



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE – FURG  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PPGCF

**$\alpha$ -Ácido lipóico e óxido de grafeno:  
Interações, citotoxicidade *in vitro* e quimioproteção**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
como requisito parcial para obtenção do  
título de Mestre.

**Discente:** Biólogo Alexandre Matos Bitencourt

**Orientador:** Professor Dr. José Maria Monserrat

Rio Grande, 26 de Maio de 2017

*O Ka é como o vento, leva o que quer, sem se importar com o apelo de nenhum homem.*

-A Torre Negra.

## **Agradecimentos**

Toda jornada tem seu fim, e a minha jornada em Rio Grande se encerra com a entrega desta dissertação. Entre altos e baixos, risadas e preocupações, esse período (que começou na graduação com a tão sofrida saída de casa para morar longe da família até esse momento da conclusão do mestrado) foi preenchido com muitos momentos que levarei para sempre na memória. Conheci pessoas maravilhosas e presenciei e vivi muitas coisas que me fizeram crescer tanto profissionalmente como pessoalmente. Agradeço minha família que sempre me apoiou incondicionalmente do momento mais feliz ao mais difícil, sem esse suporte nada do que fiz seria possível. A minha namorada, que foi o melhor presente que Rio Grande poderia me dar e que agora seguimos na mesma direção rumo ao nosso futuro, sem ela todo esse tempo não teria valido a pena. Aos meus amigos, que partilharam das dádivas e fracassos ao longo do caminho, chegando à conclusão que quando se tem amigos, suportar tudo vira apenas um detalhe em meio a momentos que serão sempre memoráveis. Ao meu orientador, que realmente sabe o que é importante na ciência e sabe como a liberdade de pensamento é fundamental para estimular o melhor caminho para se tornar um cientista e uma pessoa melhor, além de sempre estar disposto a ajudar (nunca se deixe desanimar nesse caminho da ciência, pois sua influência e paixão pelo que faz muda a vida de seus alunos, falo por experiência própria... seja sempre um professor sol!). E a todas as pessoas que cruzaram meu caminho nestes 6 anos e que mudaram de algum jeito minha vida. Nomes não são necessários, e palavras não bastam, pois a importância e o carinho que sinto por cada um vai além do que qualquer palavra poderia expressar, então sempre que lembrarem de algum momento feliz que vivemos juntos, é esse sentimento que traduz tudo isso. Não me arrependo de nada e realmente faria tudo de novo e por isso meu sincero e mais humilde obrigado. Até logo, e novamente, obrigado pelos peixes!!!!

## Sumário

<b><math>\alpha</math>-Ácido lipóico e óxido de grafeno reduzido: Interações, citotoxicidade <i>in vitro</i> e quimioproteção</b> .....	
Resumo geral.....	6
Introdução geral .....	7
A vida: sobre oxigênio e antioxidantes .....	7
Antioxidantes e espécies reativas: a perspectiva revela o culpado.....	9
Antioxidantes não enzimáticos: lembrando Paracelso .....	11
Ácido lipóico: antioxidante ou pró-oxidante? .....	12
O cérebro e suas barreiras .....	14
Neurônios: cultura celular e defesas antioxidantes .....	15
Nanoescala e a nanotoxicologia .....	16
Óxido de grafeno reduzido: características e aplicações.....	17
Ácido lipóico e óxido de grafeno .....	18
----Manuscrito----.....	19
Title page.....	21
Abstract .....	21
Introduction .....	21
Materials and methods .....	23
Preparation of rGO and AL.....	23
Reduced graphene oxide characterization.....	23
Cell culture.....	24
Experimental procedures.....	24
Cell viability (MTT assay) .....	24
Intracellular ROS quantification .....	25
Antioxidant capacity against peroxide (ACAP).....	25
Cellular oxygen consumption.....	25
Interference assay.....	26
Statistical analysis .....	26
Results .....	27
Reduced graphene oxide characterization.....	27
Cell viability.....	28
Intracellular ROS quantification .....	30
Antioxidant capacity against peroxides.....	33

Oxygen consumption .....	35
Discussion .....	37
Conclusions .....	41
References .....	41
Discussão geral .....	47
Referências bibliográficas .....	49

1

2

### 3 **Resumo geral**

4

5 O óxido de grafeno (OG) é um nanomaterial amplamente estudado para atuar no  
6 carregamento de fármacos devido aos grupos funcionais que possui em sua superfície,  
7 gerando boa solubilidade em água e biocompatibilidade. A investigação da toxicidade do  
8 OG torna-se importante para definir se este nanomaterial é seguro para utilização em  
9 aplicações biológicas e para elucidar seus possíveis efeitos nos organismos. Os  
10 antioxidantes são moléculas que atuam auxiliando e estimulando o sistema de defesa  
11 antioxidante de diversos tipos celulares a lidar com os efeitos das ERO e prevenindo  
12 assim o estresse oxidativo. O  $\alpha$ -ácido lipoico é um antioxidante que possui capacidade  
13 de atuar tanto em meio hidrofílico quanto em meio lipofílico, neutralizando espécies  
14 reativas de oxigênio (ERO) e estimulando o sistema de defesa antioxidante, tornando-se  
15 ideal para contrabalancear efeitos pró-oxidantes de outras substâncias. Logo, este estudo  
16 avaliou a citotoxicidade do OG associado a produção de ERO e interferência no  
17 metabolismo e os possíveis efeitos quimioprotetores do AL em relação ao OG em células  
18 HT-22. As concentrações utilizadas foram 10, 50 e 100  $\mu\text{g/ml}$  (OG), 5, 25 e 50  $\mu\text{M}$  (AL)  
19 e 50  $\mu\text{g/ml}+25 \mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{g/ml}+25 \mu\text{M}$  (OG+AL). Os ensaios foram realizados após 2 e  
20 24 horas de exposição. A caracterização do OG foi realizada utilizando microscopia  
21 eletrônica de varredura (MEV), microscopia eletrônica de transmissão (TEM) e  
22 espectroscopia eletrônica dispersiva (EED). Os parâmetros foram avaliados através dos  
23 ensaios de viabilidade (MTT), quantificação de ERO intracelular, capacidade  
24 antioxidante contra radicais peroxil (ACAP) e consumo de oxigênio. Os resultados  
25 mostraram que o OG aumentou a produção de ERO, mas não causou citotoxicidade. Por

26 outro lado, quando co-exposto com AL, o OG diminuiu a viabilidade celular e não  
27 demonstrou efeito pró-oxidante. Esses resultados indicam que a citotoxicidade do OG  
28 não depende apenas da produção de espécies reativas, mas também pode interferir no  
29 metabolismo. Além disso, o modo de preparo e manuseio deste nanomaterial pode  
30 influenciar em possíveis efeitos tóxicos.

31 **Palavras-chave:** nanomaterial de carbono, antioxidante, neurônios hipocampais, cultura  
32 celular, microscopia

33

#### 34 **Introdução geral**

##### 35 *A vida: sobre oxigênio e antioxidantes*

36 Em uma infinidade de universos possíveis, apenas uma dentre bilhões de galáxias  
37 existentes com seus bilhões de estrelas e planetas (Gott *et al.*, 2005), possui um pequeno  
38 ponto azul que apresenta algo único (ou pelo menos até onde se tem notícia) que  
39 culminaria em toda a variedade de seres que se conhece, que ainda não se conhece e que  
40 já deixaram de existir. Eis que há cerca de 4 bilhões de anos, surge a vida (K. Lal, 2008).

41 Este pequeno ponto azul, que recebeu o nome de Terra, há pouco era apenas um caldeirão  
42 de materiais superaquecidos e gases tóxicos, mas de forma progressiva foi se tornando  
43 um ambiente menos extremo. Essa gradual mudança somada ao surgimento de água  
44 (Cleeves *et al.*, 2014) e matéria orgânica, criou o cenário propício para a hipótese da  
45 concepção da vida, mais especificamente no ambiente aquático (K. Lal, 2008).

46 Embora a vida estivesse modificando o ambiente, o planeta seguia sofrendo alterações  
47 em maior escala que pareciam indiferentes ao surgimento da vida. No entanto, esta sofria  
48 também suas próprias transformações seguindo os princípios básicos da física, química  
49 com inúmeras possibilidades prosperando enquanto outras inúmeras pereciam no

50 decorrer do tempo. Contudo, o surgimento do RNA e posteriormente o DNA (Gollihar *et*  
51 *al.*, 2014; Higgs *et al.*, 2014), permitiu que essas mudanças que prosperavam pudessem  
52 ser armazenadas e passadas adiante para a nova geração de células, criando uma espécie  
53 de memória da vida. A partir disso, a vida passou a seguir um novo padrão de mudanças  
54 que agora possuíam um código base e apresentavam características conservativas (Alberts  
55 *et al.*, 2014).

56 Uma nova gama de possibilidades surgiu a partir do DNA, porque novas mudanças  
57 geradas através de mutações se acumulavam no decorrer do tempo, dando origem a novas  
58 moléculas e novos mecanismos. As mutações podem ocorrer espontaneamente, devido as  
59 características químicas do DNA, porém, mutações ocorrem com mais frequência devido  
60 a ações causadas por elementos do próprio ambiente (Futuyama, 2002; Somers *et al.*,  
61 2012; D’Orazio *et al.*, 2013). No ambiente aquático, entende-se que as condições sempre  
62 foram variáveis, logo cada população de células sofria ações diferentes do ambiente e  
63 adquiria mutações variadas entre si, o que gerou uma variabilidade genética  
64 progressivamente maior e conseqüentemente aumentou a probabilidade de que a vida  
65 pudesse superar cada vez mais uma quantidade cada vez maior de adversidades, além de  
66 aumentar as populações em variedade e complexidade (Futuyama 2002; Alberts *et al.*,  
67 2015).

68 Após um longo tempo de mutações acumuladas e o aparecimento de organismos mais  
69 diversos e complexos, surgem os seres fotossintéticos. A partir deste momento, começa  
70 um período de aumento progressivo na quantidade de oxigênio tanto atmosférico quanto  
71 em ambientes aquáticos e cada vez mais a respiração aeróbica torna-se vantajosa em  
72 termos de produção de energia para organismos que pudessem utilizar o oxigênio para tal  
73 procedimento (Harrison *et al.*, 2010; Decker e van Holde, 2011). Alguns organismos  
74 continuaram restritos ou facultativos ao metabolismo anaeróbico, porém a maioria das



75 espécies se tornaram aeróbicas obrigatórias com o decorrer da evolução. Logo, a  
76 utilização do oxigênio forneceu um grande aumento na utilização de energia e no aumento  
77 da complexidade dos seres vivos, fazendo com que muitas características dos tecidos e  
78 sistemas que viriam a surgir no futuro estivessem intrinsecamente ligadas a utilização e  
79 transporte de oxigênio (Harrison *et al.*, 2010). No entanto, o oxigênio possui certa  
80 toxicidade, fazendo com que os organismos necessitassem também de proteção contra  
81 estes efeitos nocivos. Eis que com o tempo e muitas mutações (algumas delas certamente  
82 causadas pelo próprio oxigênio, que era formado em pequenas quantidades por fotólise  
83 da água), as defesas antioxidantes passaram a existir de modo primitivo e com o aumento  
84 abrupto de oxigênio, começam a sofrer uma seleção natural mais intensa, levando ao  
85 sistema de defesa antioxidante, onde tanto enzimas quanto substâncias não enzimáticas  
86 favorecessem a manutenção e proteção contra espécies reativas produzidas pelo próprio  
87 metabolismo ou decorrentes de uma possível situação de estresse oxidativo (Decker e van  
88 Holde, 2011). A enzima superóxido dismutase (SOD), é provavelmente uma das  
89 primeiras defesas antioxidantes que surgiu durante o processo evolutivo, pois está  
90 presente em todos os seres aeróbicos existentes (Decker e van Holde, 2011). As defesas  
91 antioxidantes são de extrema importância, não só para lidar com substâncias que venham  
92 a provocar a geração de espécies reativas de oxigênio (ERO), mas porque a mitocôndria  
93 é o principal sítio de produção dessas ERO como consequência da utilização do oxigênio  
94 na geração de energia e de algumas eventuais falhas no transporte de elétrons, causando  
95 o desvio destes elétrons durante seu transporte e gerando ERO (Hermes-Lima, 2004).

96

97 *Antioxidantes e espécies reativas: a perspectiva revela o culpado*

98

99 Atualmente, o sistema de defesa antioxidante é considerado um mecanismo  
100 regulatório que atua removendo parcialmente as ERO que são produzidas pelo próprio  
101 metabolismo celular e também pela ação de xenobióticos (Hermes-Lima e Zenteno-  
102 Savín, 2002; Pamplona e Constantine, 2011). Conceitos antigos mais simples, baseados  
103 na dualidade de que antioxidantes são substâncias altamente benéficas e pró-oxidantes  
104 são altamente maléficas, não condizem com os conhecimentos mais atuais. Entende-se  
105 atualmente que as ERO causam danos a estruturas como lipídios, proteínas e até mesmo  
106 o DNA (Hermes-Lima, 2004), porém, apenas em situações onde existe uma quantidade  
107 elevada de ERO no meio intracelular ou pela depleção de defesas antioxidantes, como  
108 ocorre em algumas patologias e naturalmente com o processo de envelhecimento (Liu,  
109 2008; Winterbourn, 2008). No entanto, a produção de espécies reativas é inerente ao  
110 metabolismo e em condições normais, as defesas celulares são capazes de neutralizá-las  
111 até suas respectivas concentrações fisiológicas, onde exercem sua importante função  
112 como moléculas sinalizadoras (Dickinson e Chang, 2011; Reczek e Chandel, 2015).

113 Esse estado fisiologicamente normal entre produção e degradação de ERO é  
114 essencial para manter o balanço entre reações de oxidação e redução (estado redox)  
115 favoráveis ao funcionamento dos mecanismos como a sinalização celular, que é  
116 importantíssima na regulação de processos como a síntese e metabolismo de proteínas,  
117 transcrição gênica, proliferação celular e apoptose (May *et al.*, 2006). O estado redox é  
118 definido principalmente pela relação de oxidação-redução dos pares redox intracelulares  
119 (Hermes-Lima, 2004; Packer e Cadenas, 2011). Estes pares redox são moléculas que  
120 possuem em sua composição grupos passíveis de oxidação, principalmente grupos tióis  
121 que atuam como doadores de elétrons, interceptando as ERO e posteriormente,  
122 retornando a sua configuração reduzida através de enzimas redutoras do sistema  
123 antioxidante (Forman *et al.*, 2014). No entanto, algumas proteínas não relacionadas às

124 defesas antioxidantes possuem aminoácidos como a cisteína. Esses aminoácidos podem  
125 ter os grupos tióis oxidados por moléculas pró-oxidantes e sofrer modificações  
126 estruturais, acarretando na perda ou alteração de função quando fazem parte da estrutura  
127 de proteínas e causando prejuízo para a célula (May *et al.*, 2006, 2007). Por outro lado,  
128 essa oxidação dos resíduos tióis pode ser útil para a regulação de atividades enzimáticas  
129 ou alterar a estrutura de proteínas acopladas a moléculas sinalizadoras, acionando vias de  
130 sinalização ou levando a degradação. A proteína Keap 1 por exemplo, é normalmente  
131 associada ao fator de transcrição Nrf2 e favorece sua ubiquitinação e conseqüentemente  
132 sua degradação, porém, quando seus resíduos de cisteína são oxidados, a Keap 1 não  
133 consegue mais “capturar” Nrf2 e permite que ele atue no núcleo aumentando a transcrição  
134 de genes ligados ao sistema de defesa antioxidante e enzimas de fase 2 (Shay *et al.*, 2012;  
135 Forman *et al.*, 2014). Visto isso, moléculas que atuam direta ou indiretamente no  
136 ambiente redox celular tornam-se um fator importante na regulação de processos  
137 biológicos que podem ser alterados no ambiente intracelular.

138

### 139 *Antioxidantes não enzimáticos: relembando Paracelso*

140

141 Diversos organismos possuem a capacidade de sintetizar alguns antioxidantes não  
142 enzimáticos (endógenos), mas muitos são obtidos de fontes externas (exógenas), através  
143 da dieta. Após a descoberta do potencial antioxidante de diversas substâncias, houve uma  
144 tendência prematura de suplementação alimentar com altas doses de antioxidantes. Com  
145 o passar do tempo, novos estudos revelaram que a visão simplista da época não condizia  
146 com a complexa realidade onde, diferentes antioxidantes desempenham diferentes  
147 funções e interagem de diferentes formas com componentes celulares, além de  
148 demonstrar a real importância da concentração utilizada (Guttridge e Halliwell, 2010;

149 Forman *et al.*, 2014). De fato, a capacidade de sequestrar ou neutralizar espécies reativas  
150 era considerada a única função que um bom antioxidante deveria apresentar. Porém,  
151 muitos antioxidantes administrados em altas concentrações acabaram demonstrando a  
152 capacidade de desregular vias de sinalização redox e até mesmo tornar-se pró-oxidantes  
153 sob determinadas situações, muitas vezes gerando estresse oxidativo e causando danos a  
154 diversas estruturas celulares (Moini *et al.*, 2002; Çakatay, 2005; Guterridge e Halliwell,  
155 2010; Kütter *et al.*, 2014). Com o avanço do conhecimento, o termo antioxidante foi  
156 sendo cada vez mais refinado, levando em consideração as interações com as vias de  
157 sinalização e com outras substâncias intracelulares, como os metais de transição.  
158 Características como absorção rápida e eficiente pelo sistema digestório e atuação em  
159 diferentes tipos de meios (hidrofílico, lipofílico ou ambos) passaram a ser levadas em  
160 conta, além da compreensão que diferentes concentrações podem causar efeitos  
161 diversificados (Guterridge e Halliwell, 2010; Day, 2013; Forman *et al.*, 2014).

162

### 163 *Ácido lipóico: antioxidante ou pró-oxidante?*

164

165 O  $\alpha$ -ácido lipóico (AL) é um antioxidante derivado do ácido octanóico e contém em sua  
166 estrutura um anel de tiolano com uma ponte dissulfeto que une os carbonos 6 e 8 (May *et*  
167 *al.*, 2007) (Figura 1).

168



169 **Figura 1. Estrutura molecular do ácido lipóico (a) e sua forma reduzida: ácido dihidrolipóico (b).**

170 **Fonte: <http://qint.sbq.org.br>**

171 Essas características conferem ao AL uma rápida absorção e um forte potencial redutor  
172 quando está em sua forma reduzida, o ácido dihidrolipoico (DHAL) (Jones *et al.*, 2002;  
173 Packer e Cadenas, 2011; Rochette *et al.*, 2013; Kütter *et al.*, 2014). A redução do AL ao  
174 DHAL é realizada por enzimas que utilizam NADH e NAD(P)H como cofator (May *et*  
175 *al.*, 2006, 2007; Rochette *et al.*, 2013) o que implica diretamente na competição pela  
176 utilização do NADH e NAD(P)H por outras enzimas do metabolismo, incluindo a  
177 reciclagem de substratos oxidados das defesas antioxidantes. Porém, este gasto de NADH  
178 e NAD(P)H é compensado pela contribuição do DHAL para a reciclagem de outros  
179 antioxidantes como a vitamina C e vitamina E, aumentando níveis internos de glutathione  
180 reduzida (GSH) e auxiliando na regulação de fatores de transcrição e outras proteínas  
181 importantes para o estado redox intracelular (Shay *et al.*, 2009; Packer e Cadenas, 2011).

182 Outras propriedades do AL incluem atuar como quelante de metais e supressão de radicais  
183 livres, agindo de forma antagonista às causas do estresse oxidativo (May *et al.*, 2007;  
184 Shay *et al.*, 2009; Packer e Cadenas, 2011; Rochette *et al.*, 2013; Kütter *et al.*, 2014;  
185 Shinto *et al.*, 2014). O AL é naturalmente sintetizado nos tecidos (Hagen *et al.*, 1999;  
186 Mayr *et al.*, 2014), porém a concentração produzida fisiologicamente, na maioria das  
187 vezes, é direcionada para utilização como cofator de desidrogenases mitocondriais  
188 (Lester Reed, 2001; Packer & Cadenas, 2011; Li *et al.*, 2013; Mayr *et al.*, 2014), tornando  
189 irrelevante sua atuação como antioxidante. Sendo assim, a suplementação adequada  
190 apresenta maior efetividade e é a forma mais utilizada nas pesquisas, sendo responsável  
191 pela maior parte das informações geradas nos estudos das propriedades deste antioxidante  
192 (Shay *et al.*, 2009, Shinto *et al.*, 2014), principalmente em aplicações clínicas (Basu *et*  
193 *al.*, 2014, Mauro *et al.*, 2014), melhora de defesas antioxidantes e neuroproteção (Pirlich  
194 *et al.*, 2002; Kleinkauf-Rocha *et al.*, 2013). Porém, em determinadas concentrações o  
195 DHAL pode exercer efeitos pró-oxidantes a partir da interação com Fe<sup>3+</sup> (Çatakay, 2006;

196 Kütter *et al.*, 2014), gerando radicais hidroxila (HO·) que são altamente reativos e  
197 relacionados à propagação de peroxidação lipídica e danos oxidativos em diversas  
198 estruturas (Hermes-Lima, 2004; Rochette *et al.*, 2013; Forman *et al.*, 2014).

199 As características anfipáticas permitem que o AL seja suplementado via dieta e consiga  
200 alcançar órgãos que possuem uma maior seletividade em seu ambiente extracelular,  
201 possuindo as chamadas barreiras anatômicas (Panigrahi *et al.*, 1996; Arivazhagan *et al.*,  
202 2002). No entanto, apenas uma pequena fração da concentração de AL ingerida através  
203 da dieta consegue efetivamente ultrapassar essas barreiras anatômicas e agir no tecido  
204 alvo (Panigrahi *et al.*, 1996; Arivazhagan *et al.*, 2002; Shay *et al.*, 2009).

205

#### 206 ***O cérebro e suas barreiras***

207

208 Envolvendo o sistema nervoso central (especificamente os vasos sanguíneos no SNC),  
209 existe uma complexa associação de células, que constituem a barreira hematoencefálica,  
210 a qual aumenta a seletividade de substâncias advindas da circulação sanguínea,  
211 impedindo que uma variedade de moléculas e microrganismos interajam com o tecido  
212 nervoso (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001). Essa seletividade é uma grande vantagem  
213 fisiológica, porém, de um ponto de vista farmacológico acaba se transformando em  
214 desvantagem, dificultando a ação de diversos fármacos e substâncias possivelmente  
215 benéficas. A descoberta de novos materiais com possíveis aplicabilidades biológicas  
216 trouxe novas possibilidades pois, esses materiais possuem características únicas que  
217 permitem a interação com estruturas biológicas e melhor difusão por membranas  
218 celulares, sendo ideais para a liberação gradativa de fármacos e outras substâncias com  
219 alta especificidade pelas células-alvo, inclusive em tecidos que possuem alta seletividade  
220 (Hao *et al.*, 2009, Rosarin *et al.*, 2012).

221

222 *Neurônios: cultura celular e defesas antioxidantes*

223

224 Neurônios são células que constituem o sistema nervoso e possuem capacidade de  
225 transmitir impulsos elétricos ou químicos gerados em resposta aos estímulos químicos ou  
226 físicos (Kandel *et al.*, 2013). Estas células possuem altas taxas metabólicas e consomem  
227 grande parte da glicose circulante. Sabemos que a produção de ERO decorrente do  
228 metabolismo é uma condição fisiológica e implica que células com maiores taxas  
229 metabólicas tendem a gerar naturalmente uma quantidade maior de ERO, necessitando  
230 de defesas antioxidantes para gerenciar situações de estresse oxidativo (Barbosa *et al.*,  
231 2006). A sub-linhagem celular HT-22 é derivada da linhagem HT-4, que foi obtida através  
232 de cultura primária de neurônios hipocâmpais de camundongo (Liu *et al.*, 2008). Essas  
233 células vêm sendo bastante utilizadas para estudos envolvendo estresse oxidativo por  
234 demonstrar alta sensibilidade a esse tipo de estresse (Schubert *et al.*, 2001; Schubert *et*  
235 *al.*, 2006). Existem evidências de que estes neurônios possuem baixos níveis de enzimas  
236 que fazem parte das defesas antioxidantes como a superóxido dismutase, catalase e  
237 glutatona peroxidase, tornando moléculas como a GSH a principal fonte de supressão de  
238 ERO (Aoyama *et al.*, 2008; Friedman, 2011). Além disso, a barreira hematoencefálica  
239 dificulta a ação de antioxidantes não enzimáticos oriundos da dieta, tornando os neurônios  
240 particularmente sensíveis a situações de estresse oxidativo (Gilgun-Sherki *et al.*, 2001).  
241 Essas características tornam linhagens celulares de neurônios bons modelos de estudo  
242 para avaliar atividade de substâncias antioxidantes, além de parâmetros como viabilidade  
243 celular e estresse oxidativo, devido à alta sensibilidade dos neurônios a fatores tóxicos  
244 (El-Orabi *et al.*, 2011).

245

## 246 *Nanoescala e a nanotoxicologia*

247

248 Segundo o regulamento nº 696/2011 (União Européia), os nanomaterias são materiais que  
249 contém 50% ou mais de suas partículas (agregadas ou não agregadas) que possuem  
250 dimensões estruturais compreendidas na escala nanométrica (1-100 nanômetros). Além  
251 disso, os nanomateriais possuem características físicas e químicas diferenciadas de outros  
252 compostos que não estão inseridos nesta escala. Diversas destas novas características,  
253 como capacidade supercondutora, maior resistência e maleabilidade e maior  
254 biocompatibilidade (Wojtoniszak *et al.*, 2011; Chatterjee *et al.*, 2013; Xing *et al.*, 2016)  
255 causaram um crescente interesse em estudos nos campos de pesquisa de física e química  
256 e logo surgiram diversas aplicabilidades industriais que acarretaram em produtos que  
257 foram inseridos no dia-a-dia das populações em todo o mundo. No entanto, esse avanço  
258 nas aplicabilidades não foi acompanhado pelo estudo dos possíveis riscos toxicológicos,  
259 nem com o ciclo de vida dos produtos contendo nanomateriais e pouco se conhecia dos  
260 efeitos danosos que ocorreriam caso os nanomateriais fossem inseridos no meio ambiente  
261 (Hao *et al.*, 2009; Kahru e Dubourguier, 2010). Logo, a nanotoxicologia surgiu  
262 justamente com o propósito aumentar o conhecimento e discernimento sobre o  
263 funcionamento e interação dos nanomateriais com seres vivos e seus possíveis riscos  
264 (Kahru e Dubourguier, 2010). Diversos estudos começaram a ser realizados e o  
265 conhecimento foi aumentando com o tempo, revelando que as vantagens tecnológicas que  
266 os nanomateriais propiciaram deveria ser visto com ressalvas, já que muitos estudos  
267 apresentavam inovações e possíveis aplicações benéficas em áreas como biomedicina,  
268 farmacologia e imunologia, ao mesmo tempo que outros estudos demonstravam  
269 toxicidade e fortes tendências a bioacumulação em diversos organismos (Baun *et al.*,  
270 2008; Wang *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Contudo, as diferenças nas composições e na  
271 forma utilizada para a fabricação dos nanomateriais demonstram diferentes causas e



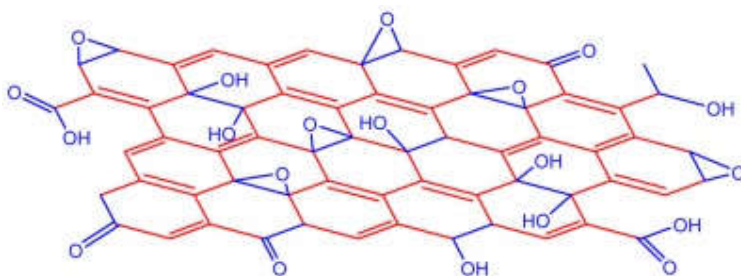
272 níveis de toxicidade. Além disso, a falta de padronização dos métodos utilizados nos  
273 estudos causa uma grande variabilidade de resultados e contribui com menos eficiência  
274 para o avanço do conhecimento nanotoxicológico.

275

## 276 ***Óxido de grafeno: características e aplicações***

277

278 O grafeno é isolado a partir do grafite e possui o formato de uma folha com apenas um  
279 átomo de espessura, composta por átomos de carbono arranjados em forma hexagonal  
280 (Novoselov *et al.*, 2004). O óxido de grafeno (OG) é um nanomaterial de carbono e faz  
281 parte de uma variedade de nanomateriais de grafeno (NMG), possui estrutura em formato  
282 de folha e é funcionalizado com grupamentos epóxi, carboxil e hidroxil, além de possuir  
283 boa solubilidade e biocompatibilidade (Liu *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2013; Zhao *et al.*,  
284 2014). Sua estrutura possui uma extensa superfície de contato, facilitando a interação e  
285 adsorção de outras moléculas (Figura 2).

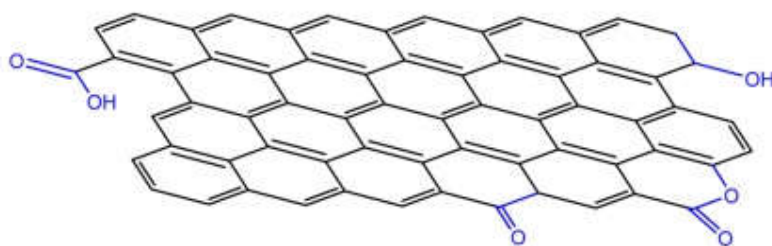


286

287 **Figura 2. Estrutura molecular do nanomaterial óxido de grafeno. Fonte: Zhao et al. (2014)**

288 No entanto, diversos estudos reportam a toxicidade do OG pois, sua boa solubilidade e  
289 biocompatibilidade permite sua absorção pelas células via endocitose e aumento na  
290 geração de ERO causando toxicidade (Duch *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2011; Yue *et al.*,  
291 2012; Wang *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014). Existem evidências de que a quantidade de

292 oxigênio pode influenciar a toxicidade do OG (Das *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Logo  
293 houve o desenvolvimento de procedimentos para reduzir a quantidade de oxigênio na  
294 superfície do OG, gerando o óxido de grafeno reduzido (rOG) (**Fig. 3**). No entanto,  
295 existem evidências de toxicidade acerca do rOG, tornando necessária a realização de  
296 novos estudos acerca da toxicidade tanto do OG quanto do rOG (Duch *et al.*, 2011;  
297 Gurunathan *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013; Chatterjee *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014; Zhou  
298 *et al.*, 2014).



299

300 **Figura 3. Estrutura molecular do óxido de grafeno reduzido. Fonte: Zhao *et al.* (2014)**

301

### 302 *Ácido lipóico e óxido de grafeno*

303

304 Visto que o principal efeito tóxico do OG é o aumento na produção de ERO, antioxidantes  
305 seriam a solução lógica para lidar com esta toxicidade e permitir que o OG fosse utilizado  
306 com mais segurança no carregamento de fármacos. No entanto, o efeito de utilizar as duas  
307 substâncias combinadas é desconhecido, já que o AL não apresenta características  
308 exclusivamente antioxidantes, mas também atua no metabolismo e pode se tornar pró-  
309 oxidante em certos contextos bioquímicos. Logo, este estudo tem como objetivo avaliar  
310 a toxicidade do OG com relação a parâmetros ligados ao metabolismo, estresse oxidativo  
311 e viabilidade celular, além de avaliar o possível efeito quimioprotetor do AL, utilizando  
312 como modelo de estudo a linhagem celular neuronal HT-22.

313

314

315

316

**-----Manuscrito-----**

317

**A ser submetido para a revista Comparative Biochemistry and Physiology –**

318

**PartC: Toxicology and Pharmacology**

319

**(Fator de impacto 2,546)**

320

321

322

323

324

325

326

327

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339 **Title page**

340 **Title:**  $\alpha$ -Lipoic acid and graphene oxide: Interactions, *in vitro* cytotoxicity and  
341 chemoprotection

342 **Authors:** <sup>1</sup>Alexandre M. Bitencourt, <sup>3</sup>Caroline P. Ruas, <sup>1</sup>Silvana M. Nunes, <sup>1</sup>Thiago  
343 F. A. França, <sup>3</sup>, <sup>4</sup>Marcos A. Gelesky, <sup>1,3</sup>José M. Monserrat

344 **Author Affiliations:** <sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas,  
345 Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil. <sup>2</sup>Instituto de  
346 Ciências Biológicas (ICB), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande,  
347 RS, Brazil. <sup>3</sup> Programa de Pós-graduação em Química Tecnológica e Ambiental,  
348 Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio Grande, RS, Brazil. <sup>4</sup>Escola de  
349 Química e Alimentos (EQA), Universidade Federal do Rio Grande (FURG), Rio  
350 Grande, RS, Brazil.

351 **Correspondence information:** Correspondence should be addressed to José M.  
352 Monserrat. Address: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Rio  
353 Grande (FURG) – Av Itália, Km 8 – Rio Grande, RS, 96210-900, Brazil. Email:  
354 josemmonserrat@gmail.com  
355

356 **Keywords:** carbon nanomaterial, antioxidant, hippocampal neurons, cell culture,  
357 microscopy

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367 **Abstract**

368

369 The graphene oxide (GO) is obtained from oxidation of graphene. Given the potential  
370 biological applications of GO it is important do properly evaluate its potential toxicity  
371 and applications to organisms. However, it is also important to evaluate substances  
372 capable to mitigate the possible toxic and pro-oxidant effects of GO. The  $\alpha$ -lipoic acid is  
373 an antioxidant that has the ability to neutralize reactive oxygen species (ROS), stimulate  
374 the antioxidant defense system and consequently counterbalance GO pro-oxidant  
375 capacity. Therefore, this study focused on cytotoxicity of GO associated with ROS  
376 production and metabolism and the chemoprotective effect of LA against GO on HT-22  
377 cells. The concentrations were set in 10, 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$  (GO), 5, 25 and 50  $\mu\text{M}$  (LA),  
378 50  $\mu\text{g/ml}$  + 25  $\mu\text{M}$  and 100  $\mu\text{g/ml}$  + 25  $\mu\text{M}$  (GO+LA). The assays were performed after  
379 2 and 24 hours of exposition. The results showed that exposure to rGO increased ROS  
380 production but did not cause cytotoxicity. On the other hand, when co-exposed with AL,  
381 GO decreased cell viability but the pro-oxidant effect was lost. These results indicate that  
382 GO's cytotoxicity is likely to involve more mechanisms than just oxidative stress and may  
383 be affected by structural characteristics and interactions with other substances.

384

385 **Introduction**

386

387 There is an ongoing effort from researches and companies to develop new drugs to treat  
388 the many neurological diseases, which become increasingly common as life expectancy  
389 rises around the globe (Kozauer and Katz, 2013). One of the challenges in the  
390 development of new drugs is the evaluation of their therapeutic potential and toxic side  
391 effects. It is not uncommon for a new drug to show promising effects in the first *in vitro*

392 tests but then fail when tested *in vivo* due to factors such as low availability in the target  
393 tissue and off target effects on other tissues (Arrowsmith, 2011 a,b; Cowan *et al.*, 2016).  
394 There are different strategies being developed to increase the specificity and availability  
395 of drugs for the target tissue, many of those using nanomaterials as drug carriers,  
396 including graphene oxide (GO), a carbon nanomaterial from the family of graphene  
397 nanomaterials (GNM) (Novoselov *et al.*, 2004; Yang *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2012;  
398 Kostarelos *et al.*, 2014). The GO stands out for its relatively high solubility and good  
399 biocompatibility (S. Liu *et al.*, 2011; Das *et al.*, 2013). Despite that, there are reports of  
400 toxic effects caused by GO exposure with production of ROS being the major source of  
401 this toxicity (Duch *et al.*, 2011; Chang *et al.*, 2011; Yue *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2013).  
402 However, this pro-oxidant effect can be counterbalanced by an antioxidant compound  
403 and mitigate the consequently cytotoxicity.

404 The  $\alpha$ -lipoic acid (LA) is an antioxidant derived from octanoic acid. It contains a  
405 dithiolane ring with a disulfide bridge uniting carbons 6 and 8 (May *et al.*, 2007). This  
406 antioxidant is capable to act as reactive oxygen species (ROS) scavenger, recycle  
407 endogenous antioxidants such as glutathione (GSH) and facilitate the action of  
408 transcription factors such as Nrf2, which increases the transcription of genes from the  
409 antioxidant defense and phase II detoxification systems (Shay *et al.*, 2009; Packer and  
410 Cadenas, 2011; Rochette *et al.*, 2013; Kütter *et al.*, 2014). There are also reports  
411 suggesting that LA can cross the blood-brain barrier (Panigrahi *et al.*, 1996; Packer *et al.*,  
412 1997; Arivazhagan *et al.*, 2002; Arivazhagan *et al.*, 2003), although there is no consensus  
413 yet regarding the amount of LA crossing this barrier. Nonetheless, this would enable LA  
414 to act directly in the central nervous system. Taken together, all those characteristics make  
415 LA a good candidate to be used together with GO to mitigate the possible toxic effects of  
416 the nanomaterial. The aim of this study was to evaluate this possibility and investigate its

417 potential and possible pitfalls. For such, we evaluated the effects of GO and LA and their  
418 interaction in HT-22 neurons lineage regarding parameters of cellular metabolism, cell  
419 viability and oxidative stress.

420

## 421 **Materials and methods**

422

### 423 **Preparation of GO and AL**

424

425 The GO (kindly provided by Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG)  
426 was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO, Synth) (0.9% in ultrapure water) followed by  
427 30 minutes of sonication at 40 Khz (ECO-SONICS). The dilution started with the higher  
428 concentration of GO (100 µg/ml) and was later diluted, after the sonication, to generate  
429 the lower concentrations of GO. The same procedure was performed with LA (Sigma),  
430 but without sonication. For the co-exposure treatment, the GO and LA solutions were  
431 separately prepared and then mixed in the appropriate concentrations before adding in the  
432 culture medium.

433

434

### 435 **Graphene oxide characterization**

436

437 The Scanning electron microscopy (SEM, JEOL JSM 6010 – 20 kV), Transmission  
438 Electron Microscopy (TEM, JEOL JEM-1400 – 120 kV) and Electron Dispersive  
439 Spectroscopy (EDS, JEOL JEM-1400) were used for GO characterization. The samples  
440 were prepared and manipulated following the same method used by González-Durruthy

441 *et al.* (2017). A solution with GO diluted in ultrapure water and sonicated for 90 minutes  
442 was prepared to compare with the GO diluted in DMSO used for the study.

443

#### 444 **Cell culture**

445

446 HT-22 mice hippocampal cells (kindly provided by Salk Institute for Biological Studies,  
447 La Jolla, CA), were grown on culture bottles containing Dulbecco's modified Eagle's  
448 medium (DMEM) with high glucose levels (Gibco) supplemented with sodium  
449 bicarbonate (1,5 g/L) (Vetec), 10% fetal bovine serum (FBS) (Invitrogen) and 1% of  
450 antibiotics and antimicotic (penicillin [100 U/mL], streptomycin [100 U/mL], and  
451 amphotericin [0.25 mg/mL]; Gibco). HT-22 cells were kept at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>.

452

#### 453 **Experimental procedures**

454

455 Before performing the experiments, cells were transferred to culture plates containing 24  
456 and 96 wells. The cell concentrations seeded were  $5 \times 10^4$  cells/well in the 24 wells plate  
457 (used for ROS, total antioxidant capacity and oxygen consumption measurements) and  
458  $1 \times 10^4$  cells/well in the 96 wells plate (used for MTT). The exposure to GO (10, 50 e 100  
459 µg/ml) (based on Wang *et al.*, 2013), LA (5, 25 e 50 µM) (based on KleinKauf-Rocha *et*  
460 *al.*, 2013) or GO+LA (50 µg/mL + 25 µM and 100 µg/mL + 25 µM) was performed after  
461 an adhesion period of 24 hours. The exposure times were 2 and 24 hours for all treatments.

462

#### 463 **Cell viability (MTT assay)**

464



465 The cells were exposed to (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium  
466 bromide, Sigma) to assess the mitochondrial dehydrogenases following the method of  
467 Franco *et al.* (2009).

468

#### 469 **Intracellular ROS quantification**

470

471 This method is based on the interaction of intracellular ROS and the fluorophore  
472 compound 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA, Biogen) and was performed  
473 according to Ramos *et al.* (2016). Phosphate buffered saline (PBS) was used as medium  
474 in the reading process to avoid interference issues related to organic compounds present  
475 in culture medium.

476

#### 477 **Antioxidant capacity against peroxide (ACAP)**

478

479 Following the method of Amado *et al.* (2009), the antioxidant capacity against peroxide  
480 was estimated measuring the cellular capacity to neutralize the ROS generated by the  
481 thermolysis at 37°C of 2'-azobis(2-methylpropionamide) dihydrochloride (ABAP,  
482 Sigma). The amount of intracellular ROS was determined using 2',7'-dichlorofluorescein  
483 diacetate (H<sub>2</sub>DCF-DA, Biogen).

484

#### 485 **Cellular oxygen consumption**

486

487 After the homogenization of 2 mL of cell suspension dissolved into culture medium  
488 Clark's electrodes (Oxygraph System Hansatech Instruments) were used to quantify the

489 cellular oxygen consumption. The oxygen depletion was quantified over 5 minutes  
490 following the method of Ramos *et al.* (2016).

491

#### 492 **Interference assay**

493

494 To assess if GO was interfering in the tests that used fluorophores or chromophores, the  
495 solutions with 10, 50 and 100  $\mu\text{g/ml}$  were directly pipetted on the fluorescence and  
496 absorbance reading plates. In the fluorescence assay, 15  $\mu\text{L}$  of an extract containing  
497 different concentrations of lysed cell were added to wells containing different  
498 concentrations of GO dissolved in PBS and 10  $\mu\text{L}$  of  $\text{H}_2\text{DCF-DA}$  (or 10  $\mu\text{L}$  of ultrapure  
499 water for control treatments). The plate was immediately forwarded to reading process,  
500 according to the specification of Amado *et al.*, (2009). In the absorbance assay, 20  $\mu\text{L}$  of  
501 an extract containing different concentrations of lysed cell were added to wells containing  
502 different concentrations of GO dissolved in culture medium without fetal bovine serum  
503 and 20  $\mu\text{L}$  of (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT).  
504 After that, the plate was incubated for 3h and then immediately forwarded to reading  
505 process, according to the specification of Franco *et al.*, (2009).

506

#### 507 **Statistical analysis**

508 Data were analyzed by two-way ANOVA (factors: exposure time and rGO and/or AL  
509 containing treatments) except for the interference assay which was analyzed using one-  
510 way ANOVA (factor: rGO concentrations). The data were previously evaluated for  
511 normality and homogeneity of variances. Whenever necessary, mathematical  
512 transformations were performed to adapt the data to normality and homogeneity of

513 variances. The Newman-Keuls post-hoc was used for mean comparison of treatments  
514 ( $\alpha=0,05$ ).

515

## 516 Results

517

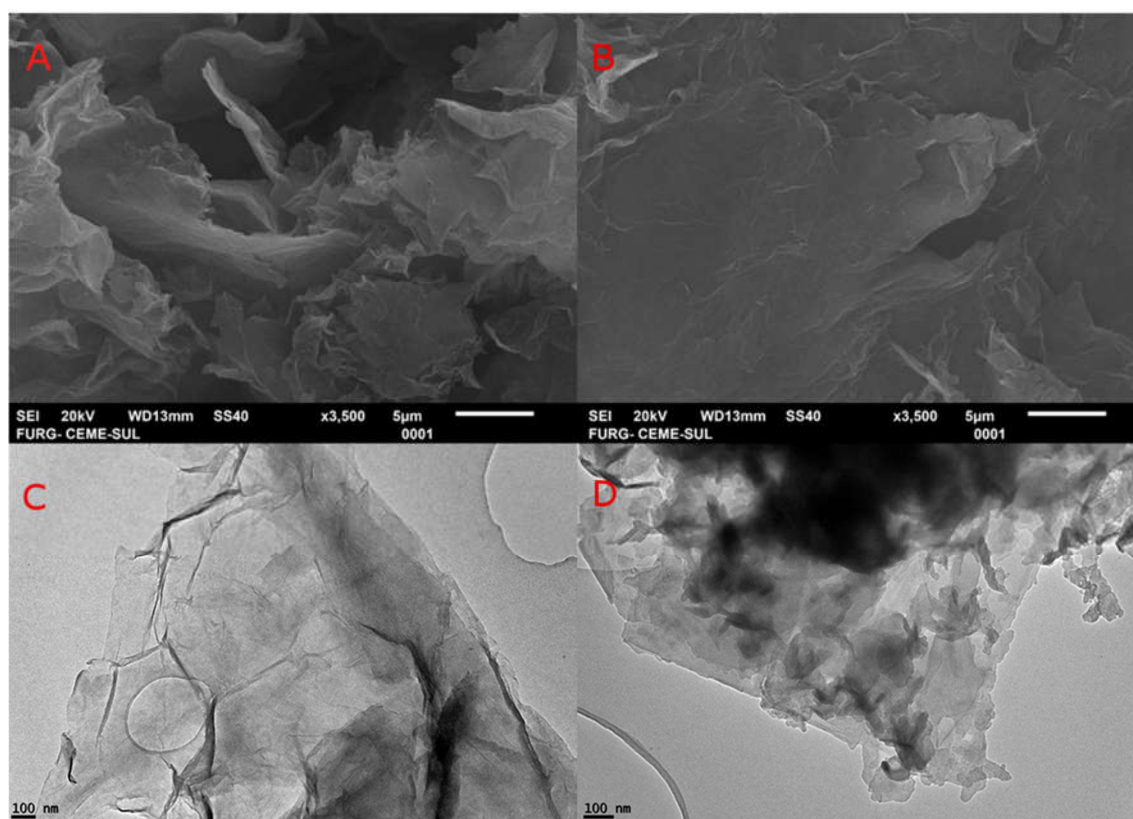
### 518 Reduced graphene oxide characterization

519

520 The TEM and SEM analysis showed that GO had rough sheets with sharp edges (**Fig.**

521 **1a,b,c**). The SEM also revealed that the longer sonication time (90 min.) caused the

522 breaking of GO sheets (**Fig. 1d**).



523

524 **Figura 1. Characterization of reduced graphene oxide (GO). (A, B) Scanning electron microscopy (SEM) of**  
525 **GO. (C) Transmission electron microscopy (TEM) of GO diluted in DMSO and sonicated for 30 min. (D)**  
526 **Transmission electron microscopy (TEM) of GO diluted in ultrapure water and sonicated for 90 min.**

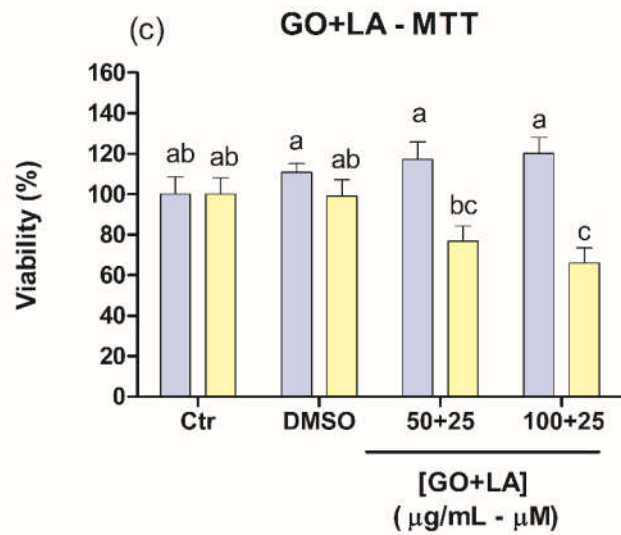
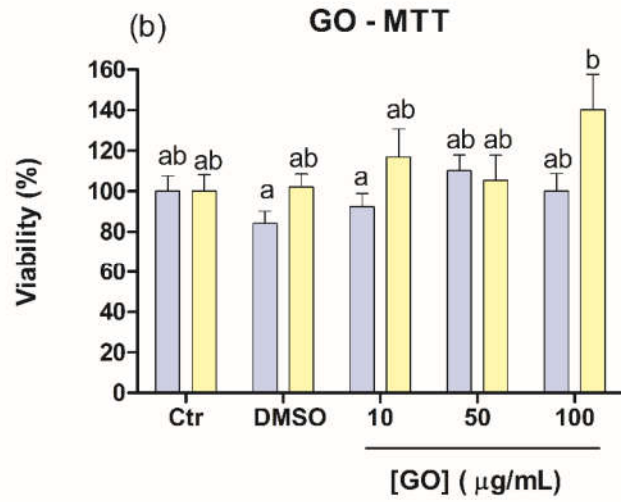
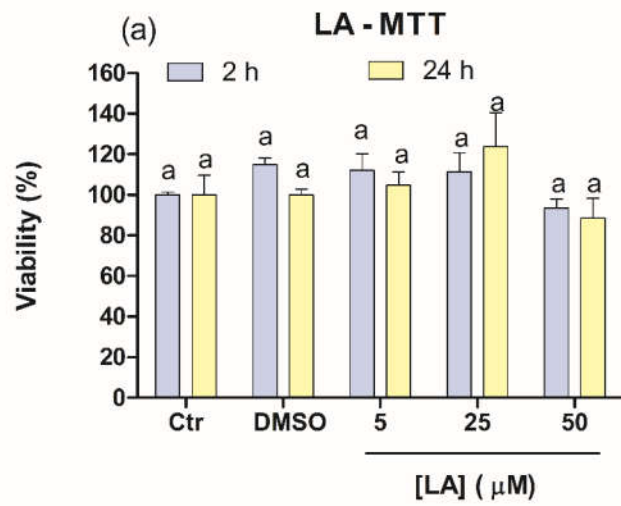
527

528 The analysis of the GO composition by EDS showed that the GO had significant values  
529 of the following compounds: C (53.27%), O (43.67%), Na (2.42 %) and Cl (0.64%).

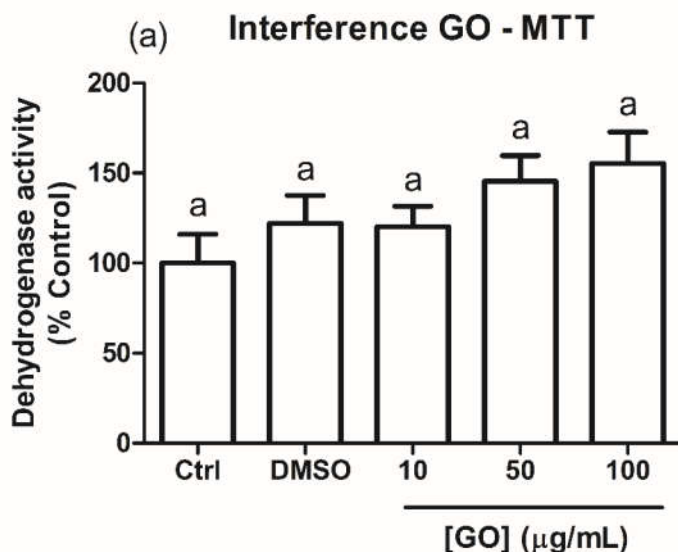
### 530 **Cell viability**

531

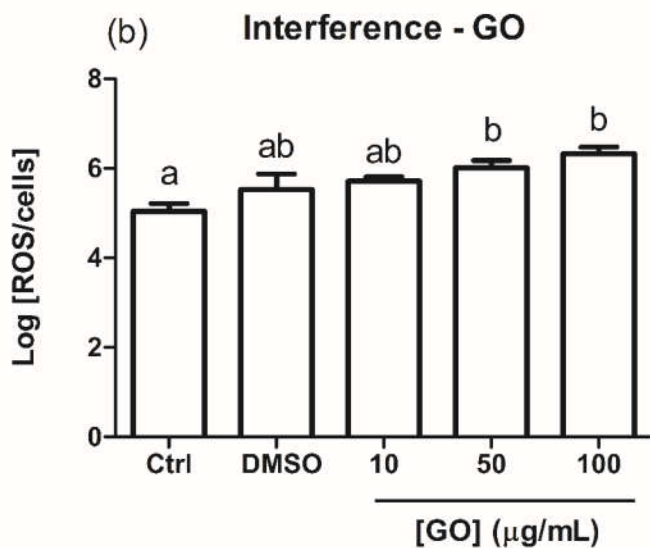
532 The MTT assay allows the quantification of formazan, a compound produced from MTT  
533 salt through the activity of mitochondrial dehydrogenases. The assay was used here as a  
534 measure of cell viability. There were no statistically significant ( $P > 0.05$ ) differences  
535 between control (DMSO), LA and GO groups in any concentration or exposure time  
536 (**Figure 2a** and **2b**). However, cells co exposed to 25  $\mu$ M LA + 100  $\mu$ g/ml GO showed  
537 decreased viability after 24 hours (**Figure 2c**). The direct exposure of GO in the cell  
538 lysates did not show evidence indicating interference in the assays that used the  
539 chromophore (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT)  
540 when compared to DMSO control (**Figure 3a**).



542 Fig. 2. Cell viability in HT-22 cells after 2 (blue bars) or 24 h (yellow bars) of exposure to graphene oxide and/or  
 543  $\alpha$ -lipoic acid. (a) Cells exposed to  $\alpha$ -lipoic acid (n=6). Cells exposed to (b) graphene oxide (n=6), (c) Cells exposed  
 544 to graphene oxide plus  $\alpha$ -lipoic acid (n=6). Data are expressed as means  $\pm$  standard error. Similar letters indicate  
 545 absence of significant difference ( $P>0.05$ ).



546



547

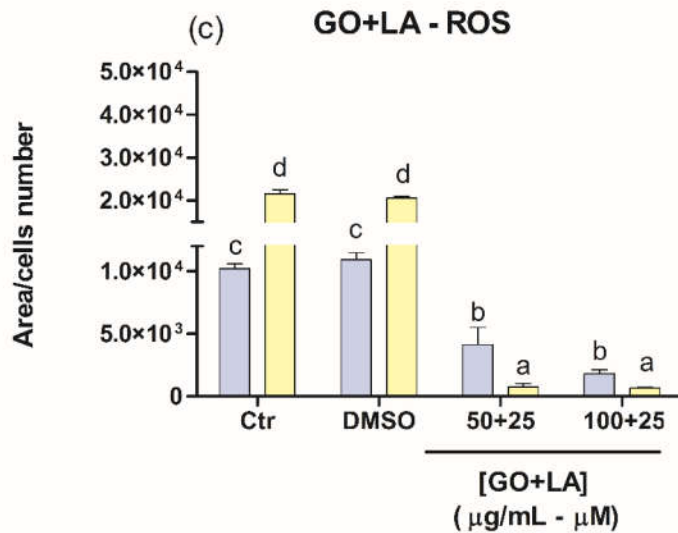
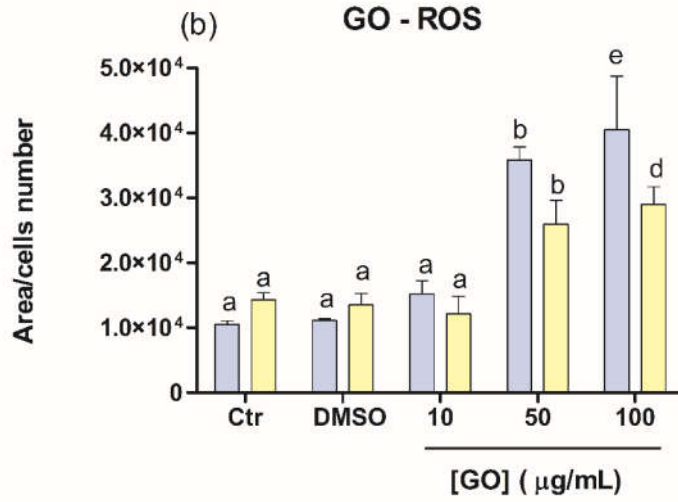
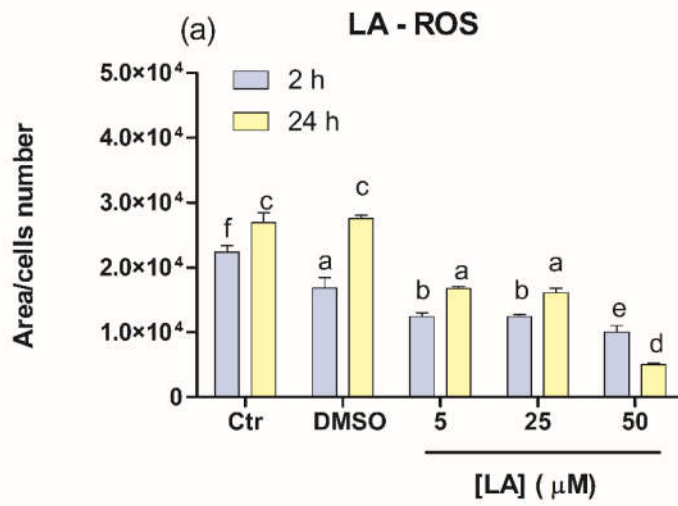
548 Fig. 3. Interference assay to evaluate the effect of graphene oxide (GO) spiked to HT-22 cell lysates for (a)  
 549 measurement of dehydrogenase activity (MTT) (n=15); (b) measurement of reactive oxygen species (ROS)  
 550 concentration (n=5). Data are expressed as means  $\pm$  standard error. Similar letters indicate absence of significant  
 551 difference ( $P>0.05$ ).

552

### 553 Intracellular ROS quantification

554

555 There was a reduction in the levels of intracellular ROS after exposure to LA in every  
556 concentration and exposure time (**Figure 4a**), with the concentration of 50  $\mu\text{M}$  showing  
557 greater potential to minimize the production of ROS when compared to the 5 and 25  $\mu\text{M}$   
558 treatments which were similar to each other. Furthermore, the solvent DMSO showed  
559 antioxidant activity when compared to control after 2 hours of exposure (**Figure 4a**). In  
560 contrast, GO treatment showed the opposite effect of LA, causing an increase in  
561 intracellular ROS in 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$  concentrations in both exposure times, with a  
562 greater increase in intracellular ROS in the 100  $\mu\text{g/mL}$  treatment (**Figure 4b**). The  
563 antagonism between the effects of LA and GO is demonstrated in the results of the co-  
564 exposed groups. In the two exposure times, 25  $\mu\text{M}$  of LA was capable to neutralize the  
565 pro oxidant effect of 50 and 100  $\mu\text{g/mL}$  of GO (**Figure 4c**), evidencing the strong  
566 antioxidant effect of LA. However, in the cells exposed for 24 h, ROS reduction could be  
567 explained by the reduction of cell viability (**Figure 2c**). The direct exposure of GO in the  
568 cell lysates did not show evidence indicating interference in the assays that used the  
569 fluorophore DCF-DA when compared to DMSO control (**Figure 3b**).





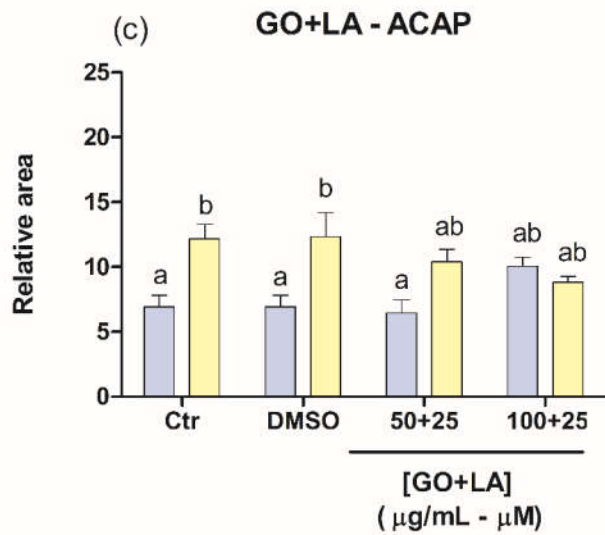
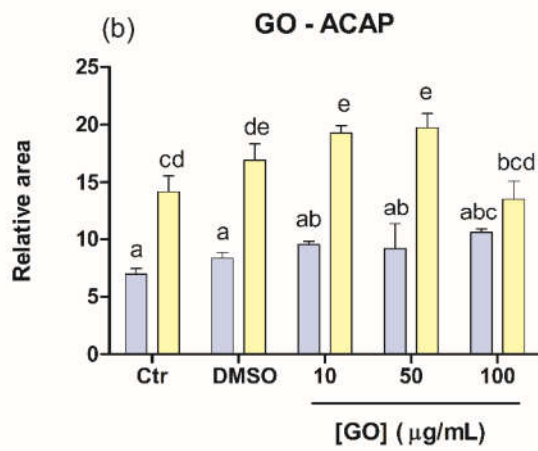
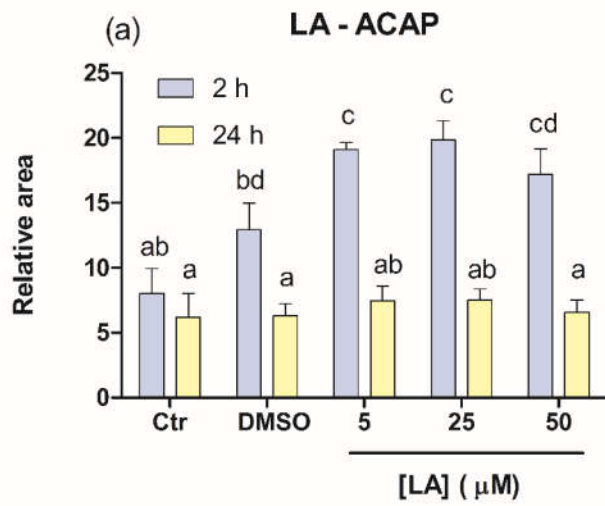
571 Fig. 4. Intracellular reactive oxygen species (ROS) in HT-22 cells after 2 (blue bars) or 24 h (yellow bars) of  
572 exposure to graphene oxide and/or  $\alpha$ -lipoic acid. (a) Cells exposed to  $\alpha$ -lipoic acid (n=4). (b) Cells exposed to  
573 graphene oxide (n=4). (c) Cells exposed to graphene oxide plus  $\alpha$ -lipoic acid (n=4). Data are expressed as means  
574  $\pm$  standard error. Similar letters indicate absence of significant difference ( $P>0.05$ ).

575

## 576 **Antioxidant capacity against peroxides**

577

578 The determination of the cellular antioxidant capacity is essential to evaluate how the  
579 cells cope with possible fluctuations in ROS production and also eventual modulation of  
580 their antioxidant system. Although LA is largely recognized as an antioxidant, exposure  
581 to 5 or 25  $\mu$ M of this molecule for two hours lead to a reduction in the antioxidant capacity  
582 compared to DMSO control (**Figure 5a**). However, this effect seems to be transient as  
583 the antioxidant capacity of cells exposed to all concentrations of LA for 24 hours was like  
584 control levels (**Figure 5a**). There was no effect of GO in the antioxidant capacity at any  
585 concentration and exposure time when compared to DMSO control (**Figure 5b**), although  
586 there was significant difference among the GO groups exposed for 24 hours, with cells  
587 exposed to 100  $\mu$ g/mL of GO showing better antioxidant capacity when compared to cells  
588 exposed to either 10 or 50  $\mu$ g/ml (**Figure 5b**). The combination of GO + LA showed no  
589 statistically significant difference when compared to DMSO control in all exposure times  
590 (**Figure 5c**), meaning that the reduction in antioxidant capacity caused by 2 hours of  
591 exposure to  $\mu$ M of LA did not repeat itself when LA was combined with GO.



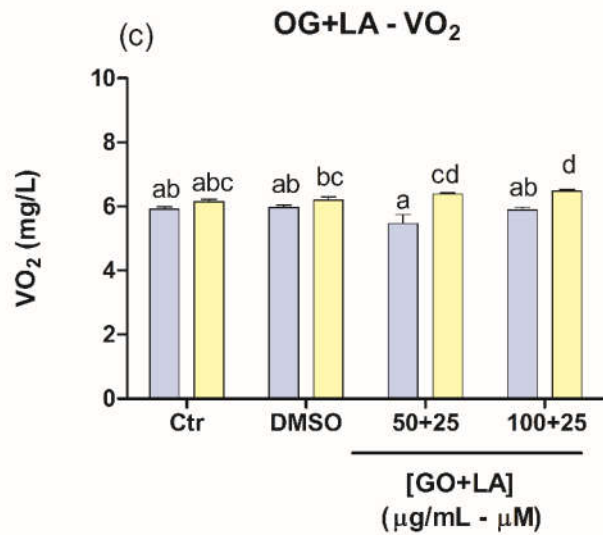
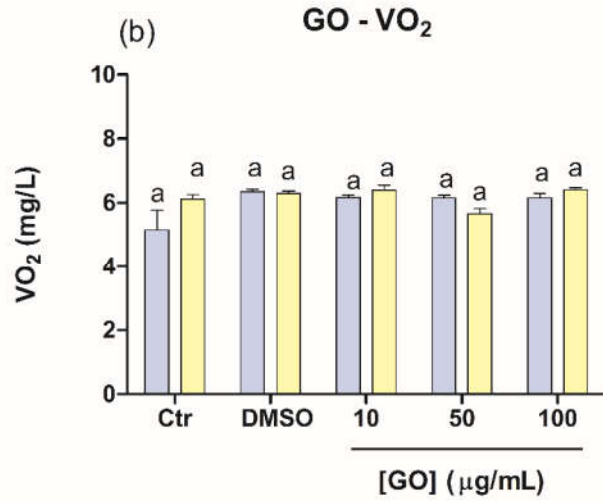
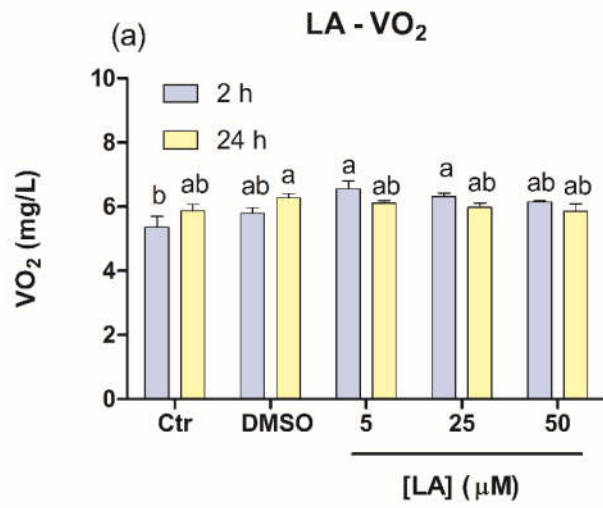
593 Fig. 5. Antioxidant capacity against peroxide (ACAP) in HT-22 cells after 2 (blue bars) or 24 h (yellow bars) of  
594 exposure to graphene oxide and/or  $\alpha$ -lipoic acid. (a) Treatments:  $\alpha$ -lipoic acid control (n=3); DMSO (n=4); 5, 25  
595 and 50  $\mu$ M of lipoic acid (n=4); (b) Treatments: graphene oxide control (n=3); DMSO (n=4); 10, 50 and 100  
596  $\mu$ g/mL or graphene oxide (n=3); (c) Treatments: graphene oxide plus  $\alpha$ -lipoic acid control (n=4); DMSO (n=3);  
597 50+25, 100+25 of graphene oxide ( $\mu$ g/mL) and lipoic acid ( $\mu$ M) (n=4). Data are expressed as means  $\pm$  standard  
598 error. Similar letters indicate absence of significant difference ( $P>0.05$ ).

599

## 600 **Oxygen consumption**

601

602 Oxygen is essential to the metabolism of aerobic organisms and a quantification of its  
603 consumption can give an estimate of state of cellular metabolism. Exposing cells to either  
604 LA or GO showed no effect in cellular oxygen consumption at any concentration or  
605 exposure time (**Figure 6a** and **6b**). However, after 24h of co-exposure to 100  $\mu$ g/mL GO  
606 + 25  $\mu$ M LA showed an increase in cellular oxygen consumption, indicating an increase  
607 in cell metabolism.



609 Fig. 6. Oxygen consumption ( $\text{VO}_2$ ) in HT-22 cells after 2 (blue bars) or 24 h (yellow bars) of exposure to graphene  
610 oxide and/or  $\alpha$ -lipoic acid. (a) Cells exposed to  $\alpha$ -lipoic acid (n=4), (b) Cells exposed to graphene oxide (n=4). (c)  
611 Cells exposed to graphene oxide plus  $\alpha$ -lipoic acid (n=4). Data are expressed as means  $\pm$  standard error. Similar  
612 letters indicate absence of significant difference ( $P>0.05$ ).

613

## 614 Discussion

615

616 The microscopy results showed that GO's sheets have more similarity with the rGO  
617 described in others studies (**Fig. 1**) (S. Liu et al., 2011; Gurunathan *et al.*, 2013; Chatterjee  
618 *et al.*, 2014). Besides, the solution used in this study is similar to rGO's solutions in other  
619 studies (S. Liu et al., 2011; Gurunathan *et al.*, 2012; Gurunathan *et al.*, 2013; Chatterjee  
620 *et al.*, 2014). Based on these evidences, it seems that part of GO presented incomplete  
621 oxidation of sheet surface, making GO's solution and their structural characteristics  
622 similar to reduced graphene oxide (rGO). For that reason, the discussion will proceed  
623 based on rGO comparisons.

624 The data showed that LA decreased intracellular ROS concentration (**Fig. 4**) and did not  
625 affect cell viability (**Fig. 2**). These results agree with other studies that also showed  
626 similar findings to a broad range of concentrations and exposure times (Jones *et al.*, 2002;  
627 Pirlich *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2008; Kleinkauf *et al.*, 2013; Koriyama *et al.*, 2013; D-W.  
628 Li *et al.*, 2013). On the other hand, GO increased the ROS production (**Fig. 4**), giving  
629 support to results of previous studies that indicate a pro oxidant effect of GNM (Akhavan  
630 *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013; Zhao *et al.*, 2014). However, despite the toxicity showed in  
631 other studies (Akhavan *et al.*, 2013; Chatterjee *et al.*, 2014; Das *et al.*, 2013; Gurunathan  
632 *et al.*, 2013; Xing *et al.*, 2016), the GO did not cause loss of viability in any of the  
633 concentrations tested (**Fig. 2**). This effect may be associated with the way that GO  
634 solutions were prepared, since their toxicity and incorporation is influenced by factors  
635 such as the size of the molecules and the level of aggregation (Yue et al., 2012; Guo and  
636 Mei, 2014; Zhao et al., 2014). Das *et al.* (2013) observed that the sheet break caused by

637 time-dependent effects of sonication (40 kHz) increased the cytotoxicity of GO. In the  
638 present study, the TEM images of GO sonicated for 90 min confirmed the sheet break  
639 (**Fig. 1d**). Based on this observation, the present study used DMSO to improve GO  
640 dispersion, and decreased the sonication time to avoid sheet breaks. Furthermore, it is  
641 possible that the GO can interact with proteins present in fetal bovine serum forming a  
642 protein corona, which could decrease GO toxicity, restraining the interactions with other  
643 molecules (Akhavan *et al.*, 2012; Ou *et al.*, 2016). The protein corona may also decrease  
644 the damage to cell membrane caused by sharp edges of GO (Li *et al.*, 2013; Wang *et al.*,  
645 2013; Guo *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014) and thus decreasing GO toxicity.

646 Both LA and GO did not decrease viability. However, the LA and GO co-exposure caused  
647 time-dependent loss of viability in 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + 25  $\mu\text{M}$  concentrations (**Fig. 2**). The  
648 solutions containing 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  GO + 25  $\mu\text{M}$  LA were mixed together before been added  
649 into culture medium and only then the medium plus solution was added to the cells. This  
650 procedure was chosen to simulate the *in vivo* co-administration of these two substances.  
651 Several studies reported the capability of GO to adsorb organic molecules (Hong *et al.*,  
652 2012; Wojtoniszak *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015). Therefore, it is  
653 possible that the LA was adsorbed by GO and became part of the corona in the surface of  
654 GO, improving the biocompatibility and dispersion of GO and decreased the levels of  
655 aggregation. It is known that LA may act as a cofactor to mitochondrial dehydrogenases  
656 (Lester Reed, 2001; Packer and Cadenas, 2011; Y. Li *et al.*, 2013; Kütter *et al.*, 2014;  
657 Mayr *et al.*, 2014). Besides, GNM tend to locate near the mitochondria (Wang *et al.*, 2013;  
658 Zhou *et al.*, 2014). Therefore, the increase of associated GO and LA cellular uptake could  
659 also increase the probability of both getting to mitochondria.

660 When in the mitochondrial environment, GNM affect the electron transport chain (Wang  
661 *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2014), diverting electrons coming from mitochondrial

662 complexes, which would interfere with the energy balance and reduce cell viability. As  
663 shown on **Fig. 4**, LA exerts an antioxidant effect even more efficient when co-exposed  
664 with GO and the GO pro-oxidant effect is lost. A viability loss also occurs (**Fig. 2c**) and  
665 an increase in oxygen consumption (**Fig. 6c**) was observed at 100 µg/mL of GO + 25 µM  
666 of LA after 24 hours of exposure. Besides, the antioxidant capacity was decreased after 2  
667 hours of LA exposure (**Fig. 5a**). This probably occur due to the reduction of LA to DHLA,  
668 which causes a direct competition with intracellular antioxidant enzymes, because both  
669 need the reducing power of NAD(P)H that is also used for enzymes like lipoamide  
670 dehydrogenase, thioredoxin reductase and glutathione reductase (Shay *et al.*, 2009;  
671 Rochette *et al.*, 2013; Kütter *et al.*, 2014). At first, the reduction of LA to DHLA may  
672 have also consumed other reducing power sources such as GSH, since this molecule have  
673 major role as peroxy radical scavenger (Amado *et al.*, 2009).

674 Furthermore this negative effect in antioxidant capacity is lost (**Fig. 5c**) and the LA  
675 antioxidant effect became more efficient (**Fig. 4c**) during the co exposure of GO and LA.  
676 These evidences indicate that the LA could be carried into mitochondria in greater  
677 quantity and consequently acting right on the major source of ROS production. These  
678 data suggest that after LA is adsorbed by GO and incorporated by the cell, the LA is  
679 gradually released and continues to carry out its antioxidant activity while GO interferes  
680 in mitochondrial metabolism bypassing electrons from mitochondrial complexes and  
681 consequently oxidizing molecules like NAD(P)H and reducing the GO (Salas *et al.*, 2010;  
682 Khanra *et al.*, 2012; Gurunathan *et al.*, 2013). Because energy is extremely important for  
683 cellular survival, an increase in metabolism occur (and with it, oxygen consumption) in  
684 attempt to compensate GO interference. However, if GO remains in the mitochondrial  
685 environment should continue to exert its interference in the metabolism, leading to energy

686 deficit that causes cellular death. Besides, the deflected electrons could reduce O<sub>2</sub> to H<sub>2</sub>O  
687 what explains part of the increase in oxygen consumption caused by GO (**Fig. 6c**).

688 Nanomaterials have certain properties that can jeopardize the reliability of certain types  
689 of analytical methods (Zhao *et al.*, 2014; Ou *et al.*, 2016, Monserrat *et al.*, 2017). For  
690 example, nanomaterials can interact with fluorophores and chromophores or attract  
691 electrons, preventing those from interacting with the fluorophores and chromophores  
692 (Monteiro-Riviere *et al.*, 2009; Wei *et al.*, 2015). Given that those effects of  
693 nanomaterials could make the results imprecise, it is indispensable to elaborate tests  
694 evaluating the possibility of interference of the nanomaterials with the results. Several  
695 studies reported that nanomaterials interfere with analytical techniques that rely on the  
696 use of fluorophores or chromophores (Monteiro-Riviere *et al.*, 2009; Jachak *et al.*, 2012;  
697 Petersen *et al.*, 2014 Zhou *et al.*, 2014, Wei *et al.*, 2015). However, the interference assays  
698 carried out in this study did not show evidence of interference by GO with the fluorophore  
699 DCF-DA or the chromophore (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium  
700 bromide, MTT) (**Figure 3a,b**). This interference assay and the other assays using DCF-  
701 DA in this study were all performed without presence of culture medium, minimizing the  
702 possibility of interaction between GO and organic molecules. Given that interaction of  
703 nanomaterials with organic molecules is appointed as a contributor to the generation of  
704 interference and experimental artifacts (Petersen *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2015), it may be  
705 that GO did not caused interference in this study due to little interaction with organic  
706 molecules, since ROS assays were carried out in PBS media. Thus, it is reasonable to  
707 conclude that results shown here regarding levels of ROS and antioxidant capacity  
708 represent biological responses and not experimental artifacts. In the MTT interference  
709 assay, culture medium was used because a long incubation time was needed for  
710 significant reduction of MTT salt and the cells would not survive that long in PBS.



711 However, the fetal bovine serum was not added to culture medium to minimize the  
712 interaction of GO with organic molecules.

## 713 **Conclusions**

714

715 The proper toxicological evaluation of potentially beneficial compounds is extremely  
716 important to improve public health. Both LA and GO possess many potential  
717 pharmacological applications and little or no evidence of toxicity by individual exposure  
718 to either one those compounds were found with the methods used in this work. The results  
719 indicate that LA is capable to act as an antioxidant in HT-22 cells and that GO elicits pro  
720 oxidant effects, although those pro oxidant effects were not sufficiently strong to  
721 influence neither cell metabolism nor cell viability. However, when cells were co exposed  
722 to both LA and GO, the substances elicited toxic effects, showing a reduction in cell  
723 viability and an increase in oxygen consumption. Taken together, the evidence presented  
724 here indicates that oxidative stress may not be the only mechanism through which GO  
725 can cause toxicity and its interference in the metabolism (elicited upon co exposure with  
726 LA) may be the main cause of toxicity when the uptake of the nanomaterial is increased.

727

## 728 **References**

729 Akhavan, O., Ghaderi, E., Akhavan, A., 2012. Size-dependent genotoxicity of graphene  
730 nanoplatelets in human stem cells. *Biomaterials* 33, 8017–8025.  
731 doi:10.1016/j.biomaterials.2012.07.040

732 Akhavan, O., Ghaderi, E., Akhavan, A., 2012. Size-dependent genotoxicity of graphene  
733 nanoplatelets in human stem cells. *Biomaterials* 33, 8017–8025.  
734 doi:10.1016/j.biomaterials.2012.07.040

735 Akhavan, O., Ghaderi, E., Emany, H., Akhavan, F., 2013. Genotoxicity of graphene  
736 nanoribbons in human mesenchymal stem cells. *Carbon N. Y.* 54, 419–431.  
737 doi:10.1016/j.carbon.2012.11.058

738 Amado, L.L., Garcia, M.L., Ramos, P.B., Freitas, R.F., B. Zafalon, J.L.R. Ferreira, J.S.Y.  
739 and Monserrat, J.M. 2009. A method to measure total antioxidant capacity against  
740 peroxy radicals in aquatic organisms: application to evaluate microcystins

- 741 toxicity. *Sci. Tot. Env.* 407, 2115-2123. doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.11.038
- 742 Arivazhagan, P., Shila, S., Kumaran, S., Panneerselvam, C., 2002. Effect of DL- $\alpha$ -lipoic  
743 acid on the status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in various brain  
744 regions of aged rats. *Exp. Gerontol.* 37, 803–811. doi:10.1016/S0531-  
745 5565(02)00015-3
- 746 Arrowsmith, J., 2011. Trial watch: phase III and submission failures: 2007-2010. *Nat.*  
747 *Rev. Drug Discov.* 10, 87. doi:10.1038/nrd3375
- 748 Arrowsmith, J., 2011. Trial watch: Phase II failures: 2008–2010. *Nat. Rev. Drug Discov.*  
749 10, 328–329. doi:10.1038/nrd3439
- 750 Chang, Y., Yang, S.-T., Liu, J.-H., Dong, E., Wang, Y., Cao, A., Liu, Y., Wang, H., 2011.  
751 In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol. Lett.* 200, 201–  
752 210. doi:10.1016/j.toxlet.2010.11.016
- 753 Chatterjee, N., Eom, H.J., Choi, J., 2014. A systems toxicology approach to the surface  
754 functionality control of graphene-cell interactions. *Biomaterials* 35, 1109–1127.  
755 doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.108
- 756 Cowan, N., Raimondo, A., Keiser, J., 2016. Approved oncology drugs lack in vivo  
757 activity against *Trichuris muris* despite in vitro activity. *Parasitol. Res.* 115, 4443–  
758 4446. doi:10.1007/s00436-016-5225-9
- 759 Das, S., Singh, S., Singh, V., Joung, D., Dowding, J.M., Reid, D., Anderson, J., Zhai, L.,  
760 Khondaker, S.I., Self, W.T., Seal, S., 2013. Oxygenated functional group density on  
761 graphene oxide: Its effect on cell toxicity. *Part. Part. Syst. Charact.* 30, 148–157.  
762 doi:10.1002/ppsc.201200066
- 763 Duch, M.C., Budinger, G.R.S., Liang, Y.T., Soberanes, S., Urich, D., Chiarella, S.E.,  
764 Campochiaro, L.A., Gonzalez, A., Chandel, N.S., Hersam, M.C., 2011. Minimizing  
765 Oxidation and Stable Nanoscale Dispersion Improves the 5201–5207.  
766 doi.org/10.1021/nl202515a
- 767 Franco, J.L., Posser, T., Dunkley, P.R., Dick, P.W., Mattos, J.J., Martins, R., Bainy,  
768 A.C.D., Marques, M.R., Dafre, A.L., Farina, M. 2009. Methylmercury neurotoxicity is  
769 associated with inhibition of the antioxidant enzyme glutathione peroxidase. *Free*  
770 *Radic. Biol. Med.* 47, 449-457. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.05.013
- 771
- 772 González-Durruthy, M., Castro, M., Nunes, S.M., Ventura-Lima, J., Alberici, L.C., Naal,  
773 Z., Atique-Sawazaki, D.T., Curti, C., Ruas, C.P., Gelesky, M.A., Roy, K., González-  
774 Díaz, H., Monserrat, J.M., 2017. QSPR/QSAR-based Perturbation Theory approach  
775 and mechanistic electrochemical assays on carbon nanotubes with optimal properties  
776 against mitochondrial Fenton reaction experimentally induced by Fe<sup>2+</sup>-overload.  
777 *Carbon N. Y.* 115, 312–330. doi:10.1016/j.carbon.2017.01.002

- 778 Guo, X., Mei, N., 2014. Assessment of the toxic potential of graphene family  
779 nanomaterials. *J. Food Drug Anal.* 22, 105–115. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.009
- 780 Gurunathan, S., Han, J.W., Dayem, A.A., Eppakayala, V., Kim, J.H., 2012. Oxidative  
781 stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide  
782 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Nanomedicine* 7, 5901–5914.  
783 doi:10.2147/IJN.S37397
- 784 Gurunathan, S., Han, J.W., Eppakayala, V., Kim, J.H., 2013. Microbial reduction of  
785 graphene oxide by *Escherichia coli*: A green chemistry approach. *Colloids Surfaces*  
786 *B Biointerfaces* 102, 772–777. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.09.011
- 787 Hagen, T. M., Ingersoll, R.T, Lykkesfeldt, J. 1999. (R)- $\alpha$ -lipoic acid supplemented old  
788 rats have improved mitochondrial function, decreased oxidative damage, and  
789 increased metabolic rate. *FASEB J.*, 13: 411-418. doi: 10.1096/fj.1530-6860
- 790 Hong, B.J., Compton, O.C., An, Z., Eryazici, I., Nguyen, S.T., 2011. Successful  
791 Stabilization of Graphene Oxide in Electrolyte Solutions : Enhancement of Bio-  
792 functionalization and Cellular Uptake. *ACS Nano* 127, 1–10.  
793 doi: 10.1021/nn202355p
- 794 Jachak, A.C., Creighton, M., Qiu, Y., Kane, A.B., Hurt, R.H. 2014 Biological interactions  
795 and safety of graphene materials. *MRS Bull.* 37, 1307-1313.  
796 doi:10.1557/mrs.2012.181
- 797 Jones, W., Li, X., Qu, Z. chao, Perriott, L., Whitesell, R.R., May, J.M., 2002. Uptake,  
798 recycling, and antioxidant actions of  $\alpha$ -lipoic acid in endothelial cells. *Free Radic.*  
799 *Biol. Med.* 33, 83–93. doi:10.1016/S0891-5849(02)00862-6
- 800 Khanra, P., Kuila, T., Kim, N.H., Bae, S.H., Yu, D. sheng, Lee, J.H., 2012. Simultaneous  
801 bio-functionalization and reduction of graphene oxide by baker’s yeast. *Chem. Eng.*  
802 *J.* 183, 526–533. doi:10.1016/j.cej.2011.12.075
- 803 Kleinkauf-Rocha, J., Bobermin, L.D., Machado, P. de M., Gonçalves, C.A., Gottfried, C.,  
804 Quincozes-Santos, A., 2013. Lipoic acid increases glutamate uptake, glutamine  
805 synthetase activity and glutathione content in C6 astrocyte cell line. *Int. J. Dev.*  
806 *Neurosci.* 31, 65–170. doi:10.1016/j.ijdevneu.2012.12.006
- 807 Koriyama, Y., Nakayama, Y., Matsugo, S., Kato, S., 2013. Protective effect of lipoic  
808 acid against oxidative stress is mediated by Keap1/Nrf2-dependent heme oxygenase-  
809 1 induction in the RGC-5 cellline. *Brain Res.* 1499, 145–157.  
810 doi:10.1016/j.brainres.2012.12.041
- 811 Kostarelos, K., Novoselov, K.S., 2014. Exploring the interface of graphene and biology.  
812 *Science* (80). 344, 261–263. doi:10.1126/science.1246736
- 813 Kozauer, N., Katz, R. 2010. Regulatory Innovation and Drug Development for Early-  
814 Stage Alzheimer’s Disease. *N. Engl. J. Med.* 363, 1–3. doi:10.1056/NEJMp1002530

- 815 Kütter, M.T., Romano, L.A., Ventura-Lima, J., Tesser, M.B., Monserrat, J.M., 2014.  
816 Antioxidant and toxicological effects elicited by alpha-lipoic acid in aquatic  
817 organisms. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 162, 70–76.  
818 doi:10.1016/j.cbpc.2014.03.008
- 819 Li, D.W., Li, G.R., Lu, Y., Liu, Z.Q., Chang, M., Yao, M., Cheng, W., Hu, L.S., 2013.  
820 alpha-lipoic acid protects dopaminergic neurons against MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis  
821 by attenuating reactive oxygen species formation. *Int. J. Mol. Med.* 32, 108–114.  
822 doi:DOI 10.3892/ijmm.2013.1361
- 823 Li, Y., Liu, Y.Z., Shi, J.M., Jia, S.B., 2013. Alpha lipoic acid protects lens from H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-  
824 induced cataract by inhibiting apoptosis of lens epithelial cells and inducing  
825 activation of anti-oxidative enzymes. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 6, 548–551.  
826 doi:10.1016/S1995-7645(13)60094-2
- 827 Li, Y., Yuan, H., von dem Bussche, A., Creighton, M., Hurt, R.H., Kane, A.B., Gao, H.,  
828 2013. Graphene microsheets enter cells through spontaneous membrane penetration  
829 at edge asperities and corner sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 12295–300.  
830 doi:10.1073/pnas.1222276110
- 831 Liu, B., Ma, X., Guo, D., Guo, Y., Chen, N., Bi, H., 2012. Neuroprotective effect of alpha-  
832 lipoic acid on hydrostatic pressure-induced damage of retinal ganglion cells in vitro.  
833 *Neurosci. Lett.* 526, 24–28. doi:10.1016/j.neulet.2012.08.016
- 834 Liu, J., 2008. The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient  $\alpha$ -lipoic acid on  
835 improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: An overview.  
836 *Neurochem. Res.* 33, 194–203. doi:10.1007/s11064-007-9403-0
- 837 Liu, S., Zeng, T.H., Hofmann, M., Burcombe, E., Wei, J., Jiang, R., 2011. Antibacterial  
838 Activity of Graphite , Graphite Oxide , Graphene Oxide , and Reduced Graphene  
839 Oxide : Membrane and Oxidative Stress 6971–6980. doi:10.1021/nn202451x
- 840 May, J.M., Qu, Z., Nelson, D.J., 2007. Uptake and reduction of alpha-lipoic acid by  
841 human erythrocytes. *Clin. Biochem.* 40, 1135–42.  
842 doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.06.009
- 843 Mayr, J.A., Feichtinger, R.G., Tort, F., Ribes, A., Sperl, W., 2014. Lipoic acid  
844 biosynthesis defects. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 553-563. doi:10.1007/s10545-014-9705-  
845 8
- 846 Monserrat, J.M., Seixas, A.L.R., Ferreira-Cravo, M., Bürguer-Mendonça, M., Garcia,  
847 S.C., Kaufmann, C.G., Ventura-Lima, J., 2017. Interference of single walled  
848 carbon nanotubes (SWCNT) in the measurement of lipid peroxidation in aquatic  
849 organisms through TBARS assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 140, 103–108.  
850 doi:10.1016/j.ecoenv.2017.02.034
- 851

- 852 Monteiro-Riviere, N.A., Inman, A.O., Zhang, L.W., 2009. Limitations and relative utility  
853 of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line.  
854 *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234, 222–235. doi:10.1016/j.taap.2008.09.030
- 855 Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S. V, Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V,  
856 Grigorieva, I. V, Firsov, A.A., 2004. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon  
857 Films. *Source Sci. New Ser. Gene Expr. Genes Action* 306, 666–669.  
858 doi:10.1126/science.1102896
- 859 Ou, L., Song, B., Liang, H., Liu, J., Feng, X., Deng, B., Sun, T., Shao, L., 2016. Toxicity  
860 of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms.  
861 *Part. Fibre Toxicol.* 13, 57. doi:10.1186/s12989-016-0168-y
- 862 Packer, L., Tritschler, H.J., Wessel, K., 1996. Neuroprotection by the metabolic  
863 antioxidant  $\alpha$ -lipoic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 359–378. doi:10.1016/S0891-  
864 5849(96)00269-9
- 865 Packer L, Cadenas E., 2011. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of  
866 transcription and cell signaling. *J. Clin. Biochem Nutr* 48, 26-32.  
867 doi:10.3164/jcbtn.11-005FR.
- 868 Pan, Y., Sahoo, N.G., Li, L., 2012. The application of graphene oxide in drug delivery.  
869 *Expert Opin. Drug Deliv.* 9, 1365–1376. doi:10.1517/17425247.2012.729575
- 870 Panigrahi, M., Sadguna, Y., Shivakumar, B.R., Kolluri, S. V, Roy, S., Packer, L.,  
871 Ravindranath, V., 1996. alpha-Lipoic acid protects against reperfusion injury  
872 following cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 717, 184–8. doi.org/10.1016/0006-  
873 8993(96)00009-1
- 874 Petersen, E.J., Henry, T.B., Zhao, J., MacCuspie, R.I., Kirschling, T.L., Dobrovolskaia,  
875 M.A., Hackley, V., Xing, B., White, J.C., 2014. Identification and avoidance of  
876 potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements.  
877 *Environ. Sci. Technol.* 48, 4226–4246. doi:10.1021/es4052999
- 878 Pirlich, M., Kiok, K., Sandig, G., Lochs, H., Grune, T., 2002. Alpha-lipoic acid prevents  
879 ethanol-induced protein oxidation in mouse hippocampal HT22 cells. *Neurosci. Lett.*  
880 328, 93–96. doi:10.1016/S0304-3940(02)00415-9
- 881 Ramos, P., Schmitz, M., Filgueira, D., Votto, A.P., Durruthy, M., Gelesky, M., Ruas, C.,  
882 Yunes, J., Tonel, M., Fagan, S., Monserrat, J., 2016. Interaction of single-walled  
883 carbon nanotubes and saxitoxin: Ab initio simulations and biological responses in  
884 hippocampal cell line HT-22. *Environ. Toxicol. Chem.* doi:10.1002/etc.3544
- 885 Reed, L.J., 2001. A Trail of Research from Lipoic Acid to  $\alpha$ -Keto Acid Dehydrogenase  
886 Complexes. *J. Biol. Chem.* 276, 38329–38336. doi:10.1074/jbc.R100026200.
- 887 Rochette, L., Eliana Ghibu, S., Richard, C., Zeller, M., Cottin, Y., Vergely, C., 2013.  
888 Direct and indirect antioxidant properties of  $\alpha$ -lipoic acid and therapeutic potential.  
889 *Mol. Nutr. Food Res* 57, 114125. doi:10.1002/mnfr.201200608

- 890 Salas, E.C., Sun, Z., Lu, A., Tour, J.M., 2010. Reduction of Graphene Oxide via Bacterial  
891 Respiration. *ACS Nano* 4, 4852–4856. doi:10.1021/nn101081t
- 892 Shay, K.P., Moreau, R.F., Smith, E.J., Smith, A.R., Hagen, T.M., 2009. Alpha-lipoic acid  
893 as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochim.*  
894 *Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1790, 1149–1160. doi:10.1016/j.bbagen.2009.07.026
- 895 Wang, A., Pu, K., Dong, B., Liu, Y., Zhang, L., Zhang, Z., Duan, W., Zhu, Y., 2013. Role  
896 of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity and genotoxicity of graphene  
897 oxide towards human lung fibroblast cells. *J. Appl. Toxicol.* 33, 1156–1164.  
898 doi:10.1002/jat.2877
- 899 Wei, X.Q., Hao, L.Y., Shao, X.R., Zhang, Q., Jia, X.Q., Zhang, Z.R., Lin, Y.F., Peng, Q.,  
900 2015. Insight into the Interaction of Graphene Oxide with Serum Proteins and the  
901 Impact of the Degree of Reduction and Concentration. *ACS Appl. Mater. Interfaces*  
902 7, 13367–13374. doi:10.1021/acsami.5b01874
- 903 Wojtoniszak, M., Chen, X., Kalenczuk, R.J., Wajda, A., Łapczuk, J., Kurzewski, M.,  
904 Drozdziak, M., Chu, P.K., Borowiak-Palen, E., 2012. Synthesis, dispersion, and  
905 cytocompatibility of graphene oxide and reduced graphene oxide. *Colloids Surfaces*  
906 *B Biointerfaces* 89, 79–85. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.08.026
- 907 Xing, F.-Y., Guan, L.-L., Li, Y.-L., Jia, C.-J., 2016. Biosynthesis of reduced graphene  
908 oxide nanosheets and their in vitro cytotoxicity against cardiac cell lines of *Catla*  
909 *catla*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 48, 110–115. doi:10.1016/j.etap.2016.09.022
- 910 Yang, X., Zhang, X., Liu, Z., Ma, Y., Huang, Y., Chen, Y., 2008. High-efficiency loading  
911 and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide. *J. Phys.*  
912 *Chem. C* 112, 17554–17558. doi:10.1021/jp806751k
- 913 Yue, H., Wei, W., Yue, Z., Wang, B., Luo, N., Gao, Y., Ma, D., Ma, G., Su, Z., 2012.  
914 The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular  
915 responses. *Biomaterials* 33, 4013–4021. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.02.021
- 916 Zhao, J., Wang, Z., White, J.C., Xing, B., 2014. Graphene in the Aquatic Environment :  
917 Adsorption , Dispersion , Toxicity and Transformation. *Environ. Sci. Technol.* 48,  
918 9995-10009. doi:10.1021/es5022679
- 919 Zhou, H., Zhang, B., Zheng, J., Yu, M., Zhou, T., Zhao, K., Jia, Y., Gao, X., Chen, C.,  
920 Wei, T., 2014. The inhibition of migration and invasion of cancer cells by graphene  
921 via the impairment of mitochondrial respiration. *Biomaterials* 35, 1597–1607.  
922 doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.020
- 923
- 924
- 925

926 **Discussão geral**

927

928 A discussão acerca da toxicidade de nanomateriais é sempre um assunto delicado.  
929 Segundo Das *et al.* (2013), o rOG demonstra menor toxicidade quando comparado ao OG  
930 e esse resultado levou o autor a aceitar a hipótese de que menores níveis de grupos  
931 funcionais que contenham oxigênio levam a uma menor toxicidade. Em bactérias, Liu *et*  
932 *al.* (2011) também encontrou menor toxicidade do rOG quando comparado ao OG e o  
933 grafite, que contém menos oxigênio em sua composição, apresentou níveis ainda menores  
934 de toxicidade. A literatura também caracteriza o rOG tão tóxico quanto ou mais tóxico  
935 que o OG (Gurunathan *et al.*, 2012; Jaworski *et al.*, 2015). No entanto, parte das  
936 informações que caracterizam o rOG como sendo tão tóxico ou mais que o OG parece ser  
937 resultado de uma abordagem que extrapola efeitos tóxicos do grafeno para o rOG, pela  
938 maior similaridade destes dois nanomateriais (Guo *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014; Ou *et*  
939 *al.*, 2016). Esta abordagem pode gerar interpretações duvidosas, pois o rOG apresenta  
940 efeitos similares tanto ao grafeno quanto ao OG, que possuem uma significativa diferença  
941 em relação a características físico-químicas e quantidade de grupos funcionais,  
942 demonstrando que o rOG pode possuir efeitos relacionados às suas características  
943 estruturais. Além disso, os solventes utilizados no processo de redução para a obtenção  
944 do rGO podem deixar resíduos e impurezas na estrutura do rGO e modificar seu nível de  
945 toxicidade e causar inconsistências nos resultados de diferentes estudos (Seabra *et al.*,  
946 2014; Ou *et al.*, 2016)

947 Apesar das contradições entre vários estudos, é comum a todos que o rOG apresenta  
948 algum nível de toxicidade (Liu *et al.*, 2011; Gurunathan *et al.*, 2012; Das *et al.*, 2013;  
949 Chatterjee *et al.*, 2014; Jaworski *et al.*, 2015). Logo, a relativa falta de toxicidade do OG  
950 apresentada neste estudo foi inesperada, o que leva a pensar que talvez o preparo e o  
951 manejo da solução possam influenciar a toxicidade de NMG, evidenciando a necessidade

952 de padronização para determinar características como as dimensões estruturais e o estado  
953 de agregação, além do solvente utilizado antes de avaliar quais as concentrações seriam  
954 mais seguras para a utilização biológicas destes NMG.

955 Outro fator importante é a interferência dos nanomateriais em diversos ensaios,  
956 principalmente em ensaios que utilizam fluoróforos (Monteiro-Riviere *et al.*, 2009;  
957 Creighton *et al.*, 2013; Jachak *et al.*, 2014; Petersen *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014). Essa  
958 interferência pode gerar artefatos experimentais e produzir falsas estimativas, aumentado  
959 ou diminuindo os valores reais daquilo que é medido. O presente estudo não apresentou  
960 interferência em relação a utilização do fluoróforo DCF-DA, isso provavelmente ocorreu  
961 devido a transferência da suspensão celular para a leitura em uma placa livre de meio de  
962 cultura, soro fetal bovino ou qualquer outra substância que poderia interagir com o OG e  
963 causar interferência nos resultados. Existem evidências de aumento da eficiência de NMG  
964 em interferir “sequestrando” parte da fluorescência quando estes nanomateriais interagem  
965 com substâncias presente em meios de cultura e soro fetal bovino (Creighton *et al.*, 2013;  
966 Wei *et al.*, 2015). Isso demonstra a importância de avaliar a interferência de NMG  
967 juntamente com outros ensaios realizados nos estudos e minimizar a interação de NMG  
968 com outras moléculas, evitando assim possíveis interferências e validando os resultados  
969 obtidos. Além disso, o presente estudo não demonstrou interferência na utilização do  
970 ensaio MTT na presença de OG corroborando com o mesmo resultado encontrado por  
971 Das *et al.* (2013). No entanto, Liao *et al.* (2011) evidenciou a interferência na utilização  
972 do ensaio MTT para avaliar a citotoxicidade do OG, onde o OG seria capaz de reagir com  
973 o MTT gerando um falso positivo e mascarando uma possível citotoxicidade. O teste de  
974 interferência deste estudo foi realizado para testar a interferência com a presença do OG  
975 diretamente na placa, sem a realização da lavagem do poço e mesmo assim não foi  
976 evidenciada a interferência dos métodos que utilizaram fluoróforos e cromóforos,



977 demonstrando que dificilmente o OG possa ter interferido nos ensaios realizados, onde  
978 ocorreu a lavagem dos poços diminuindo drasticamente a quantidade de OG presente na  
979 realização dos ensaios.

980 Diversos estudos presentes na literatura reportam o estresse oxidativo como principal  
981 mecanismo de ação para a toxicidade do rOG (Guo *et al.*, 2014; Zhao *et al.*, 2014; Ou *et*  
982 *al.*, 2016). Neste estudo, apesar o OG ter demonstrado um aumento na geração de ROS,  
983 a capacidade antioxidante total e a viabilidade não foi afetada, o que leva a conclusão de  
984 que o estresse oxidativo pode não ser a principal causa de toxicidade de OG, mas talvez  
985 esteja mais relacionado ao metabolismo e interação com outras moléculas. No entanto,  
986 para melhor confirmar essa hipótese, outros parâmetros como atividade de enzimas  
987 antioxidantes, integridade da estrutura e ocorrência de peroxidação lipídica de  
988 membranas, atividade metabólica e quantificação do estado energético celular devem ser  
989 verificados. Além disso, testes *in silico* e através de técnicas de detecção química devem  
990 ser empregados para melhor elucidar a interação do OG com outras moléculas e se sua  
991 toxicidade está sendo afetada.

992

### 993 **Referências bibliográficas**

994

- 995 Alberts, B. et al., 2010. Biologia molecular da célula. Porto Alegre: ArtMed. 1054p
- 996 Aoyama, K., Watabe, M., Nakaki, T. 2008. Regulation of Neuronal Glutathione  
997 Synthesis. J. Pharmacol. Sci. 108, 227-238. doi.org/10.1254/jphs.08R01CR
- 998 Arivazhagan, P., Shila, S., Kumaran, S., Panneerselvam, C., 2002. Effect of DL- $\alpha$ -lipoic  
999 acid on the status of lipid peroxidation and antioxidant enzymes in various brain  
1000 regions of aged rats. Exp. Gerontol. 37, 803–811. doi:10.1016/S0531-  
1001 5565(02)00015-3
- 1002 Barbosa, L.F., De Medeiros, M.H.G., Augusto, O., 2006. Danos oxidativos e  
1003 neurodegeneração: O que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? Quim.  
1004 Nova 29, 1352–1360. doi:10.1590/S0100-40422006000600034

- 1005 Basu, P.P., Shah, N.J., Aloysius, M.M., Brown Jr., R.S. 2014. Effect of Vitamin E and  
1006 Alpha Lipoic Acid in Nonalcoholic Fatty Liver Disease: A Randomized, Placebo-  
1007 Controlled, Open-Label, Prospective Clinical Trial (VAIN Trial). *Open J.*  
1008 *Gastroenterol.* 4: 199-207. doi:10.4236/ojgas.2014.45030
- 1009 Baun, A., Sorensen, S.N., Rasmussen, R.F., Hartmann, N.B., Koch, C.B. 2008. Toxicity  
1010 and bioaccumulation of xenobiotic organic compounds in the presence of aqueous  
1011 suspensions of aggregates of nano-C60. *Aquatic Tox.* 86: 379-387.  
1012 doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.11.019
- 1013 Chang, Y., Yang, S.-T., Liu, J.-H., Dong, E., Wang, Y., Cao, A., Liu, Y., Wang, H., 2011.  
1014 In vitro toxicity evaluation of graphene oxide on A549 cells. *Toxicol. Lett.* 200, 201–  
1015 210. doi:10.1016/j.toxlet.2010.11.016
- 1016 Chatterjee, N., Eom, H.J., Choi, J., 2014. A systems toxicology approach to the surface  
1017 functionality control of graphene-cell interactions. *Biomaterials* 35, 1109–1127.  
1018 doi:10.1016/j.biomaterials.2013.09.108
- 1019 Cleaves, L.I., Bergin, E.A., Alexander, C.M.O., Du, F., Graninger, D., Öberg, K.I.,  
1020 Harries, T.J., 2014. The ancient heritage of water ice in the solar system. *Science*  
1021 (80). 345, 1590–3. doi:10.1126/science.1258055
- 1022 Creighton, M.A., Rangel-Mendez, J.R., Huang, J., Kane, A.B., Hurt, R.H., 2013.  
1023 Graphene-induced adsorptive and optical artifacts during in vitro toxicology assays.  
1024 *Small* 9, 1921–1927. doi:10.1002/smll.201202625
- 1025 Çakatay, U., 2006. Pro-oxidant actions of  $\alpha$ -lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Med.*  
1026 *Hypotheses* 66, 110–117. doi:10.1016/j.mehy.2005.07.020
- 1027 Das, S., Singh, S., Singh, V., Joung, D., Dowding, J.M., Reid, D., Anderson, J., Zhai, L.,  
1028 Khondaker, S.I., Self, W.T., Seal, S., 2013. Oxygenated functional group density on  
1029 graphene oxide: Its effect on cell toxicity. Part. Part. Syst. Charact. 30, 148–157.  
1030 doi:10.1002/ppsc.201200066
- 1031 Day, B.J., 2014. Antioxidant therapeutics: Pandoras box. *Free Radic. Biol. Med.* 66, 58–  
1032 64. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.047
- 1033 Dickinson, B.C., Chang, C.J., 2012. Chemistry and biology of reactive oxygen species in  
1034 signaling or stress responses. *Nat Chem Biol* 7, 504–11.  
1035 doi:10.1038/nchembio.607.Chemistry
- 1036 Decker, H., Holde, K.E. 2011. Oxygen and the evolution of life. Germany: Springer-  
1037 Verlag Berlin Heidelberg. 172p
- 1038 D’Orazio, J., Jarrett, S., Amaro-Ortiz, A., Scott, T., 2013. UV radiation and the skin. *Int.*  
1039 *J. Mol. Sci.* 14, 12222–12248. doi:10.3390/ijms140612222
- 1040 Duch, M.C., Budinger, G.R.S., Liang, Y.T., Soberanes, S., Urich, D., Chiarella, S.E.,  
1041 Campochiaro, L.A., Gonzalez, A., Chandel, N.S., Hersam, M.C., 2011. Minimizing

- 1042 Oxidation and Stable Nanoscale Dispersion Improves the Biocompatibility of  
1043 Graphene in the Lung. *Nano Lett* 12, 5201–5207. doi:10.1021/nl202515a
- 1044 El-Orabi, N.F., Rogers, C.B., Gray Edwards, H., Schwartz, D.D., 2011. Heat-induced  
1045 inhibition of superoxide dismutase and accumulation of reactive oxygen species  
1046 leads to HT-22 neuronal cell death. *J. Therm. Biol.* 36, 49–56.  
1047 doi:10.1016/j.jtherbio.2010.11.002
- 1048 Friedman, J. 2011. Why Is the Nervous System Vulnerable to Oxidative Stress? Oxidative  
1049 Stress and Free Radicals in Neurology. Humana Press Inc. 19-28p. doi:  
1050 10.1007/978-1-60327-514-9\_2
- 1051 Forman, H.J., Davies, K.J.A., Ursini, F. 2014. How do nutritional antioxidants really  
1052 work: nucleophilic tone and para-hormesis versus free radical scavenging *in vivo*.  
1053 *Free Rad. Biol. Med.* 66, 24-35. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.045.
- 1054 Futuyama, D.J., Morgante, J.S., 2002. Evolução, ciência e sociedade. São Paulo:  
1055 Sociedade brasileira de genética. 73p.
- 1056 Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D., 2001. Oxidative stress induced-  
1057 neurodegenerative diseases: The need for antioxidants that penetrate the blood brain  
1058 barrier. *Neuropharmacology* 40, 959–975. doi:10.1016/S0028-3908(01)00019-3
- 1059 Gollihar, J., Levy, M., Ellington, A.D., 2014. Many paths to the origin of life. *Science*  
1060 (80) 343, 259–260. doi:10.1126/science.1246704
- 1061 Gott, J.R., Jurić, M., Schlegel, D., Hoyle, F., Vogeley, M., Tegmark, M., Bahcall, N.,  
1062 Brinkmann, J., 2005. A Map of the Universe. *Astrophys. J.* 624, 463.  
1063 doi:10.1086/428890
- 1064 Guo, X., Mei, N., 2014. Assessment of the toxic potential of graphene family  
1065 nanomaterials. *J. Food Drug Anal.* 22, 105–115. doi:10.1016/j.jfda.2014.01.009
- 1066 Gurunathan, S., Han, J.W., Dayem, A.A., Eppakayala, V., Kim, J.H., 2012. Oxidative  
1067 stress-mediated antibacterial activity of graphene oxide and reduced graphene oxide  
1068 in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Nanomedicine* 7, 5901–5914.  
1069 doi:10.2147/IJN.S37397
- 1070 Gurunathan, S., Han, J.W., Eppakayala, V., Kim, J.H., 2013. Microbial reduction of  
1071 graphene oxide by *Escherichia coli*: A green chemistry approach. *Colloids Surfaces*  
1072 *B Biointerfaces* 102, 772–777. doi:10.1016/j.colsurfb.2012.09.011
- 1073 Gutteridge, J.M.C., Halliwell, B., 2010. Antioxidants: Molecules, medicines, and myths.  
1074 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 393, 561–564. doi:10.1016/j.bbrc.2010.02.071
- 1075 Hao, L., Wang, Z., Xing, B. 2009. Effect of sub-acute exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles on  
1076 oxidative stress and histopathological changes in juvenile carp (*Cyprinus carpio*).  
1077 *J. Environ. Sci.*, 21: 1459-1466. doi.org/10.1016/S1001-0742(08)62440-7

- 1078 Harrison, J.F., Kaiser, A., VandenBrooks, J.M., 2010. Atmospheric oxygen level and the  
1079 evolution of insect body size. *Proc. R. Soc. B* 277, 1939.  
1080 doi:10.1098/rspb.2010.0001
- 1081 Hermes-Lima, M., Zenteno-Savín, T. 2002. Animal response to drastic changes in oxygen  
1082 availability and physiological oxidative stress. *Comp. Biochem. Physiol.*, 133, 537-  
1083 556. doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00080-7  
1084
- 1085 Hermes-Lima, M. 2004. Oxygen in biology and biochemistry: role of free radicals. In:  
1086 Storey K.B. (Eds.). *Functional metabolism: regulation and adaptation*. New  
1087 Jersey: John Wiley & Sons, p. 319-368.
- 1088 Higgs, P.G., Lehman, N., 2014. The RNA World: molecular cooperation at the origins of  
1089 life. *Nat. Rev. Genet.* 16, 7–17. doi:10.1038/nrg3841
- 1090 Jachak, A.C., Creighton, M., Qiu, Y., Kane, A.B., Hurt, R.H. 2014 Biological interactions  
1091 and safety of graphene materials. *MRS Bull.* 37, 1307-1313.  
1092 doi:10.1557/mrs.2012.181
- 1093 Jaworski, S., Sawoz, E., Kutwin, M., Wierzbicki, M., Hinzmann, M., Grodzik, M.,  
1094 Winnicka, A., Lipinska, L., Wlodyga, K., Chwalibog, A. 2015. In vitro and in vivo  
1095 effects of graphene oxide and reduced graphene oxide on glioblastoma. *Int. J.*  
1096 *Nanomed.* 10, 1585-1596. doi:10.2147/IJN.S77591
- 1097 Jones, W., Li, X., Qu, Z. chao, Perriott, L., Whitesell, R.R., May, J.M., 2002. Uptake,  
1098 recycling, and antioxidant actions of  $\alpha$ -lipoic acid in endothelial cells. *Free Radic.*  
1099 *Biol. Med.* 33, 83–93. doi:10.1016/S0891-5849(02)00862-6
- 1100 Kandel, E.R. et al., 2013. *Principles of neural science*. New York: McGraw-Hill. 1619p
- 1101 Kahru, A., Dubourguier, H.C., 2010. From ecotoxicology to nanoecotoxicology.  
1102 *Toxicology* 269, 105–119. doi:10.1016/j.tox.2009.08.016
- 1103 Kleinkauf-Rocha, J., Bobermin, L.D., Machado, P. de M., Gonçalves, C.A., Gottfried, C.,  
1104 Quincozes-Santos, A., 2013. Lipoic acid increases glutamate uptake, glutamine  
1105 synthetase activity and glutathione content in C6 astrocyte cell line. *Int. J. Dev.*  
1106 *Neurosci.* 31, 65–170. doi:10.1016/j.ijdevneu.2012.12.006
- 1107 Kostarelos, K., Novoselov, K.S., 2014. Exploring the interface of graphene and biology.  
1108 *Science* (80). 344, 261–263. doi:10.1126/science.1246736
- 1109 Kütter, M.T., Romano, L.A., Ventura-Lima, J., Tesser, M.B., Monserrat, J.M., 2014.  
1110 Antioxidant and toxicological effects elicited by alpha-lipoic acid in aquatic  
1111 organisms. *Comp. Biochem. Physiol. Part - C Toxicol. Pharmacol.* 162, 70–76.  
1112 doi:10.1016/j.cbpc.2014.03.008
- 1113 Lal, A.K., 2008. Origin of life. *Astrophys. Space Sci.* 317, 267–278. doi:10.1007/s10509-  
1114 008-9876-6

- 1115 Li, D.W., Li, G.R., Lu, Y., Liu, Z.Q., Chang, M., Yao, M., Cheng, W., Hu, L.S., 2013.  
 1116 alpha-lipoic acid protects dopaminergic neurons against MPP<sup>+</sup>-induced apoptosis  
 1117 by attenuating reactive oxygen species formation. *Int. J. Mol. Med.* 32, 108–114.  
 1118 doi:10.3892/ijmm.2013.1361
- 1119 Liu, J., 2008. The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient  $\alpha$ -lipoic acid on  
 1120 improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: An overview.  
 1121 *Neurochem. Res.* 33, 194–203. doi:10.1007/s11064-007-9403-0
- 1122 Liu, S., Zeng, T.H., Hofmann, M., Burcombe, E., Wei, J., Jiang, R., 2011. Antibacterial  
 1123 Activity of Graphite , Graphite Oxide , Graphene Oxide , and Reduced Graphene  
 1124 Oxide : Membrane and Oxidative Stress 6971–6980. doi:10.1021/nn202451x
- 1125 Mauro, G.L., Cataldo, P. Barbera, G., Sanfilippo, A. 2014.  $\alpha$ -Lipoic Acid and Superoxide  
 1126 Dismutase in the Management of Chronic Neck Pain: A Prospective Randomized  
 1127 Study. *Drugs R. D.* 14, 1-7. doi:10.1007/s40268-013-0035-3
- 1128 May, J.M., Qu, Z. chao, Nelson, D.J., 2006. Cellular disulfide-reducing capacity: An  
 1129 integrated measure of cell redox capacity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 344,  
 1130 1352–1359. doi:10.1016/j.bbrc.2006.04.065
- 1131 May, J.M., Qu, Z., Nelson, D.J., 2007. Uptake and reduction of alpha-lipoic acid by  
 1132 human erythrocytes. *Clin. Biochem.* 40, 1135–42.  
 1133 doi:10.1016/j.clinbiochem.2007.06.009
- 1134 Mayr, J.A., Feichtinger, R.G., Tort, F., Ribes, A., Sperl, W., 2014. Lipoic acid  
 1135 biosynthesis defects. *J. Inherit. Metab. Dis.* 37, 553-563. doi:10.1007/s10545-014-9705-  
 1136 8
- 1137 Moini, H., Packer, L., Saris, N.-E.L., 2002. Antioxidant and prooxidant activities of  
 1138 alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 182, 84–90.  
 1139 doi:10.1006/taap.2002.9437
- 1140 Monteiro-Riviere, N.A., Inman, A.O., Zhang, L.W., 2009. Limitations and relative utility  
 1141 of screening assays to assess engineered nanoparticle toxicity in a human cell line.  
 1142 *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 234, 222–235. doi:10.1016/j.taap.2008.09.030
- 1143 Novoselov, K.S., Geim, A.K., Morozov, S. V, Jiang, D., Zhang, Y., Dubonos, S. V,  
 1144 Grigorieva, I. V, Firsov, A.A., 2004. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon  
 1145 Films. *Source Sci. New Ser. Gene Expr. Genes Action* 306, 666–669.  
 1146 doi:10.1126/science.1102896
- 1147 Ou, L., Song, B., Liang, H., Liu, J., Feng, X., Deng, B., Sun, T., Shao, L., 2016. Toxicity  
 1148 of graphene-family nanoparticles: a general review of the origins and mechanisms.  
 1149 *Part. Fibre Toxicol.* 13, 57. doi:10.1186/s12989-016-0168-y
- 1150 Packer L, Cadenas E., 2011. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of  
 1151 transcription and cell signaling. *J. Clin. Biochem Nutr* 48, 26-32.  
 1152 doi:10.3164/jcbtn.11-005FR.

- 1153 Pamplona, R., Costantini, D. 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against  
 1154 oxidative stress in animals. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 301,  
 1155 843–863. doi:10.1152/ajpregu.00034.2011
- 1156 Pan, Y., Sahoo, N.G., Li, L., 2012. The application of graphene oxide in drug delivery.  
 1157 *Expert Opin. Drug Deliv.* 9, 1365–1376. doi:10.1517/17425247.2012.729575
- 1158 Panigrahi, M., Sadguna, Y., Shivakumar, B.R., Kolluri, S. V, Roy, S., Packer, L.,  
 1159 Ravindranath, V., 1996. alpha-Lipoic acid protects against reperfusion injury  
 1160 following cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* 717, 184–8. doi.org/10.1016/0006-  
 1161 8993(96)00009-1
- 1162 Petersen, E.J., Henry, T.B., Zhao, J., MacCuspie, R.I., Kirschling, T.L., Dobrovolskaia,  
 1163 M.A., Hackley, V., Xing, B., White, J.C., 2014. Identification and avoidance of  
 1164 potential artifacts and misinterpretations in nanomaterial ecotoxicity measurements.  
 1165 *Environ. Sci. Technol.* 48, 4226–4246. doi:10.1021/es4052999
- 1166 Pirlich, M., Kiok, K., Sandig, G., Lochs, H., Grune, T., 2002. Alpha-lipoic acid prevents  
 1167 ethanol-induced protein oxidation in mouse hippocampal HT22 cells. *Neurosci. Lett.*  
 1168 328, 93–96. doi:10.1016/S0304-3940(02)00415-9
- 1169 Reczek, C.R., Chandel, N.S., 2015. ROS-dependent signal transduction. *Curr. Opin. Cell*  
 1170 *Biol.* 33, 8–13. doi:10.1016/j.ceb.2014.09.010
- 1171 Reed, L.J., 2001. A Trail of Research from Lipoic Acid to  $\alpha$ -Keto Acid Dehydrogenase  
 1172 Complexes. *J. Biol. Chem.* 276, 38329–38336. doi:10.1074/jbc.R100026200
- 1173 Rochette, L., Eliana Ghibu, S., Richard, C., Zeller, M., Cottin, Y., Vergely, C., 2013.  
 1174 Direct and indirect antioxidant properties of  $\alpha$ -lipoic acid and therapeutic  
 1175 potential. *Mol. Nutr. Food Res* 57, 114125. doi:10.1002/mnfr.201200608
- 1176 Rosarin, F.S., Arulmozhi, V., Nagarajan, S., Mirunalini Sakaran. 2012. Antiproliferative  
 1177 effect of silver nanoparticles synthesized using amla on Hep2 cell line. *A. P. J.*  
 1178 *Trop. Med.* 1 – 10. doi: 10.1016/S1995-7645(12)60193-X
- 1179 Schubert, D., Piasecki, D., 2001. Oxidative glutamate toxicity can be a component of the  
 1180 excitotoxicity cascade. *J Neurosci* 21, 7455–7462. doi:21/19/7455
- 1181 Schubert, D., Dargusch, R., Raitano, J., Chan, S.W., 2006. Cerium and yttrium oxide  
 1182 nanoparticles are neuroprotective. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 342, 86–91.  
 1183 doi:10.1016/j.bbrc.2006.01.129
- 1184 : Seabra, A.B., Paula, A.J., De Lima, R., Alves, O.L., Durán, N., 2014. Nanotoxicity of  
 1185 graphene and graphene oxide. *Chem. Res. Toxicol.* 27, 159–168. doi  
 1186 10.1021/tx400385x
- 1187 Shay, K.P., Michels, A.J., Li, W., Kong, A.N.T., Hagen, T.M., 2012. Cap-independent  
 1188 Nrf2 translation is part of a lipoic acid-stimulated detoxification stress response.  
 1189 *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823, 1102–1109.  
 1190 doi:10.1016/j.bbamcr.2012.04.002

- 1191 Shinto, L., Quinn, J., Montine, T., Dodge, H H., Woodwar, W., Baldauf-Wagner, S.,  
1192 Waichunas, D., Bumgarner, L., Bourdette, D., Silbert, L., Kaye, J. 2014. A  
1193 Randomized Placebo-Controlled Pilot Trial of Omega-3 Fatty Acids and Alpha  
1194 Lipoic Acid in Alzheimer’s Disease. *J. Alzh. Dis.*, 38: 111-120. doi:10.3233/JAD-  
1195 130722
- 1196 Somers, C.M., Yauk, C.L., White, P.A., Parfett, C.L.J., Quinn, J.S., 2002. Air pollution  
1197 induces heritable DNA mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 15904–7.  
1198 doi:10.1073/pnas.252499499
- 1199 Wang, A., Pu, K., Dong, B., Liu, Y., Zhang, L., Zhang, Z., Duan, W., Zhu, Y., 2013. Role  
1200 of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity and genotoxicity of graphene  
1201 oxide towards human lung fibroblast cells. *J. Appl. Toxicol.* 33, 1156–1164.  
1202 doi:10.1002/jat.2877
- 1203 Wei, X.Q., Hao, L.Y., Shao, X.R., Zhang, Q., Jia, X.Q., Zhang, Z.R., Lin, Y.F., Peng, Q.,  
1204 2015. Insight into the Interaction of Graphene Oxide with Serum Proteins and the  
1205 Impact of the Degree of Reduction and Concentration. *ACS Appl. Mater. Interfaces*  
1206 7, 13367–13374. doi:10.1021/acsami.5b01874
- 1207 Winterbourn, C.C., 2008. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen  
1208 species. *Nat Chem Biol* 4, 278–286. doi:10.1038/nchembio.85
- 1209 Wojtoniszak, M., Chen, X., Kalenczuk, R.J., Wajda, A., Łapczuk, J., Kurzewski, M.,  
1210 Drozdziak, M., Chu, P.K., Borowiak-Palen, E., 2012. Synthesis, dispersion, and  
1211 cytocompatibility of graphene oxide and reduced graphene oxide. *Colloids Surfaces*  
1212 *B Biointerfaces* 89, 79–85. doi:10.1016/j.colsurfb.2011.08.026
- 1213 Xing, F.-Y., Guan, L.-L., Li, Y.-L., Jia, C.-J., 2016. Biosynthesis of reduced graphene  
1214 oxide nanosheets and their in vitro cytotoxicity against cardiac cell lines of *Catla*  
1215 *catla*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 48, 110–115. doi:10.1016/j.etap.2016.09.022
- 1216 Yang, K., Gong, H., Shi, X., Wan, J., Zhang, Y., Liu, Z., 2013. In vivo biodistribution  
1217 and toxicology of functionalized nano-graphene oxide in mice after oral and  
1218 intraperitoneal administration. *Biomaterials* 34, 2787–2795.  
1219 doi:10.1016/j.biomaterials.2013.01.001
- 1220 Yang, X., Zhang, X., Liu, Z., Ma, Y., Huang, Y., Chen, Y., 2008. High-efficiency loading  
1221 and controlled release of doxorubicin hydrochloride on graphene oxide. *J. Phys.*  
1222 *Chem. C* 112, 17554–17558. doi:10.1021/jp806751k
- 1223 Yue, H., Wei, W., Yue, Z., Wang, B., Luo, N., Gao, Y., Ma, D., Ma, G., Su, Z., 2012.  
1224 The role of the lateral dimension of graphene oxide in the regulation of cellular  
1225 responses. *Biomaterials* 33, 4013–4021. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.02.021
- 1226 Zhao, J., Wang, Z., White, J.C., Xing, B., 2014. Graphene in the Aquatic Environment :  
1227 Adsorption , Dispersion , Toxicity and Transformation. *Environ. Sci. Technol.* 48,  
1228 9995-10009. doi:10.1021/es5022679

1229 Zhou, H., Zhang, B., Zheng, J., Yu, M., Zhou, T., Zhao, K., Jia, Y., Gao, X., Chen, C.,  
1230 Wei, T., 2014. The inhibition of migration and invasion of cancer cells by graphene  
1231 via the impairment of mitochondrial respiration. *Biomaterials* 35, 1597–1607.  
1232 doi:10.1016/j.biomaterials.2013.11.020

1233