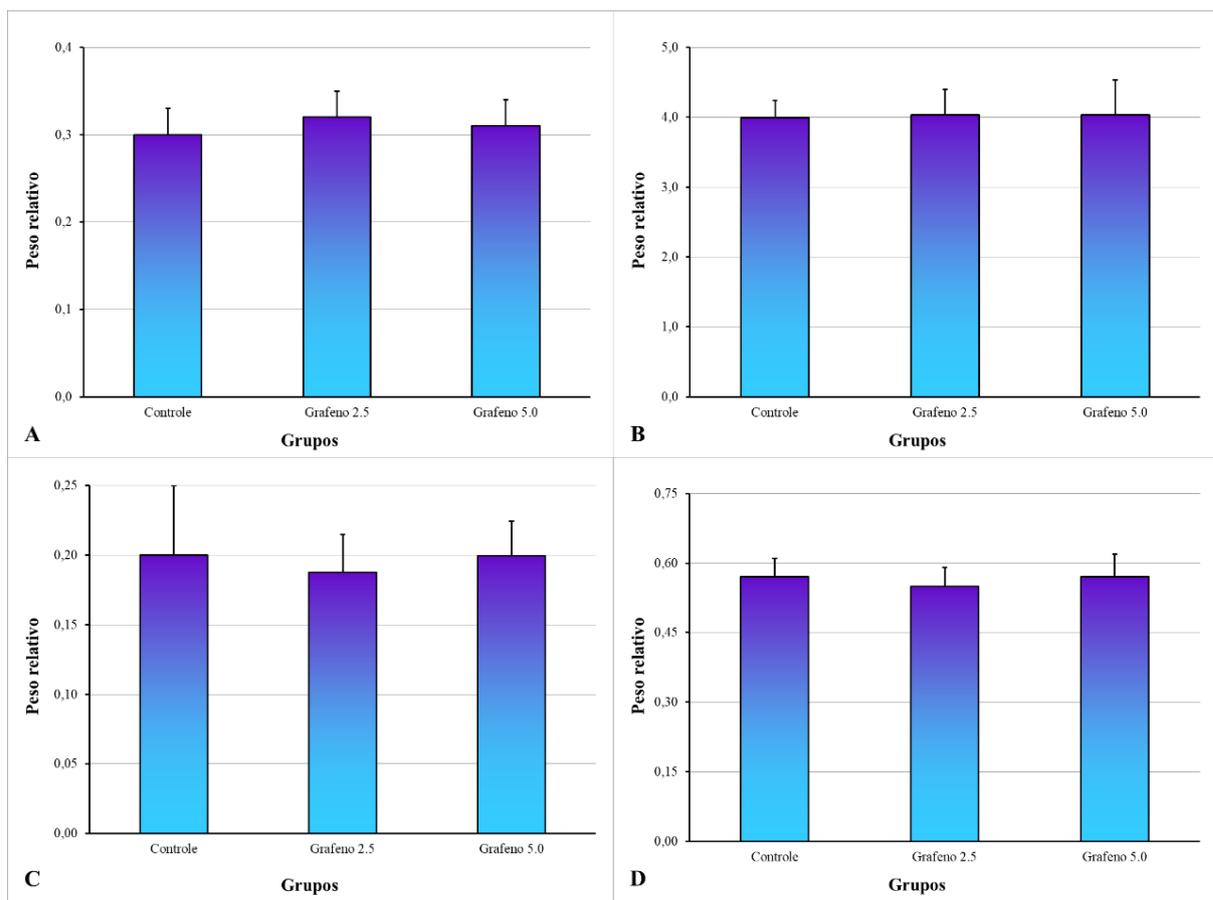


Figura 7: Peso relativo (g/100 g) do coração (A), fígado (B), baço (C) e rins (D) de ratas administradas com nanopartículas de óxido de grafeno ou água durante a prenhez.

Dados apresentados como média e desvio-padrão ($n = 12$ animais/grupo).

$p > 0,05$ – sem diferença estatística (ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey).

Já a Figura 8 mostra as análises bioquímicas realizadas (proteínas totais, AST, ALT, ureia e creatinina). Não houve diferença significativa entre os grupos administrados com o óxido de grafeno e o grupo controle, em relação aos parâmetros analisados.

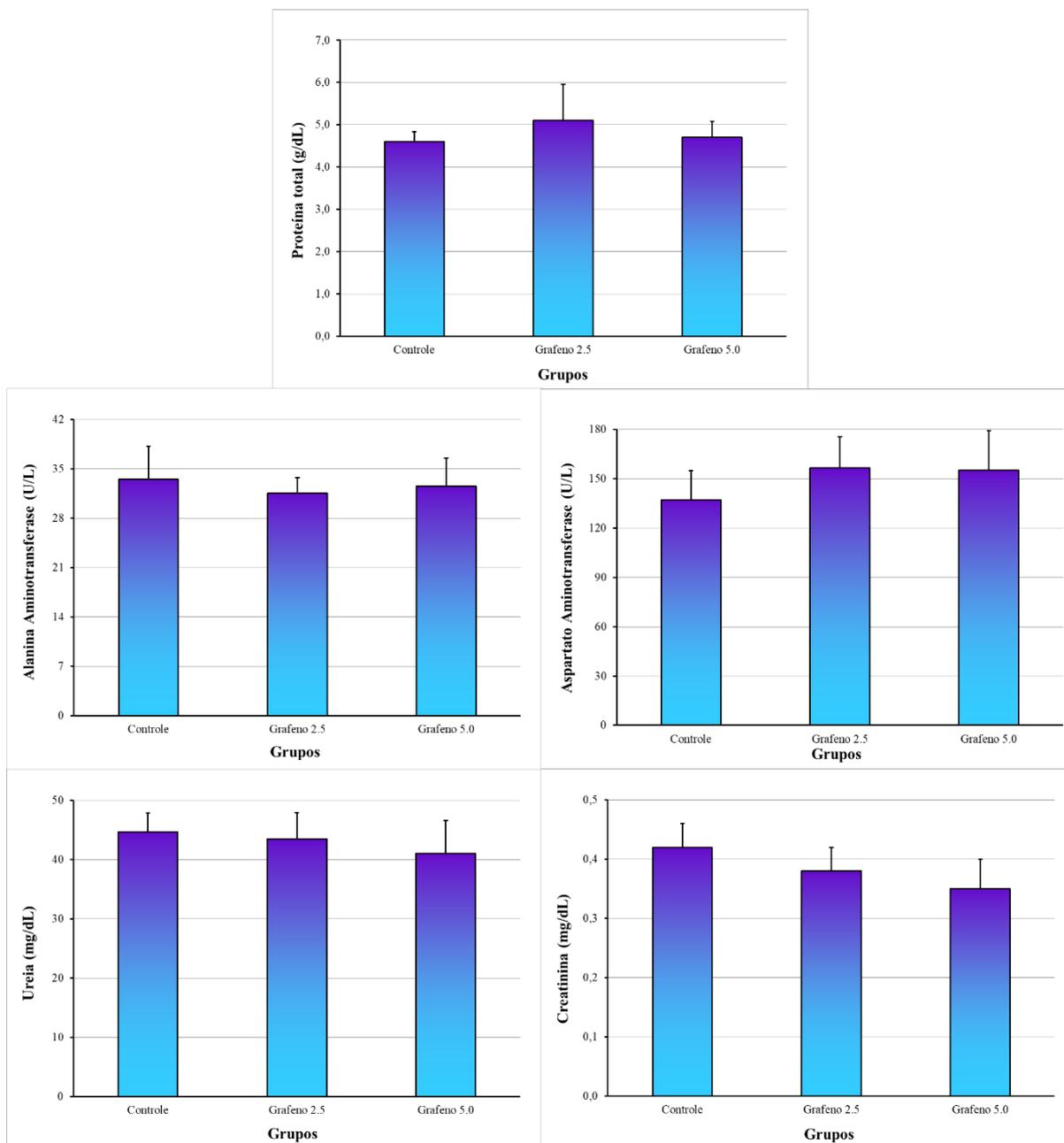


Figura 8: Análises bioquímicas proteínas totais, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), ureia e creatinina de ratas administradas com nanopartículas de óxido de grafeno ou água durante a prenhez.

Dados apresentados como média e desvio-padrão ($n = 12$ animais/grupo).

$p > 0,05$ – sem diferença estatística (ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Tukey).

5. DISCUSSÃO

Devido as suas características químicas e físicas, o óxido de grafeno é um nanomaterial promissor com inúmeras aplicações e que tem contribuído em diversos campos (MOUSAVI *et al.*, 2019; DE MORAES *et al.*, 2015; CHNG *et al.*, 2014). Com o crescente uso dessa nanopartícula, surge a necessidade de estudos utilizando modelo animal para estabelecer doses seguras, diminuindo os possíveis riscos para a saúde humana (GUO *et al.*, 2022). Além disso, é imprescindível investigar a segurança do uso do óxido de grafeno durante o período gestacional, já que as nanopartículas podem, além de induzir toxicidade materna, atravessar a membrana placentária e induzir toxicidade fetal (LIU *et al.*, 2021).

Nesse estudo foi investigado a toxicidade do uso oral do óxido de grafeno em ratas prenhes, com o intuito de averiguar a segurança da nanopartícula durante o período gestacional. Foram analisados peso corpóreo, consumo de água e ração e peso dos órgãos vitais maternos. Dentre as análises bioquímicas foram realizadas dosagens de creatinina, ureia, ALT, AST e proteínas totais. Ao final do estudo, foi constatado que nenhum dos parâmetros analisados apresentou diferença entre os grupos que receberam o óxido de grafeno (2,5 e 5 mg/kg) e o grupo que recebeu água. Para esse trabalho foram estabelecidas doses de 2,5 mg/kg e 5 mg/kg com base no estudo de Liu (2021), no qual as maiores doses de 10 mg/kg e 40 mg/kg induziram complicações na prenhez de camundongos, enquanto a menor dose de 2 mg/kg não apresentou alterações significativas.

Ao longo dos 21 dias de administração do nanomaterial, os animais foram observados e não apresentaram sinais e sintomas que indicassem toxicidade. Alguns sinais clínicos indicativos de toxicidade em estudos com animais são piloereção, olhos semicerrados e diminuição da atividade motora (SILVA *et al.*, 2021). A avaliação do peso corpóreo e do consumo de água e ração são outros parâmetros que comumente se apresentam alterados quando um tratamento induz toxicidade (LIU *et al.*, 2021; BEYER *et al.*, 2010; RAZA *et al.*, 2002). No presente estudo, não houve diferença de peso corpóreo e no consumo de água e ração entre os grupos experimentais nos diferentes momentos da prenhez, sugerindo que a administração não induziu toxicidade materna.

Um aumento progressivo de ganho de peso materno durante a gravidez é esperado, já que nesse período ocorrem o desenvolvimento fetal e dos anexos

embrionários, e adaptações do organismo materno, sendo caracterizadas por anabolismo no início e catabolismo no final da gestação (RUDGE *et al.*, 2000). Entretanto, a administração de algumas substâncias pode ocasionar toxicidade materna e interferir nessa progressão de peso materno. Segundo a Environmental Protection Agency (US EPA, 1996), a redução na massa corporal ou redução no ganho de massa pode refletir uma variedade de respostas, incluindo anorexia induzida pelo tratamento ou toxicidade sistêmica. Além disso, no período gestacional, diminuição no peso ou na quantidade de fetos também pode afetar o ganho de peso materno. No presente estudo não houve alteração do consumo alimentar e hídrico, e no peso e quantidade de fetos vivos (dados não-mostrados) nos animais que receberam óxido de grafeno, o que acarretou em ganho de peso materno similar em todos os grupos.

Alterações no peso dos órgãos vitais também são indicativos de toxicidade indireta de um tratamento (RAZA *et al.*, 2002). Aumento do peso do fígado e/ou dos rins poderia indicar alterações no funcionamento desses órgãos, uma vez que são os mais afetados quando um tratamento causa toxicidade em animais experimentais (MAALEJ *et al.*, 2017). Além disso, os nanomateriais ao entrar na corrente sanguínea e, devido ao seu tamanho, podem se acumular em algum órgão, sendo o fígado o principal alvo (GAISER *et al.*, 2013). Na avaliação do peso do fígado, coração, baço e rins não houve diferença entre os grupos experimentais, indicando que a nanopartícula não afetou a massa desses órgãos.

Para avaliar o estado fisiológico dos animais foi realizado o perfil bioquímico do sangue, que possibilita verificar se houve interferência na administração da substância utilizada (MESSIAS *et al.*, 2010). Dentre os parâmetros bioquímicos, a dosagem de proteínas totais não apresentou diferença entre os grupos experimentais. As proteínas totais são essenciais para a manutenção da pressão osmótica e têm diversas funções no organismo, o que inclui ação enzimática, hormonal, autoimune, fatores de coagulação, e de transporte através de suas ligações no sangue com substâncias hormonais ou não-hormonais. Sua dosagem fornece um bom parâmetro para a avaliação do estado nutricional e para a presença de alterações sistêmicas severas (NAOUM *et al.*, 2007).

As dosagens de creatinina e ureia plasmáticas também fornecem informações fisiológicas relevantes, já que são amplamente utilizadas como indicadores de alteração na função renal (KOVALČÍKOVÁ *et al.*, 2018). A creatinina é um metabólito da fosfocreatina e em circunstâncias fisiológicas é constantemente excretado pelos rins. A

ureia é produzida pelo fígado e também excretada pelos rins. Entretanto, o uso da creatinina e da ureia como biomarcadores de função renal é limitado, visto que, dependendo da proporção da lesão renal pode não ocorrer alteração nos níveis séricos da creatinina (KASHANI *et al.*, 2020; WAIKAR & BONVENTRE, 2007). Para isto, estudos histológicos do tecido renal podem fornecer mais dados sobre os efeitos de substâncias sobre os rins. A administração da nanopartícula não alterou os níveis séricos de creatinina e ureia. Aliado a este resultado, o peso dos rins não apresentou alteração entre os grupos, sendo indicativo que a administração de óxido de grafeno não causou comprometimento da função renal. Como os resultados mostram que não houve alteração renal, optamos por não fazer a histologia dos rins.

As enzimas transaminases hepáticas (ALT e AST) são comumente usadas na prática clínica, principalmente para identificar alterações no funcionamento do fígado. Ambas estão amplamente distribuídas nos tecidos, principalmente naqueles com alta atividade metabólica, como o fígado, coração, músculo e cérebro e uma pequena quantidade dessas enzimas é derramada no plasma sanguíneo. A ALT tem sua origem predominantemente citoplasmática, fazendo com que se eleve rapidamente após lesão no fígado, sendo um sensível marcador de lesão celular hepática (NAOUM *et al.*, 2007). Quando ocorre uma lesão no fígado, os hepatócitos danificados liberam ALT e AST no espaço extracelular e aumentam os níveis séricos dessas enzimas (OZER *et al.*, 2008). Não houve alterações estatísticas nos níveis séricos das transaminases hepáticas e nem no peso relativo do fígado, contribuindo com a hipótese que a nanopartícula não induziu alterações hepáticas.

As limitações desse estudo foram avaliar a segurança da administração da nanopartícula apenas materna, já que perdas pré e pós-implantação também seriam indicativos que a administração do óxido de grafeno induziu toxicidade materna (DAMASCENO *et al.*, 2008). Entretanto, esses parâmetros estão sendo investigados em outros trabalhos colaborativos do grupo de pesquisa. Além disso, a avaliação de poucos parâmetros bioquímicos, já que outras dosagens poderiam acrescentar mais informações na avaliação do estado fisiológico dos animais. Já os pontos fortes desse estudo foram contribuir com as pesquisas que investigam a segurança das nanopartículas no período gestacional, além de fornecer a hipótese que administração oral do óxido de grafeno é segura nas doses testadas. Em trabalhos futuros esses dados podem ajudar a estabelecer doses seguras do uso oral dessa nanopartícula no período gestacional.

6. CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que a administração oral do óxido de grafeno durante a prenhez, nas doses de 2,5 e 5,0 mg/kg, não apresentou toxicidade materna. Isso indica que nessas condições seu uso é seguro durante a gestação.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFIUNE, L. A. F. et al. Beneficial effects of *Hibiscus rosa-sinensis* L. flower aqueous extract in pregnant rats with diabetes. **Plos One**, v. 12, n. 6, p. e0179785, 2017.
- BEYER, B. K. et al. ILSI/HESI maternal toxicity workshop summary: maternal toxicity and its impact on study design and data interpretation. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 92, n. 1, p. 36–51, 2010.
- BIANCO, A. Graphene: Safe or Toxic? The Two Faces of the Medal. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 52, n. 19, p. 4986–4997, 2013.
- BOTELLA, P. et al. Surface-modified silica nanoparticles for tumor-targeted delivery of camptothecin and its biological evaluation. **Journal of Controlled Release**, v. 156, n. 2, p. 246–257, 2011.
- BROHI, R. D. et al. Toxicity of nanoparticles on the reproductive system in animal models: a review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 606, 2017.
- CHNG, E. L. K.; CHUA, C. K.; PUMERA, M. Graphene oxide nanoribbons exhibit significantly greater toxicity than graphene oxide nanoplatelets. **Nanoscale**, v. 6, n. 18, p. 10792–10797, 2014.
- CORNU, R.; BÉDUNEAU, A.; MARTIN, H. Ingestion of titanium dioxide nanoparticles: a definite health risk for consumers and their progeny. **Archives of Toxicology**, v. 96, n. 10, p. 2655–2686, 2022.
- DE MORAES, A. C. M. et al. Graphene oxide-silver nanocomposite as a promising biocidal agent against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 6847–6861, 2015.
- DAMASCENO, D. C., KEMPINAS, W. G., VOLPATO, G. T., CONSONI, M., RUDGE, M. V. C., PAUMGARTTEN, F. J. R. **Anomalias congênitas: estudos experimentais**. Belo Horizonte: Coopmed, 2008.
- DRÉNO, B. et al. Safety of titanium dioxide nanoparticles in cosmetics. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology: JEADV**, v. 33 Suppl 7, p. 34–46, 2019.
- DZIEWIĘCKA, M. et al. Short-term in vivo exposure to graphene oxide can cause damage to the gut and testis. **Journal of Hazardous Materials**, v. 328, p. 80–89, 2017.
- FADEEL, B. et al. Safety Assessment of Graphene-Based Materials: Focus on Human Health and the Environment. **ACS Nano**, v. 12, n. 11, p. 10582–10620, 2018.

- GAISER, B. K. et al. Effects of silver nanoparticles on the liver and hepatocytes in vitro. **Toxicological Sciences**, v. 131, n. 2, p. 537–547, 2013.
- GRILLI, F.; PARISA HAJIMOHAMMADI GOHARI; ZOU, S. Characteristics of graphene oxide for gene transfection and controlled release in breast cancer cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 12, p. 6802–6802, 2022.
- GUO, Q. et al. Graphene oxide toxicity in W1118 flies. **Science of The Total Environment**, v. 805, p. 150302–150302, 2022.
- GWINN, M. R.; VALLYATHAN, V. Nanoparticles: Health Effects—Pros and Cons. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, n. 12, p. 1818–1825, 2006.
- HADRUP, N. et al. Pulmonary toxicity of silver vapours, nanoparticles and fine dusts: A review. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 115, p. 104690, 2020.
- HORTA, R. A. DOS S.; DE PAULA, J. N.; CALIXTO, J. M. F. Avaliação do perfil térmico e calor de hidratação de pastas de cimento com adição de óxido de grafeno. **Matéria (Rio de Janeiro)**, v. 27, p. e20220151, 2022.
- JAURIS, I.M., *et al.* Adsorption of sodium diclofenac on graphene: a combined experimental and theoretical study. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 18, n.3, p. 1526-1536, 2016.
- JOHNSTON, H. et al. Investigating the relationship between nanomaterial hazard and physicochemical properties: Informing the exploitation of nanomaterials within therapeutic and diagnostic applications. **Journal of Controlled Release**, v. 164, n. 3, p. 307–313, 2012.
- KASHANI, K.; ROSNER, M. H.; OSTERMANN, M. Creatinine: From physiology to clinical application. **European Journal of Internal Medicine**, v. 72, p. 9–14, 2020.
- KOVALČÍKOVÁ, A. et al. Salivary creatinine and urea are higher in an experimental model of acute but not chronic renal disease. **Plos One**, v. 13, n. 7, p. e0200391, 2018.
- LEAL-SILVA, T., et al. Toxicological effects of the *Morinda citrifolia* L. fruit extract on maternal reproduction and fetal development in rats. **Drug and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 609-615, 2023.
- LI, J.-L. et al. A review of optical imaging and therapy using nanosized graphene and graphene oxide. **Biomaterials**, v. 34, n. 37, p. 9519–9534, dez. 2013.

- LIU, Y. et al. Development of high-drug-loading nanoparticles. **ChemPlusChem**, v. 85, n. 9, p. 2143–2157, 2020.
- LIU, X. et al. Altered gut microbiome accompanying with placenta barrier dysfunction programs pregnant complications in mice caused by graphene oxide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 207, p. 111143, 2021.
- MAALEJ, A. et al. Olive phenolic compounds attenuate deltamethrin-induced liver and kidney toxicity through regulating oxidative stress, inflammation and apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, n. Pt A, p. 455–465, 2017.
- MESSIAS, J.B.; et al. Avaliação dos parâmetros hematológicos e bioquímicos de ratas no segundo terço da gestação submetidas à ação do extrato metanólico de *Cereus jamaicaru* DC., Cactaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. v.20, n.4, p.478-483, ago./set. 2010.
- MISSAOUI, W. N.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Toxicological status of nanoparticles: What we know and what we don't know. *Chemico-Biological Interactions*, v. 295, p. 1–12, 2018.
- MISSAOUI, W. N.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Safe nanoparticles: are we there yet? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 385, 2020.
- MOUSAVI, S. M. et al. Graphene nano-ribbon based high potential and efficiency for DNA, cancer therapy and drug delivery applications. **Drug Metabolism Reviews**, v. 51, n. 1, p. 91–104, 2019.
- NAOUM, P.; BIOQUÍMICOS, O. [s.l: s.n.]. Disponível em: <https://www.ciencianews.com.br/arquivos/ACET/IMAGENS/livros/aceso_gratuito/Livro_completo%20-%20doencas-que-alteram-o-exame-bioquimico.pdf>.
- NIRMAL, N. K.; AWASTHI, K. K.; JOHN, P. J. Hepatotoxicity of graphene oxide in Wistar rats. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 28, n. 34, p. 46367–46376, 2020.
- OLIVEIRA, M.M., ZARDIN, G.J.A. Nanoestrutura de Carbono (Nanotubos, Grafeno): Quo Vadis? **Química Nova**, v.36, p. 1533-1539, 2013.
- OZER, J. et al. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245, n. 3, p. 194–205, 2008.
- PATLOLLA, A. K.; RONDALPH, J.; TCHOUNWOU, P. B. Biochemical and histopathological evaluation of graphene oxide in Sprague-Dawley rats. **Austin Journal of Environmental Toxicology**, v. 3, n. 1, p. 1021, 2017.

- PURI, A. et al. Lipid-Based Nanoparticles as Pharmaceutical Drug Carriers: From Concepts to Clinic. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 26, n. 6, p. 523–580, 2009.
- RAZA, M., OA, SHABANAH., MAJED, A. L. Effect of prolonged vigabatrin treatment on hematological and biochemical parameters in plasma, liver and kidney of swiss albino mice. **Scientia Pharmaceutica**, v. 70, p. 135-145, 2002.
- RUDGE, M.V.C.; BORGES, V.T.M.; CALDERON, I.M.P. Adaptação do organismo materno à gravidez. In: NEME, B. *Obstetrícia básica*. São Paulo: Sarvier, p. 42-51, 2000.
- SILVA, A. V. et al. Associations between clinical signs and pathological findings in toxicity testing. **ALTEX**, v. 38, n. 2, p. 198-214, 2021.
- SOUMYA, R. S.; RAGHU, K. G. Recent advances on nanoparticle-based therapies for cardiovascular diseases. **Journal of Cardiology**, v. 81, n. 1, p. 10-18, 2023.
- U.S. ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY (EPA). Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment. **Federal Register**, v.61 n.212, p.56274-56322. Washington, 1996.
- WAIKAR, S. S.; BONVENTRE, J. V. Biomarkers for the diagnosis of acute kidney injury. **Current Opinion in Nephrology and Hypertension**, v. 16, n. 6, p. 557–564, 2007.
- WILLHITE, C. C. et al. Systematic review of potential health risks posed by pharmaceutical, occupational and consumer exposures to metallic and nanoscale aluminum, aluminum oxides, aluminum hydroxide and its soluble salts. **Critical Reviews in Toxicology**, v. 44, n. sup4, p. 1–80, 2014.
- YANG, W. et al. Nanoparticle Toxicology. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 61, n. 1, p. 269–289, 2021.
- YOHAN, D.; CHITHRANI, B. D. Applications of Nanoparticles in Nanomedicine. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 10, n. 9, p. 2371–2392, 2014.
- XU, S.; ZHANG, Z.; CHU, M. Long-term toxicity of reduced graphene oxide nanosheets: Effects on female mouse reproductive ability and offspring development. **Biomaterials**, v. 54, p. 188–200, 2015.