

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR – PPGGEv

KARINA ALVES FEITOSA

Análise toxicológica da nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe₃O₄) com ligantes de sulfonato de sódio (SO₃-Na₊): *in vitro* e *in vivo*

SÃO CARLOS – SP
2022

KARINA ALVES FEITOSA

Análise toxicológica da nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe₃O₄) com ligantes de sulfonato de sódio (SO₃-Na⁺): *in vitro* e *in vivo*

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica e Biologia molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal

SÃO CARLOS – SP
2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Karina Alves Feitosa, realizada em 25/10/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)

Prof. Dr. Anderson Ferreira da Cunha (UFSCar)

Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra (UFSCar)

Profa. Dra. Regiane de Fátima Travençolo (Prothera Biotecnologia)

Profa. Dra. Camila Cristina de Foggi (UFRGS)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família, pelo apoio durante essa etapa.

Agradeço à minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Fernanda de Freitas Anibal pela ajuda, apoio e amizade durante todos esses anos.

Agradeço a todas as amigadas realizadas, em especial à Ana Carolina Fattori e ao Ricardo de Oliveira Correia.

Agradeço ao Prof. Dr. Iran Malavazi, Prof. Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes e Dr.^a Juliana Cancino Bernardi durante etapa de caracterização da nanopartícula.

Agradeço a Prof.^a Dr.^a Márcia Regina Cominetti e a sua equipe por disponibilizar seu equipamento para a citometria.

Agradeço ao Prof. Dr. Edson Garcia Soares e a Dr.^a Mayara Rosolem pelo auxílio na parte histológica do projeto. À Dr.^a Mayara agradeço também pela amizade.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (Código de Financiamento – 001).

Agradeço a PETROBRAS (Processo No. 2017/00010-7) pelo apoio financeiro e confiança e ao Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) pela disponibilidade em contribuir com nosso trabalho.

Obrigada!

RESUMO

Conhecida pelo seu potencial biocompatível e sua propriedade magnética, as nanopartículas de óxido de ferro são alvos de diversos estudos para diferentes aplicações. Entretanto, a síntese de novas nanopartículas com diferentes características físico-químicas acarretam em desconhecidas interações biológicas que podem trazer riscos à saúde de seus manipuladores. Nesse estudo, a nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe₃O₄) com ligantes de sulfonato de sódio (SO₃⁻Na⁺), e de interesse no setor energético, foi avaliada por meio de aspectos nanotoxicológicos. Inicialmente foi realizada caracterização morfológica, química e física da NP Fe₃O₄, através das técnicas MEV-FEG (Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução), DLS (Espalhamento de Luz Dinâmico), Potencial Zeta, UV-Vis (Espectroscopia de Absorção Ultravioleta Visível) e ATR-FTIR (Espectroscopia Infravermelho de Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier). Para os experimentos *in vitro*, foram analisadas diferentes concentrações de NP Fe₃O₄ (250; 100 e 50 µg/mL) frente aos fibroblastos murinos (LA-9) em períodos de 24, 48 e 72h. Dessa forma foi estabelecido seu potencial citotóxico através de análise de função mitocondrial (MTT), alterações morfológicas e internalização celular (Azul de Prússia), produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), Óxido nítrico (NO) (Reação de Griess), citocinas (IL-6 e TNF), determinação da morte celular (citometria de fluxo) e análise do potencial clonogênico no 7º dia após exposição. Para os experimentos *in vivo*, camundongos (BALB/c) foram divididos em 5 grupos experimentais (100; 50; 25 e 10 mg/Kg de NP Fe₃O₄), e foram expostos intraperitonealmente a 4 doses no período de 14 dias, sendo avaliado a toxicidade de doses repetidas. Foram avaliados sinais indicativos de toxicidade, parâmetros hematológicos (contagem global e diferencial de leucócitos), análises da função hepática (TGO e TGP), quantificação de citocinas (IFN-γ; TNF; IL-6 e IL-10) e análise histológica dos órgãos, coração, pulmão, fígado, baço e rins. Os resultados demonstraram que a NP Fe₃O₄ possui formato circular, com distribuição das partículas de forma heterogênea, compactada e com formação de aglomerados. Houve internalização de NP Fe₃O₄ para todas as concentrações testadas *in vitro* (250, 50 e 100 µg/mL) de forma tempo/dependente. Porém o aumento de EROs ocorreu somente para a concentração de 250 µg/mL. Além do mais, sugere-se que essa mesma concentração, desencadeou um processo de senescência nos fibroblastos (LA-9), devido ao baixo metabolismo celular e conseqüente redução na formação de colônias no período de sete dias. Todas as concentrações testadas durante experimentação *in vivo* (100; 50; 25 e 10 mg/Kg), promoveram danos aos órgãos dos camundongos, sobretudo para o fígado. Houve ativação do sistema imune mediante produção de leucócitos e citocinas pró-inflamatórias. Nossos resultados contribuem para o conhecimento acerca da toxicologia de nanopartículas de óxido de ferro, demonstrando a importância de análises em períodos maiores após exposição.

Palavras-chave: Nanotoxicologia; Inflamação; BALB/c; LA-9; Histologia; Senescência.

ABSTRACT

Known for their biocompatible potential and magnetic property, iron oxide nanoparticles are the target of several studies for different applications. However, the synthesis of new nanoparticles with different physicochemical characteristics leads to unknown biological interactions that may pose health risks to their manipulators. In this study, the mixed iron oxide nanoparticle (Fe_3O_4 NP) with sodium ($\text{SO}_3\text{-Na}^+$) sulfonate ligands, of interest in the energy sector, was evaluated through nanotoxicological aspects. Initially, morphological, chemical, and physical characterization of the Fe_3O_4 NP was performed using SEM-FEG (High-Resolution Scanning Electron Microscopy), DLS (Dynamic Light Scattering), Zeta Potential, UV-Vis (Ultraviolet-Visible Absorption Spectroscopy) and ATR-FTIR (Fourier Transform Attenuated Total Reflection Infrared Spectroscopy) techniques. For the *in vitro* experiments, different concentrations of Fe_3O_4 NP (250; 100 and 50 $\mu\text{g/mL}$) were analyzed against murine fibroblasts (LA-9) in periods of 24, 48 and 72h. Thus, its cytotoxic potential was established through analysis of mitochondrial function (MTT), morphological changes and cell internalization (Prussian Blue), production of Reactive Oxygen Species (ROS), Nitric Oxide (NO) (Griess reaction), cytokines (IL-6 and TNF), determination of cell death (flow cytometry) and analysis of clonogenic potential on the 7th day after exposure. For the *in vivo* experiments, mice (BALB/c) were divided into 5 experimental groups (100; 50; 25 and 10 mg/Kg of Fe_3O_4 NP) and were intraperitoneally exposed to 4 doses over 14 days, and the toxicity of repeated doses was evaluated. Indicative signs of toxicity, hematological parameters (overall and differential leukocyte count), liver function analyses (TGO and TGP), quantification of cytokines (IFN- γ ; TNF; IL-6 and IL-10) and histological analysis of the organs, heart, lung, liver, spleen and kidneys were evaluated. The results showed that Fe_3O_4 NP has a circular shape, with heterogeneous particle distribution, compacted and agglomerate formation. There was the internalization of Fe_3O_4 NP for all concentrations tested *in vitro* (250, 50 and 100 $\mu\text{g/mL}$) in a time/dependent manner. However, the increase in ROS occurred only for the 250 $\mu\text{g/mL}$ concentration. Moreover, it is suggested that this same concentration triggered a senescence process in fibroblasts (LA-9), due to the low cellular metabolism and consequent reduction in colony formation within seven days. All concentrations tested during *in vivo* experimentation (100; 50; 25 and 10 mg/Kg) promoted damage to mouse organs, especially to the liver. There was activation of the immune system through the production of leukocytes and pro-inflammatory cytokines. Our results contribute to the knowledge about the toxicology of iron oxide nanoparticles, demonstrating the importance of analyses in longer periods after exposure.

Keywords: Nanotoxicology; Inflammation; BALB/c; LA-9; Histology; Senescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mecanismos de exposição às nanopartículas	4
Figura 2: Nanopartícula de Óxido de Ferro Misto (NP Fe ₃ O ₄)	6
Figura 3: Efeitos tóxicos da nanopartícula de óxido de ferro	10
Figura 4: Delineamento experimental <i>in vitro</i>	27
Figura 5: Delineamento experimental <i>in vivo</i>	29
Figura 6: MEV-FEG da nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe ₃ O ₄)	34
Figura 7: ATR-FTIR da nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe ₃ O ₄)	35
Figura 8: UV-VIS da nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe ₃ O ₄)	37
Figura 9: Viabilidade celular de fibroblastos (LA-9)	38
Figura 10: Morfologia dos fibroblastos (LA-9)	39
Figura 11: Internalização de nanopartículas em fibroblastos (LA-9)	40
Figura 12: Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	41
Figura 13: Produção de Óxido Nítrico (NO)	42
Figura 14: Quantificação de citocinas <i>in vitro</i>	42
Figura 15: Determinação da morte celular em fibroblastos (LA-9)	44
Figura 16: Ensaio clonogênico em fibroblastos (LA-9)	45
Figura 17: Colônias formadas pelos fibroblastos (LA-9)	46
Figura 18: Consumo de ração e água	46
Figura 19: Média do peso dos animais	47
Figura 20: Leucócitos totais no sangue e LCP	48
Figura 21: Contagem diferencial dos leucócitos no sangue	49
Figura 22: Contagem diferencial dos leucócitos no LCP	50
Figura 23: Peso do fígado e baço dos animais	50
Figura 24: Acúmulo da NP Fe ₃ O ₄ no fígado dos animais	51
Figura 25: Fotomicrografias de cortes de coração após 14 dias de exposição à NP Fe ₃ O ₄	52
Figura 26: Fotomicrografias de cortes de pulmão após 14 dias de exposição	54
Figura 27: Fotomicrografias de cortes de fígado após 14 dias de exposição	56
Figura 28: Fotomicrografias de cortes de baço após 14 dias de exposição	57
Figura 29: Fotomicrografias de cortes de rim após 14 dias de exposição	59
Figura 30: Dosagem de TGO e TGP	60
Figura 31: Quantificação de citocinas no plasma e LCP	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Experimento <i>in vivo</i>	29
Tabela 2: Valores médios do tamanho (Z-average) obtidos por DLS, Índice de Polidispersividade (Pdl) e Potencial Zeta da NP Fe ₃ O ₄ em água destilada, salina (NaCl 0,9%) e em meio de cultura (DMEM) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB)	36

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Nanotecnologia e Nanotoxicologia	1
1.2 Nanopartículas de Ferro	5
1.3 Propriedades e Aplicações das Nanopartículas de Ferro	7
1.4 Nanopartículas de Ferro: Biocompatibilidade e Toxicidade	9
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo geral	16
3.2 Objetivos específicos.....	16
3.2.1 Caracterização da nanopartícula	16
3.2.2 Experimentos <i>In vitro</i>	16
3.2.3 Experimentos <i>In vivo</i>	16
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Obtenção da nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe ₃ O ₄)	18
4.2 Caracterização da nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe ₃ O ₄)	18
4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG)	18
4.2.2 Espectroscopia Infravermelho de Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier (ATR-FTIR).....	18
4.2.3 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (PZ)	19
4.2.4 Espectroscopia de Absorção Ultravioleta Visível (UV-Vis)	19
4.3 Experimentos <i>in vitro</i>	19
4.3.1 Fibroblastos LA-9	19
4.3.2 Preparo das soluções e escolha das concentrações para exposição <i>in vitro</i>	20
4.3.3 Ensaio de citotoxicidade - Teste do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difeniltetrazólio (MTT).....	20
4.3.4 Análise de morfologia celular.....	21
4.3.5 Ensaio de Internalização celular - Azul de Prússia	21
4.3.6 Quantificação intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs).....	22
4.3.7 Quantificação de Óxido Nítrico (NO) no sobrenadante celular – Reação de Griess	23
4.3.8 Quantificação de citocinas no sobrenadante celular – <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ELISA)	23
4.3.9 Ensaio de Determinação da Morte Celular por Citometria de Fluxo.....	24
4.3.10 Ensaio de Clonogenicidade – <i>Clonogenic Assay</i>	26
4.4 Experimentos <i>In vivo</i>	27
4.4.1 Animais	27
4.4.2 Preparo das soluções para exposição <i>in vivo</i>	28
4.4.3 Via de exposição	28

4.4.4 Delineamento experimental	28
4.4.5 Consumo de ração e água e acompanhamento do peso dos animais	29
4.4.6 Punção da veia braquial	30
4.4.7 Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP).....	30
4.3.9 Contagem total e diferencial de leucócitos do sangue e do Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP).....	30
4.3.10 Coleta de órgãos: Peso e Análise histológica	31
4.3.11 Parâmetros bioquímicos: Função hepática.....	32
4.3.12 Quantificação de citocinas no plasma sanguíneo e Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) dos animais– <i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i> (ELISA).....	33
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
6. RESULTADOS	34
6.1 Caracterização	34
6.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG)	34
6.1.2 Espectroscopia Infravermelho de Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier (ATR-FTIR).....	34
6.1.3 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta	35
6.1.4 Espectroscopia de Absorção Ultravioleta Visível (UV-Vis)	36
6.2 Resultados <i>In vitro</i> – Fibroblastos (LA-9).....	37
6.2.1 Teste de citotoxicidade brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difeniltetrazólio (MTT).....	37
6.2.2 Morfologia celular.....	38
6.2.3 Internalização celular- Azul de Prússia	39
6.2.4 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	41
6.2.5 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO).....	41
6.2.6 Quantificação de citocinas no sobrenadante celular	42
6.2.7 Determinação da Morte Celular- Citometria de fluxo.....	43
6.2.8 Teste de viabilidade reprodutiva - Ensaio clonogênico (<i>Clonogenic Assay</i>)	45
6.3 Resultados <i>In vivo</i> – Camundongos (BALB/c)	46
6.3.1 Variação no consumo de ração e água pelos animais durante a exposição à NP Fe ₃ O ₄	46
6.3.2 Variação do peso dos animais durante a exposição à NP Fe ₃ O ₄	47
6.3.3 Contagem global de leucócitos totais no sangue e no Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) após exposição à NP Fe ₃ O ₄	47
6.3.4 Contagem diferencial dos leucócitos no sangue após a exposição à NP de Fe ₃ O ₄	48
6.3.5 Contagem diferencial dos leucócitos no Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) após a exposição à NP de Fe ₃ O ₄	49
6.3.6 Variações do peso dos fígados e baços dos animais após a exposição à NP Fe ₃ O ₄	50

6.3.7 Análise histopatológica dos órgãos (coração, pulmão, fígado, baço e rim) dos animais expostos à NP Fe ₃ O ₄	51
6.3.8 Parâmetros bioquímicos: Análise dos níveis das Transaminases Oxalacética (TGO) e Pirúvica (TGP) - Função hepática	60
6.3.9 Quantificação de citocinas no plasma sanguíneo e no Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) de camundongos (BALB/c) expostos a NP Fe ₃ O ₄	60
7. DISCUSSÃO	63
8. HIPÓTESES	74
9. CONCLUSÕES	75
10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
ANEXOS	89
i. Certificado CEUA	89
ii. Artigo <i>In vitro</i> : Toxicological effects of the mixed iron oxide nanoparticle (Fe ₃ O ₄ NP) on murine fibroblasts LA-9	91

1. INTRODUÇÃO

1.1 Nanotecnologia e Nanotoxicologia

Em 1969, o físico Richard Feynman, hoje considerado o pai da nanotecnologia, abordou durante uma palestra diversos conceitos sobre a manipulação dos átomos. Porém foi em 1974, que o cientista japonês Nório Taniguchi cunhou o termo “nanotecnologia”, como a ciência que consiste no processamento, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou uma molécula (BAYDA et al., 2019; POKRAJAC et al., 2021; KUMAR et al., 2022).

Hoje, a nanotecnologia encontra-se em vasto desenvolvimento e pode ser considerada como uma valiosa e promissora ferramenta do século XXI (BAYDA et al., 2019; POKRAJAC et al., 2021). Estudos utilizando nanopartículas (0,1 - 100 nm), onde fenômenos únicos ocorrem, permitem versatilidade em sua aplicação, dessa forma, revolucionando muitos setores da tecnologia, medicina e indústria (MAZARI et al., 2021; NNI, 2022).

As nanopartículas (NPs) são componentes essenciais que promovem o estudo da nanotecnologia (KHAN et al., 2021). Suas propriedades físico-químicas exclusivas derivam principalmente devido ao seu tamanho reduzido e da proximidade de suas partículas, que promovem por exemplo, aumento da área superficial, condutividade, aglomeração, solubilidade e permeabilidade, características que diferem de partículas com tamanhos maiores que 100 nm (NEL et al., 2006; SAJID et al., 2015; SENGUL e ASMATULU, 2020; HASSANI; DARAEI e SOBAT, 2020).

Diferentes estudos abordam o uso de nanopartículas nos mais diversos campos do conhecimento. Na área médica, a utilização de nanopartículas como *drug-delivery* na entrega direcionada de fármacos na terapia do câncer é um tema promissor (DANG e GUAN, 2020; ZHENG et al., 2020; YAO et al., 2020; SUN et al., 2021). Recentemente, durante pandemia do COVID-19, as nanopartículas também foram alvos de estudos sendo exploradas para desenvolvimento de vacinas ou ainda através de potencial propriedades antivirais contra o SARS-CoV-2 (KUSUMOPUTRO et al., 2020; VU et al., 2021). No setor alimentício, encontramos nanopartículas como nanosensores para detecção de microrganismos e toxinas contaminantes (LI et al., 2019; ANH et al., 2022). Na área de cosméticos, as

nanopartículas também podem ser encontradas em nanoemulsões de gel, loções, cremes e protetor solar (HAMMED et al., 2019; DRENO et al., 2019). Na construção civil, as nanopartículas podem ser utilizadas em diversos materiais, como concreto, tijolos, madeira e aços (MOHAJERANI et al., 2019). No setor de gás e petróleo, as nanopartículas, podem auxiliar durante extração, perfuração, refino, limpeza do derramamento de óleo, purificação de água e remoção de compostos indesejados (SIMONSEN; STRAND e ØYE, 2018; ZHOU et al., 2020). No presente estudo, a nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe₃O₄), possui potencial aplicação neste setor.

Indiscutivelmente, a nanotecnologia proporciona uma infinidade de aplicações e promove muitos benefícios para a sociedade o que resulta em mais oportunidades e desenvolvimentos de novas tecnologias (POKRAJAC et al., 2021). Em contraste, as características únicas das nanopartículas responsáveis por sua versatilidade tecnológica, estão relacionadas também ao seu potencial de toxicidade. Seu tamanho nanométrico, composição e carga superficial e formato, podem resultar em maior absorção, aumento de interações biológicas pelas células, e conseqüentemente podem desencadear uma ação pró-inflamatória (DOKTOROVOVA et al., 2014; VISWANATH e KIM, 2016; ZIELIŃSKA et al., 2020).

O chamado “nano-paradoxo” gera preocupações quanto ao desenvolvimento de regulações acerca da síntese e desenvolvimento de novos nanomateriais (LIU et al., 2022). Atualmente não há uma legislação unificada e assim, diferentes países utilizam-se de agências reguladoras específicas para os nanoproductos (HUPFFER e LAZZARETTI, 2019). A exemplo, os Estados Unidos (EUA) contam com a *Food and Drug Administration* (FDA), no qual suas políticas reguladoras atentam-se para os produtos nano em diferentes setores, como na alimentação, ramo farmacêutico, dispositivos médicos e cosméticos para segurança de possíveis efeitos tóxicos ao público. Já na União Europeia, os nanoproductos estão sob a mesma regulação de produtos químicos e os que apresentam potencial tóxico devem ser notificados junto Agência Europeia de Produtos Químicos e serem devidamente rotulados para garantir uso seguro (RESNIK e TINKLE, 2007; HAMBURG, 2012; RASMUSSEN et al., 2017; SOLTANI e POUYPOUY, 2019; HUPFFER e LAZZARETTI, 2019; LIU et al., 2022).

No Brasil, não há nenhuma regulação específica para a nanotecnologia. Órgãos não governamentais e internacionais, como a “*Organization for Economic*

Co-operation and Development” (OECD) e normas ISO, norteiam os estudos nanotoxicológicos, sobretudo sobre diferentes metodologias que podem ser utilizadas (OECD, 2018; HUPFFER e LAZZARETTI, 2019).

Assim, a Nanotecnologia deve estar aliada com a Nanotoxicologia, visando através de estudos sobre a toxicidade dos nanomateriais a qualidade de vida humana e do ambiente (AZQUETA e DUSINSKA, 2015; ZIELIŃSKA et al., 2020). Já que, a síntese de nanomateriais seguros e funcionais devem ser aliados ao conhecimento físico-químico e com as interações em sistemas biológicos (BURELLO, 2017).

Os estudos nanotoxicológicos utilizam-se de métodos disponíveis para linhagens celulares (*in vitro*) e em organismos vivos (*in vivo*), buscando alvos e mecanismos dos possíveis efeitos colaterais, acúmulo, degradação e eliminação da nanopartícula (ZIELIŃSKA et al., 2020; MOHAMED et al., 2022).

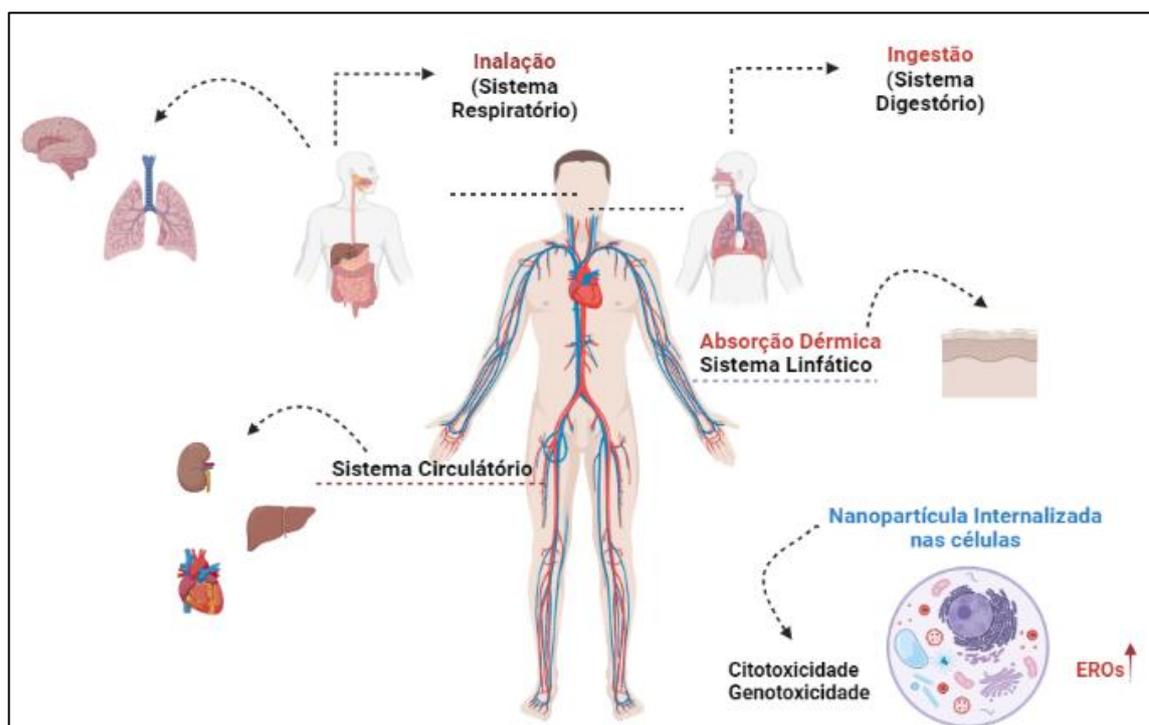
O modelo *in vitro* para estudos nanotoxicológicos tem sido amplamente utilizado, uma vez que culturas celulares podem ser melhor controladas e os dados são obtidos de maneira mais rápida. As células mais utilizadas para estudos citotóxicos, são macrófagos, fibroblastos, hepatócitos e células pulmonares e epiteliais (CLIFT et al., 2013; RICCARDI, SANTOS e GUASTALDI, 2015; CAO, LI e CHEN, 2021). No modelo *in vivo*, as técnicas de avaliação toxicológica focam em absorção, toxicocinética, metabolismo, identificação dos mecanismos de ação *in vivo* e identificação e caracterização das rotas e taxas de eliminação pelo organismo (HOBSON et al., 2016), permitindo assim uma análise sistêmica do organismo.

A exposição humana pelas NPs pode ocorrer pelo trato respiratório; trato gastrointestinal, absorção dérmica, injeção ou implantação. Devido ao reduzido tamanho das NPs, sendo menores que uma célula, o deslocamento para o sistema circulatório e linfático é facilitado, podendo alcançar e causar danos em tecidos e órgãos (NEL et al., 2006; BUZEA, BLANDINO e ROBBIE, 2007; BROHI et al., 2017; MOHAMED et al., 2022). Ainda podendo levar a alterações respiratórias, neurológicas, cardíacas, toxicidade do sistema reprodutivo e câncer (BUZEA e PACHECO, 2019; MOHAMED et al., 2022).

A toxicidade das NPs vem sendo alvo de diversos estudos e os fatores determinantes para a citotoxicidade e genotoxicidade de diferentes tipos de nanopartículas devem se ao fato de que, esses materiais podem ser internalizados pelas células e penetrar em organelas ou ainda sobrecarregar a superfície celular,

alterando sua fisiologia (WANG et al., 2015; BUZEA e PACHECO, 2019). Dentro das células, as NPs podem provocar o chamado estresse oxidativo, produzindo espécies reativas de oxigênio (EROs), ativando mediadores pró inflamatórios, o que está intrinsecamente relacionado com a capacidade tóxica das NPs (NAQVI et al., 2010; BIRBEN et al., 2012; MOHAMED et al., 2022).

Figura 1: Mecanismos de exposição às nanopartículas



A exposição humana pelas nanopartículas pode ocorrer por inalação, ingestão ou absorção dérmica, podendo causar danos a diferentes órgãos. Seu tamanho nanométrico também facilita sua entrada através da membrana celular, levando a danos intracelulares. **Fonte:** Criado com BioRender.com pela autora.

Outro ponto importante para os estudos nanotoxicológicos é a caracterização da nanopartícula, que deve anteceder os estudos *in vitro* e *in vivo*. O conhecimento obtido através da caracterização auxilia no entendimento da toxicidade, qualidade e segurança da nova nanopartícula (ZIELIŃSKA et al., 2020; MOHAMED et al., 2022), gerando resultados confiáveis e comparáveis com outros nanomateriais, permitindo sua categorização ou agrupamento (RASMUSSEN et al., 2018; LIU et al., 2022).

As técnicas de caracterização abordam aspectos morfológicos, estruturais, e físico-químicos, que permitem a obtenção de dados como tamanho, forma, área e carga superficial, morfologia, composição de ligantes, dispersabilidade,

aglomeração, atividade fotocatalítica, entre outros (BRAGUER et al., 2011; MOURDIKOUDIS; PALLARES e THAN, 2018; RASMUSSEN et al., 2018).

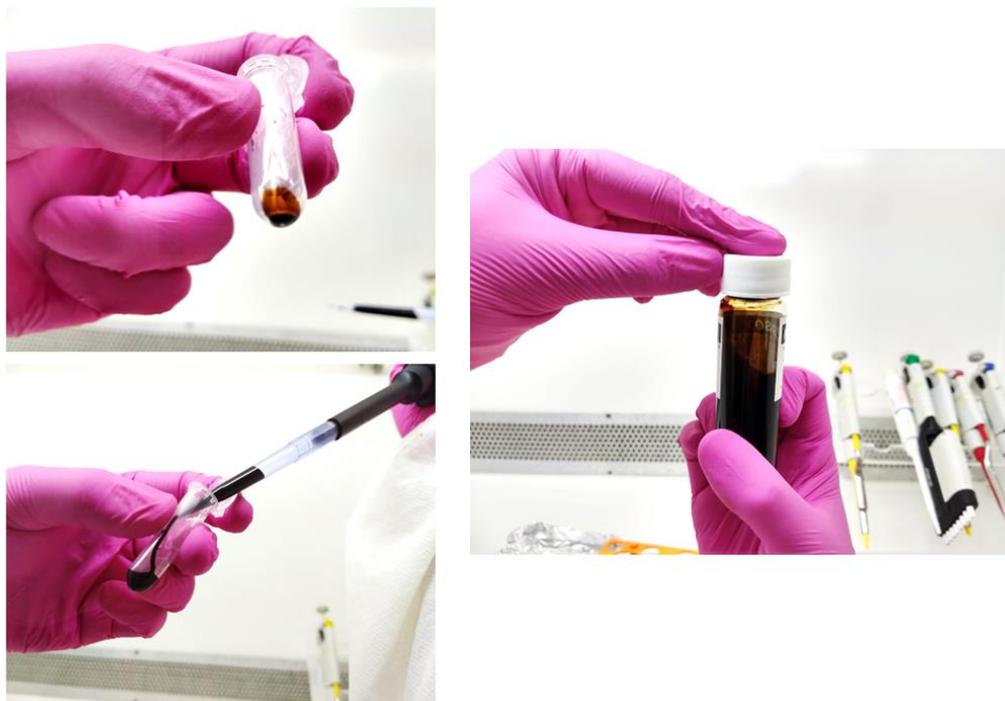
As NPs podem sofrer alterações dinâmicas de acordo com suas propriedades e o ambiente em que se encontra. Essas alterações resultam de transformações como, aglomeração, dissolução, tamanho e superfície química. Um exemplo é a formação da chamada proteína corona, que pode afetar sua biodistribuição no organismo, conseqüentemente interferindo no metabolismo, absorção celular, circulação sanguínea e outros efeitos biológicos subsequentes (CAI AND CHEN, 2018; DING et al., 2018; BAI et al., 2021; LIU et al., 2022).

1.2 Nanopartículas de Ferro

As nanopartículas de ferro podem ser oriundas de minérios magnéticos, como a magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e a hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (WU et al., 2015; NOQTA et al., 2019).

A magnetita é um mineral de coloração preta, com propriedade ferrimagnética e exibe em sua composição química, o ferro bivalente e trivalente, por isso também chamada de óxido de ferro misto (WU et al., 2015; NICULESCU; CHIRCOV e GRUMEZESCU, 2021). A maghemita é a forma oxidada da magnetita, dessa forma também ferrimagnética, de cor preta (WU et al., 2015). Por sua vez a hematita, possui cor avermelhada e é considerada paramagnética, e pode ser utilizada como material para obtenção de magnetita e maghemita (WU et al., 2015; MIRI; KHATAMI e SARANI, 2020). No presente trabalho foi utilizado a nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe_3O_4).

Figura 2: Nanopartícula de Óxido de Ferro Misto (NP Fe₃O₄)



A NP Fe₃O₄ analisada no presente trabalho apresenta-se de forma ferro-fluída e é oriunda do mineral magnetita. Fotos: Ricardo de Oliveira Correia.

A síntese de novas nanopartículas de ferro ocorre basicamente por dois processos, “*top-down*” e “*bottom-up*” (HAMDALLAH et al., 2020). A síntese “*top-down*” utiliza-se de métodos físicos, onde há o fracionamento do metal em pequenas frações por ação mecânica, podendo ocorrer por exemplo por moagem do mineral ou ablação a laser, onde o mineral é irradiado por ação a laser. Enquanto que a síntese “*bottom-up*”, dá se por métodos químicos, utilizando solventes, coprecipitação, microemulsões ou decomposição termal, por exemplo (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020; NICULESCU; CHIRCOV e GRUMEZESCU, 2021).

A síntese “*bottom-up*”, também pode ocorrer por métodos biológicos, chamado de “síntese-verde”, onde plantas e microorganismos podem ser usados para a síntese de nanopartículas de ferro (SÁNCHEZ-LÓPEZ et al., 2020; NICULESCU; CHIRCOV e GRUMEZESCU, 2021). A síntese verde é possível devido a bactérias magnetotáticas, que são produtoras de ferro ou por alguns compostos presentes em plantas como, aminoácidos, polifenóis ou açúcares, que agem como redutores ou estabilizadores do ferro (SAIF e CHEN, 2016; GONÇALO et al., 2020; LÓPEZ e ANTUCH, 2020; NICULESCU; CHIRCOV e GRUMEZESCU, 2021; GUAN et al., 2022).

O fato é que o método ideal para a síntese de nanopartículas de ferro, deve abordar parâmetros de ajustes e controles, em aspectos como temperatura, pH, cristalinidade, solubilidade, pureza, distribuição e forma das nanopartículas (AJINKYA et al., 2020). Ressaltando a importância dos estudos nanotoxicológicos para cada nanopartícula sintetizada, uma vez que a interação com diferentes meios e ligantes pode acarretar em alterações de sua estabilidade, promovendo possíveis danos tóxicos.

1.3 Propriedades e Aplicações das Nanopartículas de Ferro

Dentro do grupo das nanopartículas de ferro, estão as *SPIONs* (do inglês *Super Paramagnetic Iron Oxide Nanoparticles*), que compreendem às nanopartículas de óxido de ferro, com tamanhos entre 10-50 nm, que são alvos de diversos estudos, sobretudo para aplicação biomédica (PATIL et al., 2018). Além das propriedades únicas das nanopartículas, as *SPIONs* são conhecidas por serem biocompatíveis e biodegradáveis. Além do mais, sua principal propriedade, o magnetismo, permite sua utilização como agente de contraste para ressonância magnética e entrega direcionada de fármacos no organismo através de campos magnéticos externos (*Drug delivery*) (VO-DINH, 2007; COTIN et al., 2018; CHEE; LEO e LAI, 2018).

O uso das nanopartículas de ferro como agente de contraste para ressonância está em fase de estudos clínicos ou pré-clínicos, porém já encontra-se comercialmente, o Ferumoxytol, que possui aprovação pelo FDI (*Food and Drugs Administration*) dos Estados Unidos (STEPHAN; KIEVIT e ZHANG, 2011; SHEN; WU e CHEN, 2011) para o tratamento de anemia em pacientes com doença renal crônica (DULIŃSKA-LITEWKA et al., 2019).

Alguns estudos indicam poucos efeitos colaterais na utilização de nanopartículas de ferro, como no estudo de Anzai e colaboradores (2003) utilizando Ferumoxtran revestido com dextrano, desenvolvido para estudos de linfografia por ressonância, que demonstra apenas 6% dos pacientes com efeitos colaterais como dor de cabeça, náuseas e diarreia. Outro estudo com Ferrumoxytol e Ferumoxtran, realizado por Elhalawani e colaboradores (2020), mostrou que efeitos colaterais graves, como hipotensão e dores no peito, foram reportados para menos de 1% dos pacientes.

A terapia do câncer também ganha destaque na utilização das nanopartículas de ferro. O chamado *drug delivery* permite que medicamentos sejam direcionados ao tecido tumoral, utilizando um campo magnético externo. Dessa forma, as *SPIONs* funcionalizadas com tal droga, são guiadas através do magnetismo para o tecido alvo (YUAN et al., 2018; ZHI et al., 2020). Outra estratégia é o uso da hipertermia magnética, onde através de um campo magnético externo, é possível a elevação da temperatura do tecido tumoral, onde as *SPIONs* seriam injetadas. As células tumorais são mais sensíveis ao calor do que as células normais, e dessa forma ocorre a necrose apenas dessas células (KANDASAMY et al., 2018; ZHI et al., 2020; KAUSHIK et al., 2020).

As *SPIONs* também estão presentes no setor energético, nos processos de aumento de rendimento na recuperação de óleo nos reservatórios de petróleo. Um dos problemas enfrentados é que cerca de 2/3 do óleo não podem ser recuperados pelos métodos convencionais, uma vez que essa percentagem fica retido em poros de rochas mais profundas (HASHEMI-KIASARI et al., 2014; DIVANDARI et al., 2019). O estudo de Divandari e colaboradores (2019) demonstra a aplicação de NPs Fe_3O_4 para melhorar a recuperação de petróleo usando um campo magnético. Uma vez que, estas possuem um tamanho reduzido, é possível sua penetração nos poros das rochas, que atuam como se fossem um pistão em direção ao campo magnético, dessa forma retirando o óleo preso a esses poros.

As NPs também podem ser revestidas com polímeros, surfactantes ou compostos inorgânicos, que permitem uma maior estabilidade das partículas e melhor aplicabilidade, principalmente na separação óleo-água (SIMONSEN; STRAND e ØYE, 2018).

A NP do presente estudo (NP Fe_3O_4) foi sintetizado com a intenção de uso na indústria petrolífera e, portanto, grupos terminais de sulfonato de sódio (SO_3)- Na^+ , um surfactante, foram funcionalizados à sua superfície. Como dito anteriormente, surfactantes são geralmente aplicados para estabilizar nanopartículas, mas também auxiliam na sua solubilidade. A adição deste surfactante reduz a tensão superficial dos fluidos e aumenta a imersão das partículas, que são responsáveis por funções específicas, como controle na entrega de surfactante na interface óleo-água e molhabilidade da rocha, que é a capacidade desse fluido em aderir aos poros dessas rochas (I RIVERA-SOLÁRIO et al., 2013; CAPLAN et al., 2019;

ROSESTOLATO et al., 2019; SILVA-YUMI, ROMERO e LESCANO, 2021), ajudando assim na recuperação de petróleo.

1.4 Nanopartículas de Ferro: Biocompatibilidade e Toxicidade

O ferro participa de diversos processos em nosso organismo, como transporte de oxigênio, atuando como um co-fator essencial para enzimas da cadeia respiratória, replicação de ácido nucleico para síntese de DNA ou ainda promovendo a sinalização e proliferação celular (YU e RICHARDSON, 2007; NAKAMURA et al., 2019; WANG e BABITT, 2019). Além do mais, está presente na formação de hemoglobina e mioglobina e em vias bioquímicas, como produção de neurotransmissores (EDSON; BAJEL e CHANDY, 2008).

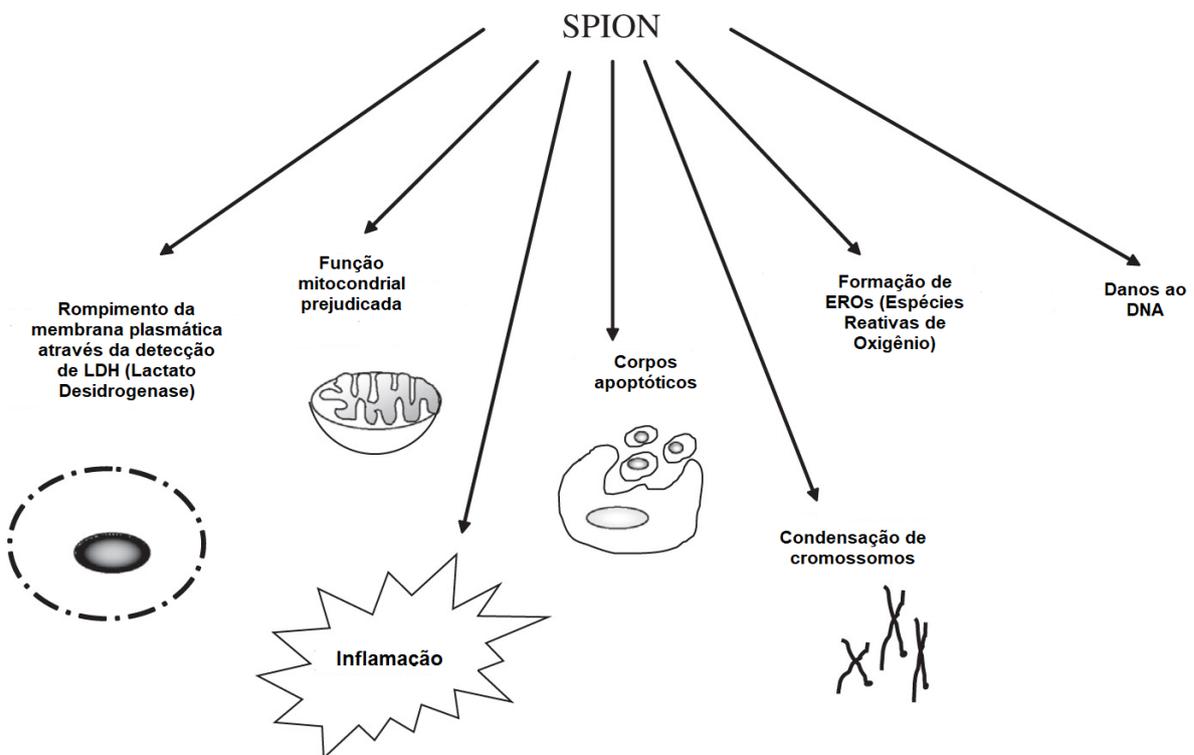
A biocompatibilidade das *SPIONs* está relacionada com a presença de vias metabólicas do ferro em nosso organismo. O ferro é degradado no fígado e após, íons de Fe livres ligam se as chamadas apoferritina e apotransferrina, formando a ferritina e transferrina, que são complexos proteicos cuja função é respectivamente, o armazenamento e transporte do ferro no organismo. E assim o ferro pode ser filtrado pelos rins e excretado ou agrupados nas hemácias (NAKAMURA et al., 2019; BRESGEN e ECKL, 2015).

Além do mais, a homeostase de ferro é necessária para nosso organismo. Para isso, de forma sistêmica, o excesso de ferro é armazenado como ferritina e a regulação ocorre por meio hepcidina, que quando se liga a ferroportina, diminui a absorção do ferro quando este encontra-se em excesso. Intracelularmente, a maior parte do ferro é encontrada no citoplasma, porém a mitocôndria pode armazenar ferro nas chamadas mitoferrinas (EDSON; BAJEL e CHANDY, 2008; BRESGEN e ECKL, 2015).

Embora nosso corpo possa metabolizar e equilibrar o ferro, seu excesso devido a exposição por nanopartículas de ferro, interferem em sua homeostase gerando Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) provocando efeitos na função celular (MULENS-ARIAS; ROJAS e BARBER, 2020). A chamada Reação de Fenton ocorre quando Fe^{2+} (ferro reduzido) reage com peróxido de hidrogênio (H_2O_2), resultando no radical livre hidroxila (HO) que pode danificar DNA, proteínas e lipídios (EDSON; BAJEL e CHANDY, 2008; WANG e BABITT, 2019; MULENS-ARIAS; ROJAS e BARBER, 2020).

A exposição a *SPIONs* é relacionada a efeitos tóxicos significativos, como inflamação, alteração na função mitocondrial e rompimento de membrana plasmática, formação de corpos apoptóticos, formação de EROs e genotoxicidade. Entretanto, outros estudos demonstram que são poucos os efeitos citotóxicos causados por essas nanopartículas, demonstrando biocompatibilidade (SINGH et al., 2010; PATIL et al., 2018; VALDIGLESIAS et al., 2016).

Figura 3: Efeitos tóxicos da nanopartícula de óxido de ferro



Fonte: Adaptado de Singh et al., 2010.

Na literatura é encontrado diversos dados com células de linhagem tumoral frente a *SPIONs*, como no estudo de Zhang e colaboradores (2021) que analisou a exposição de nanopartículas de ferro de diferentes tamanhos (7.3 nm, 15.1 nm e 30 nm) sob células de câncer de mama (MCF7). Os resultados encontrados demonstram que o tamanho da NP pode influenciar no potencial citotóxico, sobretudo no local de produção de EROs, enquanto a menor NP (7.3 nm) gerou maiores danos na função mitocondrial, as de tamanho médio e a maior (15.1 e 30 nm) produziram mais EROs no citoplasma, gerando danos a citomembranas.

Balk e colaboradores (2021) também analisaram a citotoxicidade e internalização de *SPIONs* frente a diferentes linhagens tumorais de língua, faringe e glândula salivar (FaDu; SCC-9; A-253 e Detroit 562). Neste estudo as *SPIONs* foram revestidas com ácido láurico ou com ácido láurico + soro humano em busca de maior absorção celular para terapia do câncer. Os achados demonstram que, diferentes revestimentos podem afetar a absorção e toxicidade celular, uma vez que *SPIONs* revestidas com ácido láurico, foram mais prejudiciais em comparação as *SPIONs* revestidas com ácido láurico + soro humano.

Um aspecto importante que leva a maior internalização de NPs é a carga presente nas membranas celulares e o revestimento presente na superfície das *SPIONs* que pode ser um fator potencial para citotoxicidade. O estudo de Li et al. (2013) investiga *SPIONs* sem nenhum revestimento ou revestidas com (COOH e/ou NH₂), que foram analisadas sob três linhagens celulares humanas, BE-2-C (cérebro), HCM (coração) e 293-T (rim) e os dados demonstram que as *SPIONs* carregadas positivamente (NH₂) foram mais tóxicas que as *SPIONs* carregadas negativamente (COOH).

Em contrapartida, a biocompatibilidade das nanopartículas de ferro também é demonstrada. O trabalho de Thomas; Sankaranarayanan e Rengan (2021) utilizam NP Fe₃O₄ encapsuladas com polietileno modificado (FL PEG) com o objetivo de melhorar a cicatrização de feridas e para isso testam a NP sob linhagem de fibroblastos murinos (L929) e não encontram citotoxicidade. Já no estudo de Ferraz et al. (2020), *SPIONs* revestidas com citrato de sódio somente foram tóxicas para a linhagem de fibroblastos de pulmão humano (MRC-5) em concentrações acima de 8x10² mg/mL ou ao aplicar campo magnético e hipertermia, provocando a morte dos fibroblastos por apoptose. Diferentes resultados, quanto a citotoxicidade e biocompatibilidade das nanopartículas de ferro, podem ser associados ao seu revestimento, carga superficial, à concentração utilizada e a linhagem celular estudada que influem nos resultados obtidos, reforçando a importância dos estudos nanotoxicológicos.

A solubilidade das nanopartículas de ferro, também é um fator que pode contribuir com sua toxicidade. Quando essas nanopartículas não se dissolvem ou se dissolvem parcialmente, torna-se mais difícil diferenciar as causas de sua toxicidade, se pela própria composição química ou através dos íons liberados (BRUNNER et al., 2006; WANG et al., 2016). Além do mais, a composição da superfície das

nanopartículas de óxido de ferro também pode influenciar na solubilidade, e quando são analisadas sem nenhum ligante possuem maior propensão a baixa solubilidade. O revestimento adequado de *SPIONs* pode promover aumento de sua estabilidade, biocompatibilidade e dispersabilidade (THORAT et al., 2016; PATIL et al., 2018).

O revestimento das NPs também pode influenciar na taxa de internalização celular. O estudo de Feng et al. (2018), demonstra que nanopartículas de óxido de ferro revestidas com polietilenina (PEI) obtiveram maior internalização em macrófagos (RAW 264.7) e células de câncer de ovário (SKOV-3), do que as NPs revestidas com polietilenoglicol (PEG) e promoveram citotoxicidade através da produção de EROs e apoptose.

Outro ponto relevante é a compreensão acerca da interação das NPs com macromoléculas (proteínas, lipídios e polissacarídeos) presentes em meios de cultura, mas principalmente os encontrados nos fluídos biológicos. NPs tendem a atrair essas macromoléculas, devido sua alta reatividade, e formam em sua superfície uma camada de moléculas, denominada proteína corona (LIU; TANG e DING, 2020). O chamado efeito corona pode alterar as propriedades da superfície da nanopartícula e afetar a interação célula-célula, bloqueando receptores por exemplo, ou até contribuir para internalização celular promovendo ou aumentando a citotoxicidade e resposta imune (RITZ et al., 2015; LIU; TANG e DING 2020; RICHTERING; ALBERG e ZENTEL, 2020). Além do mais, a proteína corona é responsável por modificações físicas e químicas nas NPs, podendo alterar tamanho e contribuir para agregação de suas partículas (MULLER et al., 2018).

Um interessante estudo investiga a formação da proteína corona no soro de camundongos (BALB/c) e os resultados podem auxiliar no entendimento das interações que ocorrem em estudos *in vivo*. Os dados mostraram que a formação da proteína corona depende do tamanho da NP e do tempo de exposição, e que sua formação afetou as características iniciais da NP, aumentando seu tamanho e modificando sua carga superficial (LIMA; VILANOVA e CEDERVALL, 2020). O tamanho hidrodinâmico pode determinar a biodistribuição e remoção das nanopartículas de ferro do organismo, uma vez que partículas maiores que 100 nm, são facilmente acumuladas no fígado e baço, e NPs menores que 10 nm são eliminadas pelo rim (KUMAR et al., 2011).

No organismo *in vivo*, as nanopartículas de ferro ativam o sistema imune e os possíveis mecanismos de captação intracelular, envolvem difusão passiva,

endocitose mediada por receptor ou clatrina e caveolina, ou fagocitose (HILLAIREAU e COUVREUR, 2009; SINGH et al., 2010; SAKHTIANCHI et al., 2013). A fagocitose é realizada por apenas algumas células, como os macrófagos. Ao enfrentar a exposição às nanopartículas, essas células especializadas tentarão fagocitar essas partículas; no entanto, os macrófagos podem se aglomerar, resultando em infiltrados celulares e um consequente processo inflamatório que, se prolongado, pode levar a casos mais graves, causando lesões, fibrose e até tumores teciduais (ARICK et al., 2015; RADAIC et al., 2016).

Os danos causados por *SPIONS* é intrinsecamente relacionado a concentração e tempo de exposição, uma vez que podem ser removidas do organismo (PATIL et al., 2018). No estudo de Xiang e colaboradores (2019), NPs de Fe_3O_4 foram funcionalizadas com polímeros de dodecantiol-ácido politacrílico (DDT-PMAA) e injetadas via venosa em camundongos (BALB/c) na concentração de 2,5 mg/kg. Os animais foram eutanasiados (7 e 14 dias) e tiveram órgãos como, coração, fígado, baço, pulmão e intestino corados por hematoxilina-eosina (HE). Os resultados demonstraram que em comparação ao grupo controle, não foi encontrado necrose ou infiltrado inflamatório para nenhum dos órgãos, demonstrando biocompatibilidade.

Os estudos nanotoxicológicos *in vivo* também investigam parâmetros bioquímicos que podem indicar toxicidade. O estudo *in vivo*, de Ghasempour et al. (2015), analisou algumas enzimas, AST (Aspartato aminotransferase) e ALT (Alanina aminotransferase), hoje denominadas como TGO (Transaminase Glutâmico Oxalacética) e TGP (Transaminase Glutâmico Pirúvica), Fosfatase Alcalina (ALP), creatinina e dosagem de ferro sérico. Os ratos (Wistar) foram expostos a 200 e 400 $\mu\text{g/mL}$ de nano bastões de óxido de ferro, e o sangue foi analisado no tempo de 1 hora e de 24 horas. Fígado e Baço também foram analisados histologicamente. Não houve nenhuma alteração nas enzimas analisadas, somente aumento de ferro sérico e os órgãos demonstraram estar saudáveis. Já no estudo de Parivar e colaboradores (2016), camundongos (BALB/c) foram expostos em dias alternados por 3 dias a NP Fe_3O_4 em doses de 25, 50, 75, 150 e 300 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados demonstraram que os níveis de ALT para os grupos expostos a 150 e 300 $\mu\text{g/mL}$ estavam aumentados, corroborando com os dados histológicos encontrados para o fígado, onde foi observado infiltrado de linfócitos e

neutrófilos, congestão venosa central e hepatócitos hipertrofiados. Para as concentrações mais baixas da NP não foi encontrada nenhuma alteração. Os dados reforçam a ideia de que a toxicidade é dependente da concentração utilizada e tempo de exposição.

2. JUSTIFICATIVA

O conhecimento nanotoxicológico torna-se fundamental, devido ao surgimento de novas nanopartículas destinadas para variados fins e dessa forma, asseguram sua utilização. A nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe₃O₄), utilizada neste estudo, apresenta características distintas das nanopartículas de óxido de ferro já existentes (novo tamanho/novo ligante) sendo assim, além de possuir um caráter inovador também se justificam os estudos que promovam informações a respeito dos possíveis riscos biológicos que a exposição desta pode proporcionar aos seus futuros manipuladores da área petrolífera.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os possíveis efeitos que a nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe₃O₄), de interesse na indústria petrolífera, pode oferecer aos seus manipuladores. Assim, determinar informações morfológicas, químicas e físicas da nanopartícula, por meio de técnicas de caracterização e aspectos nanotoxicológicos, por meio de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Caracterização da nanopartícula

- Determinação de características morfológicas, estruturais e físico-químicas da NP Fe₃O₄.

3.2.2 Experimentos *In vitro*

- Ensaio da citotoxicidade de fibroblastos de camundongos (LA-9) frente à exposição às diferentes concentrações da NP Fe₃O₄;
- Análise da morfologia celular de fibroblastos (LA-9) frente à exposição às diferentes concentrações da NP Fe₃O₄;
- Avaliação da internalização celular da NP Fe₃O₄ nos fibroblastos de camundongos (LA-9);
- Quantificação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e Óxido Nítrico (NO) pelos fibroblastos (LA-9);
- Quantificação de citocinas (IL-6 e TNF) em amostras de sobrenadantes de fibroblastos (LA-9) expostos a diferentes concentrações da NP Fe₃O₄;
- Determinação da morte celular por apoptose ou necrose em fibroblastos (LA-9);
- Avaliação da clonogenicidade de fibroblastos de camundongos (LA-9) no 7º dia pós exposição às diferentes concentrações da NP Fe₃O₄.

3.2.3 Experimentos *In vivo*

- Avaliação de sinais indicativos de toxicidade (consumo de água/ração e acompanhamento do peso dos camundongos) durante a exposição à NP Fe₃O₄;

- Contagem celular total e diferencial do sangue e do Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP);
- Determinação do peso dos órgãos fígado e baço;
- Avaliação da função hepática através das transaminases TGO e TGP;
- Quantificação de citocinas (TNF, IFN- γ , IL-6 e IL-10) em amostras do plasma e LCP;
- Determinação da toxicidade sistêmica da NP Fe₃O₄ em órgãos como coração, pulmão, fígado, baço e rins através de estudo histológico.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção da nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe₃O₄)

A nanopartícula utilizada no presente trabalho foi cedida pelo Centro de Pesquisas, Desenvolvimento e Inovação Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES) (unidade da Petróleo Brasileiro S. A. - Petrobras). Trata-se de uma nanopartícula com característica ferro-fluida e magnética, composta por óxido de ferro misto (magnetita) e ligantes com grupos terminais de sulfonato de sódio (SO₃) - Na⁺. A NP foi recebida em solução aquosa (água deionizada) na concentração de 30,6%. Possui boa dispersabilidade em água com pH entre 4 e 10 e em solução salina com concentração de até 0,15 mol/L (aproximadamente 1% de NaCl).

4.2 Caracterização da nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe₃O₄)

4.2.1 Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG)

A microfotografia da NP Fe₃O₄ foi obtida através de Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG). A técnica fornece imagens com elevada qualidade, e assim características acerca da distribuição das nanopartículas podem ser analisadas. Para isso foi utilizado um microscópio (Philips XL-30 FEG-*Field Emission Gun*), com ampliação de 50000x, a uma tensão de aceleração de 25 Kv (Kilovolts) com um detetor secundário. Esta análise foi realizada no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE), no Departamento de Materiais (DEMA) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

4.2.2 Espectroscopia Infravermelho de Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier (ATR-FTIR)

A análise ATR-FTIR foi realizada para qualificar áreas específicas da NP Fe₃O₄, como seus ligantes estruturais. O ensaio foi realizado utilizando o equipamento Bruker Alpha-P (Alemanha) equipado com janelas de cristal de diamante como elemento refletivo de 4 mm². O espectro preparado foi de 4000 cm⁻¹ a 400 cm⁻¹, em temperatura ambiente (25°C), resolução de 4 cm⁻¹ e a medida considerou 128 varreduras. O software OMNIC (versão 8.2 - Thermo Fisher

Scientific®) foi utilizado na análise de resultados. Esta técnica foi realizada no Laboratório de Superfícies e Materiais, no Departamento de Engenharia Metalúrgica e de Materiais, da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

4.2.3 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta (PZ)

O DLS foi realizado para a obtenção do Diâmetro Médio Hidrodinâmico (dH) da NP Fe₃O₄ e a partir do Potencial Zeta, sua carga superficial foi estabelecida. Dessa forma, NP Fe₃O₄ foi dispersa em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), em solução salina (NaCl 0,9%) e em água destilada e assim as análises foram feitas usando o equipamento Malvern Spectrometro Nano-ZS (Malvern Instruments). Sendo o DMEM a solução dispersora para os experimentos *in vitro* e a solução salina, utilizada para os experimentos *in vivo*. Para o DLS e Potencial Zeta da NP Fe₃O₄ dispersa em DMEM com SFB 10%, foram avaliados os tempos de 0, 6, 24, 48 e 72 horas. O valor do Índice de Polidispersidade (Pdl) também foi incluído. A concentração da NP Fe₃O₄ foi avaliada com Nano Tracking Analysis (NTA), Nanosight NS300, Malvern. Esta análise foi realizada no Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia (LNN), no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP).

4.2.4 Espectroscopia de Absorção Ultravioleta Visível (UV-Vis)

A análise UV-VIS foi realizada para avaliar as propriedades ópticas de absorção de luz da NP Fe₃O₄. A técnica foi realizada utilizando um espectrofotômetro (U-2900) na faixa de comprimento de onda de 190 nm a 800 nm. Esta análise foi realizada no Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia (LNN), no Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo (USP).

4.3 Experimentos *in vitro*

4.3.1 Fibroblastos LA-9

Os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando fibroblastos aderentes da linhagem LA-9 (Código 0142), obtidas a partir do Banco de Células do Rio de

Janeiro (BCRJ). Os fibroblastos LA-9 são células oriundas do tecido adiposo conjuntivo de camundongos (*Mus musculus*/Camundongo; C3H/Na).

Os fibroblastos foram escolhidos por serem células com características favoráveis a estudos nanotoxicológicos. São células que desempenham funções essenciais para órgãos, através de fatores estruturais, biomecânicos e químicos, secreção de citocinas e metabolitos. Além do mais, são células do sistema imune e exercem uma relação com aspectos inflamatórios, fibróticos e genotóxicos mediados por nanopartículas (OBERDÖRSTER et al., 2005; OBERDÖRSTER 2012; KOERICH et al., 2020; PLIKUS et al., 2021).

Os fibroblastos foram cultivados em meio DMEM (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de SFB e 1% de antibiótico (estreptomicina/penicilina 0,1 g/L) (LGC Biotecnologia) e incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O repique foi estabelecido de acordo com seu crescimento e confluência de 80 a 90% nas garrafas de cultivo. Para o desprendimento das células da superfície das garrafas de cultivo e posterior execução dos ensaios ou manutenção celular, foi utilizado solução tripsina (1x) (LGC Biotecnologia), por 5 minutos a 37 °C.

4.3.2 Preparo das soluções e escolha das concentrações para exposição *in vitro*

Através da densidade da solução da NP Fe₃O₄ recebida (µg/mL), foram realizados os cálculos para as concentrações utilizadas com meio de cultura DMEM. As concentrações iniciais escolhidas foram de: 600, 500, 250, 100, 50, 10, 1,0 e 0,5 µg/mL da NP Fe₃O₄. A solução mãe da NP Fe₃O₄ foi previamente filtrada para realização das concentrações *in vitro*, que foram realizadas em fluxo laminar.

4.3.3 Ensaio de citotoxicidade - Teste do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) - 2,5-difeniltetrazólio (MTT)

O ensaio de citotoxicidade foi realizado através do ensaio de MTT. Trata-se de um ensaio colorimétrico executado por meio da avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais presentes em células viáveis (MOSMANN, 1983). Foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços, onde 200 µL dos fibroblastos LA-9 foram distribuídos na concentração de 6x10³ por poço. As placas foram incubadas em estufa sob tensão constante de 5% de CO₂ e após a aderência

celular, os fibroblastos foram expostos a diferentes concentrações da NP Fe₃O₄ (600, 500, 250, 100, 50, 10 e 1,0 e 0,5 µg/mL) dispersos em DMEM por 24, 48 e 72 horas. Foram realizados poços para o controle negativo (células + DMEM), controle positivo (células + SDS/Extran® 5%) e brancos para as diferentes concentrações da NP Fe₃O₄ (concentração NP Fe₃O₄ sem células), que foram realizados devido a cor da nanopartícula. Após os tempos de exposição, o sobrenadante celular foi descartado, a placa foi lavada três vezes com PBS 1x e foram adicionados 100 µL da solução de MTT (Sigma-Aldrich) a 1 mg/mL em meio DMEM, e as placas foram incubadas nas mesmas condições estabelecidas por três horas e protegidas da luz. O sobrenadante foi novamente removido e foi adicionado 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido – Synth) sob as células, para a solubilização dos cristais de formazana produzidos durante a reação e com coloração roxa. Cada poço foi devidamente homogeneizado e a leitura da densidade óptica (absorbância) foi determinada em espectrofotômetro de placas (Multiskan GO) em comprimento de onda de 570 nm. Foram realizados três experimentos independentes em quadruplicata. A viabilidade celular foi calculada em porcentagem, considerando-se o controle negativo como 100% de viabilidade.

4.3.4 Análise de morfologia celular

Para a análise de características morfológicas dos fibroblastos LA-9 em contato com a NP Fe₃O₄, utilizou-se placas de microtitulação de 96 poços, onde 200 µL das células foram distribuídas na densidade de 6x10³ por poço. As placas foram incubadas em estufa sob tensão constante de 5% de CO₂ para aderência celular. Os fibroblastos foram expostos às concentrações de 250, 100 e 50 µg/mL da NP Fe₃O₄ por 24, 48 e 72 horas. As microfotografias foram obtidas através de microscópio invertido (Zeiss) em aumento de 100x, utilizando o software Future WinJoe™. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.3.5 Ensaio de Internalização celular - Azul de Prússia

Para verificação da internalização da NP Fe₃O₄ nos fibroblastos LA-9, foi utilizado o ensaio de Azul de Prússia. O princípio do método decorre através dos íons férricos intracelulares (Fe³⁺) que são detectados quando combinados com o

ferrocianeto ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]_4$) e resulta na formação de um pigmento azul (ZHU et al., 2012; FENG et al., 2018). Para isso, foram utilizadas placas de microtitulação de 24 poços, onde 500 μL das células foram distribuídas na densidade de 5×10^3 por poço. As placas foram incubadas em estufa para aderência celular, nas mesmas condições descritas anteriormente. Após, os fibroblastos foram expostos às concentrações de 250, 100 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da NP Fe_3O_4 por 24, 48 e 72 horas. O sobrenadante celular foi removido, a placa foi lavada três vezes com PBS 1x e as células foram fixadas com 1 mL de metanol gelado por 5 minutos. Após fixação, o metanol foi descartado e foi adicionado 1 mL da solução de Azul de Prússia (1:1), sendo composta de 4% de ferrocianeto de potássio ($\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) e 4% de ácido clorídrico (HCl), por 15 minutos. As microfotografias foram obtidas em microscópio invertido (Zeiss), em aumento de 400x, usando o software Future WinJoe™. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.3.6 Quantificação intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Para a determinação de EROs intracelular nos fibroblastos LA-9, foi utilizado a sonda DCFH-DA (diacetato de 2',7'-diclorodihidrofluoresceína). As esterases intracelulares e a oxidação são responsáveis pela clivagem de grupos acetatos, e forma-se o DCF(2',7'-diclorodi-hidrofluoresceína), que é um produto fluorescente (WAN, MYUNG e LAU 1993). Para o ensaio, os fibroblastos foram cultivados em placas pretas de fundo transparente de 96 poços, na densidade celular de 1×10^4 por poço. A placas foi incubada em estufa sob tensão constante de 5% de CO_2 para a aderência celular. Posteriormente, o sobrenadante celular foi removido, e os fibroblastos foram expostos às concentrações de 250, 100 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ da NP Fe_3O_4 por 24 horas. Como controle negativo foi utilizado meio + células e para o controle positivo adicionado 100 μM de H_2O_2 por 30 minutos. Também foram realizados brancos para as diferentes concentrações da NP Fe_3O_4 (concentração NP Fe_3O_4 sem células). Após esse período, o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados três vezes com PBS 1x, e foi adicionado 100 μM da sonda DCFH-DA (Sigma-Aldrich®) diluído em meio DMEM sem fenol e protegido da luz. Após 30 minutos, os poços foram lavados uma vez com PBS 1x e adicionado 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ do PBS para leitura, afim de evitar possíveis interferências do meio extracelular. A análise foi feita em leitora de fluorescência para microplacas (Spectra MAX i3 -

Molecular Devices) em 485 nm para excitação e 330 nm para emissão. O equipamento está localizado no Departamento de Fisiologia - Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LBBM), sob responsabilidade da Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo. A produção de EROs foi calculada em porcentagem, considerando-se a média de emissão do controle negativo, como 100%. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.3.7 Quantificação de Óxido Nítrico (NO) no sobrenadante celular – Reação de Griess

A quantificação indireta de NO foi realizada a partir do sobrenadante dos fibroblastos pós exposição a NP Fe₃O₄. Para isso foi realizado a Reação de Griess, que permite a quantificação do acúmulo de nitritos (NO₂⁻) (GREEN et al., 1982; SALTZMAN, 1954). Os fibroblastos foram distribuídos na concentração de 1x10⁴ por poço em placas de 96 poços, no volume de 200 µL, e foram incubadas em estufa sob tensão constante de 5% de CO₂ para a adesão celular. O sobrenadante celular foi removido, e as concentrações de 250, 100 e 50 µg/mL da NP Fe₃O₄ foram adicionadas aos fibroblastos, por 24 horas. Posteriormente, alíquotas de 50 µL do sobrenadante de cada poço contendo concentrações diferentes da nanopartícula, controle negativo (células + meio de cultura) e brancos (concentração NP Fe₃O₄ sem células) foram transferidos para uma nova placa de 96 poços. Então, foi adicionado aos poços, 50 µL do reagente de Griess (naftiletenodiamina dicloridrato (NEDD) - 0,1% diluído em água destilada + 1% sulfanilamida - C₆H₈N₂O₂S diluído em ácido fosfórico a 5% (H₃PO₄), por 10 minutos e ao abrigo da luz. Após a reação, a leitura da placa foi realizada em espectrofotômetro de placas (Multiskan Go) com comprimento de onda de 550 nm. Para os cálculos da concentração de nitritos, foi utilizada uma curva padrão com concentrações molares conhecidas de nitrito de sódio (NaNO₂). Foram realizados três experimentos independentes em triplicata. O restante do sobrenadante celular foi coletado em pool/concentração e foi armazenado a -80 °C para o ensaio ELISA.

4.3.8 Quantificação de citocinas no sobrenadante celular – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA)

A quantificação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (Interleucina-6) e TNF

(*Tumor Necrosis Factor* – Fator de Necrose Tumoral) foi realizada através do ELISA direto. Para isso foi utilizado um pool da concentração do sobrenadante dos fibroblastos obtido pós exposição às concentrações de 250, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ da NP Fe_3O_4 por 24 horas. O sobrenadante foi obtido através do cultivo celular em placa de 96 poços na densidade de 1×10^4 células/poço. Todo o procedimento foi seguido conforme instruções dos kits ELISA utilizados (BD Bioscience). Inicialmente, placas de 96 poços foram sensibilizadas com 100 $\mu\text{L/poço}$ de solução contendo o anticorpo de captura primário respectivo para cada citocina e foram incubadas por até 18 h a 4 $^\circ\text{C}$. E então, o sobrenadante foi descartado, e as placas foram lavadas três vezes, utilizando lavadora automática de microplacas com tampão de lavagem, constituído de PBS Tween 0,05%. O bloqueio dos sítios de ligações inespecíficas foi feito com 200 $\mu\text{L/poço}$ de albumina 1%, por 1 hora a 25 $^\circ\text{C}$. Posteriormente, uma nova etapa de lavagem foi realizada e foram adicionadas 50 $\mu\text{L/poço}$ das amostras de sobrenadante celular e 50 $\mu\text{L/poço}$ da curva padrão recombinante para cada citocina. Após um novo ciclo de lavagem, foram adicionados aos poços, 100 $\mu\text{L/poço}$ do anticorpo de detecção (anticorpo secundário conjugado com a enzima estreptavidina- HRP). As placas foram incubadas por 1 hora e meia, em temperatura ambiente e protegida da luz. Após, as placas foram lavadas e foram adicionados 100 $\mu\text{L/poço}$ da solução substrato (peróxido de hidrogênio - H_2O_2) e tetrametilbenzidina (TMB – 1:1), que permaneceu por até 30 minutos. A reação foi interrompida por adição de 50 $\mu\text{L/poço}$ de ácido sulfúrico (H_2SO_4). A leitura foi realizada a partir do espectrofotômetro de placas (Multiskan Go) no comprimento de onda de 450 nm. Os cálculos das concentrações (pg/mL) foram realizados a partir da curva recombinante de cada citocina. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

4.3.9 Ensaio de Determinação da Morte Celular por Citometria de Fluxo

A determinação da morte celular foi realizada empregando *PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I* (BD Bioscience). A metodologia foi seguida de acordo com o protocolo adaptado do fabricante. O kit utiliza os marcadores 7AAD (*7-Amino actinomycin D*) e PE Anexina V, para assim determinar morte celular por necrose ou distinguir entre apoptose inicial e tardia. Células necróticas ou em apoptose tardia são permeáveis a sonda 7AAD, enquanto que células em apoptose inicial expressam em sua membrana, moléculas de fosfatidilserinas (*phosphatidylserines* -

PS), que são suscetíveis ao corante PE Anexina V (ZIMMERMANN e MEYER, 2011). Os fibroblastos foram cultivados em placa de 24 poços na concentração celular de 1×10^5 células/poço. Após adesão celular, os fibroblastos foram expostos a 250, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ da NP Fe_3O_4 por 24 horas. Para o controle positivo foi utilizado solução de Camptotecina (500 μM) (Sigma-Aldrich®). Após o período de exposição, a placa foi centrifugada por 10 minutos, a 1500 RPM e a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido. Esse ciclo repetiu-se por 2 vezes e teve como finalidade a obtenção de células mortas que conseqüentemente não estariam aderidas na placa de cultivo celular. Após, foi adicionado 200 μL do tampão de ligação. Os fibroblastos expostos a nanopartícula e o controle de células vivas (duplo marcado), foram marcados com 7AAD e PE Anexina V (1 μL para cada corante). O controle camptotecina foi marcado com 1 μL da sonda PE Anexina V, o controle PE foi marcado com 1 μL da sonda PE Anexina V e o controle 7AAD foi marcado com 1 μL da sonda 7AAD. A placa foi incubada por 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Posteriormente, a placa foi centrifugada por 5 minutos, a 1500 RPM e a 4 °C. O sobrenadante foi removido e aos poços foi adicionado 300 μL de tampão de ligação. Por fim, as células foram removidas dos poços com auxílio de um raspador de celular (*cell scraper*), transferidas para microtubos e armazenadas em caixa com gelo até o momento da análise. Para realização do controle de células mortas, os fibroblastos foram cuidadosamente removidos dos poços e foram transferidas para microtubos, onde foram aquecidos através de banho seco, por 80 °C, por 2 horas. Após resfriamento, foram corados com 1 μL de 7AAD ou com 1 μL de PE por 15 minutos, protegidos da luz e em temperatura ambiente. Os microtubos foram centrifugados por 5 minutos, a 1500 RPM e a 4°C, o sobrenadante foi removido, 300 μL do tampão de ligação foi adicionado e assim mantidos no gelo. Também foram realizados poços com controle negativo de células não marcadas, onde nenhum corante foi adicionado, e que foi utilizado para calibração do citômetro de fluxo (BD Accuri C6). O equipamento está localizado no Departamento de Gerontologia - Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN) sob responsabilidade da Prof. Dra. Márcia Cominetti. A análise foi realizada considerando 10.000 eventos por gate, utilizando o software FlowJo versão X (BD Biocience). Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata.

4.3.10 Ensaio de Clonogenicidade – *Clonogenic Assay*

O ensaio clonogênico foi realizado para determinar possíveis efeitos citotóxicos que a NP Fe₃O₄, poderia promover frente aos fibroblastos (LA-9), num período maior após a exposição. O ensaio é baseado na capacidade de uma única célula se dividir e formar colônias após a exposição a um material (FRANKEN et al., 2006). Os fibroblastos foram cultivados em placas de 6 poços na densidade celular de 100 células/poço. Após aderência celular, foram expostos às concentrações de 250, 100 e 50 µg/mL da NP Fe₃O₄ por 24 horas. Também foi realizado o controle negativo (Células + meio DMEM). Após este período, o sobrenadante celular foi descartado, a placa foi lavada 3 vezes com PBS 1x e o meio DMEM fresco e suplementado com 10% de SFB foi adicionado. Após 7 dias, as células foram fixadas com 1 mL/poço de metanol (CH₃OH) gelado por 5 minutos e coradas com 1 mL de cristal violeta (C₂H₂8N₃Cl – 0,1%) por 1 minuto. Os poços foram fotografados e as colônias foram contadas utilizando o software ImageJ 1.53^a (Wayne Rasband, *National Institutes of Health, USA*). Para análise dos resultados foi considerado a Eficiência de Plaqueamento (*Plating Efficiency*- PE) e a Fração de Sobrevivência (*Survival Fraction* - SF). Onde PE é a porcentagem de células plaqueadas que efetivamente formaram colônias visíveis e SF, corresponde a porcentagem de células que formaram colônias após exposição à nanopartícula. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata. Os cálculos foram realizados utilizando as fórmulas:

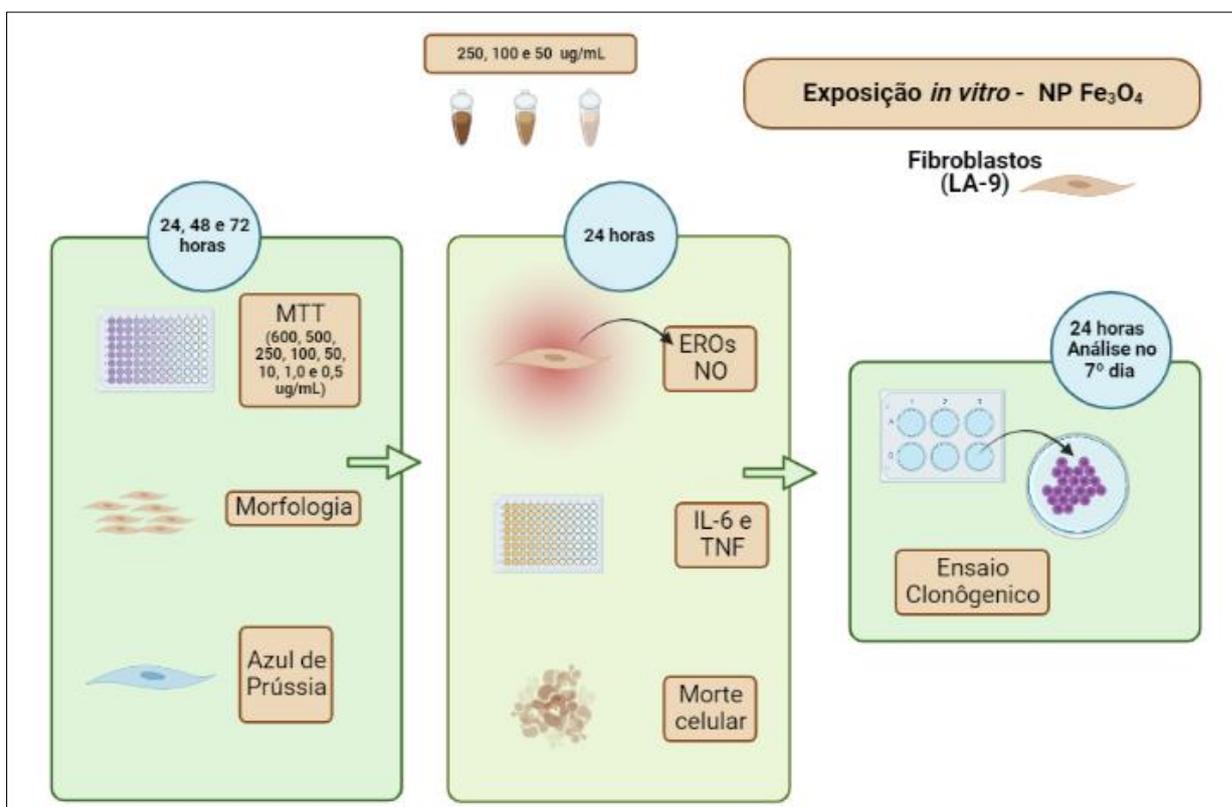
$$PE = \frac{\text{Número de colônias formadas após exposição}}{\text{Número de células iniciais} \times 100}$$

$$SF = \frac{PE \text{ médio das concentrações da NP}}{\text{Número de células iniciais} \times PE \text{ médio do controle}} \times 100$$

4.3.11 Resumo gráfico do delineamento experimental *in vitro*

Um resumo gráfico sobre a célula utilizada, ensaios, concentrações da NP Fe₃O₄, tempo de exposição e de análise (ensaio clonogênico), pode ser observado na figura 4:

Figura 4: Delineamento experimental *in vitro*



Fonte: Criado com BioRender.com pela autora.

4.4 Experimentos *In vivo*

4.4.1 Animais

Para a etapa de experimentação *in vivo*, foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c, fêmeas, com 8 a 10 semanas e pesando entre 19 a 23 gramas. Os animais são oriundos do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP). Os camundongos passaram por ambientação por uma semana e foram mantidos no Biotério de experimentação do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), com livre acesso à água e ração para roedores e alocados em isoladores ventilados (ALESCO). O delineamento experimental desse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFSCar (nº 2881090418).

4.4.2 Preparo das soluções para exposição *in vivo*

Inicialmente, os animais foram pesados e a média de peso/grupo e a densidade da solução da NP (mg/mL) foram utilizadas nos cálculos para que as concentrações fossem realizadas na unidade de mg/kg. Assim, as quantidades necessárias da NP Fe₃O₄ para as concentrações de 100, 50, 25 e 10 mg/kg, foram dispersas em solução salina (0,9%) estéril. A solução mãe de Fe₃O₄ foi previamente filtrada para realização das concentrações, sendo estas feitas em fluxo laminar.

4.4.3 Via de exposição

A exposição foi realizada por via intraperitoneal em quatro doses durante 14 dias (toxicidade de doses repetidas) (ANVISA, 2013), simulando o tempo de exposição dos operários no ambiente de trabalho. A via de exposição e doses foram escolhidas com base em diversos trabalhos da literatura (MA et al., 2012; JALIL et al., 2017; MANICKAM et al., 2017; SALIMI et al., 2018; ABOUSHOUHAH et al., 2021; DE SOUZA et al., 2022).

Para isso, foi utilizada uma seringa estéril com volume final de 1 mL acoplada a uma agulha, sendo administrado um volume final de 0,2 mL da solução correspondente a cada grupo experimental. As doses foram empregadas no 1º, 4º, 8º e 12º dia e diluídas em solução estéril de salina 0,9%, no volume de 0,2 mL/animal. No 14º dia, os animais foram previamente anestesiados por meio de inalação por Isoflurano (BioChimico), e posterior eutanásia por sangria total

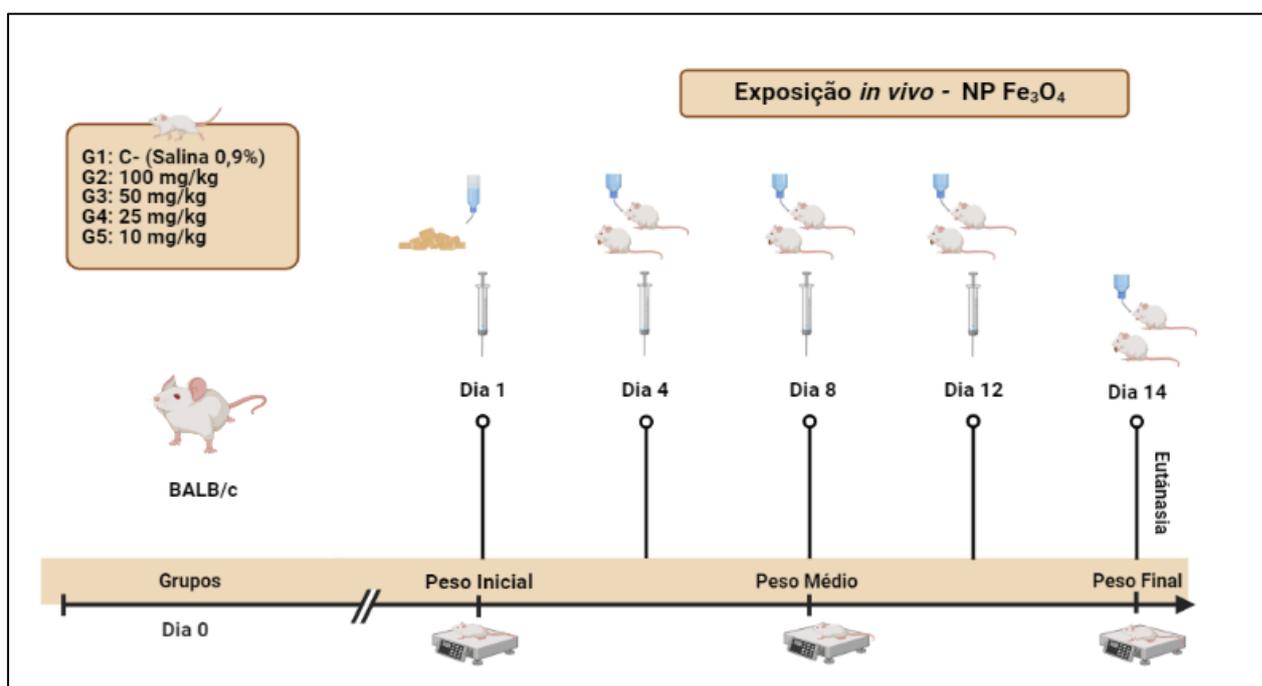
4.4.4 Delineamento experimental

Os camundongos foram divididos em cinco grupos experimentais, mantendo uma média de peso semelhante para cada grupo. Os grupos foram: grupo controle negativo (C-) que não foi exposto à nanopartícula, recebeu apenas solução salina (0,9%), grupo exposto a 100 mg/kg da nanopartícula (100); grupo exposto a 50 mg/kg da nanopartícula (50), grupo exposto a 25 mg/kg da nanopartícula (25) e grupo exposto a 10 mg/kg da nanopartícula (10). Foram realizados dois experimentos independentes, conforme descrito na Tabela 1, totalizando um n de 48 animais:

Tabela 1: Experimento *in vivo*

Grupos	Exposição	Número de animais (n)
G1- Controle negativo (C-)	Salina 0,9% - 0,2 mL/animal	8
G2- 100	100 mg/kg da NP Fe ₃ O ₄ em salina 0,9% - 0,2 mL/animal	10
G3- 50	50 mg/kg da NP Fe ₃ O ₄ em salina 0,9% - 0,2 mL/animal	10
G4- 25	25 mg/kg da NP Fe ₃ O ₄ em salina 0,9% - 0,2 mL/animal	10
G5- 10	10 mg/kg da NP Fe ₃ O ₄ em salina 0,9% - 0,2 mL/animal	10

A figura 5, ilustra os detalhes do delineamento experimental *in vivo*:

Figura 5: Delineamento experimental *in vivo*

Fonte: Criado com BioRender.com pela autora.

4.4.5 Consumo de ração e água e acompanhamento do peso dos animais

Durante todo o período de experimentação foram verificados possíveis sinais indicativos de toxicidade nos animais. Para isso, no 1º dia de experimentação foram

disponibilizadas quantidades definidas de água (300 mL) e de ração (100 g) e nos dias de manutenção da limpeza dos isoladores dos camundongos, que ocorreram duas vezes por semana, as respectivas quantidades eram verificadas e repostas, para assim registro e cálculos do consumo. Outro parâmetro verificado foi o peso inicial, médio e final dos animais, que ocorreram respectivamente nos dias 1, 8 e 14.

4.4.6 Punção da veia braquial

A obtenção do sangue foi realizada por punção da veia braquial esquerda (YOUNG; CHAMBERS, 1973). O sangue total foi utilizado para contagem de leucócitos totais (contagem global), contagem diferencial dos leucócitos (esfregaço sanguíneo) e para obtenção do plasma, utilizada nos ensaios de função hepática (TGO e TGP) e quantificação de citocinas (ELISA).

4.4.7 Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP)

Para recuperação do LCP foram utilizados respectivamente 3 mL de PBS 1x, contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/Citrato). A solução LCP foi utilizada para contagem de leucócitos totais (contagem global), contagem diferencial dos leucócitos e para quantificação de citocinas (ELISA).

4.3.9 Contagem total e diferencial de leucócitos do sangue e do Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP)

i. Contagem Global

A obtenção do número total de leucócitos/mm³ no sangue e no LCP foram determinados após diluição da amostra utilizando solução de Turk (1:20) e contagem das células em câmara de Neubauer. As contagens foram realizadas em quatro quadrantes utilizando microscópio óptico (Microscópio Nikon YS2) com ampliação de 400x.

ii. Contagem Diferencial

Para a contagem diferencial dos leucócitos do sangue foi realizada lâminas de esfregaço sanguíneo. Enquanto que, para a contagem diferencial dos leucócitos do LCP as lâminas foram feitas através de citocentrífuga (Serocito Mod. 2400-Fanem)

em rotação de 1500 rpm durante 3 minutos. As lâminas foram coradas utilizando o kit Panótico-Laborclin (Laborclin-LB) e a contagem foi através do microscópio óptico (Microscópio Nikon YS2) em aumento de 1000x.

4.3.10 Coleta de órgãos: Peso e Análise histológica

Com auxílio de instrumentos cirúrgicos removeu-se os corações, pulmões, fígados, baços e rins de todos os animais pertencentes aos diferentes grupos experimentais. Os órgãos foram previamente lavados em solução PBS (1x) e cuidadosamente secos em papel toalha. Os fígados dos animais expostos a NP Fe₃O₄ foram fotografados.

i. Peso dos órgãos

Os fígados e baços dos camundongos pertencentes a cada grupo experimental foi removido e com auxílio de uma balança semi-analítica tiveram os valores de peso registrados.

ii. Análise histológica

Órgãos como corações, pulmões, fígados, baços e rins dos animais foram armazenados em formol tamponado (10%) até etapas de confecção de lâminas histológicas. A princípio, os tecidos dos diferentes órgãos foram desidratados a partir de sucessivos banhos de álcool em diferentes concentrações (70%, 80%, 90%, 95%, 100%) por 4 vezes, com intervalos de uma hora, seguido por etapa de clareamento (2 vezes) com xilol. Posteriormente, os tecidos foram mantidos em parafina (60° C) por 4 horas e por fim, foram incluídos em blocos de parafina e seccionados em cortes de 5 micrômetros, através de um micrótomo. As lâminas foram coradas com H.E (Hematoxilina/Eosina) para análises da inflamação e possíveis alterações celulares.

As lâminas decorrentes do primeiro experimento, foram confeccionadas pela técnica Ana Maria da Rocha do laboratório de Anatomia Patológica, do Departamento de Patologia da FMRP –USP, sob à responsabilidade do Prof. Dr. Edson Soares Garcia. As lâminas do segundo experimento, foram confeccionadas pela Dr^a. Mayara Rosolem, no laboratório de Patologia, do Departamento de Morfologia e Patologia da UFSCar.

Para análise, as lâminas foram escaneadas em sua totalidade, no Equipamento Multi-Usuário (EMU) da FAPESP (2014/50256-4) *Pannoramic Desk* (3D Histech), disponível no Laboratório de Imunologia Aplicada, no Departamento de Genética e Evolução – DGE, da UFSCar, sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra. As imagens foram obtidas através do programa *Pannoramic Viewer 1.15.4* (3D Histech). Três cortes de cada órgão foram analisados em sua totalidade, sendo os laudos emitidos pela Dr^a. Mayara Rosolem.

4.3.11 Parâmetros bioquímicos: Função hepática

i. Transaminase Glutâmica oxalacética (TGO) e Transaminase Glutâmica pirúvica (TGP)

Em busca de possíveis alterações na função hepática dos animais pós exposição a NP Fe₃O₄, foi realizada quantificação das transaminases oxalacética e pirúvica. O procedimento seguiu de acordo com a bula de instruções do fabricante (LabTest) com pequenas modificações. Trata-se de um ensaio colorimétrico que mede de forma indireta as transaminases TGO e TGP através da produção de oxalacetato e piruvato, respectivamente.

Primeiramente, foram adicionados 100 µL da solução TGO substrato ou de TGP substrato em tubos de ensaio devidamente identificados. Os tubos foram incubados em banho-maria, a 37 °C. Após 2 minutos, foram adicionados 20 µL de amostra de plasma dos animais, e realizou-se nova incubação em banho-maria (37°C) por 60 minutos para teste de TGO e incubação de 30 minutos para teste TGP. Posteriormente, foi adicionado 100 µL do reagente de cor, por 20 minutos em temperatura ambiente e após esse período, adicionou-se 1 mL da solução de NaOH (1,25 mol/L) e aguardou-se 5 minutos. Por fim, 300 µL das amostras foram transferidas para placas de microtitulação de 96 poços. A leitura foi realizada a partir do espectrofotômetro de placas (Multiskan Go) no comprimento de onda de 505 nm. Os cálculos das concentrações (unidades/mL) de TGO e TGP, foram realizados a partir da curva de calibração. Foram realizados dois experimentos independentes em triplicata.

4.3.12 Quantificação de citocinas no plasma sanguíneo e Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) dos animais– *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)*

A partir do plasma e LCP dos animais foram analisadas as citocinas TNF (*Tumor Necrosis Factor*- Fator de Necrose Tumoral), INF- γ (interferon gama), IL-6 e IL-10. Todo o procedimento foi seguido de acordo com a bula do fabricante (BD Bioscience). A metodologia seguiu conforme descrito no item 4.3.8. As amostras foram analisadas em triplicata a partir de um pool/grupo. Foram realizados dois experimentos independentes.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todos os dados obtidos, foi utilizado o software GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., versão 7.0), para a análise de normalidade, estatística e gráficos. Os resultados considerados paramétricos foram analisados utilizando o teste *One-way ANOVA (One-Way analysis of variance)*, pós-teste pelo Método de Tukey (*Compare all pairs of columns*). Para dados considerados como não paramétricos foram utilizados o teste de Kruskal-Wallis e pós-teste pelo método de Dunns (*Compare all pairs of columns*). Dados com variáveis foram analisados utilizando o teste *Two-away ANOVA*, pós teste pelo Método de Tukey (*Within each row, compare columns (simple effect within rows)*). Os resultados foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$, expressos com média \pm DP (Desvio Padrão).

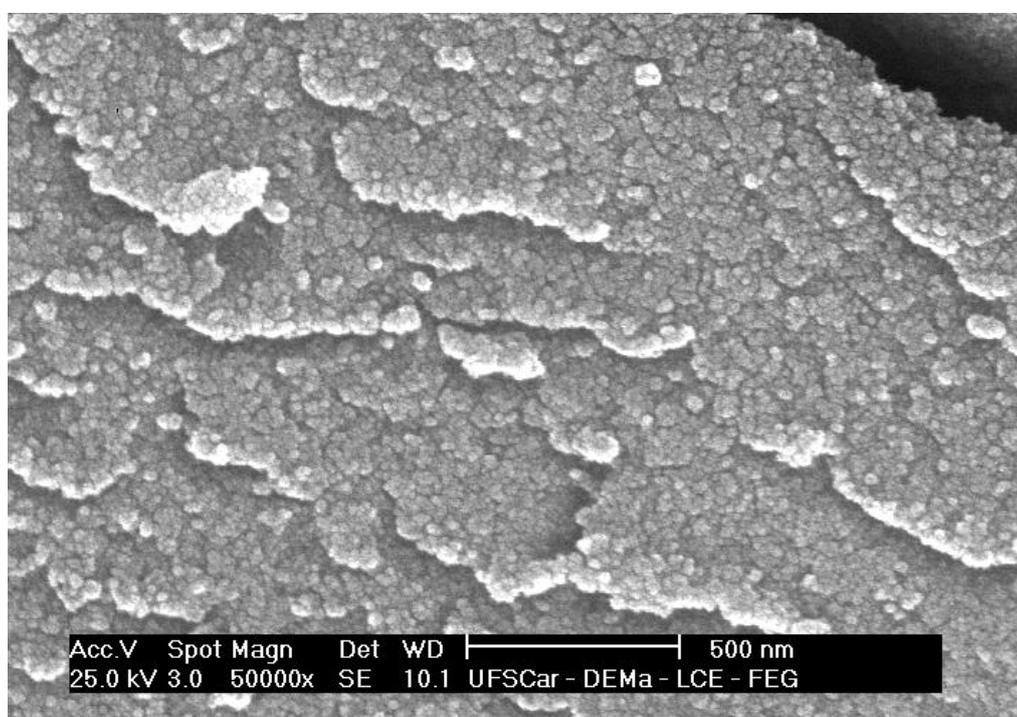
6. RESULTADOS

6.1 Caracterização

6.1.1 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG)

A figura 6, mostra a NP Fe₃O₄ através da análise de MEV-FEG. Observa-se que a nanopartícula possui formato esférico, distribuição heterogênea compactada e presença de aglomerados.

Figura 6: MEV-FEG da nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe₃O₄)



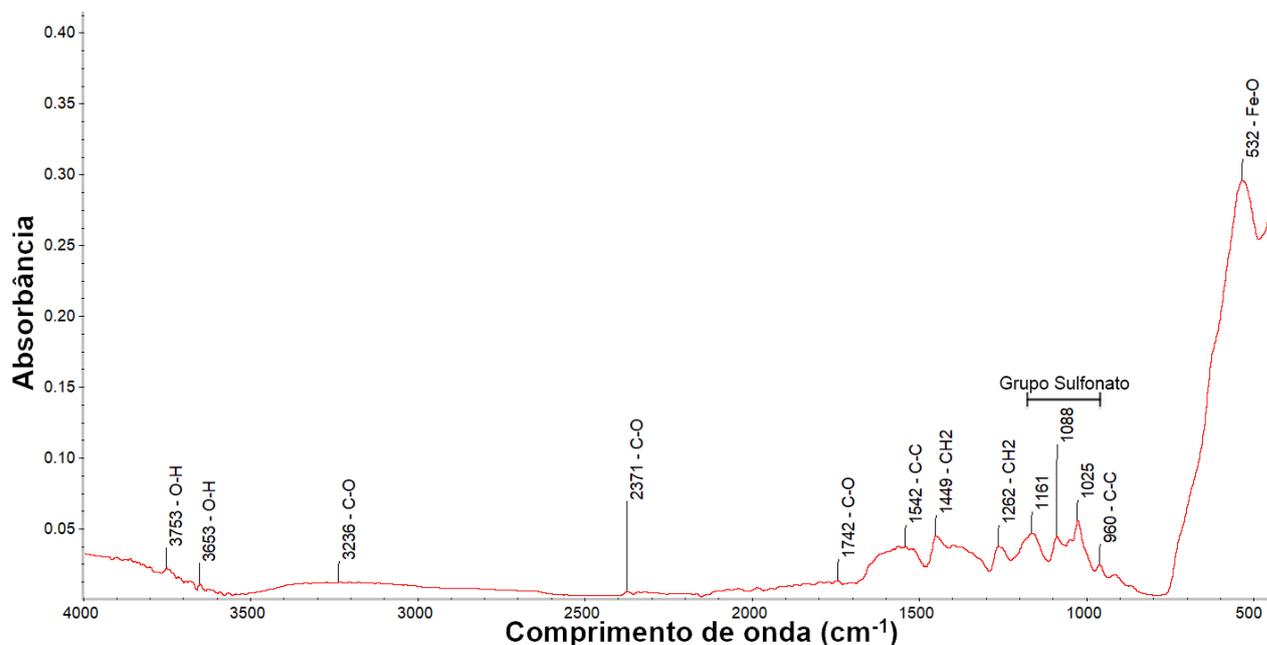
Microfotografia da NP Fe₃O₄ obtida através de MEV-FEG. Aumento: 50000x/Escala:500 nm.

6.1.2 Espectroscopia Infravermelho de Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier (ATR-FTIR)

A figura 7 mostra os espectros ATR-FTIR da NP Fe₃O₄. Os espectros mostram picos de 532 (estiramento do Fe-O); 960 (alongamento CC); 1025; 1088 e 1161 (atribuídos à presença do grupo sulfonato); 1262 e 1449 (vibrações de torção e tesoura -CH₂); 1542 (vibração de anéis no esqueleto aromático ou bandas duplas CC); 1742 (banda dupla de CO); 2371 (ligações CO), 3236, 3653 e 3753 cm⁻¹

(vibrações OH). Todos estes picos estão associados à presença de grupos de estiramentos da nanopartícula.

Figura 7: ATR-FTIR da nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe₃O₄)



Espectros ATR-FTIR da NP Fe₃O₄.

6.1.3 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e Potencial Zeta

Na tabela 2, temos a análise da dispersão da NP Fe₃O₄ em água, salina (NaCl 0,9%) e no meio de cultura DMEM. Em água, a nanopartícula mostrou um diâmetro hidrodinâmico de $26,3 \pm 3,1$ nm e potencial zeta de $-19 \pm 1,6$ mV. O Pdl médio da dispersão de NP Fe₃O₄ foi de $0,604 \pm 0,082$. Porém, no tempo zero ($t = 0$), a dispersão de NP Fe₃O₄ num meio rico em proteínas (DMEM suplementado com 10% de SFB), resultou em alterações no seu potencial zeta de $-19 \pm 1,6$ mV para $-8,7 \pm 0,5$ mV e um aumento do seu tamanho de $26,3 \pm 3,1$ nm para $35,2 \pm 3,2$ nm. Além do mais, observa-se que o tamanho da NP Fe₃O₄ aumenta conforme o tempo analisado, sendo que no período de 72 horas, a nanopartícula atinge um tamanho de $48,9 \pm 1,70$ nm e seu potencial zeta atinge um valor ainda menor, de $-7,2 \pm 1,2$ mV. Por outro lado, os valores de Pdl diminuem à medida que o tempo de dispersão da nanopartícula no meio de cultura aumentam.

Enquanto que, para a dispersão da NP Fe₃O₄ em água e em salina, o tamanho hidrodinâmico da NP Fe₃O₄ dispersa em salina aumenta quando comparada à análise realizada em água, de 26.3 ± 3.06 para 41.7 ± 3.61 em salina. Já para o potencial zeta o valor diminui de -19 ± 1.6 em água para -15 ± 0.7 em salina. Por outro lado, o valor de Pdl tem uma redução de 0.604 ± 0.082 em água para 0.307 ± 0.022, quando a nanopartícula é analisada em solução salina.

Tabela 2: Valores médios do tamanho (Z-average) obtidos por DLS, Índice de Poldispersividade (Pdl) e Potencial Zeta da NP Fe₃O₄ em água destilada, salina (NaCl 0,9%) e em meio de cultura (DMEM) suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB)

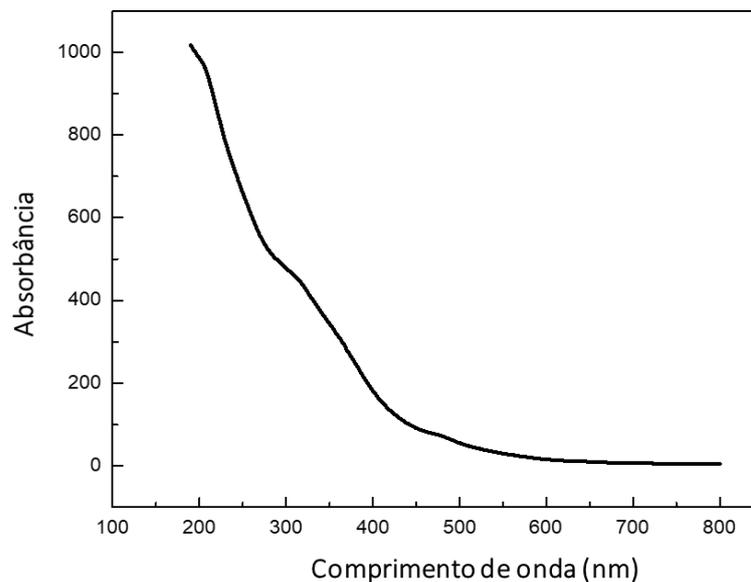
	Água destilada	Salina (NaCl 0,9%)	DMEM suplementado com 10% de SFB				
			t = 0	t = 6 h	t = 24 h	t = 48 h	t = 72 h
Tamanho hidrodinâmico Z-average (nm)	26.3 ± 3.06	41.7 ± 3.61	35.2 ± 3.25	43.7 ± 1.50	47.3 ± 3.60	48.4 ± 0.73	48.9 ± 1.70
Índice de Poldispersividade (Pdl)	0.604 ± 0.082	0.307 ± 0.022	0.491 ± 0.087	0.372 ± 0.021	0.322 ± 0.043	0.271 ± 0.001	0.291 ± 0.010
Potencial Zeta (mV)	-19 ± 1.6	-15 ± 0.7	-8.7 ± 0.5	-9.3 ± 0.3	-7.0 ± 0.4	-8.9 ± 1.9	-7.2 ± 1.2

Os resultados representam a média ± SD obtidos através de 3 medidas diferentes. Concentração da NP Fe₃O₄: 4.72x10¹⁰ ± 1.46 x10⁸ partículas/mL (Nano Tracking Analysis (NTA), Nanosight NS300, Malvern).

6.1.4 Espectroscopia de Absorção Ultravioleta Visível (UV-Vis)

A figura 8, mostra o espectro de absorção visível aos raios UV da NP Fe₃O₄, através da técnica de UV-Vis. Não houve pico de absorção UV-Vis. Os espectros indicam uma dispersão de absorção de luz de cerca de 350 nm.

Figura 8: UV-VIS da nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe₃O₄)

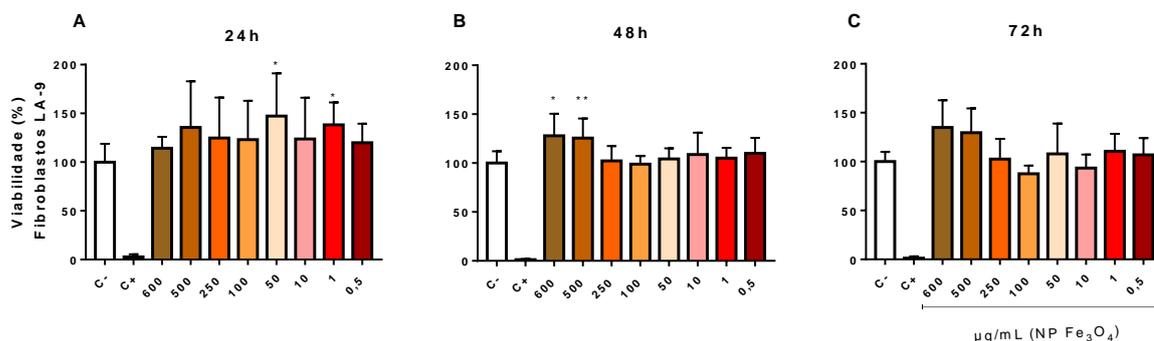


Espectro de absorção visível de NP Fe₃O₄ obtida através de UV-VIS.

6.2 Resultados *In vitro* – Fibroblastos (LA-9)

6.2.1 Teste de citotoxicidade brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difeniltetrazólio (MTT)

O teste de citotoxicidade mostra que nenhuma das concentrações da NP Fe₃O₄ em nenhum dos períodos testados (Figuras 9A, 9B e 9C) foi significativo para redução da viabilidade celular dos fibroblastos LA-9. Todas as concentrações atingiram viabilidade acima de 70%, sendo assim, a NP Fe₃O₄ não foi citotóxica para fibroblastos nestas condições. Algumas concentrações mostraram-se significativas em relação ao controle negativo quanto ao aumento de viabilidade celular (600, 500, 50 e 1,0 µg/mL de NP Fe₃O₄).

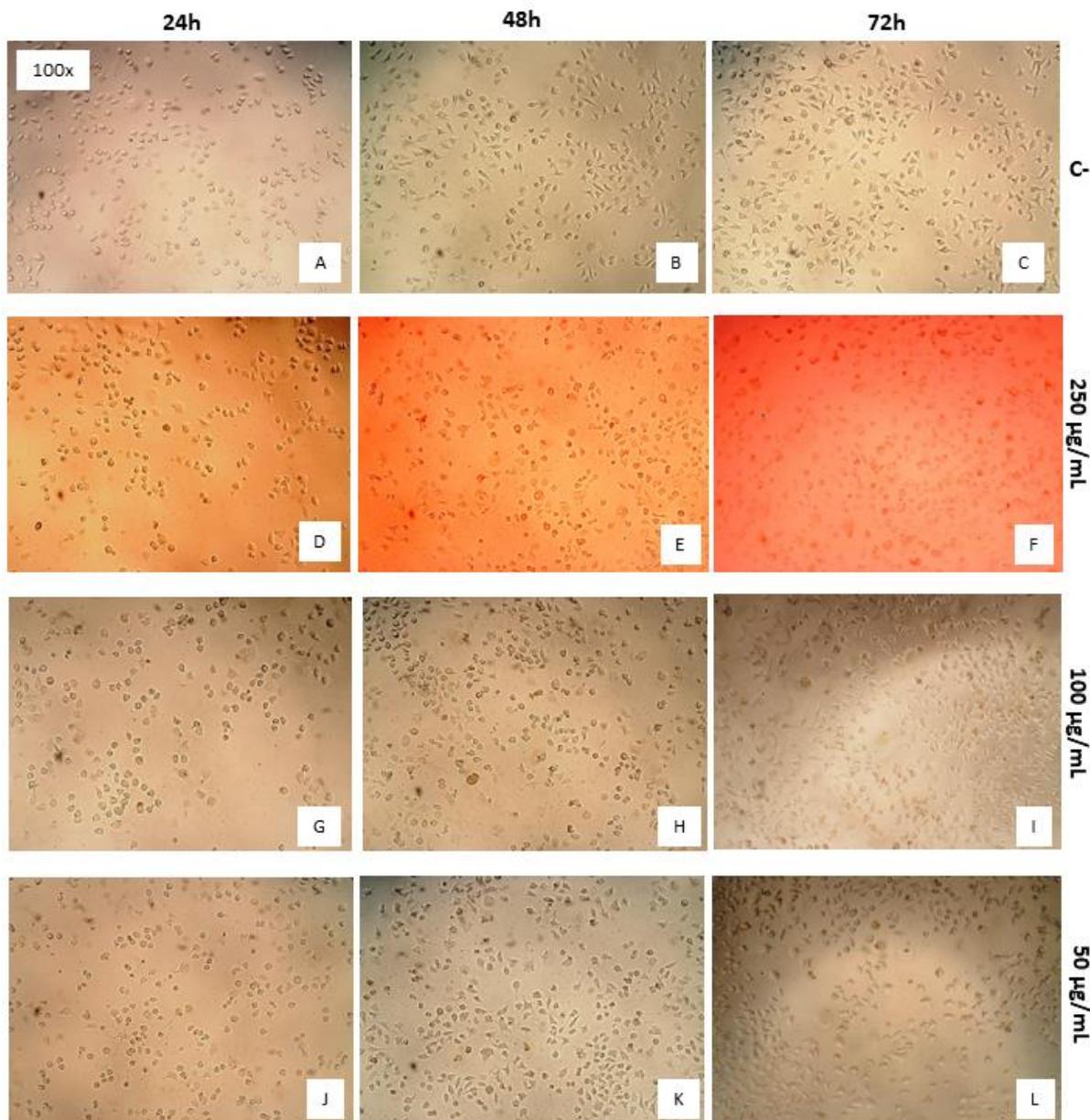
Figura 9: Viabilidade celular de fibroblastos (LA-9)

Porcentagem da viabilidade celular de fibroblastos (LA-9) após exposição à NP Fe₃O₄ nos períodos de exposição de 24h (9A), 48h (9B) e 72 horas (9C). A viabilidade foi calculada usando a média do Controle Negativo (C-) (células + meio de cultura) como 100% de viabilidade e C + representa 100% de células não-viáveis (células + SDS/Extran 5%). Os dados representam a média ± DP de 3 experimentos independentes. A análise foi realizada pelo teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunns. Os símbolos * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, representam a diferença significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP Fe₃O₄ quando comparado ao grupo C-.

6.2.2 Morfologia celular

Ao observar a morfologia dos fibroblastos, notou-se que o controle negativo apresentou morfologia e crescimento normais (Figuras 10A; 10B e 10C). Para 250 µg/mL em 24 h, não houve alteração morfológica (Figura 10D), mas após 48 h (Figura 10E), observam-se células menos alongadas em relação ao controle negativo e em 72 h (Figura 10F), há uma possível retração do citoplasma celular. Não foram observadas alterações morfológicas para as concentrações de 100 e 50 µg/mL de NP Fe₃O₄ em nenhum momento testado em relação ao controle negativo. Apesar das alterações morfológicas descritas para a concentração de 250 µg/mL, para todas as concentrações testadas, a densidade celular foi semelhante ao controle negativo, demonstrando crescimento e viabilidade encontrados no ensaio MTT.

Figura 10: Morfologia dos fibroblastos (LA-9)



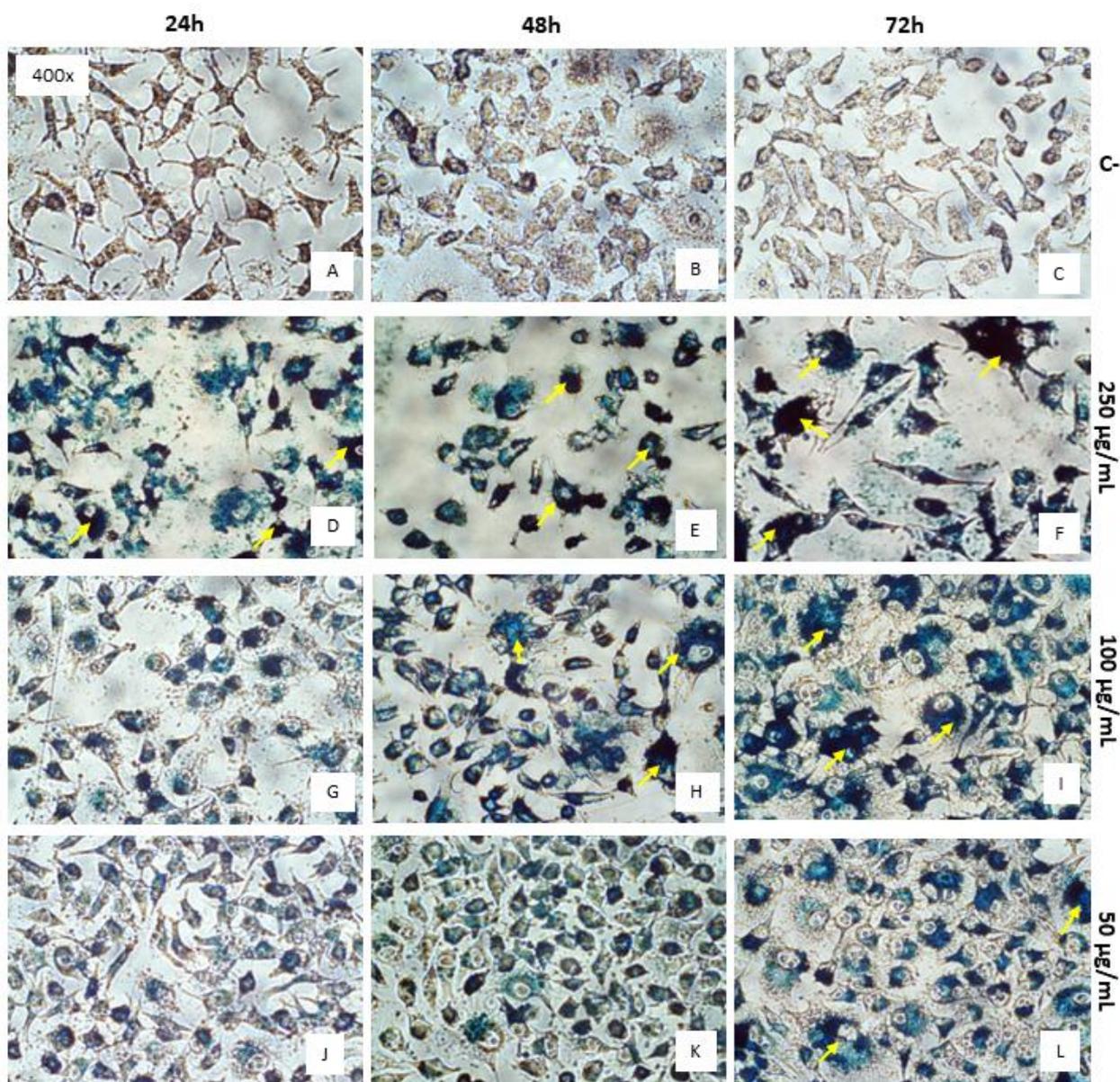
Morfologia dos fibroblastos LA-9 pós-exposição no período de 24, 48 e 72 horas da NP Fe₃O₄. (a; b; c) Controle negativo (C-) 24, 48 e 72 h; (d; e; f) 250 µg/ml 24, 48 e 72 h; (g; h; i) 100 µg/ml 24, 48 e 72 h; (j; k; l) 50 µg/ml 24, 48 e 72 h. (C-): células + meio de cultura. Análise qualitativa realizada através de três experimentos independentes. Ampliação: 100x.

6.2.3 Internalização celular- Azul de Prússia

Em todas as concentrações e horários testados foi observado a internalização da NP Fe₃O₄ no interior citoplasmático dos fibroblastos, (Figura 11), que é definida tempo-dependente. Além do mais, para todas as concentrações da NP Fe₃O₄ observa-se processo de formação de aglomerados da nanopartícula envolta da

membrana celular. Esse processo intensifica-se no decorrer do tempo para todas as concentrações e pode ter contribuído para os danos morfológicos encontrados nas células expostas a 250 $\mu\text{g/ml}$ após 48 horas. Para o controle negativo (meio de cultura sem NP Fe_3O_4 (Figura 11A; 11B e 11C), não foram identificadas quaisquer alterações de cor intracelular.

Figura 11: Internalização de nanopartículas em fibroblastos (LA-9)

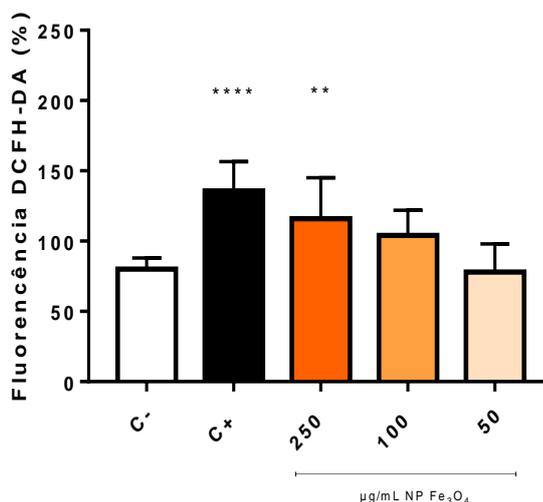


Internalização de nanopartículas em fibroblastos LA-9 após exposição a NP Fe_3O_4 em 24, 48 e 72 horas. (a; b; c) C- 24, 48 e 72 h; (d; e; f) 250 $\mu\text{g/ml}$ 24, 48 e 72 h; (g; h; i) 100 $\mu\text{g/ml}$ 24, 48 e 72 h; (j; k; l) 50 $\mu\text{g/ml}$ 24, 48 e 72 h. Controle Negativo (C-): células + meio de cultura. Coloração Azul de Prússia. Análise qualitativa realizada em três experimentos independentes. As setas amarelas indicam a formação de aglomerados da NP Fe_3O_4 . Ampliação: 400x.

6.2.4 Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Na figura 12 podemos observar os resultados para a produção de EROs intracelular em fibroblastos (LA-9) pós exposição as concentrações de 250, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ da NP Fe_3O_4 por 24 horas. Houve aumento significativo da produção de EROs apenas para a concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ da NP Fe_3O_4 quando comparado ao controle negativo e também para o controle positivo em relação ao controle negativo, evidenciando a eficácia do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em induzir a produção de EROs.

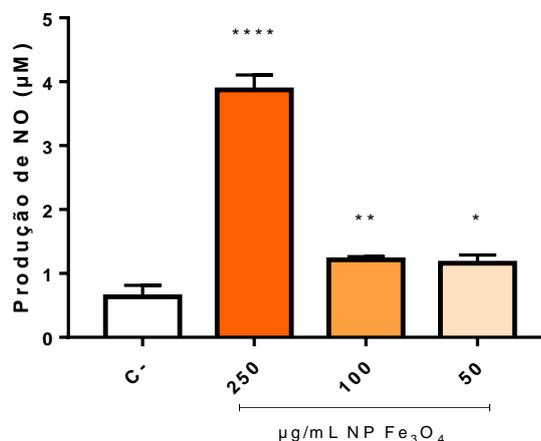
Figura 12: Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)



Produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) através da sonda DCFH-DA para fibroblastos (LA-9) pós exposição à NP Fe_3O_4 no período de 24 horas. Controle Negativo (C-) (células + meio de cultura); Controle Positivo (C+) (Células + 100 μm de H_2O_2). Os dados representam a média \pm DP de 3 experimentos independentes. A análise foi realizada pelo teste paramétrico *One away ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. Os símbolos ** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ representa a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos expostos à NP Fe_3O_4 quando comparado ao grupo C-.

6.2.5 Avaliação da produção de Óxido Nítrico (NO)

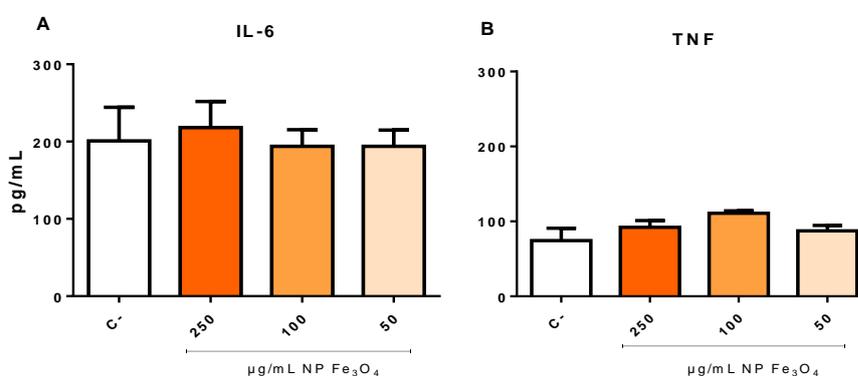
A figura 13 demonstra a produção de NO avaliado no sobrenadante celular dos fibroblastos, expostos a diferentes concentrações da NP Fe_3O_4 por 24 horas. Houve aumento significativo para todas as concentrações testadas em relação ao controle negativo. Ressalta-se o aumento expressivo da produção de NO na concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$ da NP Fe_3O_4 .

Figura 13: Produção de Óxido Nítrico (NO)

Concentração de Óxido Nítrico (NO) no sobrenadante de fibroblastos (LA-9) pós exposição á NP Fe₃O₄ no período de 24 horas. Controle Negativo (C-) (células + meio de cultura). Os dados representam a média ± DP de 3 experimentos independentes (pool/concentração), sendo realizada análise em triplicata. A análise foi realizada pelo teste paramétrico *One way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. Os símbolos * p<0,05, ** p<0,01 e **** p < 0,0001 representa a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos expostos à NP Fe₃O₄ quando comparado ao grupo C-.

6.2.6 Quantificação de citocinas no sobrenadante celular

A produção das citocinas IL-6 e TNF (Figura 14A e 14B), no sobrenadante de fibroblastos (LA-9) pós exposição as concentrações de 250, 100 e 50 μg/mL da NP Fe₃O₄ por 24 horas, não foi significativa em relação ao controle negativo.

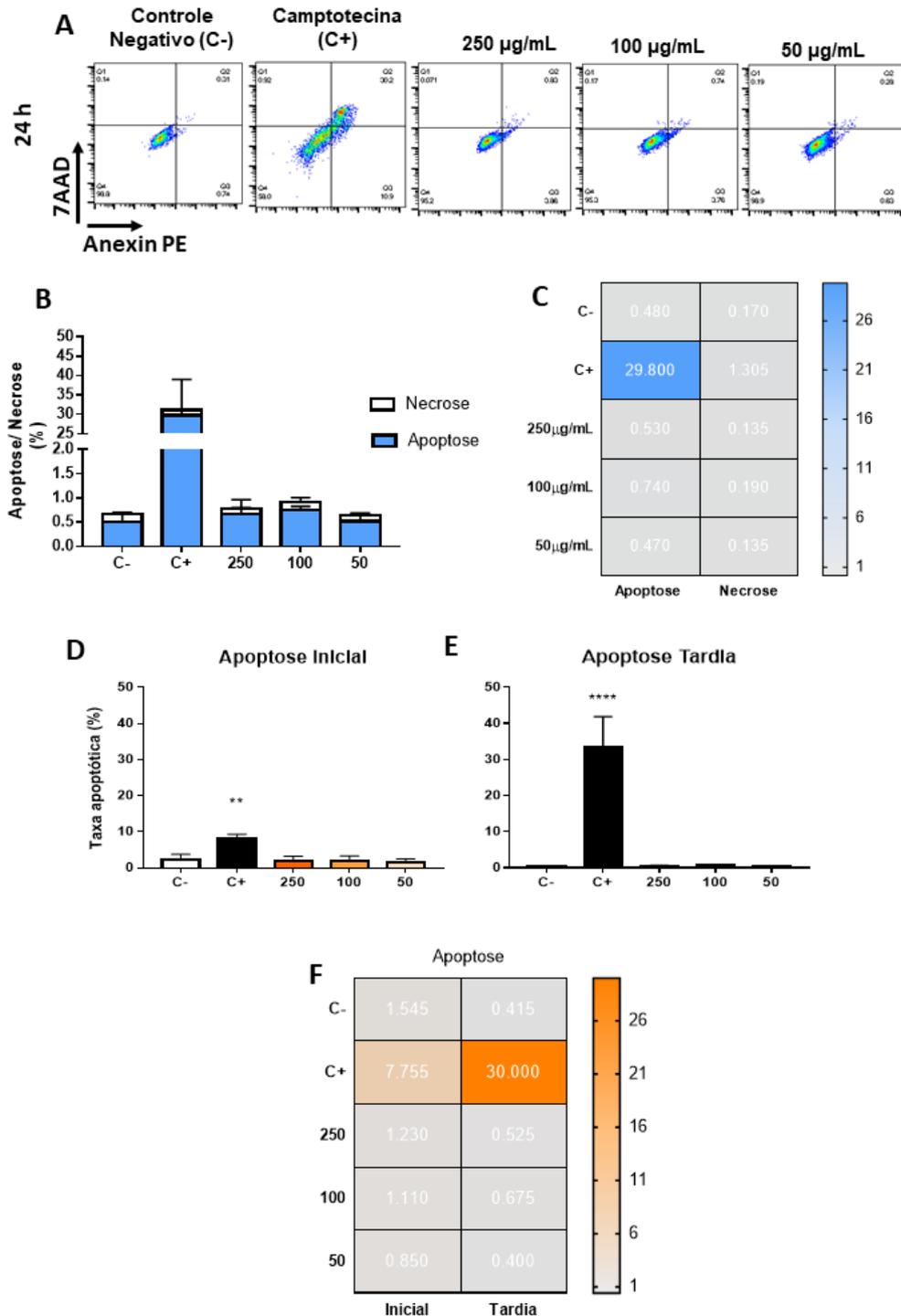
Figura 14: Quantificação de citocinas *in vitro*

Concentrações de IL-6 e TNF em pg/mL no sobrenadante de fibroblastos (LA-9) após a exposição a diferentes concentrações da NP de Fe₃O₄. (14-A: IL-6 e 14-B: TNF). Os dados representam a média ± DP de 3 experimentos independentes (pool/concentração), sendo realizada análise em triplicata. A análise estatística foi realizada utilizando o teste paramétrico *One-way ANOVA* e o pós-teste de *Tukey*. Não houve diferença estatística entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP Fe₃O₄ quando comparado ao grupo controle negativo (C-).

6.2.7 Determinação da Morte Celular- Citometria de fluxo

A figura 15 demonstra a determinação da morte celular, por citometria de fluxo, dos fibroblastos pós exposição por 24 horas às concentrações de 250, 100 e 50 $\mu\text{g/mL}$ da NP Fe_3O_4 . A análise qualitativa da proporção de expressão da Sonda PE Anexina V e do marcador 7AAD, para todas concentrações da NP Fe_3O_4 (50, 100 e 250 $\mu\text{g/ml}$), controle negativo (células e meio de cultura) e controle positivo (camptotecina) são apresentados em Figura 15A. Quanto à determinação da morte celular (Figura 15B), a comparação entre a percentagem (%) de ambos os marcadores mostrou um processo apoptótico e a correlação entre apoptose e necrose (Figura 15C) demonstrou um aumento significativo no controle positivo diante do processo apoptótico. Enquanto que, todas as concentrações da NP Fe_3O_4 produziram níveis semelhantes em comparação ao controle negativo. Durante a investigação da fase do processo apoptótico (Figura 15D e 15E) não foram encontrados resultados significativos para as concentrações da NP Fe_3O_4 . A correlação existente entre apoptose inicial e tardia (Figura 15F) apontou um aumento significativo apenas no controle positivo para apoptose.

Figura 15: Determinação da morte celular em fibroblastos (LA-9)

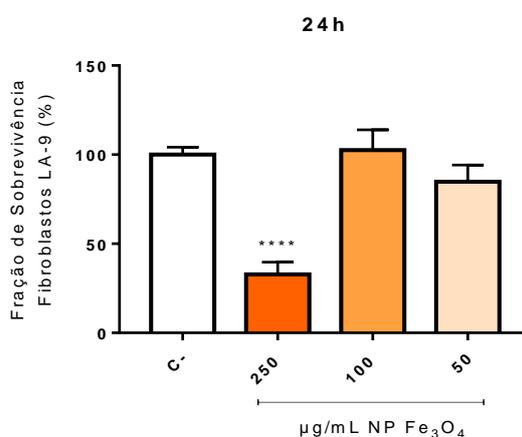


Ensaio de quantificação do tipo de morte celular em fibroblastos LA-9. (15A) Diagramas de *Dot Plot Density* com as percentagens de apoptose e necrose induzidas por camptotecina (C+) e diferentes concentrações da NP Fe₃O₄ (250, 100 e 50 µg/mL). Controle negativo (C-): células e meio de cultura. Controle positivo (C+): células e camptotecina 500 µM. (15B) Diagrama de barras representando a percentagem de fibroblastos LA-9 em estado de apoptose ou necrose; (15C) Correlação entre os níveis encontrados para apoptose e necrose; (15D) Diagrama de barras representando a percentagem de fibroblastos LA-9 em estado de apoptose inicial ou (15E) apoptose tardia; (15F) Correlação entre os níveis encontrados para apoptose inicial e tardia. Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos independentes, onde **p < 0,01 e **** p < 0,0001.

6.2.8 Teste de viabilidade reprodutiva - Ensaio clonogênico (*Clonogenic Assay*)

A figura 16 mostra a fração de sobrevivência de fibroblastos (LA-9) após exposição a NP Fe₃O₄ por 24 horas e análise no 7º dia. Apenas a concentração mais alta, de 250 µg/mL, foi significativa na redução de viabilidade reprodutiva (capacidade clonogênica) quando comparado ao controle negativo.

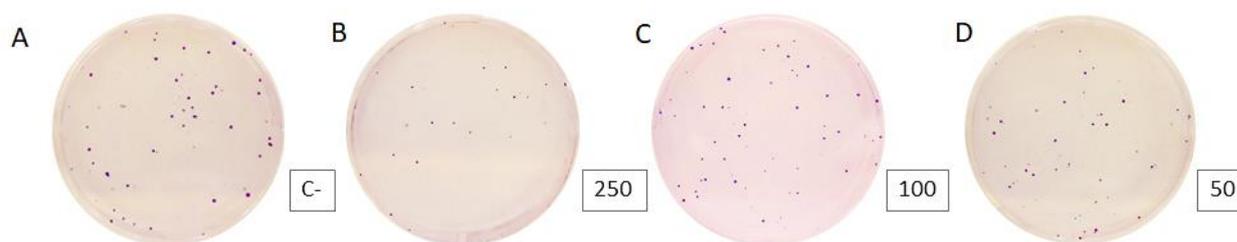
Figura 16: Ensaio clonogênico em fibroblastos (LA-9)



Fração de sobrevivência de fibroblastos (LA-9) expresso em percentagem (%) após exposição da NP Fe₃O₄ no período de 24 horas e incubação por 7 dias. Controle Negativo (C-): células + meio de cultura. Os dados representam a média ± DP de 3 experimentos independentes. A análise foi realizada pelo teste paramétrico *One way ANOVA* e pós-teste de *Tukey*. O símbolo **** $p < 0,0001$, representa a diferença significativa entre o resultado obtido nos grupos expostos à NP Fe₃O₄ quando comparado ao grupo C-.

A figura 17, representa as colônias de células formadas pelos fibroblastos, evidenciando a concentração de 250 µg/mL, como redutora do potencial de clonogenicidade. Observa-se um número menor de colônias nesta concentração, quando comparada com o controle negativo e as concentrações de 100 e 50 µg/mL da NP Fe₃O₄. Dessa forma, evidencia-se que há citotoxicidade da NP Fe₃O₄ frente aos fibroblastos (LA-9) na maior concentração testada, quando analisamos a clonogenicidade em 7 dias pós exposição.

Figura 17: Colônias formadas pelos fibroblastos (LA-9)



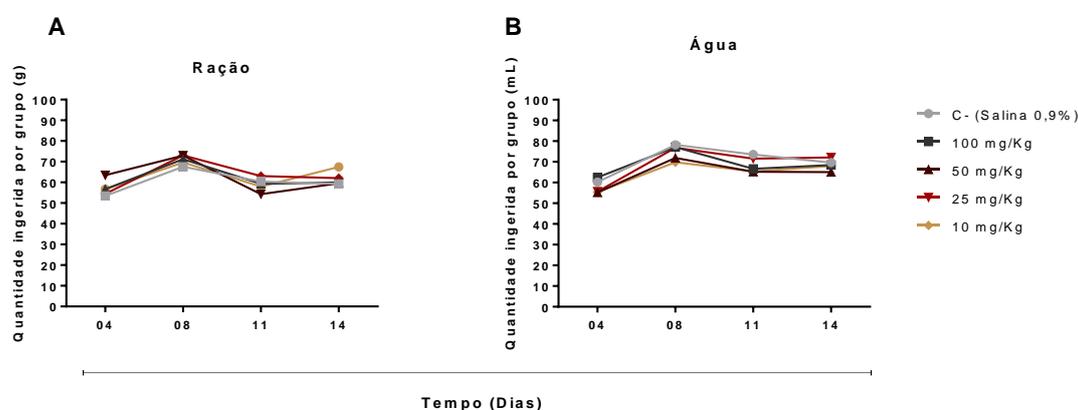
Colônias formadas pelos fibroblastos (LA-9) pós exposição á NP Fe₃O₄ no período de 24 horas e incubação por 7 dias. (A) Controle Negativo (C-): células + meio de cultura; (B) 250 ug/mL NP Fe₃O₄; (C) 100 ug/mL NP Fe₃O₄; (D) 50 ug/mL NP Fe₃O₄. A contagem das colônias foi realizada através do software ImageJ 1.53^a. Cada ponto representa uma colônia.

6.3 Resultados *In vivo* – Camundongos (BALB/c)

6.3.1 Variação no consumo de ração e água pelos animais durante a exposição à NP Fe₃O₄

A Figura 18 representa a quantidade de ração e de água consumidos pelos animais por grupo, nos dias 04, 08, 11 e 14 durante a exposição à NP Fe₃O₄ por via intraperitoneal. Não houve diferença significativa entre os grupos expostos à NP Fe₃O₄ em relação ao grupo controle para o consumo de ração (Figura 18A) e nem para a quantidade ingerida de água (Figura 18B).

Figura 18: Consumo de ração e água

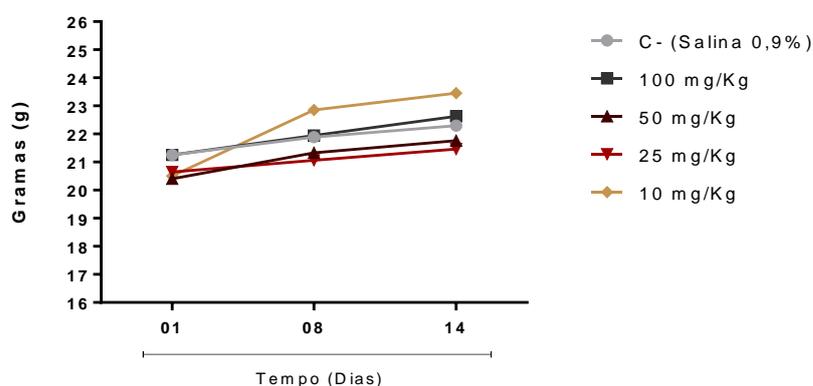


Consumo de ração (g) e água (mL) por grupo ao longo do período de exposição à NP Fe₃O₄ (18A – Ração e 18B- Água). Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos (n_{total}= 48 animais, sendo n=8 para C- e n=10 para grupos experimentais expostos à NP Fe₃O₄). A análise estatística foi realizada utilizando o teste *Two-way* anova e pós teste de Tukey. Não houve diferença estatística entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP Fe₃O₄ quando comparado ao grupo controle negativo (C-)

6.3.2 Variação do peso dos animais durante a exposição à NP Fe₃O₄

A Figura 19 representa a média do peso do grupo controle negativo (salina 0,9%) e dos grupos expostos a NP Fe₃O₄ (100, 50, 25 e 10 mg/Kg) após 01, 08 e 14 dias após início dos experimentos. Não foram encontradas diferenças significativas nos grupos expostos à NP quando comparado com o grupo controle.

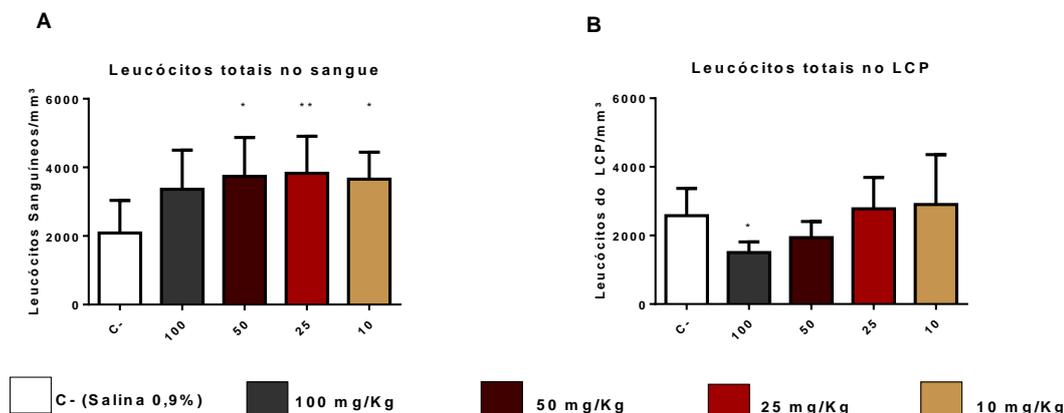
Figura 19: Média do peso dos animais



Média do peso (g) dos animais por grupo ao longo do período de exposição à NP de Fe₃O₄. Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos (n_{total}= 48 animais, sendo n=8 para C- e n=10 para grupos experimentais expostos à NP Fe₃O₄). A análise estatística foi realizada utilizando o teste paramétrico de *Two-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. Não houve diferença estatística entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP Fe₃O₄ quando comparado ao grupo controle negativo (C-).

6.3.3 Contagem global de leucócitos totais no sangue e no Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) após exposição à NP Fe₃O₄

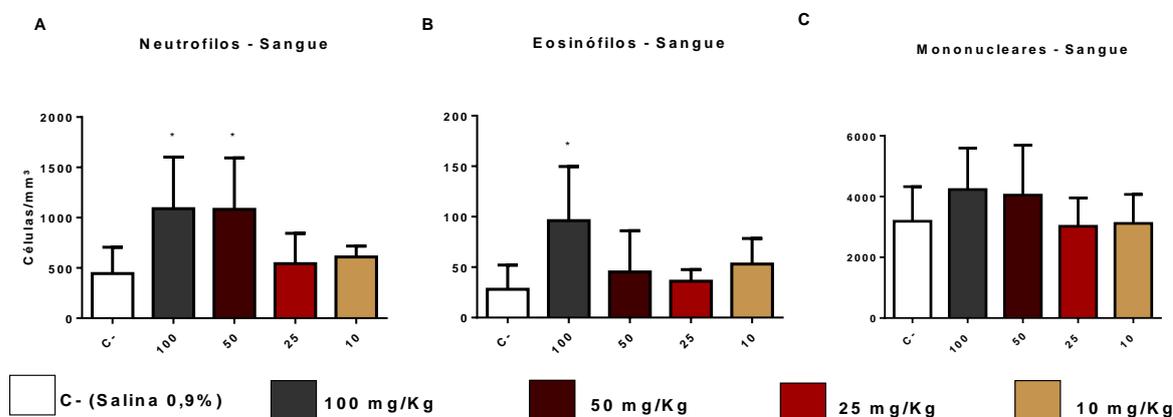
A Figura 20 representa o perfil dos leucócitos presentes no sangue (Figura 20A) e no Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) (Figura 20B). Para os leucócitos sanguíneos houve aumento significativo para os grupos expostos a 50, 25 e 10 mg/Kg da NP, em relação ao controle negativo. Enquanto que, para os leucócitos da cavidade peritoneal, houve redução significativa para o grupo exposto a 100 mg/Kg da NP, em relação ao controle negativo.

Figura 20: Leucócitos totais no sangue e LCP

Número de leucócitos/mm³ após exposição à NP Fe₃O₄ (20-A – Sangue, 20-B - LCP). Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos (n_{total}= 48 animais, sendo n=8 para C- e n=10 para grupos experimentais expostos à NP Fe₃O₄), sendo realizada análise individual. Para leucócitos sanguíneos, a análise estatística foi realizada utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e o pós-teste de Tukey. Para leucócitos no LCP, a análise foi realizada utilizando o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e pós teste Dunns. Os símbolos * p<0,05 e ** p<0,01 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP Fe₃O₄ quando comparado ao grupo controle negativo (C).

6.3.4 Contagem diferencial dos leucócitos no sangue após a exposição à NP de Fe₃O₄

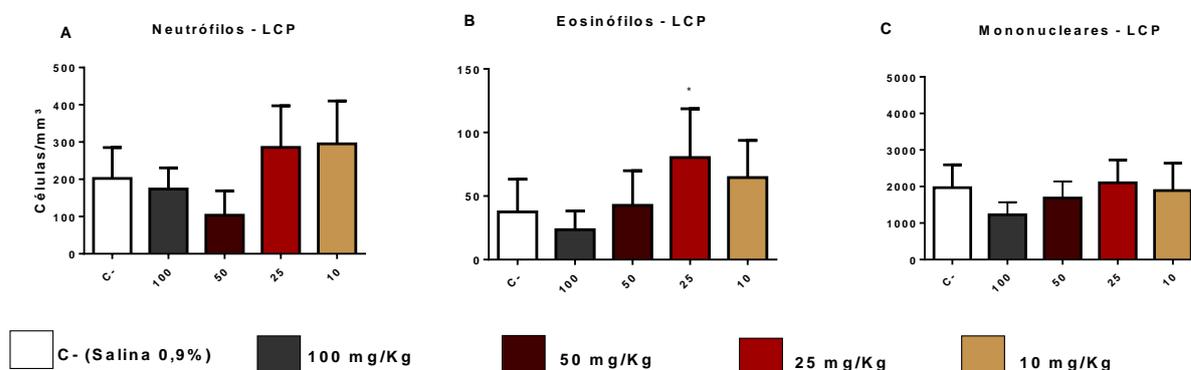
A Figura 21 representa a quantidade de neutrófilos (21A), eosinófilos (21B) e de mononucleares (21C) presentes no sangue dos animais expostos a NP Fe₃O₄. Para os neutrófilos sanguíneos houve diferença significativa nos grupos 50 e 100 mg/Kg quando comparado ao grupo controle. Para eosinófilos, houve diferença significativa no grupo de 100 mg/Kg quando comparado ao grupo controle. Não foi observada diferença significativa no número de mononucleares, porém evidencia-se aumento expressivo, nos grupos 100 e 50 mg/Kg.

Figura 21: Contagem diferencial dos leucócitos no sangue

Número de células/mm³ no sangue dos animais após exposição à NP Fe₃O₄ (21A – Neutrófilos, 21B - Eosinófilos e 21C - Mononucleares). Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos (n_{total}= 48 animais, sendo n=8 para C- e n=10 para grupos experimentais expostos à NP Fe₃O₄), sendo realizada análise individual. Para os neutrófilos e eosinófilos, a análise foi realizada utilizando o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e pós teste Dunns. Para os mononucleares a análise estatística foi realizada utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e pós-teste de Tukey. O símbolo * p<0,05, representa a diferença significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP Fe₃O₄ quando comparados ao grupo controle negativo (C-).

6.3.5 Contagem diferencial dos leucócitos no Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) após a exposição à NP de Fe₃O₄

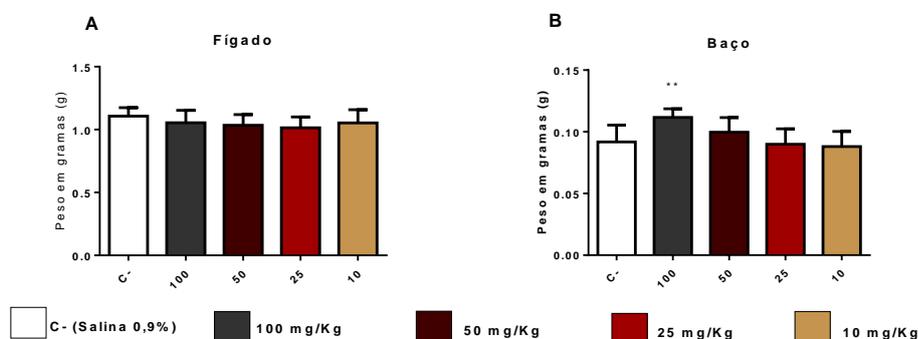
A Figura 22 representa a quantidade de neutrófilos (22A), eosinófilos (22B) e de células mononucleares (22C) presentes no LCP nos grupos controle negativo (salina 0,9%) e nos grupos expostos à NP Fe₃O₄. Houve apenas diferença significativa no número de eosinófilos para o grupo exposto a 25 mg/Kg em relação ao grupo controle.

Figura 22: Contagem diferencial dos leucócitos no LCP

Número de células/mm³ no Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) após exposição à NP Fe₃O₄ (22-A – Neutrófilos, 22-B - Eosinófilos e 22-C - Mononucleares). Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos (n_{total}= 48 animais, sendo n=8 para C- e n=10 para grupos experimentais expostos à NP Fe₃O₄), sendo realizada análise individual. A análise estatística foi realizada utilizando o teste paramétrico *One-way* ANOVA e pós teste de Tukey. Não houve diferença estatística entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP Fe₃O₄ quando comparado ao grupo controle negativo (C-).

6.3.6 Variações do peso dos fígados e baços dos animais após a exposição à NP Fe₃O₄

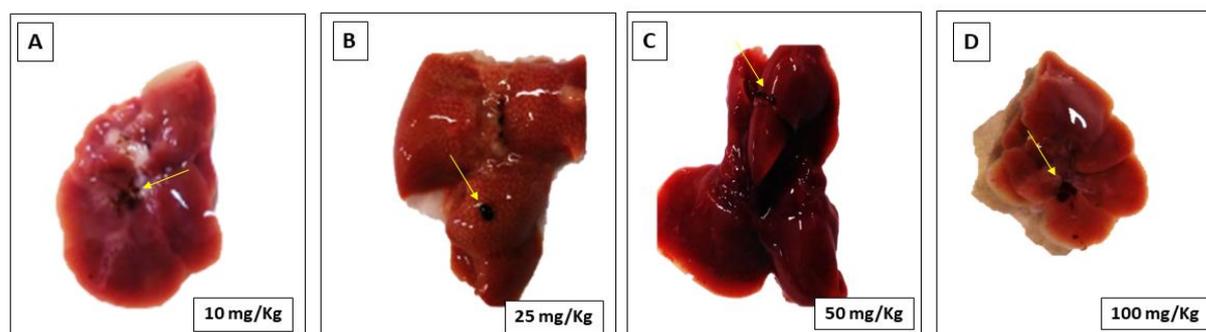
A Figura 23A e 23B representam o peso do fígado e do baço, respectivamente. Não houve alterações significativas no peso do fígado. Para o baço, observou-se aumento significativo no grupo exposto a 100 mg/kg, em relação ao controle negativo.

Figura 23: Peso do fígado e baço dos animais

Peso (g) do fígado (23A) e do baço (23B) dos animais após a exposição intraperitoneal à NP Fe₃O₄. Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos (n_{total}= 48 animais, sendo n=8 para C- e n=10 para grupos experimentais expostos à NP Fe₃O₄). A análise estatística foi realizada utilizando o teste paramétrico *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. O símbolo ** p<0,01, representa a diferença significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP Fe₃O₄ quando comparados ao grupo controle negativo (C-).

Durante a mensuração do peso dos órgãos, foi observado o acúmulo da NP Fe₃O₄ no fígado dos animais expostos a NP (Figura 24). Não foi observado acúmulo da NP Fe₃O₄ no baço dos animais.

Figura 24: Acúmulo da NP Fe₃O₄ no fígado dos animais

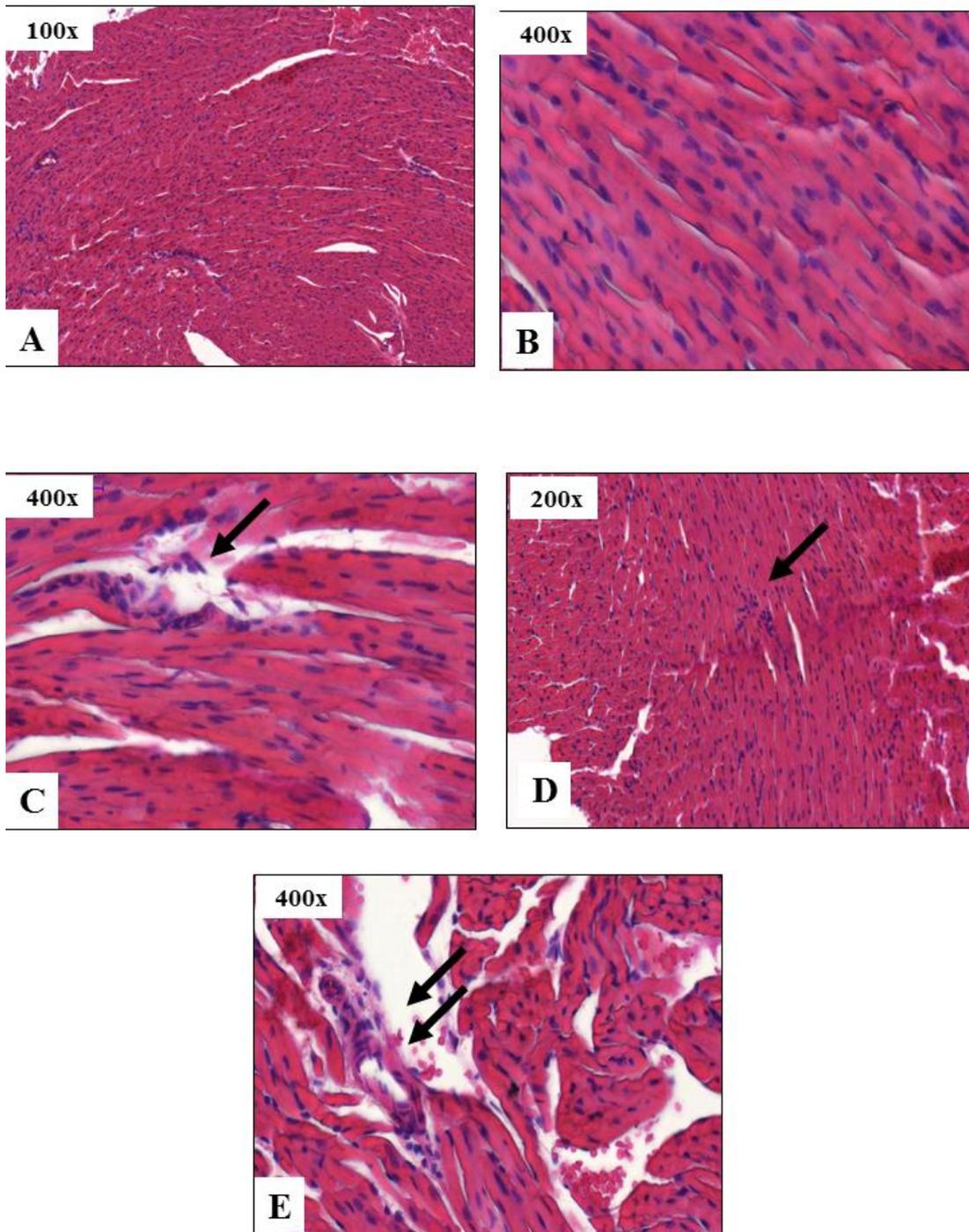


NP Fe₃O₄ no fígado dos animais após exposição por 14 dias (24A) 10 mg/kg de NP Fe₃O₄; (24B) 25 mg/kg de NP Fe₃O₄; (24C) 50 mg/kg de NP Fe₃O₄. (24D) 100 mg/kg de NP Fe₃O₄. Não foram encontradas alterações no fígado dos animais do Controle Negativo (Salina 0,9%). As setas em amarelo indicam a NP Fe₃O₄.

6.3.7 Análise histopatológica dos órgãos (coração, pulmão, fígado, baço e rim) dos animais expostos à NP Fe₃O₄

Na Figura 25 podemos observar as alterações encontradas em cortes histológicos do coração pós exposição à NP Fe₃O₄. Para a maior concentração da NP Fe₃O₄ (100 mg/Kg) (25B), foi encontrado alteração em apenas um dos tecidos analisados, sendo uma hipertrofia concêntrica de parede ventricular esquerda, grau discreto a moderado; congestão venosa em grau moderado. Para 50 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (25C) foi encontrado em um dos cortes do tecido, uma hipertrofia concêntrica de parede ventricular esquerda, grau discreto a moderado, que está em grau inicial, sua evolução pode levar a uma insuficiência cardíaca. Além disso também foram encontrados infiltrados inflamatório linfoplasmocitário discreto e focal no miocárdio. Os grupos expostos com 25 mg/Kg (25D) e 10 mg/Kg (25E) de NP Fe₃O₄ apresentaram infiltrado linfoplasmocitário discreto e multifocal no miocárdio, ou seja, pequenos focos de células inflamatórias distribuídos pelo tecido. Não foram encontradas alterações nos cortes histológicos de coração dos animais do controle negativo (25A).

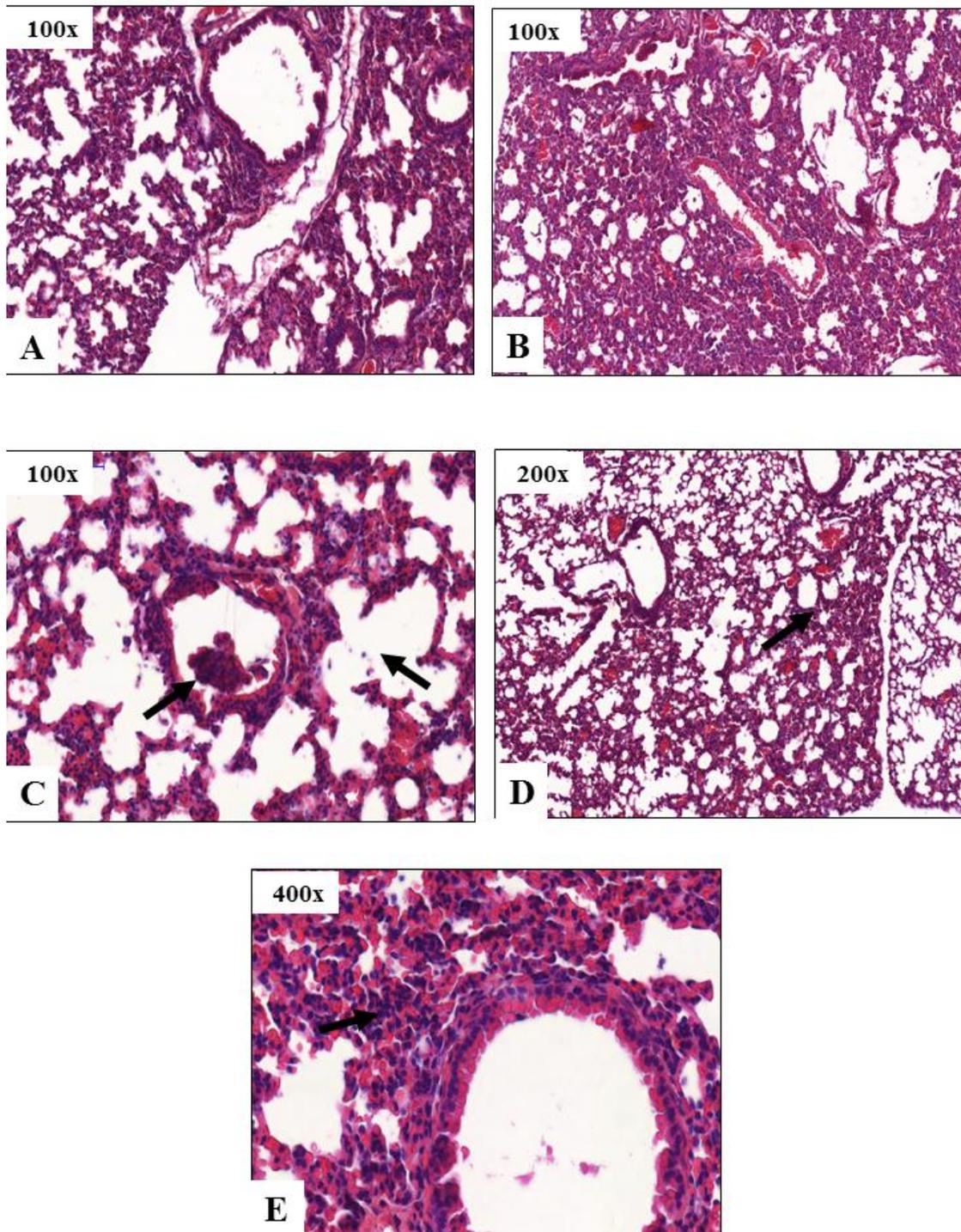
Figura 25: Fotomicrografias de cortes de coração após 14 dias de exposição à NP Fe₃O₄



Análise morfológica de cortes histológicos de coração dos animais de cada grupo experimental após 14 dias de exposição à NP Fe₃O₄: controle negativo: salina 0,9% (25A), 100 mg/kg de Fe₃O₄ (25B), 50 mg/kg de Fe₃O₄ (25C), 25 mg/kg de Fe₃O₄ (25D), 10 mg/kg de NP Fe₃O₄ (25E). As setas indicam hipertrofia concêntrica de parede ventricular esquerda (55-C) e infiltrado linfoplasmocitário discreto (25-D e E). aumento variando de 100x (200 µm) a 400x (50 µm).

A Figura 26 apresenta as alterações encontradas em cortes histológicos do tecido pulmonar pós exposição à NP Fe₃O₄. Nos grupos expostos com 100 mg/Kg (26B), 25 mg/Kg (26D) e 10 mg/Kg (26E), pode-se observar a presença de infiltrado inflamatório composto de linfócitos, plasmócitos, macrófagos e neutrófilos, além de espessamento de septos alveolares de grau discreto a acentuado e congestão venosa (aumento local de volume de sangue nos vasos). Para 50 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (26C), um dos tecidos revelou uma broncopneumonia, onde encontra-se um aglomerado de células inflamatórias (neutrófilos e linfócitos) no interior de brônquios (broncopneumonia). Além disso, foram encontradas espessamento dos septos alveolares e congestão venosa. Não foram encontradas alterações no pulmão dos animais do controle negativo (26A).

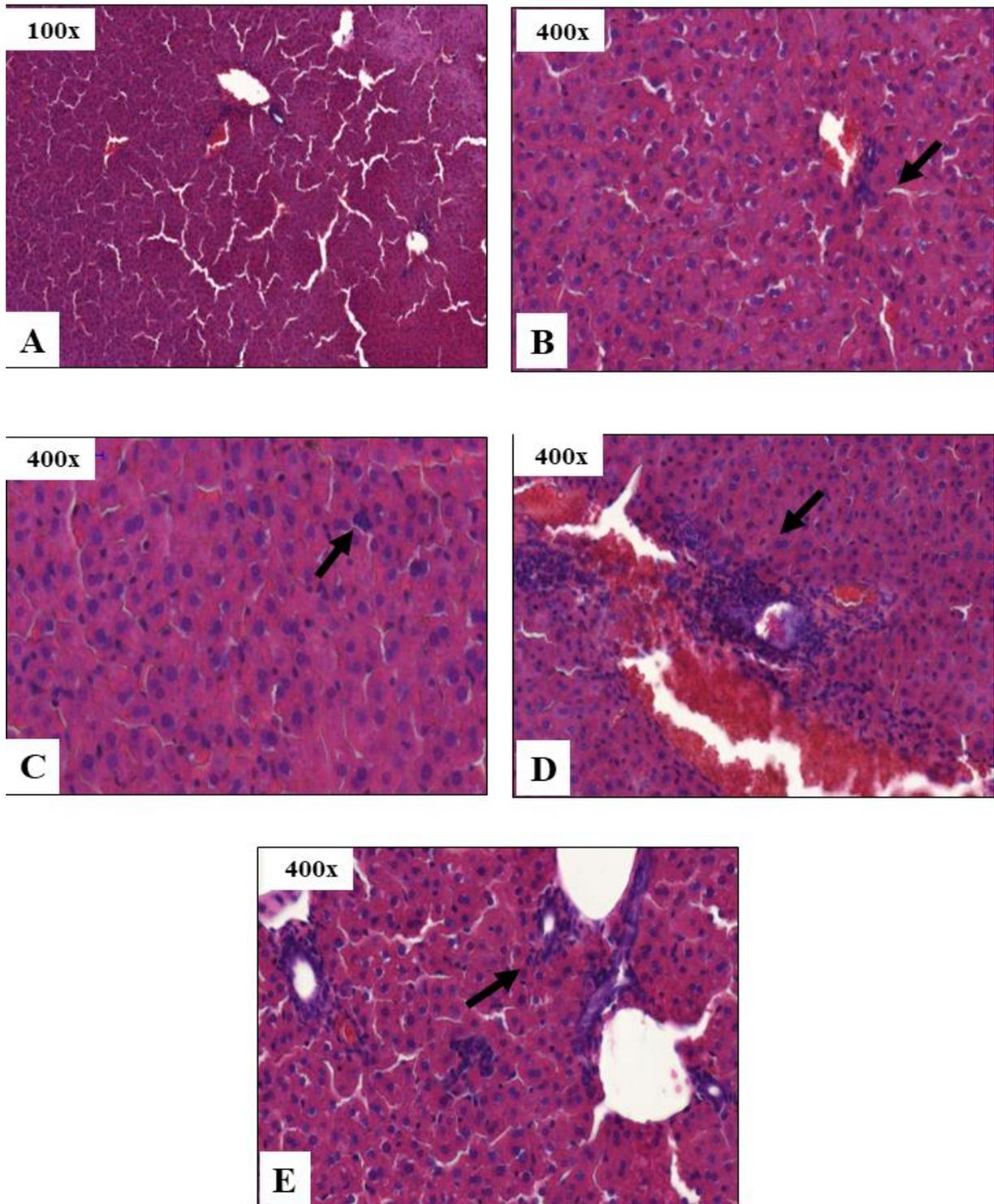
Figura 26: Fotomicrografias de cortes de pulmão após 14 dias de exposição



Fotomicrografias de cortes histológicos de pulmão após 14 dias de exposição à NP Fe₃O₄ - HE. Análise morfológica de cortes histológicos de pulmão dos animais de cada grupo experimental após 14 dias de exposição à NP Fe₃O₄: Controle negativo: salina 0,9% (26-A), 100 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (26-B), 50 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (26-C), 25 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (26-D) e 10 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (26-E). As setas indicam células inflamatórias dentro de um brônquio (26-C), espessamento de septos alveolares em grau acentuado e difuso (26-D) e infiltrado inflamatório (26-E). Aumento variando de 100X (200 µm) a 400X (50 µm).

Na Figura 27 podemos observar as alterações encontradas no tecido hepático pós exposição à NP Fe₃O₄. Na concentração de 100 mg/Kg da NP Fe₃O₄ (27B), observou-se a presença de multifocos de infiltrado linfoplasmocitário e hepatócitos com grau de tumefação discreto a acentuado e congestão venosa discreta a moderada. Para a concentração de 50 mg/Kg da NP Fe₃O₄ (27C) foram encontradas alterações inflamatórias, como degeneração de hepatócitos de grau moderado com congestão venosa difusa. Já o grupo exposto com 25 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (27D), apresentou diversos focos de infiltrado inflamatório, hepatócitos com grau de tumefação moderado e congestão moderada. Para o grupo expostos com 10 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (27E) foram encontrados hepatócitos com tumefação em grau moderado, ou seja, com tamanho alterado e congestão venosa discreta a moderado e um dos cortes apresentou um infiltrado inflamatório composto por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos discreto e multifocal, próximo a veias centro-lobulares. Não foram encontradas alterações no fígado dos animais do controle negativo (27A).

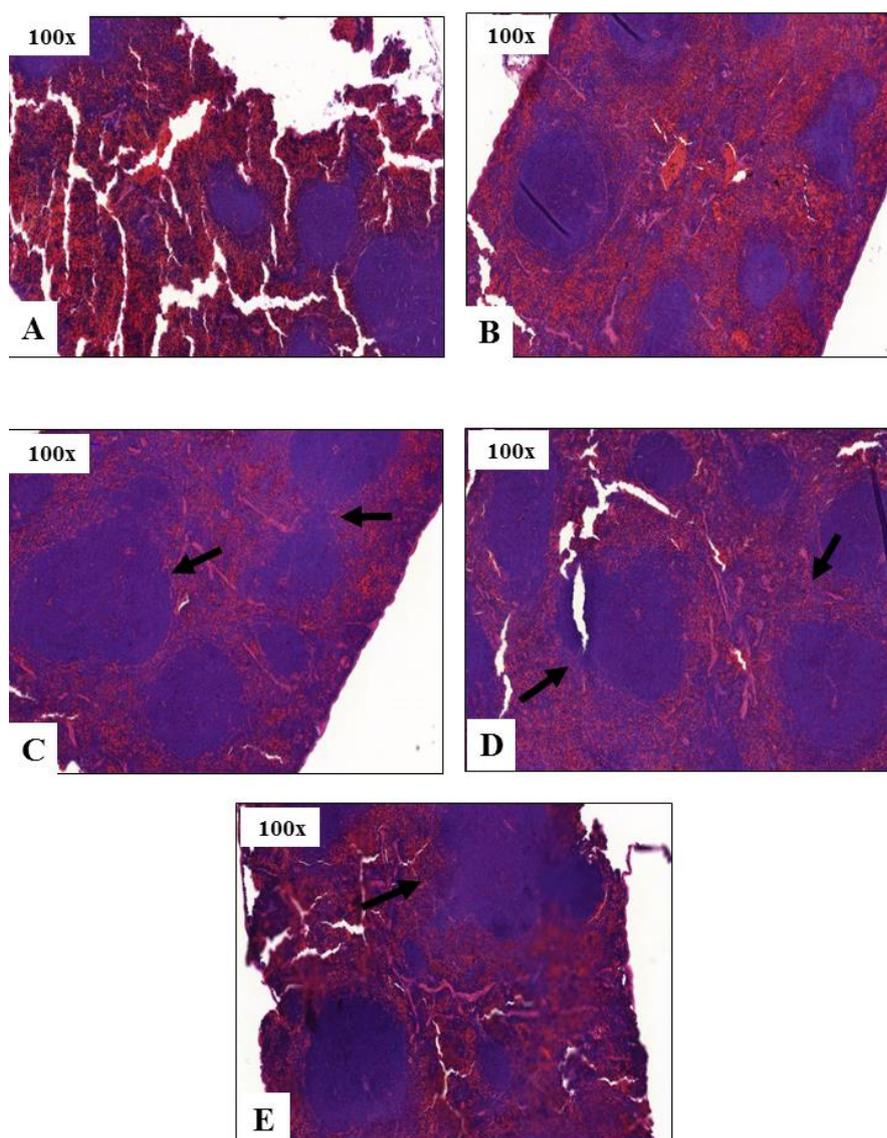
Figura 27: Fotomicrografias de cortes de fígado após 14 dias de exposição



Fotomicrografias de cortes de fígado após 14 dias de exposição à NP Fe₃O₄ - HE. Análise morfológica de cortes histológicos de fígado dos animais de cada grupo experimental após 14 dias de exposição à NP Fe₃O₄: Controle negativo: salina 0,9% (27-A), 100 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (27-B), 50 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (27-C), 25 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (27-D) e 10 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (27-E). As setas indicam infiltrado inflamatório (27-B, 27-C, 27-D e 27-E). Aumento variando de 100X (200 µm) a 400X (50 µm).

A Figura 28 demonstra as alterações encontradas no baço pós exposição à NP Fe₃O₄. Os grupos expostos com 50 mg/Kg (28C), 25 mg/Kg (28D) e 10 mg/Kg (28E) de NP Fe₃O₄ apresentaram aumento moderado dos nódulos linfáticos. Enquanto que para o grupo exposto a 100 mg/Kg (28B), maior concentração da NP Fe₃O₄ não foram encontradas nenhuma alteração nesse tecido. Também não foram encontradas alterações no baço dos animais do controle negativo (28A).

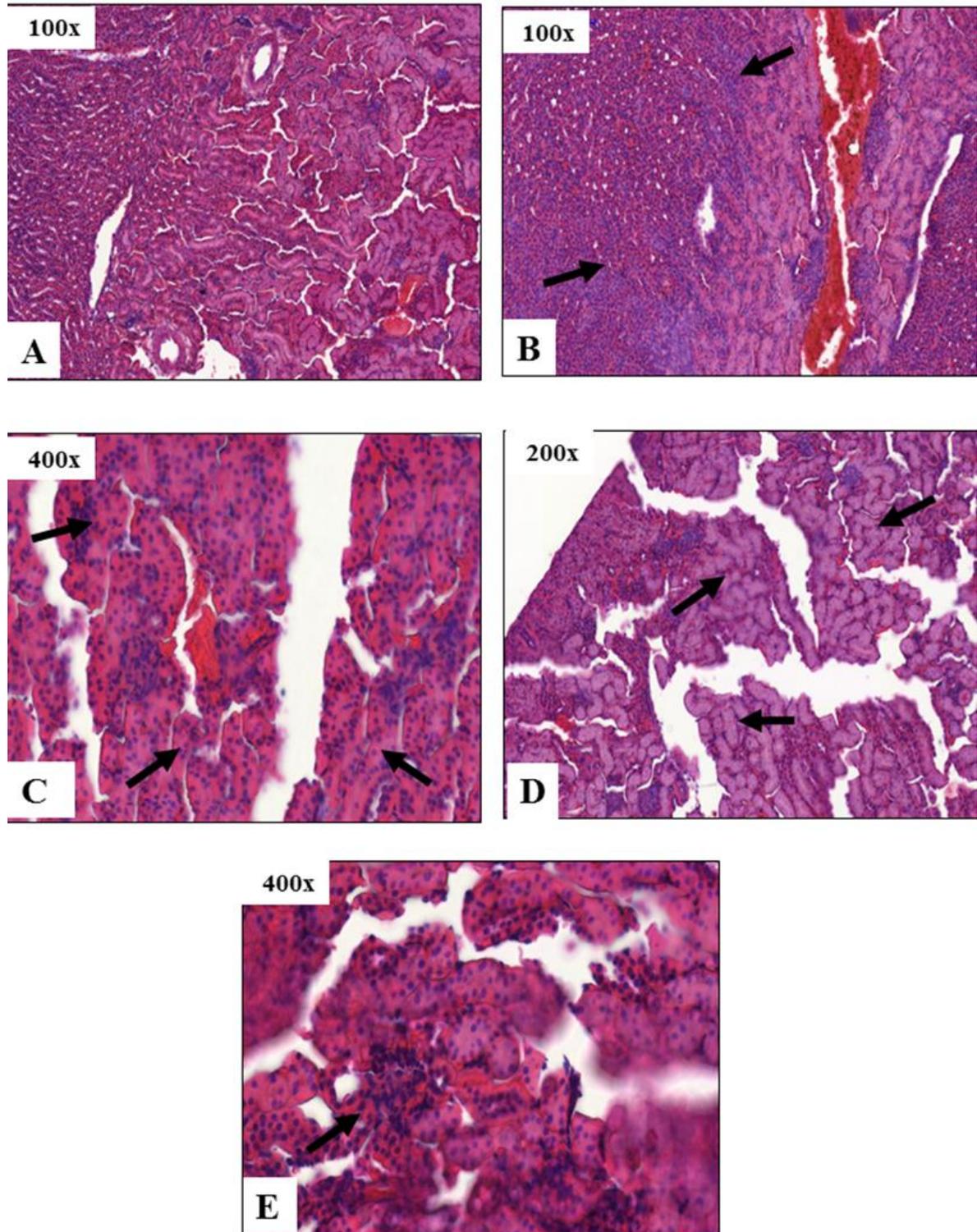
Figura 28: Fotomicrografias de cortes de baço após 14 dias de exposição



Análise morfológica de cortes histológicos de baço dos animais de cada grupo experimental após 14 dias de exposição à NP Fe₃O₄: controle negativo: salina 0,9% (28-A), 100 mg/kg de NP Fe₃O₄ (28-B), 50 mg/kg de NP Fe₃O₄ (28-C), 25 mg/kg de NP Fe₃O₄ (28-D) e 10 mg/kg de NP Fe₃O₄ (28-E). As setas indicam nódulos linfático aumentados (28-C, D e E). aumento variando de 100x (200 µm) a 400x (50 µm).

A Figura 29 revela as alterações presentes no rim dos animais pós exposição à NP Fe₃O₄. O grupo exposto com 100 mg/Kg (29B), os tecidos renais apresentaram congestão difusão em cortical e medular de grau acentuado a moderado. Para a concentração de 50 mg/Kg (29C), observou-se também congestão acentuada e difusa na cortical e medular, e ainda alguns glomérulos apresentando volume aumentado. O grupo exposto a concentração de 25 mg/Kg (29D), os tecidos apresentaram congestão de grau acentuada e difusa na cortical, além de discretos focos de hemorragia em cortical. Para 10 mg/Kg (29E) apresentou congestão acentuada e difusa na cortical renal. Em um dos cortes foi possível observar infiltrado inflamatório linfoplasmocitário multifocal e discreto em cortical. Não foram encontradas alterações no rim dos animais do controle negativo (29A).

Figura 29: Fotomicrografias de cortes de rim após 14 dias de exposição

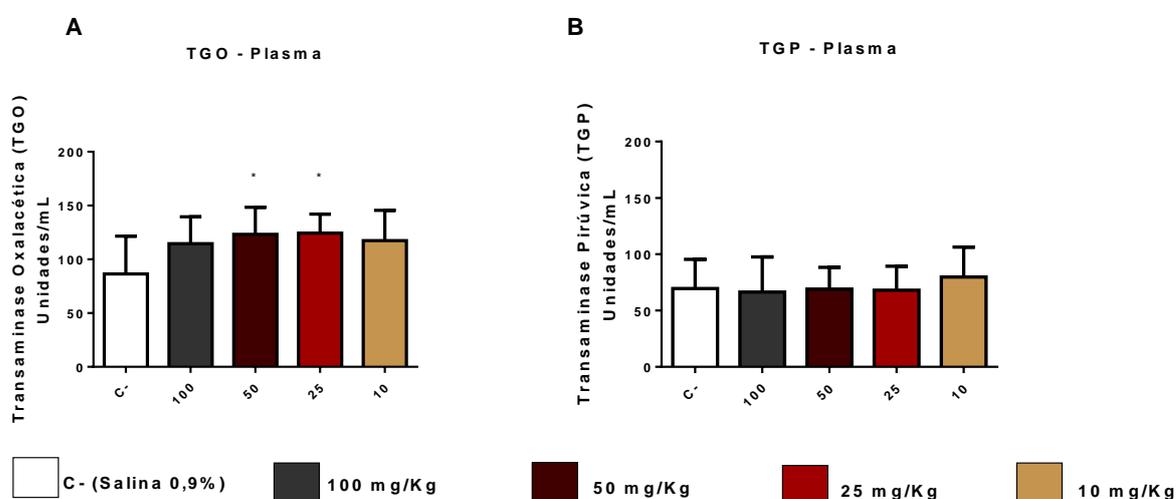


Análise morfológica de cortes histológicos de rim dos animais de cada grupo experimental após 14 dias de exposição à NP Fe₃O₄: Controle negativo: salina 0,9% (29-A), 100 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (29-B), 50 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (29-C), 25 mg/Kg de NP Fe₃O₄ (29-D) e 10 mg/Kg de Fe₃O₄ (29-E). As setas indicam congestão venosa (29-B, C e D) e infiltrado linfoplasmocitário (29-E). Aumento variando de 100X (200 µm) a 400X (50 µm).

6.3.8 Parâmetros bioquímicos: Análise dos níveis das Transaminases Oxalacética (TGO) e Pirúvica (TGP) - Função hepática

Para TGO (30A), observa-se que houve aumento significativo nos grupos 50 e 25 mg/Kg da NP Fe₃O₄ em relação ao controle negativo e embora não significativo o grupo exposto a 10 e 100 mg/Kg também encontra-se aumentado. Já para TGP (30B), não houve resultados significativos.

Figura 30: Dosagem de TGO e TGP



Dosagem de TGO (Transaminase Oxalacética) e TGP (Transaminase Pirúvica) no plasma dos animais após exposição à NP Fe₃O₄. (30A – TGO no plasma e 30-B- TGP no plasma). Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos (n_{total}= 48 animais, sendo n=8 para C- e n=10 para grupos experimentais expostos à NP Fe₃O₄), sendo realizada análise individual. A análise estatística foi realizada utilizando o teste paramétrico *One-way* ANOVA e o pós-teste de Tukey. O símbolo * p<0,05 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP Fe₃O₄ quando comparado ao grupo controle negativo (C-).

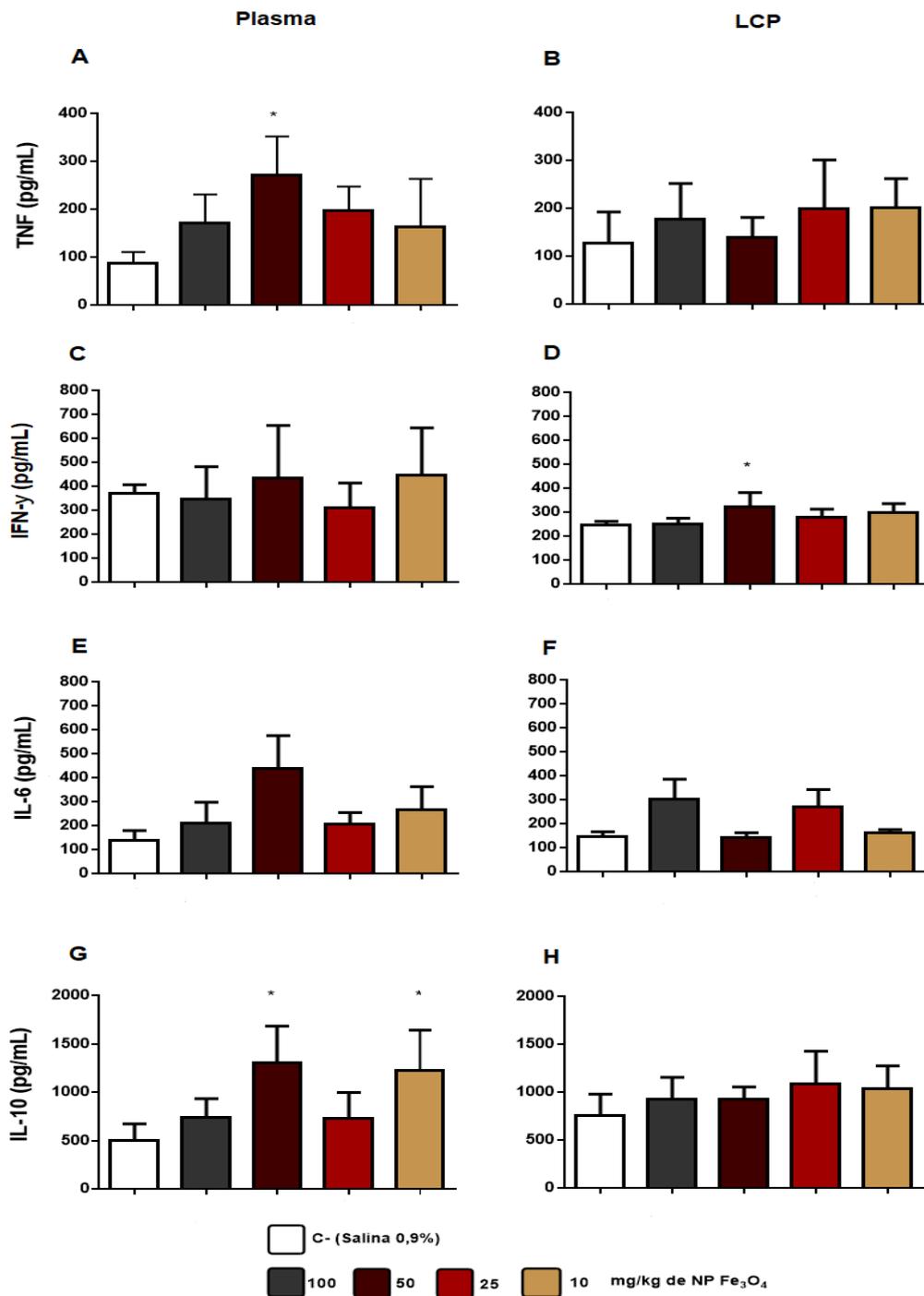
6.3.9 Quantificação de citocinas no plasma sanguíneo e no Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) de camundongos (BALB/c) expostos a NP Fe₃O₄

Em busca de analisar se houve alteração no perfil inflamatório no local alvo da via de administração *in vivo* da NP Fe₃O₄ (intraperitoneal) e também no perfil inflamatório circulante, foi realizado a dosagem de citocinas tanto no Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP), quanto no plasma sanguíneo dos animais (Figura 31).

Foi observado aumento significativo de TNF apenas para os animais expostos a 50 mg/kg da NP Fe₃O₄ no plasma (31A), quanto ao LCP, (31B) não foi observada diferença significativa em relação ao grupo controle negativo para nenhum grupo.

Para a produção da citocina IFN- γ , observa-se que para o plasma (31C) não houve produção significativa. Não foi encontrado aumento significativo da citocina IL-6 no plasma e nem no LCP, embora observa-se aumento no plasma para o grupo exposto a 50 mg/kg. Já para a produção da citocina IL-10, no plasma, os grupos 50 e 10 (31G) tiveram aumento significativo em relação ao controle. Não houve aumento significativo de IL-10 no LCP.

Figura 31: Quantificação de citocinas no plasma e LCP



Concentrações das citocinas TNF (Tumor Necrosis Factor – Fator de Necrose Tumoral), IFN- γ (interferon gama), IL-6 e IL-10 em pg/mL no plasma e no Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) de camundongos (BALB/c) expostos a diferentes concentrações da NP de Fe₃O₄. (31-A - TNF no plasma e 31-B- TNF no LCP); (31-C - IFN- γ no plasma e 31-D IFN- γ no LCP) (31-E - IL-6 no plasma e 31-F- IL-6 no LCP); (31-G – IL-10 no plasma e 31-H- IL-10 no LCP). Os dados representam a média \pm DP de 2 experimentos (pool/grupo), (n_{total}= 48 animais, sendo n=8 para C- e n=10 para grupos experimentais expostos à NP Fe₃O₄), sendo realizada análise em triplicata. A análise estatística foi realizada utilizando o teste paramétrico One-way ANOVA e o pós-teste de Tukey. Exceto para IFN- γ no plasma, onde a análise estatística foi realizada utilizando o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis e pós teste Dunns. Os símbolos * p<0,05, ** p<0,01 e **** p<0,0001 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP Fe₃O₄ quando comparado ao grupo controle negativo (C-).

7. DISCUSSÃO

Conhecida principalmente devido seu magnetismo, sua biodegradabilidade e seu potencial biocompatível em sistemas *in vivo* e *in vitro*, as nanopartículas de ferro são inegavelmente versáteis (VO-DINH, 2007; COTIN et al., 2018). A principal aplicação dessas nanopartículas é na área médica, como na entrega direcionada de medicamentos (*drug delivery*), tratamento contra anemia, agente de contraste para ressonância magnética e até mesmo na terapia do câncer (VANGIJZEGEM, STANICKI e LAURENT 2018; MUSIELAK, PIOTROWSKI e SUCHORSKA 2019; DADFAR et al., 2019; ALPHANDÉRY 2020; SOETAERT et al., 2020). Seu destaque na área industrial, decorre de modificações que podem ser realizadas em sua superfície, resultando em aplicabilidade por exemplo, na indústria de gás e petróleo (DIVANDARI et al. 2019; ZHOU et al., 2020; PEREIRA et al., 2020).

No entanto, mesmo que conhecida como biocompatível, a relevância de estudos nanotoxicológicos para cada nova nanopartícula desenvolvida é fundamental, promovendo assim informações sobre os possíveis riscos biológicos que sua exposição pode causar. Os modelos *in vitro* e *in vivo* norteiam a Nanotoxicologia e promovem conhecimento sobre a utilização segura das nanopartículas.

Para o presente estudo, foi realizada a caracterização da NP Fe₃O₄, experimentos utilizando fibroblastos murinos da linhagem LA-9 e camundongos da linhagem BALB/c. Assim, mediante caracterização, foi analisado parâmetros morfológicos, químicos e físicos. No estudo *in vitro*, foi analisado internalização celular e os efeitos derivados durante interação célula-nanopartícula, bem como morfologia celular, produção de EROs, NO, citocinas, viabilidade celular e morte celular. Além disso, o efeito pós-exposição foi avaliado analisando a formação de colônias através do ensaio clonogênico. O estudo *in vivo*, permitiu uma análise sistêmica dos efeitos da nanopartícula no organismo dos camundongos, e assim foi analisado parâmetros indicativos de toxicidade, produção de leucócitos, citocinas e estudo histológico de diferentes órgãos.

A nível fisiológico, as concentrações utilizadas no estudo *in vitro* (50, 100 e 250 µg/mL) e *in vivo* (10, 25, 50 e 100 mg/kg), são consideradas altas, pois o uso permitido de nanopartículas de óxido de ferro para ressonância magnética aplica

uma faixa de 0,2 a 0,8 mg Fe/kg de peso corporal, que é semelhante as concentrações de 2,5–10 µg/mL (REIMER e BALZER et al., 2003; FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ et al., 2019). No entanto, a toxicidade dessa nanopartícula, está relacionada a doses mais altas, que podem resultar em estresse oxidativo. Em baixas concentrações, a toxicidade não é observada, pois as *SPIONs* podem ser removidas do corpo (PATIL et al., 2018; NATARAJAN et al., 2019). Além do mais, de acordo com as diretrizes da OECD (OECD-425/2008-2008), as doses utilizadas em estudos de toxicidade de produtos químicos, devem estar numa faixa entre 5 e 5000 mg/kg. Assim, selecionamos concentrações encontradas em estudos nanotoxicológicos, com nanopartículas de óxido de ferro analisadas em modelo *in vitro* e *in vivo* que visam potencial aplicação humana (COMĂNESCU et al., 2015; SILVA et al., 2016; SALIMI et al., 2018; YUSEFI; SHAMELI e JUMAAT 2020; HUSSEIN et al., 2021; EBADI et al., 2021).

A caracterização de nanopartículas permite um melhor entendimento de como elas se comportam em diferentes soluções, o que pode auxiliar no entendimento dos resultados experimentais. As características da superfície das nanopartículas, como carga, área superficial e reatividade superficial, podem ser consideradas como potenciais moduladores de toxicidade (SHARMA, MADHUNAPANTULA e ROBERTSON 2012). As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro na forma de ferroflúido, como a do presente trabalho, além de possuírem alta magnetização, apresentam interação dependente de suas características físico-químicas, composição, morfologia e seus ligantes de superfície (MA et al., 2004; GUBIN et al., 2005; RAMYA e MAHADEVAN 2012).

A NP Fe₃O₄ foi sintetizada com intenção de uso na indústria petrolífera, e assim sua superfície foi funcionalizada com ligantes de sulfonato de sódio (SO₃)-Na⁺, um surfactante. *ATR-FTIR* é uma técnica útil para observar os grupos de superfície nas nanopartículas devido à picos de vibração de estiramento (LEE, LIONG e JEMAINB 2017; NASEER, ALI e QAZI, 2021). Nossos resultados mostraram picos em 532; 960; 1025; 1088; 1161; 1262; 1449; 1542.; 1742; 2371, 3236, 3653 e 3753 cm⁻¹ (Fig. 7). A banda apresentou um pico em 532 cm⁻¹ devido à vibração de estiramento do Fe-O, conforme a literatura (NI et al., 2009; MEDEIROS et al., 2015). Outros picos de vibração de estiramento foram relacionados ao polímero utilizado para estabilizar as partículas ricas em grupos sulfonatos. Foi observado pico em 960 cm⁻¹ associado a vibrações de alongamento CC (AGHAZADEH, KARIMZADEH e

GANJALI 2017a) e picos em 1025, 1088 e 1161 cm^{-1} , atribuídos à presença do grupo sulfonato (TOMA et al., 2022). Segundo Medeiros et al. (2015), bandas em torno de 1035 e 1195 cm^{-1} representam a vibração de estiramento assimétrico e simétrico do SO_3 , confirmando assim os ligantes da NP Fe_3O_4 . Além disso, no espectro foram demonstrados picos em torno de 1262 e 1449 cm^{-1} , sendo essas bandas atribuídas a vibrações de torção e tesoura $-\text{CH}_2$ (MASOUDI et al., 2012; AGHAZADEH et al., 2017b). Os picos em torno de 1542 cm^{-1} são caracterizados por vibração de anéis no esqueleto aromático ou bandas duplas CC (LIU, ZHANG e SASAI 2010; Toma et al., 2022). Enquanto que os picos observados em torno de 1742 cm^{-1} são correspondentes à banda dupla de CO, o pico em 2371 cm^{-1} é indicativo de ligações CO (KADIK et al., 2006; NADIMI et al., 2019; ISLAM e PENG, 2020). As bandas de 3200 a 3700 cm^{-1} têm sido descritas na literatura como vibrações OH (MEDEIROS et al., 2015; KARIMZADEH et al., 2017).

Grupos sulfonatos podem auxiliar na solubilidade das nanopartículas de ferro e a solubilidade também está relacionada à toxicidade desta nanopartícula (MIELOCH et al., 2010). Para o estudo de Brunner et al. (2006), a nanopartícula de ferro utilizada foi descrita como parcialmente solúvel, mas sua toxicidade foi atribuída a algum mecanismo específico dessas nanopartículas, como a produção de EROs, e não apenas aos efeitos químicos de íons de ferro não dissolvidos. Porém, quando as *SPIONs* são analisadas sem qualquer ligante, elas apresentam baixa solubilidade, o que pode levar ao entupimento de vasos sanguíneos (THORAT et al., 2016; PATIL et al., 2018). Uma possível solução para obter melhora da solubilidade em água é adicionar ligantes químicos tensoativos a essas nanopartículas, como foi feito em nosso estudo (MIELOCH et al., 2020).

Por meio da análise DLS, o tamanho e o potencial zeta da NP Fe_3O_4 foram estimados no meio de cultura utilizado no estudo *in vitro* (DMEM), em salina 0,9% utilizada no estudo *in vivo* e em água destilada. O potencial zeta é importante para entender a estabilidade da nanopartícula dispersa. Quanto à análise em meio de cultura celular, o potencial zeta foi de -8,7 mV, para salina foi de -15 mV e em água o valor encontrado foi de -19 mV (Tab. 2), portanto há tendência de agregação das partículas, mesmo adicionando ligantes surfactantes em sua superfície. Suspensões de nanopartículas são consideradas estáveis quando a medida do potencial zeta é maior que ± 30 mV (NURDIN, RIDWAN e SATRIANANDA, 2016).

Não houve pico de absorção *UV-VIS* para a amostra de NP Fe₃O₄ (Fig. 8). Nanopartículas que formam aglomerados podem não formar pico de absorção (SARMA et al., 2009), uma vez que os agregados podem dispersar a luz, mascarando a absorção.

Portanto, podemos observar que a nanopartícula em nosso estudo sofre alterações em contato com o meio de cultura e solução salina em comparação a água destilada (Tab. 2). Por exemplo, o tamanho da NP Fe₃O₄ no meio de cultura aumenta ao longo do tempo (0, 6, 24, 48 e 72 horas). Estudos observaram uma tendência de nanopartículas inorgânicas, assim como NP Fe₃O₄, em adsorver proteínas do meio de cultura celular, criando um efeito corona de proteínas ao redor dessas nanopartículas (CASALS et al., 2011; CALATAYUD et al., 2014). O estudo *in vitro* de Maiorano et al. (2010) mostra uma comparação entre os meios de cultura DMEM e RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*), onde foi observado que o meio DMEM induz uma maior formação de proteína corona de forma tempo-dependente em relação ao meio RPMI, em linhagens celulares HeLa e U937. A nível intracelular, os efeitos tóxicos das nanopartículas também podem ser provocados pela formação do efeito corona. As proteínas celulares são diretamente afetadas, resultando em interrupções de mecanismos importantes como transcrição, proliferação, transdução de sinal, regulação do ciclo celular, metabolismo e apoptose (PARK et al., 2020).

Os danos causados pela NP Fe₃O₄ mediante estudo *in vitro* foram investigados para os fibroblastos (LA-9) e assim, seria preciso determinar a ocorrência de internalização da NP Fe₃O₄ nessas células. Em meio intracelular, quando as nanopartículas de ferro são degradadas pelos lisossomos, são gerados íons Fe (GUPTA e CURTIS 2004b), que podem ser identificados intracelularmente. Zhu et al. (2012), observaram que a eficiência de internalização das SPIONs é dependente das características que cada linhagem celular apresenta, bem como a natureza da nanopartícula, incluindo seu revestimento. Nossos resultados *in vitro* do Azul da Prússia confirmam a internalização da NP Fe₃O₄ nos fibroblastos LA-9 em todas as concentrações e tempos experimentais realizados (Fig.11) e podemos observar que houve uma relação tempo-dependente. Gu et al. (2011) observaram a internalização de SPIONs em macrófagos RAW 264.7 em diferentes períodos de até 48 horas e mostraram que isso também ocorre de forma tempo-dependente, observando assim um aumento na captação de SPIONs em tempos de incubação mais longos.

Os danos morfológicos encontrados em nosso estudo *in vitro* (Fig. 10) podem estar relacionados à tendência de formação de aglomerados de nanopartículas, confirmados pela caracterização por MEV-FEG (Fig. 6) e Azul da Prússia (Fig. 11). Zhu et al. (2012), realizam o Azul da Prússia em diferentes células, incluindo fibroblastos da linhagem L929, e não encontraram alterações morfológicas celulares após exposição às nanopartículas em 24 horas. No entanto, outros estudos demonstram que a internalização de nanopartículas de óxido de ferro em fibroblastos dérmicos pode resultar na formação de vacúolos, e na linhagem L929, grânulos e danos em organelas foram observados em períodos de exposição de até 72 horas (BERRY et al., 2004; MAHMOUDI et al., 2009, 2012), sugerindo que longos períodos de exposição podem promover danos celulares.

A internalização e acúmulo da NP Fe₃O₄ pode ser um fator chave para descrever a toxicidade, e nesse sentido alguns mecanismos fisiológicos intrínsecos podem ser observados. A reação química via Fenton é bem descrita quando nanopartículas de ferro são avaliadas no ambiente biológico e ocorre a partir de um acúmulo de íons Fe⁺ livres no citoplasma da célula, o que induz um aumento na produção de H₂O₂ que resulta na produção de radicais hidroxilas que podem ser tóxicos por prejudicar a homeostase celular. E assim, outro fator envolvido no desequilíbrio do sistema de proteção celular através da produção de enzimas oxidantes/antioxidantes, e por fim, disfunção mitocondrial é o estresse oxidativo via produção de *EROs*, que em excesso induz toxicidade, acompanhada de NO que pode exacerbar ainda mais essa resposta, inibir a adesão de moléculas ou mesmo induzir a morte celular (DE JESUS e KAPILA 2014; WU et al., 2014; RADAIC et al., 2016; MAURIZI et al., 2018; GHOLINEJAD et al., 2019; YU et al., 2019; NAKAMURA, NAGURO e ICHIJO 2019; BONADIO et al., 2020).

Estudos *in vitro* apresentam considerações interessantes a respeito do estresse oxidativo via *EROs* induzidos por nanopartículas de ferro, porém pouco se explora sobre o NO. Nossos achados indicam que a internalização dessas nanopartículas induz produção significativa de *EROs* e NO nos fibroblastos LA-9 na concentração de 250 µg/mL (Fig. 12 e 13), possivelmente derivada do acúmulo de íons de ferro intracelular detectados pela metodologia do Azul da Prússia. Os resultados do estudo de Radu et al. (2015) corroboram nossos achados, pois também identificaram acúmulo de íons de ferro no interior de fibroblastos pulmonares MRC-5 após exposição a nanopartículas magnéticas, gerando alta

produção de ROS, aumento de NO e PGE2 (Prostaglandinas *E2*) que juntos levaram a disfunções celulares significativas. Tais estudos demonstram que o NO está diretamente envolvido na via do estresse oxidativo e sua avaliação pode prever alterações em vias metabólicas e problemas na adesão celular, mas estudos futuros ainda são necessários para explorar seu papel na citotoxicidade induzida por nanopartículas de ferro.

Além disso, nosso estudo aponta que os danos causados pelo aumento do estresse oxidativo possivelmente levaram os fibroblastos a um processo de senescência, pois foi possível detectar uma redução na formação de colônias no período de sete dias, o que sugere uma redução na atividade do metabolismo das células em um período mais longo após exposição (Fig. 16 e 17). O aumento do estresse oxidativo via Fenton e o desequilíbrio no sistema de proteção celular, mediado pela Superóxido Dismutase (SOD) e Catalases (CAT), podem ativar a via ATM/ATR-P53 que induz dano direto ao DNA, resultando em morte celular (necrose/apoptose) ou senescência (KEHRER 2000; LINKERMANN et al., 2014). Em particular, o mecanismo de senescência é visto após dano crônico ao DNA, resistência à apoptose ou estresse do retículo endoplasmático, mas esse mecanismo também envolve a quebra do mecanismo de reparo do DNA celular e, devido a isso, o processo de proliferação celular começa a diminuir com o tempo (SFERA et al., 2018; YARJANLI et al., 2017; HERNANDEZ-SEGURA et al., 2018). Berry et al (2004) e Soenen et al (2009) descreveram que magnetolipossomos com núcleos de óxido de ferro podem afetar a formação de complexos de adesão focal e prejudicar a proliferação celular a longo prazo em fibroblastos 3T3, e que o estresse oxidativo mediado por *SPIONs* pode estar relacionado à ruptura de uma proteína do citoesqueleto (tubulina) em fibroblastos humanos hTERT-BJ1, afetando assim a reprodutibilidade celular. Além disso, o estudo de Prijic et al. (2010) corrobora com nossos achados, pois observaram que a exposição com 200 µg/mL de *SPIONs* no período de 72 horas, podem reduzir a reprodutibilidade dos fibroblastos L929 após oito dias de exposição.

Diferentemente do processo de senescência, alguns autores apontam que o aumento do estresse oxidativo e o desequilíbrio na regulação redox podem desencadear mecanismos celulares relacionados à morte celular por apoptose (BASUROY et al., 2011). A apoptose é caracterizada por uma série de eventos celulares como alterações no citoesqueleto que causam contração celular,

fragmentação do DNA, condensação da cromatina e formação de vesículas sem que ocorra perda da integridade da membrana plasmática. Outra característica importante geralmente é a não ativação da resposta inflamatória, uma vez que as células em processo apoptótico não liberam seus constituintes celulares para o meio extracelular ou, caso isso ocorra, são rapidamente fagocitadas, evitando necrose e de maneira imunologicamente silenciosa (KUROSAKA et al., 2003; ELMORE 2007; SZONDY et al., 2017). A produção de IL-6 e TNF está associada à estimulação da resposta inflamatória (SCHELLER et al., 2011). Além do mais TNF é uma citocina que está envolvida nos mecanismos de ativação de processos apoptóticos (RATH e AGGARWAL, 1999). Em nossos resultados, não encontramos produção significativa de citocinas pró-inflamatórias, como TNF e IL-6 (Fig. 14) e não houve aumento significativo de células em apoptose em relação ao controle negativo (Fig. 15). Sendo assim, o aumento na produção de ROS e NO na maior concentração analisada (250 µg/mL) não pode ser atribuída à toxicidade que causa inviabilidade celular, e assim podemos sugerir que não houve alterações suficientes para uma análise apoptótica significativa. Os resultados não significativos de apoptose estão relacionados ao que foi observado no ensaio MTT.

Nenhuma das concentrações testadas apresentou citotoxicidade significativa quando avaliada pelo ensaio MTT, independente do tempo e das concentrações testadas (Fig. 9). Estudos em diferentes linhagens celulares também não encontraram citotoxicidade de nanopartículas de óxido de ferro frente a fibroblastos dérmicos, fibroblastos de camundongo L929 e fibroblastos humanos HDF (AUFFAN et al., 2006; PRIJIC et al., 2010; ALILI et al., 2015). No estudo de Keshtkar et al. (2018), fibroblastos da linhagem HFFF-PI6 foram expostos por 12 e 24 horas nas concentrações de 10, 50, 100, 200, 300 e 400 µg/mL de NP Fe₃O₄. Observou-se que apenas as concentrações de 300 e 400 µg/mL foram citotóxicas para os fibroblastos. Este estudo corrobora nossos dados, onde concentrações próximas às utilizadas também demonstraram viabilidade celular. Sabe-se que o ferro participa do metabolismo celular como nutriente que, assim como os fosfolipídios, pode estimular o crescimento e a proliferação celular. Além disso, a deficiência de ferro pode até afetar algumas proteínas como *CDKS* (Cyclin-Dependent Kinases - Quinases Dependentes de Ciclinas) e ciclinas, e assim prejudicar o ciclo celular (GUPTA e CURTIS 2004a; MAHMOUDI et al., 2009; MAO et al., 2013; GHASEMPOUR et al., 2015). Cabe ressaltar que a toxicidade das nanopartículas está relacionada à dose e

ao tempo e qualquer concentração pode ser tóxica, dependendo do tipo de célula e da nanopartícula analisada (KESHTKAR et al., 2018).

Frente ao organismo *in vivo*, a formação do efeito corona através da interação proteica pode alterar a superfície da nanopartícula modificando assim sua interação com as células, o que pode causar uma distribuição não direcionada de nanopartículas, resultando em respostas imunes (PARK 2020). Stepien e colaboradores (2018) demonstram que a proteína corona, também está relacionada com a biodegradação a longo prazo da nanopartícula de óxido de ferro *in vivo*. Uma vez que esta permanece por mais tempo no organismo, mais danos podem ser gerados.

Em estudos *in vivo*, os órgãos mais atingidos frente à exposição e acúmulo por NPs de óxido de ferro, são o fígado, baço e rins, seguido por coração, pulmão e cérebro (PANDEY e PRAJAPATI 2017; PATIL et al., 2018). Nas análises histopatológicas dos órgãos dos animais expostos à NP Fe₃O₄, foi observado alteração tecidual e processo inflamatório em todos os órgãos analisados, com exceção apenas do baço dos animais expostos à 100 mg/Kg da NP (Fig. 25; 26; 27; 28 e 29).

O processo inflamatório nos diferentes órgãos vai de encontro aos dados encontrados durante análise leucocitária. Foi observado aumento de neutrófilos no sangue de forma significativa, no grupo exposto a 50 mg/kg e 100 mg/kg. Além de aumento significativo de eosinófilos para o grupo exposto a 100 mg/kg (Fig. 21). No LCP, houve aumento significativo de eosinófilos somente no grupo exposto a 25 mg/kg. O aumento de leucócitos demonstra a ativação do sistema imune dos camundongos perante a exposição à nanopartícula. O estudo de Silva et al. (2016), analisou o perfil hematológico de camundongos (Swiss) expostos a SPIONs recobertas com PEG (polietilenoglicol). Os animais receberam uma dose única de nanopartículas via intravenosa (12,5; 25 e 50 mg/kg) e foram eutanasiados no 14º dia pós exposição. Os resultados também indicaram alteração, sobretudo aumento de basófilos nos grupos expostos a 12,5 e 50 mg/kg e apesar das transaminases TGO e TGP não estarem alteradas, danos histológicos no fígado foram demonstrados, além de alterações no pulmão e rins dos camundongos. O aumento de leucócitos demonstra a ativação do sistema imune frente a exposição de NP Fe₃O₄, mesmo numa exposição de única dose. Em nosso estudo a exposição provavelmente provocou um acúmulo de nanopartículas nos órgãos, os leucócitos

circulantes foram ativados, porém o excesso de ferro no organismo acabou sobrecarregando os órgãos, gerando danos aos tecidos. Resultado semelhante ao encontrado por Comanescu e colaboradores (2015), onde camundongos (C57BL-6) foram expostos a dose única de 2,5 mg/kg de NPs de óxido de ferro revestidos por L-DOPA (L-3,4-dihidroxifenilalanina) também de forma intraperitoneal, e os resultados indicaram que a administração intraperitoneal de NPs induziu inflamação local e consequente aumento no recrutamento de linfócitos no peritônio e em outros órgãos onde as NPs se acumulam.

Nossos resultados também demonstraram aumento de citocinas, tanto no plasma quanto no LCP (Fig. 31) dos animais expostos a NP Fe₃O₄. Foi observado que o grupo exposto a 50 mg/Kg da NP Fe₃O₄ exibiu produção significativa para as citocinas TNF e IL-10 (plasma) e INF- γ (LCP). A citocina IL-10, no plasma, também está aumentada para o grupo exposto a 10 mg/kg da NP Fe₃O₄. Essas citocinas estão relacionadas ao metabolismo do ferro, uma vez que TNF e INF- γ , induzem a fagocitose de ferro pelos macrófagos e IL-10 é responsável pelo aumento de expressão de ferritina, proteína de reserva de ferro no organismo (GROTTO 2008). E embora não significativo, o aumento de IL-6 no grupo exposto a 50 mg/Kg da NP Fe₃O₄, pode indicar o aumento de hepcidina no fígado (RIVERA et al., 2005), sugerindo a tentativa de regulação de ferro nos camundongos, perante seu excesso.

O aumento de citocinas encontra-se também em conjunto aos achados da histologia, onde processos inflamatórios puderam ser observados e com os dados de aumento de leucócitos através de análise celular. Uma vez que, citocinas como TNF e INF- γ são importantes mediadoras da resposta inflamatória, pois recrutam leucócitos para o sítio inflamatório. Sugere-se que esse aumento decorre de processos oxidativos que o acúmulo de NP Fe₃O₄ promoveu. Por exemplo, quando macrófagos fagocitam as nanopartículas, citocinas pro inflamatórias como TNF, INF- γ e IL-6 são produzidas (DOBROVOLSKAIA e MCNEIL 2010; PARK et al., 2010), desencadeando uma toxicidade local e sistêmica. A produção de citocinas também pode estar relacionada ao número de doses em que os animais são experimentalmente expostos e a composição química da nanopartícula, uma vez que no trabalho de Silva et al. (2016), que também utilizaram uma concentração de 50 mg/kg de SPIONs, porém em dose única, não foram encontrados produção de citocinas, no caso IL-6 e TNF.

Além do mais, houve alterações significativas no peso do baço dos animais expostos a 100 mg/kg da NP Fe₃O₄ (Fig. 23), indicando um processo inicial de esplenomegalia. Não foi encontrado aumento do peso do fígado, mas foi analisado possíveis alterações hepáticas através dos níveis das transaminases TGO e TGP e houve aumento significativo de TGO (Fig. 30) para os grupos expostos a 50 e 25 mg/Kg da NP Fe₃O₄, reforçando junto aos achados da histologia o comprometimento dos hepatócitos e conseqüentemente, do fígado. As transaminases hepáticas também foram analisadas nos estudos *in vivo* de Salimi et al. (2018) e Aboushoushah et al. (2021). No estudo de Salimi os animais foram expostos a dose única de 100; 50 e 25 mg/kg e a eutanásia, logo após 24h de injeção intraperitoneal. No trabalho de Aboushoushah, foram realizados 3 grupos experimentais expostos a 5 mg/kg de óxido de ferro revestido com curcumina, administrado intraperitonealmente, totalizando 6 doses. A eutanásia ocorreu nos tempos de 3 ou 10 dias de acordo com o grupo. Não foram encontradas quaisquer alterações para TGO e TGP em ambos estudos. Em nosso estudo, podemos observar que as concentrações de 50 e 25 mg/kg da NP Fe₃O₄, sendo exposta em doses repetidas e com maior período experimental podem contribuir para o aumento de enzimas hepáticas.

A literatura aponta o fígado com predominância no acúmulo de ferro, corroborando com o nosso achado, onde foi observado acúmulo de NP Fe₃O₄ no tecido hepático dos animais (Fig. 24). O estudo de Homayoun; Pishkar e Mojtaba (2017), demonstraram que a exposição por uma semana, com concentrações acima de 10 mg/kg de nanopartículas de Fe₂O₃, causaram danos no fígado e rins de ratos Wistar. Danos hepáticos também foram observados por Xiang e colaboradores (2019) onde a nanopartícula de ferro estava acumulada principalmente no fígado, seguido de baço, após dose única de apenas 20 mg/Kg de NP Fe₃O₄ em camundongos BALB/c, após 5h, 3 dias e 14 dias. O estudo de De Souza et al. (2022), revela o acúmulo de SPIONs no lúmen de vasos do fígado, túbulos renais e glomérulos e no interior do citoplasma de células mononucleares, além de infiltração de células mononucleares e aumento de espaços intersticiais nos tecidos hepáticos e renais, corroborando com nossos dados histológicos.

O panorama mostrado durante análise do experimento *in vitro* aliado aos resultados encontrados mediante análise sistêmica do organismo, nos mostram a importância dos estudos nanotoxicológicos e o quanto esse entendimento pode

auxiliar a elucidar os processos envolvidos durante a exposição às nanopartículas.

A partir da análise *in vitro*, observou-se aumento de estresse oxidativo (EROS e NO) quando exposto em 24 horas, mas que não foi capaz de gerar um aumento significativo de células apoptóticas. E apesar das alterações morfológicas, internalização celular das nanopartículas e estresse oxidativo, não houve redução na viabilidade celular pelo ensaio MTT. Os efeitos citotóxicos foram encontrados somente quando analisamos o potencial clonogênico dos fibroblastos LA-9 no 7º dia após a exposição a NP Fe₃O₄. Dessa forma, como o ensaio clonogênico avalia um intervalo de tempo maior em relação ao ensaio de viabilidade (MTT), o acúmulo de nanopartículas internalizadas pelos fibroblastos e o consequente aumento do estresse oxidativo podem causar efeitos citotóxicos significativos que interferem no seu potencial reprodutivo e consequente formação de colônias.

Ao passo que, no estudo *in vivo* embora os animais não apresentassem sinais indicativos de toxicidade (Fig. 18 e 19), a exposição a NP Fe₃O₄ desencadeou processos inflamatórios e ativação do sistema imune dos camundongos, mediante aumento de leucócitos, citocinas e transaminases hepáticas e danos no coração, pulmão, fígado, baço e rins dos animais. Sugere-se que o organismo dos camundongos frente ao excesso de ferro e seu potencial de aglomeração, não pôde realizar a homeostase de forma funcional, resultando nos danos demonstrados. Um dos resultados de todo esse desequilíbrio, em humanos, é que o acúmulo de ferro e o estresse oxidativo podem ter papel crítico em doenças como Alzheimer e Parkinson, uma vez que são capazes de interagir com proteínas (A β e α -sinucleína) relacionadas a essas doenças (YARJANLI et al., 2017).

8. HIPÓTESES

▪ *In vitro*

Houve internalização de NP Fe₃O₄ para todas as concentrações testadas *in vitro* (50, 100 e 250 µg/mL) de forma tempo/dependente. Além de produção de NO para todas as concentrações testadas (250; 100 e 50 µg/mL). Porém o aumento de EROs ocorreu somente para a concentração de 250 µg/mL. Além do mais, sugere-se que essa mesma concentração, levou os fibroblastos (LA-9) a um possível processo de senescência, devido ao baixo metabolismo celular e consequente redução na formação de colônias no período de sete dias. Estudos complementares como, avaliação da expressão de catalases e enzimas antioxidantes podem auxiliar no entendimento desse estudo.

▪ *In vivo*

Todas as concentrações testadas durante experimentação *in vivo* (10, 25, 50 e 100 mg/kg NP Fe₃O₄) promoveram danos aos órgãos dos camundongos (coração, pulmão, fígado, baço e rins), dessa forma, apresentaram toxicidade sistêmica. Porém, diante dos resultados, o grupo experimental exposto a concentração de 50 mg/kg, parece ser o que apresenta maior toxicidade *in vivo*, mostrando aumento de neutrófilos no sangue, produção aumentada de TGO e aumento na produção de citocinas.

9. CONCLUSÕES

A NP Fe₃O₄ possui formato esférico, com distribuição das partículas de forma heterogênea e compactada. Em contato com Salina (NaCl 0,9%) e DMEM sofre alteração de seu tamanho e pode ser considerada uma nanopartícula instável pela consequente formação de aglomerados. Quanto aos experimentos *in vitro* utilizando a linhagem LA-9 de fibroblastos, a internalização da nanopartícula ocorreu de forma tempo/dependente. Observou-se a produção de EROS, NO e danos morfológicos, além de um possível processo de senescência celular. Para os experimentos *in vivo*, a NP Fe₃O₄ demonstrou toxicidade sistêmica para os camundongos da linhagem BALB/c. Houve danos histológicos, sobretudo para o fígado, além de ativação do sistema imune mediante produção de leucócitos e citocinas pró-inflamatórias.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUSHOUSHAH, Samia et al. Toxicity and biodistribution assessment of curcumin-coated iron oxide nanoparticles: Multidose administration. **Life Sciences**, v. 277, p. 119625, 2021.
- AGHAZADEH, Mustafa; KARIMZADEH, Isa; GANJALI, Mohammad Reza. Ethylenediaminetetraacetic acid capped superparamagnetic iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles: A novel preparation method and characterization. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 439, p. 312-319, 2017.
- AGHAZADEH, Mustafa et al. A novel preparation method for surface coated superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles with vitamin C and sucrose. **Materials Letters**, v. 196, p. 392-395, 2017.
- ALILI, Lirija et al. Effect of Fe₃O₄ nanoparticles on skin tumor cells and dermal fibroblasts. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.
- ALPHANDÉRY, Edouard. Iron oxide nanoparticles for therapeutic applications. **Drug discovery today**, v. 25, n. 1, p. 141-149, 2020.
- ANH, Nguyen Ha et al. Gold nanoparticle-based optical nanosensors for food and health safety monitoring: recent advances and future perspectives. **RSC advances**, v. 12, n. 18, p. 10950-10988, 2022.
- ANVISA**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos, de 31 de janeiro de 2013. Disponível em: < portal.anvisa.gov.br > pesquisa-clinica > manuais > Acessado em: 08 set. 2022.
- ANZAI, Yoshimi et al. Evaluation of neck and body metastases to nodes with ferumoxtran 10-enhanced MR imaging: phase III safety and efficacy study. **Radiology**, v. 228, n. 3, p. 777-788, 2003.
- AUFFAN, Melanie et al. In vitro interactions between DMSA-coated maghemite nanoparticles and human fibroblasts: a physicochemical and cyto-genotoxic study. **Environmental science & technology**, v. 40, n. 14, p. 4367-4373, 2006.
- AZQUETA, Amaya; DUSINSKA, Maria. The use of the comet assay for the evaluation of the genotoxicity of nanomaterials. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 239, 2015.
- BAI, Xue et al. In vivo Protein Corona Formation: Characterizations, Effects on Engineered Nanoparticles' Biobehaviors, and Applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 646708, 2021.
- BALK, Matthias et al. Cellular SPION uptake and toxicity in various head and neck cancer cell lines. **Nanomaterials**, v. 11, n. 3, p. 726, 2021.
- BASUROY, Shyamali et al. Nox4 NADPH oxidase-derived reactive oxygen species, via endogenous carbon monoxide, promote survival of brain endothelial cells during TNF- α -induced apoptosis. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 300, n. 2, p. C256-C265, 2011.
- BAYDA, Samer et al. The history of nanoscience and nanotechnology: from chemical-physical applications to nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 112, 2019.

BERRY, Catherine C. et al. The influence of transferrin stabilised magnetic nanoparticles on human dermal fibroblasts in culture. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, n. 1, p. 211-225, 2004.

BIRBEN, Esra et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World allergy organization journal**, v. 5, n. 1, p. 9-19, 2012.

BONADIO, Raphael S. et al. Exposure to maghemite nanoparticles induces epigenetic alterations in human submandibular gland cells. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 20, n. 3, p. 1454-1462, 2020.

BRAGUER, D. et al. Minimal analytical characterization of engineered nanomaterials needed for hazard assessment in biological matrices. **Nanotoxicology**, v. 5, n. 1, p. 11 Brouwer, 2011.

BREGEN, Nikolaus; ECKL, Peter M. Oxidative stress and the homeodynamics of iron metabolism. **Biomolecules**, v. 5, n. 2, p. 808-847, 2015.

BROHI, Rahim Dad et al. Toxicity of nanoparticles on the reproductive system in animal models: a review. **Frontiers in pharmacology**, v. 8, p. 606, 2017.

BRUNNER, Tobias J. et al. In vitro cytotoxicity of oxide nanoparticles: comparison to asbestos, silica, and the effect of particle solubility. **Environmental science & technology**, v. 40, n. 14, p. 4374-4381, 2006.

BURELLO, Enrico. Review of (Q) SAR models for regulatory assessment of nanomaterials risks. **NanoImpact**, v. 8, p. 48-58, 2017.

BUZEA, Cristina; PACHECO, Ivan. Toxicity of nanoparticles. In: **Nanotechnology in Eco-efficient Construction**. Woodhead Publishing, 2019. p. 705-754.

BUZEA, Cristina; PACHECO, Ivan I.; ROBBIE, Kevin. Nanomaterials and nanoparticles: sources and toxicity. **Biointerphases**, v. 2, n. 4, p. MR17-MR71, 2007.

CAI, Rong; CHEN, Chunying. The crown and the scepter: roles of the protein corona in nanomedicine. **Advanced Materials**, v. 31, n. 45, p. 1805740, 2019.

CALATAYUD, M. Pilar et al. The effect of surface charge of functionalized Fe₃O₄ nanoparticles on protein adsorption and cell uptake. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p. 6389-6399, 2014.

CAO, Yi; LI, Shuang; CHEN, Jiamao. Modeling better in vitro models for the prediction of nanoparticle toxicity: A review. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 31, n. 1, p. 1-17, 2021.

CAPLAN, P. C. Shalimar et al. Sulfonated polystyrene nanoparticles as oleic acid diethanolamide surfactant nanocarriers for enhanced oil recovery processes. **Polymers**, v. 11, n. 9, p. 1513, 2019.

CASALS, Eudald et al. Hardening of the nanoparticle–protein corona in metal (Au, Ag) and oxide (Fe₃O₄, CoO, and CeO₂) nanoparticles. **Small**, v. 7, n. 24, p. 3479-3486, 2011.

CHEE, Chin Fei; LEO, Bey Fen; LAI, Chin Wei. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery. In: **Applications of nanocomposite materials in drug delivery**. Woodhead Publishing, 2018. p. 861-903.

CLIFT, Martin JD et al. A comparative study of different in vitro lung cell culture systems to assess the most beneficial tool for screening the potential adverse effects of carbon nanotubes. **Toxicological sciences**, v. 137, n. 1, p. 55-64, 2014.

COMĂNESCU, Maria Victoria et al. Toxicity of L-DOPA coated iron oxide nanoparticles in intraperitoneal delivery setting—Preliminary preclinical study. **Rom J Morphol Embryol**, v. 56, n. 2 Suppl, p. 691-696, 2015.

COTIN, G. et al. Iron oxide nanoparticles for biomedical applications: Synthesis, functionalization, and application. In: **Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications**. Elsevier, p. 43-88, 2018.

DADFAR, Seyed Mohammadali et al. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 138, p. 302-325, 2019.

DANG, Yu; GUAN, Jianjun. Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. **Smart Materials in Medicine**, v. 1, p. 10-19, 2020.

DE JESUS, Marcelo Bispo; KAPILA, Yvonne L. Cellular mechanisms in nanomaterial internalization, intracellular trafficking, and toxicity. In: **Nanotoxicology**. Springer, New York, NY, p. 201-227, 2014.

DE SOUZA, Maria de Fátima Santos et al. Acute Toxicological and Biodistribution Aspects of Superparamagnetic Magnetite Nanoparticles In Vitro and on Animal Tissues. **BioNanoScience**, v. 12, n. 1, p. 49-61, 2022.

DING, Lin et al. Size, shape, and protein corona determine cellular uptake and removal mechanisms of gold nanoparticles. **Small**, v. 14, n. 42, p. 1801451, 2018.

DIVANDARI, Hassan et al. Integrating synthesized citric acid-coated magnetite nanoparticles with magnetic fields for enhanced oil recovery: Experimental study and mechanistic understanding. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 174, p. 425-436, 2019.

DOBROVOLSKAIA, Marina A.; MCNEIL, Scott E. Immunological properties of engineered nanomaterials. **Nanoscience And Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals**, p. 278-287, 2010.

DOKTOROVOVA, Slavomira et al. Comet assay reveals no genotoxicity risk of cationic solid lipid nanoparticles. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 4, p. 395-403, 2014.

DRENO, Brigitte et al. Safety of titanium dioxide nanoparticles in cosmetics. **Journal of the European academy of dermatology and venereology**, v. 33, p. 34-46, 2019.

DULIŃSKA-LITEWKA, Joanna et al. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles Current and prospective medical applications. **Materials**, v. 12, n. 4, p. 617, 2019.

EBADI, Mona et al. Drug delivery system based on magnetic iron oxide nanoparticles coated with (polyvinyl alcohol-zinc/aluminium-layered double hydroxide-sorafenib). **Alexandria Engineering Journal**, v. 60, n. 1, p. 733-747, 2021.

EDISON, Eunice S.; BAJEL, Ashish; CHANDY, Mammen. Iron homeostasis: new players, newer insights. **European journal of haematology**, v. 81, n. 6, p. 411-424, 2008.

ELHALAWANI, Hesham et al. Data from a terminated study on iron oxide nanoparticle magnetic resonance imaging for head and neck tumors. **Scientific Data**, v. 7, n. 1, p. 1-7, 2020.

ELMORE, Susan. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicologic pathology**, v. 35, n. 4, p. 495-516, 2007.

FENG, Qiyi et al. Uptake, distribution, clearance, and toxicity of iron oxide nanoparticles with different sizes and coatings. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.

FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ, Natalia et al. Assessment of oxidative damage induced by iron oxide nanoparticles on different nervous system cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 845, p. 402989, 2019.

FERRAZ, Fausto S. et al. Biotechnological approach to induce human fibroblast apoptosis using superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 206, p. 111017, 2020.

FRANKEN, Nicolaas AP et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

GHASEMPOUR, Sariah et al. Investigating the cytotoxicity of iron oxide nanoparticles in in vivo and in vitro studies. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 67, n. 10, p. 509-515, 2015.

GHOLINEJAD, Zafar; ANSARI, Mohammad Hasan Khadem; RASMI, Yousef. Titanium dioxide nanoparticles induce endothelial cell apoptosis via cell membrane oxidative damage and p38, PI3K/Akt, NF- κ B signaling pathways modulation. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 54, p. 27-35, 2019.

GONÇALO M. A. et al. Magnetic, fluorescent and hybrid nanoparticles: From synthesis to application in biosystems. **Materials Science and Engineering: C**, v. 106, p. 110104, 2020.

GREEN, Laura C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GROTTO, Helena ZW. Iron metabolism: an overview on the main mechanisms involved in its homeostasis. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 30, p. 390-397, 2008.

GU, Jing Li et al. The internalization pathway, metabolic fate and biological effect of superparamagnetic iron oxide nanoparticles in the macrophage-like RAW264. 7 cell. **Science China Life Sciences**, v. 54, n. 9, p. 793-805, 2011.

GUAN, Zhenru et al. Green synthesis of nanoparticles: Current developments and limitations. **Environmental Technology & Innovation**, p. 102336, 2022.

GUBIN, Sergei P. et al. Magnetic nanoparticles: preparation, structure and properties. **Russian Chemical Reviews**, v. 74, n. 6, p. 489, 2005.

GUPTA, Ajay Kumar; CURTIS, Adam SG. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. **Biomaterials**, v. 25, n. 15, p. 3029-3040, 2004a.

GUPTA, Ajay Kumar; CURTIS, Adam SG. Surface modified superparamagnetic nanoparticles for drug delivery: interaction studies with human fibroblasts in culture. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 15, n. 4, p. 493-496, 2004b.

HAMBURG, Margaret A. FDA's approach to regulation of products of nanotechnology. **Science**, v. 336, n. 6079, p. 299-300, 2012.

HAMEED, Awais et al. Scope of nanotechnology in cosmetics: dermatology and skin care products. **J. Med. Chem. Sci**, v. 2, n. 1, p. 1-40, 2019.

HASHEMI-KIASARI, Hani et al. Effect of operational parameters on SAGD performance in a dip heterogeneous fractured reservoir. **Fuel**, v. 122, p. 82-93, 2014.

HASSANI, Sedigheh Sadegh; DARAEE, Maryam; SOBAT, Zahra. Advanced development in upstream of petroleum industry using nanotechnology. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 28, n. 6, p. 1483-1491, 2020.

HERNANDEZ-SEGURA, Alejandra; NEHME, Jamil; DEMARIA, Marco. Hallmarks of cellular senescence. **Trends in cell biology**, v. 28, n. 6, p. 436-453, 2018.

HOBSON, David W. et al. Applied nanotoxicology. **International journal of toxicology**, v. 35, n. 1, p. 5-16, 2016.

HOMAYOUN, Sanaz; PISHKAR, Leila; MOJTABA, Falahati. The study of the expression of Bax and Bcl-2 genes in the liver and kidneys of rats after chronic administration of different doses of iron oxide nanoparticles. 2017.

HUPFFER, Haide Maria; LAZZARETTI, Luisa Laueremann. Nanotecnologia e sua regulamentação no Brasil. **Revista Gestão e Desenvolvimento**, v. 16, n. 3, p. 153-177, 2019.

HUSSEIN-AL-ALI, Samer Hasan et al. Chlorambucil-iron oxide nanoparticles as a drug delivery system for leukemia cancer cells. **International journal of nanomedicine**, v. 16, p. 6205, 2021.

I RIVERA-SOLORIO, Carlos et al. Formulation techniques for nanofluids. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 7, n. 3, p. 208-215, 2013.

ISLAM, Tariqul; PENG, Changsheng. Synthesis of carbon embedded silica and zeolite from rice husk to remove trace element from aqueous solutions: characterization, optimization and equilibrium studies. **Separation Science and Technology**, v. 55, n. 16, p. 2890-2903, 2020.

JALIL, W. B. F. et al. Low toxicity superparamagnetic magnetite nanoparticles: One-pot facile green synthesis for biological applications. **Materials Science and Engineering: C**, v. 78, p. 457-466, 2017.

KADIK, A. A. et al. Solubility of hydrogen and carbon in reduced magmas of the early Earth's mantle. **Geochemistry International**, v. 44, n. 1, p. 33-47, 2006.

KANDASAMY, Ganeshlenin et al. Functionalized hydrophilic superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic fluid hyperthermia application in liver cancer treatment. **ACS omega**, v. 3, n. 4, p. 3991-4005, 2018.

KARIMZADEH, Isa et al. Superparamagnetic Iron Oxide (Fe₃O₄) Nanoparticles Coated with PEG/PEI for Biomedical Applications: A Facile and Scalable Preparation Route Based on the Cathodic Electrochemical Deposition Method. **Advances in Physical Chemistry**, 2017.

KAUSHIK, Swati et al. In situ biosynthesized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONS) induce efficient hyperthermia in cancer cells. **ACS Applied Bio Materials**, v. 3, n. 2, p. 779-788, 2020.

KEHRER, James P. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. **Toxicology**, v. 149, n. 1, p. 43-50, 2000.

KESHTKAR, M. et al. Synthesis and cytotoxicity assessment of gold-coated magnetic iron oxide nanoparticles. **Journal of biomedical physics & engineering**, v. 8, n. 4, p. 357, 2018.

KHAN, Salman et al. A review on nanotechnology: Properties, applications, and mechanistic insights of cellular uptake mechanisms. **Journal of Molecular Liquids**, p. 118008, 2021.

KÖERICH, Jéssica Schweitzer et al. Toxicity of binary mixtures of Al₂O₃ and ZnO nanoparticles toward fibroblast and bronchial epithelium cells. **Journal of toxicology and environmental health, part A**, v. 83, n. 9, p. 363-377, 2020.

KUMAR, Ashutosh et al. Cellular uptake and mutagenic potential of metal oxide nanoparticles in bacterial cells. **Chemosphere**, v. 83, n. 8, p. 1124-1132, 2011.

KUMAR, Rupesh et al. Role of nanotechnology in biomedical applications: an updated review. **UPI Journal of Pharmaceutical, Medical and Health Sciences**, p. 39-43, 2022.

KUROSAKA, Kahori et al. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 171, n. 9, p. 4672-4679, 2003.

KUSUMOPUTRO, Sydney et al. Potential nanoparticle applications for prevention, diagnosis, and treatment of COVID-19. **View**, v. 1, n. 4, p. 20200105, 2020.

LEE, Loong Chuen; LIONG, Choong-Yeun; JEMAIN, Abdul Aziz. A contemporary review on Data Preprocessing (DP) practice strategy in ATR-FTIR spectrum. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 163, p. 64-75, 2017.

LI, Lei et al. Toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles: research strategies and implications for nanomedicine. **Chinese Physics B**, v. 22, n. 12, p. 127503, 2013.

LI, Yue et al. Nanoparticle-based sensors for food contaminants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p. 74-83, 2019.

LINKERMANN, Andreas et al. Regulated cell death and inflammation: an auto-amplification loop causes organ failure. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 11, p. 759-767, 2014.

LIU, Na; TANG, Meng; DING, Jiandong. The interaction between nanoparticles-protein corona complex and cells and its toxic effect on cells. **Chemosphere**, v. 245, p. 125624, 2020.

LIU, Yaping et al. Toxicity of manufactured nanomaterials. **Particuology**, v. 69, p. 31-48, 2022.

LIU, Zhengang; ZHANG, Fu-Shen; SASAI, Ryo. Arsenate removal from water using Fe₃O₄-loaded activated carbon prepared from waste biomass. **Chemical Engineering Journal**, v. 160, n. 1, p. 57-62, 2010.

LÓPEZ, Yeisy C.; ANTUCH, Manuel. Morphology control in the plant-mediated synthesis of magnetite nanoparticles. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 24, p. 32-37, 2020.

MA, Ming et al. Size dependence of specific power absorption of Fe₃O₄ particles in AC magnetic field. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 268, n. 1-2, p. 33-39, 2004.

MA, Ping et al. Intraperitoneal injection of magnetic Fe₃O₄-nanoparticle induces hepatic and renal tissue injury via oxidative stress in mice. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 4809, 2012.

MAHMOUDI, Morteza et al. Cytotoxicity and cell cycle effects of bare and poly (vinyl alcohol)-coated iron oxide nanoparticles in mouse fibroblasts. **Advanced Engineering Materials**, v. 11, n. 12, p. B243-B250, 2009.

MAHMOUDI, Morteza et al. Assessing the in vitro and in vivo toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Chemical reviews**, v. 112, n. 4, p. 2323-2338, 2012.

MAIORANO, Gabriele et al. Effects of cell culture media on the dynamic formation of protein– nanoparticle complexes and influence on the cellular response. **ACS nano**, v. 4, n. 12, p. 7481-7491, 2010.

MANICKAM, Vijayprakash et al. Recurrent exposure to ferric oxide nanoparticles alters myocardial oxidative stress, apoptosis and necrotic markers in male mice. **Chemico-biological interactions**, v. 278, p. 54-64, 2017.

MAO, Hong Ying et al. Graphene: promises, facts, opportunities, and challenges in nanomedicine. **Chemical reviews**, v. 113, n. 5, p. 3407-3424, 2013.

MASOUDI, Afshin et al. The effect of poly (ethylene glycol) coating on colloidal stability of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agent. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 433, n. 1-2, p. 129-141, 2012.

MAURIZI, Lionel et al. Toxicological risk assessment of emerging nanomaterials: cytotoxicity, cellular uptake, effects on biogenesis and cell organelle activity, acute toxicity and biodistribution of oxide nanoparticles. 2018.

MAZARI, Shaukat Ali et al. Nanomaterials: Applications, waste-handling, environmental toxicities, and future challenges—A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 2, p. 105028, 2021.

MEDEIROS, Simone F. et al. Synthesis and characterization of stable aqueous dispersion of functionalized double-coated iron oxide nanoparticles. **Materials Letters**, v. 160, p. 522-525, 2015.

MIELOCH, Adam Aron et al. Bioevaluation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) functionalized with dihexadecyl phosphate (DHP). **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 1-11, 2020.

MIRI, Abdolhossein; KHATAMI, Mehrdad; SARANI, Mina. Biosynthesis, magnetic and cytotoxic studies of hematite nanoparticles. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 30, n. 3, p. 767-774, 2020.

MOHAJERANI, Abbas et al. Nanoparticles in construction materials and other applications, and implications of nanoparticle use. **Materials**, v. 12, n. 19, p. 3052, 2019.

MOHAMED, Omnia A. et al. Toxicological impact of nanoparticles on human health: A review. 2022.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MOURDIKOUDIS, Stefanos; PALLARES, Roger M.; THANH, Nguyen TK. Characterization techniques for nanoparticles: comparison and complementarity upon studying nanoparticle properties. **Nanoscale**, v. 10, n. 27, p. 12871-12934, 2018.

MULENS-ARIAS, Vladimir; ROJAS, José Manuel; BARBER, Domingo F. The intrinsic biological identities of iron oxide nanoparticles and their coatings: Unexplored territory for combinatorial therapies. **Nanomaterials**, v. 10, n. 5, p. 837, 2020.

MÜLLER, Laura K. et al. The transferability from animal models to humans: challenges regarding aggregation and protein corona formation of nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 19, n. 2, p. 374-385, 2018.

MUSIELAK, Marika; PIOTROWSKI, Igor; SUCHORSKA, Wiktoria M. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) as a multifunctional tool in various cancer therapies. **Reports of Practical Oncology and Radiotherapy**, v. 24, n. 4, p. 307-314, 2019.

NADIMI, M. et al. Photodegradation of methylene blue by a ternary magnetic TiO₂/Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposite under visible light. **Materials Chemistry and Physics**, v. 225, p. 464-474, 2019.

NAKAMURA, Toshitaka; NAGURO, Isao; ICHIJO, Hidenori. Iron homeostasis and iron-regulated ROS in cell death, senescence and human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 1863, n. 9, p. 1398-1409, 2019.

NAQVI, Saba et al. Concentration-dependent toxicity of iron oxide nanoparticles mediated by increased oxidative stress. **International journal of nanomedicine**, v. 5, p. 983, 2010.

NASEER, Khulla; ALI, Salmann; QAZI, Javaria. ATR-FTIR spectroscopy as the future of diagnostics: a systematic review of the approach using bio-fluids. **Applied Spectroscopy Reviews**, v. 56, n. 2, p. 85-97, 2021.

NATARAJAN, Subramanian et al. Multifunctional magnetic iron oxide nanoparticles: Diverse synthetic approaches, surface modifications, cytotoxicity towards biomedical and industrial applications. **BMC Materials**, v. 1, n. 1, p. 1-22, 2019.

National Nanotechnology Initiative - NNI. (2022). About Nanotechnology. Disponível em: <<https://www.nano.gov/about-nanotechnology>>. Acesso em 23 jun. 2022.

NEL, Andre et al. Toxic potential of materials at the nanolevel. **science**, v. 311, n. 5761, p. 622-627, 2006.

NI, Shibing et al. Hydrothermal synthesis of Fe₃O₄ nanoparticles and its application in lithium-ion battery. **Materials Letters**, v. 63, n. 30, p. 2701-2703, 2009.

NICULESCU, Adelina-Gabriela; CHIRCOV, Cristina; GRUMEZESCU, Alexandru Mihai. Magnetite nanoparticles: Synthesis methods—A comparative review. **Methods**, 2021.

NOQTA, Osama Abu et al. Recent advances in iron oxide nanoparticles (IONPs): synthesis and surface modification for biomedical applications. **Journal of Superconductivity and Novel Magnetism**, v. 32, n. 4, p. 779-795, 2019.

NURDIN, Irwan et al. The effect of temperature on synthesis and stability of superparamagnetic maghemite nanoparticles suspension. **Journal of Materials Science and Chemical Engineering**, v. 4, n. 03, p. 35, 2016.

OBERDÖRSTER, Günter. Nanotoxicology: in vitro—in vivo dosimetry. **Environmental health perspectives**, v. 120, n. 1, p. a13-a13, 2012.

OBERDÖRSTER, Günter et al. Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. **Particle and fibre toxicology**, v. 2, n. 1, p. 1-35, 2005.

OECD, (2008) Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. No. 425, OECD Publishing, Paris.

OECD, (2018). Evaluation of *in vitro* methods for human hazard assessment applied in the OECD Testing Programme for the Safety of Manufactured Nanomaterials - Series on the Safety of Manufactured Nanomaterials, No. 85, OECD Publishing, Paris.

PANDEY, Rajan Kumar; PRAJAPATI, Vijay Kumar. Molecular and immunological toxic effects of nanoparticles. **International journal of biological macromolecules**, v. 107, p. 1278-1293, 2018.

PARIVAR, Kazem et al. Evaluation of iron oxide nanoparticles toxicity on liver cells of BALB/c rats. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 18, n. 1, 2016.

PARK, Sung Jean. Protein–nanoparticle interaction: corona formation and conformational changes in proteins on nanoparticles. **International Journal of Nanomedicine**, v. 15, p. 5783, 2020.

PATIL, Rakesh M. et al. Comprehensive cytotoxicity studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 13, p. 63-72, 2018.

PEREIRA, Maria Luiza de O. et al. Fe₃O₄ nanoparticles as surfactant carriers for enhanced oil recovery and scale prevention. **ACS Applied Nano Materials**, v. 3, n. 6, p. 5762-5772, 2020.

PLIKUS, Maksim V. et al. Fibroblasts: Origins, definitions, and functions in health and disease. **Cell**, v. 184, n. 15, p. 3852-3872, 2021.

POKRAJAC, Lisa et al. Nanotechnology for a sustainable future: Addressing global challenges with the international network4sustainable nanotechnology. 2021.

PRIJIC, Sara et al. Increased cellular uptake of biocompatible superparamagnetic iron oxide nanoparticles into malignant cells by an external magnetic field. **The Journal of membrane biology**, v. 236, n. 1, p. 167-179, 2010.

RADAIC, Allan et al. Studying the interactions between nanoparticles and biological systems. **Química Nova**, v. 39, p. 1236-1244, 2016.

RADU, Mihaela et al. Magnetite nanoparticles induced adaptive mechanisms counteract cell death in human pulmonary fibroblasts. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 7, p. 1492-1502, 2015.

RAMYA, SI Srikrishna; MAHADEVAN, C. K. Preparation by a simple route and characterization of amorphous and crystalline Fe₂O₃ nanophases. **Materials Letters**, v. 89, p. 111-114, 2012.

RASMUSSEN, Kirsten et al. Physico-chemical properties of manufactured nanomaterials-Characterisation and relevant methods. An outlook based on the OECD Testing Programme. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 92, p. 8-28, 2018.

RASMUSSEN, Kirsten et al. Regulation and Legislation. In: **Adverse Effects of Engineered Nanomaterials**. Academic Press, 2017. p. 159-188.

- RATH, Pramod C.; AGGARWAL, Bharat B. TNF-induced signaling in apoptosis. **Journal of clinical immunology**, v. 19, n. 6, p. 350-364, 1999.
- REIMER, Peter; BALZER, Thomas. Ferucarbotran (Resovist): a new clinically approved RES-specific contrast agent for contrast-enhanced MRI of the liver: properties, clinical development, and applications. **European radiology**, v. 13, n. 6, p. 1266-1276, 2003.
- RESNIK, David B.; TINKLE, Sally S. Ethical issues in clinical trials involving nanomedicine. **Contemporary clinical trials**, v. 28, n. 4, p. 433-441, 2007.
- RICCARDI, C. dos S.; SANTOS, Marcio Luiz dos; GUASTALDI, Antonio Carlos. Engineered nanomaterials: nanotoxicology issues, nanosafety and regulatory affairs. **Cultura Acadêmica**, 2015.
- RICHTERING, Walter; ALBERG, Irina; ZENTEL, Rudolf. Nanoparticles in the biological context: surface morphology and protein corona formation. **Small**, v. 16, n. 39, p. 2002162, 2020.
- RITZ, Sandra et al. Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 4, p. 1311-1321, 2015.
- RIVERA, Seth et al. Hepcidin excess induces the sequestration of iron and exacerbates tumor-associated anemia. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1797-1802, 2005.
- ROSESTOLATO, Jônatas CS et al. Lipid nanostructures as surfactant carriers for enhanced oil recovery. **Fuel**, v. 239, p. 403-412, 2019.
- SAIF, Sadia; TAHIR, Arifa; CHEN, Yongsheng. Green synthesis of iron nanoparticles and their environmental applications and implications. **Nanomaterials**, v. 6, n. 11, p. 209, 2016.
- SAJID, Muhammad et al. Impact of nanoparticles on human and environment: review of toxicity factors, exposures, control strategies, and future prospects. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 6, p. 4122-4143, 2015.
- SALIMI, Marzieh et al. Biodistribution, pharmacokinetics, and toxicity of dendrimer-coated iron oxide nanoparticles in BALB/c mice. **International journal of nanomedicine**, v. 13, p. 1483, 2018.
- SALTZMAN, Bernard E. Colorimetric microdetermination of nitrogen dioxide in atmosphere. **Analytical Chemistry**, v. 26, n. 12, p. 1949-1955, 1954.
- SÁNCHEZ-LÓPEZ, Elena et al. Metal-based nanoparticles as antimicrobial agents: an overview. **Nanomaterials**, v. 10, n. 2, p. 292, 2020.
- SARMA, Sweety et al. Synthesis, characterization and application of PbS quantum dots. In: **AIP Conference Proceedings**. American Institute of Physics, 2009. p. 436-442.
- SENGUL, Ayse Busra; ASMATULU, Eylem. Toxicity of metal and metal oxide nanoparticles: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 18, n. 5, p. 1659-1683, 2020.
- SFERA, Adonis et al. Ferrosenescence: the iron age of neurodegeneration?. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 174, p. 63-75, 2018.
- SHARMA, Arati; MADHUNAPANTULA, SubbaRao V.; ROBERTSON, Gavin P. Toxicological considerations when creating nanoparticle-based drugs and drug delivery systems. **Expert opinion on drug metabolism & toxicology**, v. 8, n. 1, p. 47-69, 2012.

SHELLER, Jürgen et al. The pro-and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878-888, 2011.

SHEN, Zheyu; WU, Aiguo; CHEN, Xiaoyuan. Iron oxide nanoparticle based contrast agents for magnetic resonance imaging. **Molecular pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 1352-1364, 2017.

SILVA, Adny H. et al. Superparamagnetic iron-oxide nanoparticles mPEG350–and mPEG2000-coated: cell uptake and biocompatibility evaluation. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 4, p. 909-919, 2016.

SILVA-YUMI, Jorge; ROMERO, Telmo Moreno; LESCANO, Gabriela Chango. Nanofluids, synthesis and stability-brief review. **ESPOCH Congresses: The Ecuadorian Journal of STEAM**, p. 998–1006-998–1006, 2021.

SIMONSEN, Galina; STRAND, Mikael; ØYE, Gisle. Potential applications of magnetic nanoparticles within separation in the petroleum industry. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 165, p. 488-495, 2018.

SINGH, Neenu et al. Potential toxicity of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPION). **Nano reviews**, v. 1, n. 1, p. 5358, 2010.

SOENEN, Stefaan JH et al. The role of nanoparticle concentration-dependent induction of cellular stress in the internalization of non-toxic cationic magnetoliposomes. **Biomaterials**, v. 30, n. 36, p. 6803-6813, 2009.

SOETAERT, Frederik et al. Cancer therapy with iron oxide nanoparticles: Agents of thermal and immune therapies. **Advanced drug delivery reviews**, v. 163, p. 65-83, 2020.

SOLTANI, Ali Mohammad; POUYPOUY, Hassan. Standardization and regulations of nanotechnology and recent government policies across the world on nanomaterials. In: **Advances in phytonanotechnology**. Academic Press, p. 419-446, 2019.

STEPHEN, Zachary R.; KIEVIT, Forrest M.; ZHANG, Miqin. Magnetite nanoparticles for medical MR imaging. **Materials Today**, v. 14, n. 7-8, p. 330-338, 2011.

STAPIEN, Grazyna et al. Effect of surface chemistry and associated protein corona on the long-term biodegradation of iron oxide nanoparticles in vivo. **ACS applied materials & interfaces**, v. 10, n. 5, p. 4548-4560, 2018.

SUN, Tianmeng et al. Engineered nanoparticles for drug delivery in cancer therapy. **Nanomaterials and Neoplasms**, p. 31-142, 2021.

SZONDY, Zsuzsa et al. Anti-inflammatory mechanisms triggered by apoptotic cells during their clearance. **Frontiers in immunology**, v. 8, p. 909, 2017.

THOMAS, Aswathi; SANKARANARAYANAN, Sri Amruthaa; RENGAN, Aravind Kumar. Modified Polyethylene Glycol Encapsulated Iron Oxide Nanoparticles for Accelerated Wound Healing Application. **IEEE Transactions on Nanotechnology**, v. 21, p. 1-5, 2021.

THORAT, Nanasaheb D. et al. Multimodal superparamagnetic nanoparticles with unusually enhanced specific absorption rate for synergetic cancer therapeutics and magnetic resonance imaging. **ACS applied materials & interfaces**, v. 8, n. 23, p. 14656-14664, 2016.

TOMA, Sergio H. et al. Improving stability of iron oxide nanofluids for enhanced oil recovery: Exploiting wettability modifications in carbonaceous rocks. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 212, p. 110311, 2022.

VALDIGLESIAS, Vanessa et al. Effects of iron oxide nanoparticles: cytotoxicity, genotoxicity, developmental toxicity, and neurotoxicity. **Environmental and molecular mutagenesis**, v. 56, n. 2, p. 125-148, 2015.

VANGIJZEGEM, Thomas; STANICKI, Dimitri; LAURENT, Sophie. Magnetic iron oxide nanoparticles for drug delivery: Applications and characteristics. **Expert opinion on drug delivery**, v. 16, n. 1, p. 69-78, 2019.

VISWANATH, Buddolla; KIM, Sanghyo. Influence of nanotoxicity on human health and environment: The alternative strategies. **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 242**, p. 61-104, 2016.

VO-DINH, Tuan. **Nanotechnology in biology and medicine: methods, devices, and applications**. CRC Press, 2007.

VU, Mai N. et al. Current and future nanoparticle vaccines for COVID-19. **EBioMedicine**, v. 74, p. 103699, 2021.

WAN, Chok P.; MYUNG, Eunice; LAU, Benjamin HS. An automated micro-fluorometric assay for monitoring oxidative burst activity of phagocytes. **Journal of Immunological Methods**, v. 159, n. 1-2, p. 131-138, 1993.

WANG, Chia-Yu; BABITT, Jodie L. Liver iron sensing and body iron homeostasis. **Blood, The Journal of the American Society of Hematology**, v. 133, n. 1, p. 18-29, 2019.

WANG, Dali et al. Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: the nanoparticles, the ions, or a combination of both?. **Journal of hazardous materials**, v. 308, p. 328-334, 2016.

WANG, Yanli et al. Excess titanium dioxide nanoparticles on the cell surface induce cytotoxicity by hindering ion exchange and disrupting exocytosis processes. **Nanoscale**, v. 7, n. 30, p. 13105-13115, 2015.

WU, Haohao et al. Reactive oxygen species-related activities of nano-iron metal and nano-iron oxides. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 86-94, 2014.

WU, Wei et al. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. **Science and technology of advanced materials**, v. 16, n. 2, p. 023501, 2015.

XIANG, Chenyang et al. Fe₃O₄ nanoparticles functionalized with polymer ligand for T1-weighted MRI in vitro and in vivo. **Polymers**, v. 11, n. 5, p. 882, 2019.

YAO, Yihan et al. Nanoparticle-based drug delivery in cancer therapy and its role in overcoming drug resistance. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, p. 193, 2020.

YARJANLI, Zahra et al. Iron oxide nanoparticles may damage to the neural tissue through iron accumulation, oxidative stress, and protein aggregation. **BMC neuroscience**, v. 18, n. 1, p. 1-12, 2017.

YOUNG, L.; CHAMBERS, T. R. A mouse bleeding technic yielding consistent volume with minimal hemolysis. **Laboratory animal science**, v. 23, n. 3, p. 428-430, 1973.

YU, Han et al. Recent developments in nitric oxide-releasing biomaterials for biomedical applications. **Medical gas research**, v. 9, n. 4, p. 184, 2019.

YU, Yu; KOVACEVIC, Zaklina; RICHARDSON, Des R. Tuning cell cycle regulation with an iron key. **Cell cycle**, v. 6, n. 16, p. 1982-1994, 2007.

YUAN, Ye et al. A facile approach to fabricate self-assembled magnetic nanotheranostics for drug delivery and imaging. **Nanoscale**, v. 10, n. 46, p. 21634-21639, 2018.

YUSEFI, Mostafa; SHAMELI, Kamyar; JUMAAT, Ahmad Faris. Preparation and properties of magnetic iron oxide nanoparticles for biomedical applications: A brief review. **Journal of Advanced Research in Materials Science**, v. 75, n. 1, p. 10-18, 2020.

ZHANG, Yuanxiao et al. The toxicity mechanism of different sized iron nanoparticles on human breast cancer (MCF7) cells. **Food chemistry**, v. 341, p. 128263, 2021.

ZHENG, Yilin et al. Nanoparticle-based drug delivery systems for controllable photodynamic cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 144, p. 105213, 2020.

ZHI, Defu et al. Targeting strategies for superparamagnetic iron oxide nanoparticles in cancer therapy. **Acta biomaterialia**, v. 102, p. 13-34, 2020.

ZHOU, Kaibo et al. Application of magnetic nanoparticles in petroleum industry: A review. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 188, p. 106943, 2020.

ZHU, Xiao-Ming et al. Enhanced cellular uptake of aminosilane-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles in mammalian cell lines. **International journal of nanomedicine**, v. 7, p. 953, 2012.

ZIELIŃSKA, Aleksandra et al. Nanotoxicology and nanosafety: Safety-by-design and testing at a glance. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 13, p. 4657, 2020.

ZIMMERMANN, Maya; MEYER, Norbert. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. In: **Mammalian Cell Viability**. Humana Press, 2011. p. 57-63.

ANEXOS

i. Certificado CEUA

Pró Reitoria
Pesquisa

Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "AVALIAÇÃO TOXICOLÓGICA DE UMA NOVA NANOPARTÍCULA DE ÓXIDO DE FERRO III (Fe2O3) DE INTERESSE INDUSTRIAL: IN VITRO E IN VIVO", protocolada sob o CEUA nº 2881090418, sob a responsabilidade de **Karina Alves Feitosa** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) na reunião de 23/04/2018.

We certify that the proposal "TOXICOLOGICAL EVALUATION OF A NEW NANOPARTICLE OF IRON OXIDE III (Fe2O3) OF INDUSTRIAL INTEREST: IN VITRO AND IN VIVO", utilizing 48 Isogenics mice (48 females), protocol number CEUA 2881090418, under the responsibility of **Karina Alves Feitosa** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of São Carlos (CEUA/UFSCAR) in the meeting of 04/23/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **04/2018** a **04/2022**

Área: **Morfologia E Patologia**

Origem: **Biotério Externo**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

Idade: **6 a 8 semanas**

N: **48**

Linhagem: **Balb/c**

Peso: **15 a 18 g**

Resumo: Devido às características únicas de aumento de superfície de contato e tamanho reduzido (até 100 nm), as nanopartículas ganharam seu espaço em diversos setores relacionados à energia, construção, alimentos, medicina, cosméticos, entre outros. As nanopartículas de óxido de ferro são utilizadas sobretudo na área médica, como agente de contraste para ressonância magnética e direcionamento de fármacos para locais específicos do corpo, mas também são alvos de diversos estudos para diferentes aplicações. Entretanto, a síntese de novas nanopartículas com diferentes características físico-químicas acarretam em desconhecidas interações biológicas que podem trazer riscos à saúde de seus manipuladores. Nesse estudo avaliar-se-á por meio de aspectos nanotoxicológicos uma nova nanopartícula de óxido de ferro III (Fe2O3), recém sintetizada e de interesse industrial, que possui suas informações sobre suas características limitadas, devido a patente e proteção de propriedade intelectual. Para tanto, será realizado testes in vitro, para determinar a citotoxicidade utilizando duas diferentes linhagens celulares (RAW 264.7 e HeLa) frente às diferentes concentrações da nanopartícula de Fe2O3, assim como será feita a determinação da morte celular, se por necrose ou apoptose, além da análise da atividade fagocítica dos macrófagos, óxido nítrico e citocinas presentes nos sobrenadantes dos cultivos celulares. Para os experimentos in vivo, será realizado a exposição das nanopartículas de Fe2O3, por meio de 3 doses intraperitonealmente em camundongos (BALB/c), onde cada grupo receberá concentrações diferentes da nanopartícula no período de 14 dias, analisando a exposição aguda. Para determinar os efeitos dessas nanopartículas será feita a avaliação dos leucócitos do sangue dos animais, análises da função hepática e renal e quantificação de prostaglandinas, leucotrienos e citocinas no plasma desses animais. Por fim, analisaremos órgãos como cérebro, coração, fígado, baço, rins e intestino por meio de histologia e análise imunohistoquímica, buscando determinar quais perfis inflamatórios estão sendo induzidos por esses nanomateriais. Assim, teremos informações que sugerem segurança ou não para a utilização dessa nova nanopartícula de óxido de ferro III (Fe2O3) nunca antes estudada, no âmbito ocupacional

Local do experimento: Laboratório de Inflamação e Doenças Infeciosas (LIDI) - Departamento de Morfologia e Patologia- DMP-UFSCar

São Carlos, 24 de abril de 2018



São Carlos, 17 de fevereiro de 2023
CEUA N 2881090418

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Karina Alves Feitosa
Área: Morfologia E Patologia

Título da proposta: "Análise toxicológica da nanopartícula de óxido de ferro misto (NP Fe3O4) com ligantes de sulfonato de sódio (SO3-Na+): in vitro e in vivo".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSCar (ID 001267)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 02/dezembro/2022) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Alteração do Título da proposta.".

Comentário da CEUA: "".

Profa. Dra. Luciana Thie Seki Dias
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

Profa. Dra. Cleoni dos Santos Carvalho
Vice-presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de São Carlos

ii. **Artigo *In vitro*:** Toxicological effects of the mixed iron oxide nanoparticle (Fe_3O_4 NP) on murine fibroblasts LA-9



Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A
Current Issues

ISSN: (Print) (Online) Journal homepage: <https://www.tandfonline.com/loi/uteh20>

Toxicological effects of the mixed iron oxide nanoparticle (Fe_3O_4 NP) on murine fibroblasts LA-9

Karina Alves Feitosa, Ricardo de Oliveira Correia, Ana Carolina Maragno Fattori, Yulli Roxenne Albuquerque, Patricia Brassolatti, Genoveva Flores Luna, Joice Margareth de Almeida Rodolpho, Camila T. Nogueira, Juliana Cancino Bernardi, Carlos Speglich & Fernanda de Freitas Anibal

To cite this article: Karina Alves Feitosa, Ricardo de Oliveira Correia, Ana Carolina Maragno Fattori, Yulli Roxenne Albuquerque, Patricia Brassolatti, Genoveva Flores Luna, Joice Margareth de Almeida Rodolpho, Camila T. Nogueira, Juliana Cancino Bernardi, Carlos Speglich & Fernanda de Freitas Anibal (2022): Toxicological effects of the mixed iron oxide nanoparticle (Fe_3O_4 NP) on murine fibroblasts LA-9, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, DOI: [10.1080/15287394.2022.2068711](https://doi.org/10.1080/15287394.2022.2068711)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15287394.2022.2068711>



Published online: 25 Apr 2022.



Submit your article to this journal



Article views: 91



View related articles



View Crossmark data

