

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

ANA CAROLINA MARAGNO FATTORI

**Efeitos toxicológicos da nanopartícula de dióxido de titânio (TiO₂)
utilizando modelos experimentais *in vitro* e *in vivo***

São Carlos – SP

2023

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

ANA CAROLINA MARAGNO FATTORI

**Efeitos toxicológicos da nanopartícula de dióxido de titânio (TiO₂)
utilizando modelos experimentais *in vitro* e *in vivo***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientadora: Prof.^a Dra. Fernanda de Freitas Anibal

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Karina Nogueira Zambone Pinto Rossi

São Carlos – SP

2023



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 Ana Carolina Maragno Fattori, realizada em 30/11/2023.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Fernanda de Freitas Anibal (UFSCar)

Profa. Dra. Cynthia Aparecida de Castro (UFSCar)

Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra (UFSCar)

Prof. Dr. Otávio Henrique Thiemann (USP)

Prof. Dr. Andre Capaldo Amaral (UNIARA)

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.

Dedico este trabalho ao Sagrado Coração de Jesus, para Sua maior honra e glória.

Aos meus pais, Júlia e Valdir, pelo amor e apoio incondicional.

À minha família e amigos, pela confiança e compreensão.

Vocês foram e são essenciais. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ser presença em minha vida, por me abençoar e fortalecer, me concedendo sabedoria em todos os momentos de minha vida e especialmente ao longo deste caminho. Muito obrigada Senhor!

Aos meus pais, Júlia e Valdir, por tudo o que me ensinaram e que me tornaram a pessoa que sou hoje. Pelo apoio e incentivo que fizeram com que eu conquistasse meus sonhos. Pela paciência, confiança e amor incondicional que sempre devotaram a mim: vocês são fundamentais em minha vida. Amo vocês e sou eternamente grata!

A minha irmã, Angelita, pela amizade, compreensão, por me ouvir sempre. Obrigada por você ter entrado e permanecido em minha vida e por ter me dado os sobrinhos Miguel e Diogo que são a nossa alegria. A distância e a saudade são grandes.

Ao meu namorado, Evandro, pelo amor, paciência, apoio e incentivo constantes, principalmente na etapa da escrita da tese. Você foi e é de extrema importância em minha vida. Te amo!

A toda minha família, que sempre esteve comigo, me apoiando, torcendo por mim. Obrigada por compreenderem algumas ausências devido aos estudos. Vocês são minha base! E de maneira especial, a minha avó Ivanilde, que completa 80 anos de vida, por todo amor, cuidado, ensinamento e experiências que guardarei para sempre em meu coração. Obrigada!

A minha querida orientadora, Prof.^a Dra. Fernanda de Freitas Anibal, pela confiança, pelos ensinamentos, acadêmicos e também de vida, pela paciência em muitos momentos e por ser mais que uma orientadora, uma amiga ao longo de todos esses anos!

A Prof.^a Dra. Karina Nogueira Zambone Pinto Rossi, minha co-orientadora, pela participação e oferecimento de seu laboratório para o desenvolvimento de grande parte desse trabalho.

Agradeço a todos os meus amigos, que de uma maneira ou outra estiveram presentes, me apoiando e torcendo por mim. Em especial aos meus companheiros e amigos do laboratório, Karina, Patrícia, Ricardo, Matheus, Genoveva, pela amizade, pelos ensinamentos, por colaborarem com esta pesquisa, por me auxiliarem na construção do aprendizado científico e também pelos momentos de descontração.

A todos os funcionários do Departamento de Morfologia e Patologia, pela convivência agradável e por contribuírem nos trabalhos. Sem vocês não seria possível.

Aos Prof. Dr. Iran Malavazi, Prof. Dr. Eduardo Henrique Martins Nunes e Dra. Juliana Cancino Bernardi durante as etapas de caracterização da nanopartícula. Obrigada!

À Prof.^a Dra. Márcia Regina Cominetti e a sua equipe por disponibilizar seu laboratório e equipamento para a realização da análise por citometria de fluxo. Obrigada!

Também à equipe do Laboratório de Citopatologia, da FMRP-USP, pela contribuição no que diz respeito às análises histológicas, ao Prof. Dr. Edson Garcia Soares e em especial à Ana Maria da Rocha, pela confecção das lâminas. E à Dra. Mayara Rosolem pelo auxílio também na confecção das lâminas e análise histopatológica, bem como pela amizade. Obrigada!

Ao Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra por disponibilizar seu laboratório e o equipamento para escanear as lâminas histológicas, bem como pela amizade e disponibilidade em sempre ajudar e tirar dúvidas. Obrigada!

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular por toda a formação acadêmica e apoio na participação de congressos, bem como à instituição CAPES pelo apoio financeiro.

À Petrobras pelo apoio financeiro e confiança na realização deste trabalho.

Agradeço a todos, que de forma direta ou indireta contribuíram para a realização deste trabalho e que estiveram presentes ao longo desta trajetória. Obrigada!

“O cientista não é aquele que fornece as verdadeiras respostas; é quem faz as verdadeiras perguntas”.

Claude Lévi-Strauss

RESUMO

O advento da nanotecnologia e suas aplicações em diversas áreas decorre do incremento das propriedades físico-químicas que as nanopartículas apresentam devido à escala nanométrica. Entretanto essas novas características podem desencadear efeitos biológicos prejudiciais à saúde e ao meio ambiente destacando a necessidade da avaliação da segurança na utilização desses nanomateriais. Dessa forma, o presente trabalho analisou os efeitos toxicológicos da nanopartícula de dióxido de titânio (NP TiO₂) funcionalizada com carboxilato de sódio (-COO⁻ Na⁺), de interesse para a indústria petrolífera, utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. A caracterização físico-química da NP TiO₂ foi realizada pelos métodos de Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), sendo determinado seu tamanho hidrodinâmico, potencial zeta e índice de polidispersividade (PdI), Espectroscopia de Infravermelho com Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier (ATR-FTIR) e Microscopia Eletrônica de Varredura de alta resolução (MEV-FEG). Para o modelo *in vitro* foi utilizada a linhagem de fibroblastos LA-9 sendo a citotoxicidade avaliada para as concentrações de 250, 150 e 50 µg/mL através de ensaio de viabilidade celular (MTT) e análise de morfologia celular após exposição à NP TiO₂ por 24, 48 e 72h. Também foram avaliados, após exposição à NP TiO₂ por 24h, produção intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), produção de citocinas IL-6 e TNF no sobrenadante celular por ELISA e morte celular por citometria de fluxo, bem como a sobrevivência clonogênica após 7 dias da exposição. Já no modelo *in vivo*, camundongos Balb/c foram expostos por via intranasal à NP TiO₂ (500, 250, 100 e 50 µg/animal) em 4 doses no período de 14 dias. Ao longo do período de exposição foram avaliados a ingestão de ração e água e a variação do peso dos animais. Posteriormente foi feita avaliação leucocitária no sangue, lavado broncoalveolar (LBA) e lavado da cavidade peritoneal (LCP), quantificação de citocinas (INF- γ , TNF, IL-6 e IL-10) no plasma e LBA e anticorpo IgE no LBA por ELISA, avaliação da função hepática (TGO/TGP), pesagem dos pulmões e análise histológica dos órgãos (encéfalo, pulmões, coração, fígado, baço e rins). Nossos resultados demonstraram que a NP TiO₂ possui funcionalização com ligantes de carboxilato de sódio e sugere-se que apresenta forma cristalina anatase, além de dispersão heterogênea e tamanho hidrodinâmico em torno de 3,5 nm em água e 2,96 nm em PBS, apresentando aumento para 7,62 nm em meio DMEM devido ao processo de aglomeração. Para a linhagem de fibroblastos LA-9 houve redução de viabilidade celular (250 e 150 µg/mL) dose e tempo dependentes bem como estresse oxidativo e morte celular por apoptose (150 µg/mL). Para a concentração de 150 µg/mL houve uma possível recuperação celular após a retirada da NP. No modelo *in vivo*, a NP gerou alterações histopatológicas no encéfalo, pulmão, fígado e rins dos camundongos Balb/c após exposição intranasal com 4 doses em um período de 14 dias. Para os outros parâmetros avaliados não foram observadas alterações, com exceção do aumento de TGO para a concentração de 250 µg. Os resultados deste trabalho demonstraram que a NP TiO₂ funcionalizada com carboxilato de sódio apresenta citotoxicidade para a linhagem de fibroblastos LA-9 e toxicidade com alterações histopatológicas para encéfalo, pulmão, fígado e rins em camundongos Balb/c, contribuindo para o conhecimento sobre os efeitos desta NP TiO₂ em modelo *in vitro* e *in vivo*. Destaca-se ainda a importância de análises em períodos mais longos de exposição a fim de determinar a segurança na utilização deste nanomaterial.

Palavras-chave: Nanotoxicologia; Dióxido de titânio; Citotoxicidade; LA-9; Inflamação; Balb/c.

ABSTRACT

The advent of nanotechnology and its applications in diverse areas is due to the increase in the physical and chemical properties of nanoparticles because of their nanometric scale. However, these new characteristics can trigger biological effects that harm health and the environment, highlighting the need to assess the safety of using these nanomaterials. Therefore, this study analyzed the toxicological effects of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂ NP) functionalized with sodium carboxylate (-COO-Na⁺), of interest to the oil industry, using *in vitro* and *in vivo* models. The physicochemical characterization of the TiO₂ NP was carried out using Dynamic Light Scattering (DLS), determining its hydrodynamic size, zeta potential and polydispersity index (PdI), Attenuated Total Reflection Fourier Transform Infrared Spectroscopy (ATR-FTIR) and High-Resolution Scanning Electron Microscopy (SEM-FEG). For the *in vitro* model, the LA-9 fibroblast lineage was used and cytotoxicity was evaluated for the concentrations of 250, 150 and 50 µg/mL using the cell viability assay (MTT) and cell morphology analysis after exposure to TiO₂ NP for 24, 48 and 72 hours. After exposure to TiO₂ NP for 24 hours, intracellular production of Reactive Oxygen Species (ROS), production of cytokines IL-6 and TNF in the cell supernatant by ELISA and cell death by flow cytometry were also evaluated, as well as clonogenic survival 7 days after exposure. In the *in vivo* model, Balb/c mice were exposed intranasally to TiO₂ NP (500, 250, 100 and 50 µg/animal) in 4 doses over 14 days. Throughout the exposure period, the animals' feed and water intake and weight variation were assessed. Subsequently, leukocyte levels were analyzed in the blood, bronchoalveolar lavage (BAL) and peritoneal cavity lavage (PCL), quantification of cytokines (INF- γ , TNF, IL-6 and IL-10) in plasma and BAL and IgE antibody in BAL by ELISA, evaluation of liver function (TGO/TGP), weighing of the lungs and histological analysis of the organs (brain, lungs, heart, liver, spleen and kidneys). Our results showed that NP TiO₂ is functionalized with sodium carboxylate ligands and suggests that it has an anatase crystalline form, as well as heterogeneous dispersion and a hydrodynamic size of around 3.5 nm in water and 2.96 nm in PBS, increasing to 7.62 nm in DMEM medium due to the agglomeration process. For the LA-9 fibroblast cell line, there was a reduction in cell viability (250 and 150 µg/mL) dose and time-dependent as well as oxidative stress and cell death by apoptosis (150 µg/mL). For the 150 µg/mL concentration there was a possible cell recovery after the NP was removed. In the *in vivo* model, NP generated histopathological changes in the brain, lungs, liver and kidneys of Balb/c mice after intranasal exposure with 4 doses over a period of 14 days. No changes were observed in the other parameters evaluated, with the exception of an increase in TGO at a concentration of 250 µg. The results of this study showed that NP TiO₂ functionalized with sodium carboxylate has cytotoxicity for the LA-9 fibroblast line and toxicity with histopathological alterations for the brain, lung, liver and kidneys in Balb/c mice, contributing to knowledge about the effects of this NP TiO₂ in *in vitro* and *in vivo* models. It is also interesting to analyze long-term exposure in order to determine the safety of using this nanomaterial.

Keywords: Nanotoxicology; Titanium dioxide; Cytotoxicity; LA-9; Inflammation; Balb/c.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Escala nanométrica	19
Figura 2 - Extração de petróleo utilizando nanopartículas	21
Figura 3 - Estruturas cristalinas de dióxido de titânio	22
Figura 4 - Transporte da NP via corrente sanguínea e possíveis efeitos ao organismo	26
Figura 5 - Potenciais efeitos tóxicos das NP TiO ₂	28
Figura 6 - Delineamento experimental <i>in vitro</i>	40
Figura 7 - Via intranasal	42
Figura 8 - Delineamento experimental <i>in vivo</i>	45
Figura 9 - Gráfico de dispersão da NP TiO ₂	48
Figura 10 - Espectroscopia de Infravermelho (ATR-FTIR) da NP TiO ₂	49
Figura 11 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG) da NP TiO ₂	49
Figura 12 - Viabilidade celular de fibroblastos LA-9	50
Figura 13 - Morfologia celular de fibroblastos LA-9	52
Figura 14 - Produção Intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	53
Figura 15 - Citocinas (IL-6 e TNF) no sobrenadante celular	54
Figura 16 - Determinação de morte celular em fibroblastos LA-9	55
Figura 17 - Clonogenicidade em fibroblastos LA-9	56
Figura 18 - Consumo de ração e água	57
Figura 19 - Peso dos animais	57
Figura 20 - Leucócitos totais no sangue, LBA e LCP	58
Figura 21 - Contagem diferencial de leucócitos no sangue, LBA e LCP	60
Figura 22 - Citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 no plasma e LBA	61
Figura 23 - Anticorpo IgE no LBA	62
Figura 24 - Dosagem de TGO e TGP	63
Figura 25 - Peso dos pulmões dos animais	64
Figura 26 - Fotomicrografias de cortes histológicos do encéfalo dos animais	65
Figura 27 - Fotomicrografias de cortes histológicos do coração dos animais	66
Figura 28 - Fotomicrografias de cortes histológicos dos pulmões dos animais	67
Figura 29 - Fotomicrografias de cortes histológicos do fígado dos animais	68
Figura 30 - Fotomicrografias de cortes histológicos do baço dos animais	69
Figura 31 - Fotomicrografias de cortes histológicos dos rins dos animais	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta da NP TiO ₂ em água ultrapura, meio de cultivo DMEM suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) e PBS 1x.....	47
--	----

LISTA DE SIGLAS

- 7-AAD** – *7-Aminoactinomycin D* (7-Aminoactinomicina D)
- ANOVA** – *Analysis of Variance* (Análise de Variância)
- ATR-FTIR** – *Attenuated Total Reflectance Fourier Transformed Infrared* (Infravermelho com Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier)
- BCRJ** – Banco de Células do Rio de Janeiro
- CENPES** – Centro de Pesquisas, Desenvolvimento e Inovação Leopoldo Américo Miguez de Mello
- CEUA** – Comissão de Ética no Uso de Animais
- DCFH-DA** – *2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate* (Diacetato de 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína)
- DEMA** – Departamento de Engenharia de Materiais
- DEMET** – Departamento de Engenharia de Metalúrgica e de Materiais
- DGE** – Departamento de Genética e Evolução
- DGero** – Departamento de Gerontologia
- DLS** – *Dynamic Light Scattering* (Espalhamento Dinâmico de Luz)
- DMEM** – *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DMP** – Departamento de Morfologia e Patologia
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DP** – Desvio Padrão
- EDTA** – *Ethylenediamine tetraacetic acid* (Ácido etilendiamino tetra-acético)
- ELISA** – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de Imunoabsorção Enzimática)
- EMU** – Equipamento Multiusuários
- FMRP** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
- HE** – Hematoxilina-Eosina
- HRP** – *Horseradish Peroxidase* (Peroxidase de Rábano)
- IFSC** – Instituto de Física de São Carlos
- IgE** – Imunoglobulina E
- IL-6** – Interleucina 6
- IL-10** – Interleucina 10
- INF- γ** – Interferon-gama
- ISO** – *International Organization for Standardization* (Organização Internacional para Padronização)

LABEN – Laboratório de Biologia do Envelhecimento

LBA – Lavado Broncoalveolar

LCE – Laboratório de Caracterização Estrutural

LCP – Lavado da Cavidade Peritoneal

LNN – Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia

MEV-FEG – Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (FEG – *Field Emission Gun* – Canhão de Emissão de Campo)

MTT – brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio

NP – nanopartícula

NP TiO₂ – nanopartícula de dióxido de titânio

OECD – *Organisation for Economic Co-operation and Development* (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico)

PBS – *Phosphate Buffered Saline* (Tampão Fosfato-Salino)

PdI – *Polydispersity index value* (Índice de Polidispersidade)

PE – *Phycoerythrin* (Ficoeritrina)

PE – *Plating Efficiency* (Eficiência de Plaqueamento)

Petrobras – Petróleo Brasileiro S.A

PS – *Phosphatidylserine* (fosfatidilserina)

SBCAL – Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório

SF – *Survival Fraction* (Fração de Sobrevivência)

SFB – Soro Fetal Bovino

SPF – *Specified Pathogen Free* (Livre de Patógenos Específicos)

TGO – Transaminase Glutâmico Oxalacética

TGP – Transaminase Glutâmico Pirúvica

TMB – Tetrametilbenzidina

TNF – *Tumor Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UFSCar – Universidade Federal de São Carlos

USP – Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

g – gramas

°C – graus Celsius

kV – quilovolts

L – litros

M – molar

µg – microgramas

µL – microlitros

µm – micrômetros

µM – micromolar

mg – miligramas

mm – milímetros

m/m – massa/massa

mL – mililitros

mM – milimolar

MΩ.cm⁻¹ – megaohms por centímetro (resistividade)

N – normal

nm – nanômetros

pg – picogramas

® – marca registrada

™ – *Trade Mark* (marca comercial)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 Nanopartículas e suas aplicações	18
1.2 Nanopartículas de dióxido de titânio	22
1.3 Toxicidade das nanopartículas	24
2. OBJETIVOS	30
2.1 Objetivo geral	30
2.2 Objetivos específicos	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Obtenção da nanopartícula de dióxido de titânio (NP TiO ₂).....	32
3.2 Caracterização da nanopartícula de dióxido de titânio (NP TiO ₂)	32
3.2.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta	32
3.2.2 Espectroscopia de Infravermelho com Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier (ATR-FTIR)	33
3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG)	33
3.3 Experimentos <i>in vitro</i>	33
3.3.1 Fibroblastos LA-9	33
3.3.2 Ensaio de viabilidade celular – Teste do MTT	34
3.3.3 Análise de morfologia celular	35
3.3.4 Ensaio de produção intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	35
3.3.5 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante celular – Ensaio de imun absorção enzimática – ELISA	36
3.3.6 Ensaio de morte celular por citometria de fluxo	37
3.3.7 Ensaio de Clonogenicidade	38
3.3.8 Resumo gráfico do delineamento experimental <i>in vitro</i>	40
3.4 Experimentos <i>in vivo</i>	40

3.4.1 Animais	41
3.4.2 Exposição à nanopartícula de TiO ₂	41
3.4.3 Consumo de ração e água e verificação do peso dos animais durante a exposição à NP TiO ₂	42
3.4.4 Avaliação leucocitária no sangue, lavado broncoalveolar (LBA) e lavado da cavidade peritoneal (LCP)	42
3.4.5 Quantificação de citocinas no plasma sanguíneo e lavado broncoalveolar (LBA) e anticorpo IgE no LBA – Ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA.....	43
3.4.6 Análise de função hepática por meio da Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO) e Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP).....	43
3.4.7 Coleta de órgãos: pesagem dos pulmões e análise histológica.....	44
3.4.8 Resumo gráfico do delineamento experimental <i>in vivo</i>	45
3.5 Análise Estatística	46
4. RESULTADOS	47
4.1 Caracterização da NP TiO ₂	47
4.1.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta	47
4.1.2 Espectroscopia de Infravermelho com Reflexão Total Atenuada por Transformada de Fourier (ATR-FTIR)	48
4.1.3 Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG)	49
4.2 <i>In vitro</i> – Fibroblastos LA-9.....	50
4.2.1 Viabilidade celular	50
4.2.2 Morfologia celular	51
4.2.3 Estresse oxidativo - produção intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)	53
4.2.4 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante celular	53
4.2.5 Determinação de morte celular	54
4.2.6 Clonogenicidade	55
4.3 <i>In vivo</i> – Camundongos Balb/c.....	56
4.3.1 Consumo de ração e água pelos animais durante a exposição à NP TiO ₂	56
4.3.2 Variação do peso dos animais durante a exposição à NP TiO ₂	57

4.3.3 Leucócitos totais no sangue, no Lavado Bronco Alveolar (LBA) e no Lavado da Cavityde Peritoneal (LCP) após a exposição à NP TiO ₂	58
4.3.4 Contagem diferencial de leucócitos no sangue, no Lavado Bronco Alveolar (LBA) e no Lavado da Cavityde Peritoneal (LCP) após a exposição à NP TiO ₂	58
4.3.5 Dosagem das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 no plasma sanguíneo e no Lavado Bronco Alveolar (LBA) após a exposição à NP TiO ₂	60
4.3.6 Dosagem do anticorpo IgE no Lavado Bronco Alveolar (LBA) após a exposição à NP TiO ₂	62
4.3.7 Função hepática – Dosagem dos níveis de Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO) e Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP) após a exposição à NP TiO ₂	62
4.3.8 Variação do peso dos pulmões dos animais após a exposição via intranasal à NP TiO ₂	63
4.3.9 Análise histopatológica dos órgãos (encéfalo, coração, pulmões, fígado, baço e rins) dos animais após a exposição à NP TiO ₂	64
5. DISCUSSÃO	71
6. CONCLUSÕES.....	84
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
APÊNDICE A – ARTIGO REFERENTE À EXPERIMENTAÇÃO <i>IN VITRO</i>: TITANIUM DIOXIDE NANOPARTICLE (TiO₂ NP) INDUCES TOXIC EFFECTS ON LA-9 MOUSE FIBROBLAST CELL LINE.....	96
ANEXO A – CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFSCAR.....	97
ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – UFSCAR	99

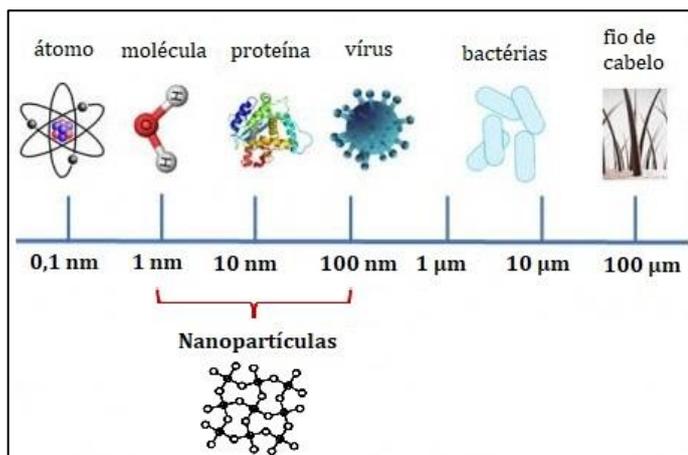
1. INTRODUÇÃO

1.1 Nanopartículas e suas aplicações

O conceito de nanotecnologia foi utilizado pela primeira vez em 1959 pelo físico americano Richard Feynman, considerado o pai da nanotecnologia moderna. Entretanto, somente após 15 anos, em 1974, é que o termo “nanotecnologia” foi utilizado e definido pelo cientista japonês Norio Taniguchi como o processo de separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou uma molécula (BAYDA et al., 2020). Nas últimas décadas houve um avanço exponencial no campo da nanotecnologia e muitos produtos que apresentam nanopartículas em sua composição são utilizados em diferentes áreas, como na indústria alimentícia, agrícola, petroquímica, farmacêutica, construção civil, bem como na medicina para diagnóstico e tratamento de doenças (BARANOWSKA-WÓJCIK et al., 2020; KHALIL M, JAN BM, TONG CW, 2017; NAJAH-MISSAOUI; ARNOLD; CUMMINGS, 2020).

Existem controvérsias quanto à definição de nanopartículas, entretanto a mais aceita é de que são partículas sintetizadas, que apresentam tamanho de 1 a 100 nm (Figura 1) com propriedades que diferem dos materiais de origem (sólido “bulk” ou sólido estendido) (AUFFAN et al., 2009; NAJAH-MISSAOUI; ARNOLD; CUMMINGS, 2020). O estudo dessas estruturas e moléculas em escala nanométrica compreende a nanociência e a aplicação prática das mesmas em processos e produtos define o que chamamos de nanotecnologia. Duas das premissas que definem a nanotecnologia são a escala nanométrica, em ao menos um de seus componentes, e a novidade, ou seja, modificações e aprimoramentos em várias propriedades da partícula devido a nanoescala (BAYDA et al., 2020).

Figura 1 - Escala nanométrica



Representativo da escala nano e micrométrica.

Fonte: Adaptado de INECOL – *Partículas de origem natural*

Disponível em: <https://www.cronica.com.mx/academia/nanopartículas-origem-natural.html>

As nanopartículas apresentam maior área superficial por unidade de volume, quando comparadas às partículas de maior diâmetro, o que faz com que a superfície desses nanomateriais apresente uma grande quantidade de átomos. Essa característica faz com que essas partículas apresentem propriedades físico-químicas muito distintas dos materiais de mesma composição que deram origem às mesmas (SHI et al., 2013; ZIELIŃSKA et al., 2020). Esse incremento em propriedades ópticas, mecânicas, elétricas e magnéticas faz com que as nanopartículas sejam utilizadas em diversas áreas da indústria e também da medicina (AZAM A., 2018; HULLA; SAHU; HAYES, 2015; KHALIL M, JAN BM, TONG CW, 2017).

A síntese das nanoestruturas pode ocorrer de maneira geral de duas maneiras distintas: *top-down* e *bottom-up*, que se diferem pelo grau de qualidade, velocidade e custo. Na abordagem *top-down* o sólido “bulk” é quebrado para obtenção das partículas de tamanho nanométrico através dos métodos de moagem ou gravura mecânica. Já na *bottom-up* a nanoestrutura é construída átomo por átomo ou molécula por molécula por métodos físicos ou químicos que podem ser exemplificados pela condensação molecular/atômica ou precipitação química/eletroquímica (BAYDA et al., 2020; MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013). Após a síntese é possível então realizar a caracterização físico-química da nanoestrutura e determinar seu tamanho, formato, estrutura cristalina, composição dentre outras características (BLEEKER et al., 2013; TINKLE et al., 2014).

O tamanho que a nanopartícula apresenta está intimamente ligado às propriedades que a mesma possui. Quanto menor a partícula, maior a concentração de átomos na sua superfície, o que a torna mais reativa. Essa característica se deve às contrações de rede que favorecem o

confinamento de elétrons e a existência de discretos estados eletrônicos que estão praticamente ausentes nas partículas maiores (AUFFAN et al., 2009). Quanto ao tamanho, os nanomateriais podem estar na forma de partículas primárias, aglomerados e agregados. Nas partículas primárias as ligações entre os átomos ou moléculas são bem definidas. Já nos aglomerados as partículas interagem entre si por ligações fracas e nos agregados essas interações ocorrem por ligações fortes (OBERDÖRSTER, 2010).

Diversos tipos de nanopartículas (NP) são utilizados na indústria sendo as principais as metálicas (ouro e prata), as de óxido metálico (titânio e alumínio) e não metálico (sílica), os nanotubos de carbono e as partículas magnéticas (ferro) (ARFIN; TARANNUM, 2018). Na área de armazenamento, produção e conversão de energia pode-se destacar a utilização das NPs em nanotubos de carbono nas células solares e em nanocatalisadores para geração de hidrogênio. E ainda, na área de engenharia civil há grande utilização de nanomateriais que promovem baixo custo e durabilidade das construções. Já nas áreas agrícola e ambiental, a nanotecnologia é utilizada no aumento da produtividade, por exemplo, com a utilização de nanossensores para monitoramento do solo e detecção e controle de pragas, bem como para o tratamento de água e controle dos efeitos da poluição do ar (DANIYAL; AZAM; AKHTAR, 2018; SALAMANCA-BUENTELLO et al., 2005).

No setor alimentício, as nanopartículas são utilizadas para pigmentação e melhor absorção dos alimentos bem como em nanossensores para detecção de contaminantes (ANH et al., 2022; HE; HWANG, 2016; LI et al., 2019). Também na área de cosméticos as NPs se apresentam na forma de nanoemulsões de gel, em cremes e principalmente no protetor solar, como é o caso das nanopartículas de titânio (DRÉNO et al., 2019; HAMEED et al., 2019).

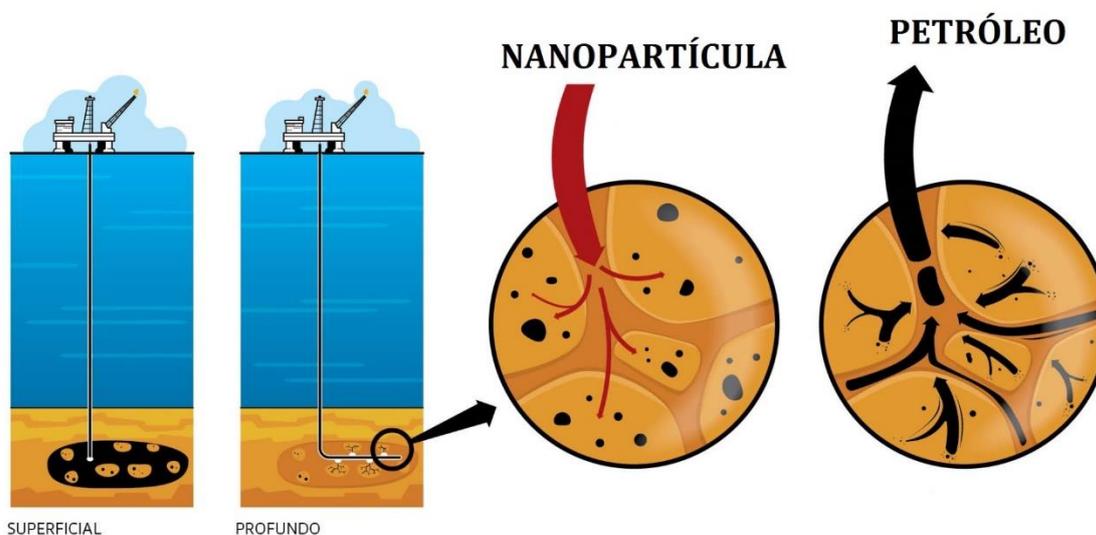
Outra área na qual a nanotecnologia exerce um papel importante é a área da saúde, devido à utilização dos nanomateriais para o diagnóstico de doenças, nos sistemas de liberação de medicamentos, como nanopartículas magnéticas que permitem a liberação lenta e controlada dos fármacos e no monitoramento de alterações bioquímicas significativas, como os sensores para detecção de glicose e colesterol produzidos a partir dessas partículas de escala nanométrica (DADFAR et al., 2019; MITCHELL et al., 2021; SALAMANCA-BUENTELLO et al., 2005).

Além de todas essas utilizações, as nanopartículas também se destacam na indústria petroquímica, a qual devido ao aumento da demanda energética, tem buscado métodos mais eficientes para extração do petróleo e que tenham viabilidade econômica e ambiental (KONG; OHADI, 2010). Nesse sentido as NPs auxiliam nos processos de perfuração e cimentação dos poços, bem como na recuperação mais eficiente do petróleo (KHALIL M, JAN BM, TONG CW, 2017; YU et al., 2014). As nanopartículas de sílica, por exemplo, são utilizadas para

reduzir a formação de espuma, um subproduto indesejável durante o processo de extração do petróleo (YU et al., 2014). Já as nanopartículas de titânio podem ser empregadas como aditivos em fluidos para a perfuração de poços e para melhorar o processo de extração (HENDRANINGRAT; TORSÆTER, 2015; MAO et al., 2015).

Somente 35 a 50% do petróleo contido nas rochas é recuperado após extração primária e secundária. Uma das estratégias utilizada para melhorar a eficiência da recuperação é a injeção de surfactantes, os quais reduzem a tensão interfacial água/óleo aumentando a capacidade de remoção do óleo residual contido nos poros dos reservatórios. Entretanto há grande adsorção dos surfactantes na superfície das rochas diminuindo a eficiência do processo de recuperação do petróleo. Além disso, os surfactantes têm alto custo não sendo viáveis em termos econômicos (P. C. CAPLAN et al., 2019). Sendo assim, as nanopartículas são empregadas para auxiliar na retirada do petróleo nos nano e microporos das rochas aumentando assim a eficiência de extração, conforme mostra a figura 2.

Figura 2 - Extração de petróleo utilizando nanopartículas



Processo secundário de extração de petróleo utilizando nanopartículas que modificam a interface água/óleo facilitando a extração do petróleo residual armazenado em nanoporos da rocha.

Fonte: Adaptado de Revista FAPESP 2016 – *Poços de petróleo mais produtivos*.

Uma das estratégias para melhorar as características das NPs e poder direcionar o seu uso é a funcionalização, que pode ser realizada através da ligação de moléculas orgânicas ou inorgânicas na superfície da partícula (VARANDA et al., 2019). A incorporação de ligantes orgânicos, como por exemplo a carboxilação, é um dos métodos de funcionalização mais utilizados (KHALIL et al., 2014; MEDEIROS; MACHADO; RUBIM, 2015), o qual torna a partícula mais hidrofílica e, portanto, apresenta melhor dispersão (HAMILTON et al., 2014).

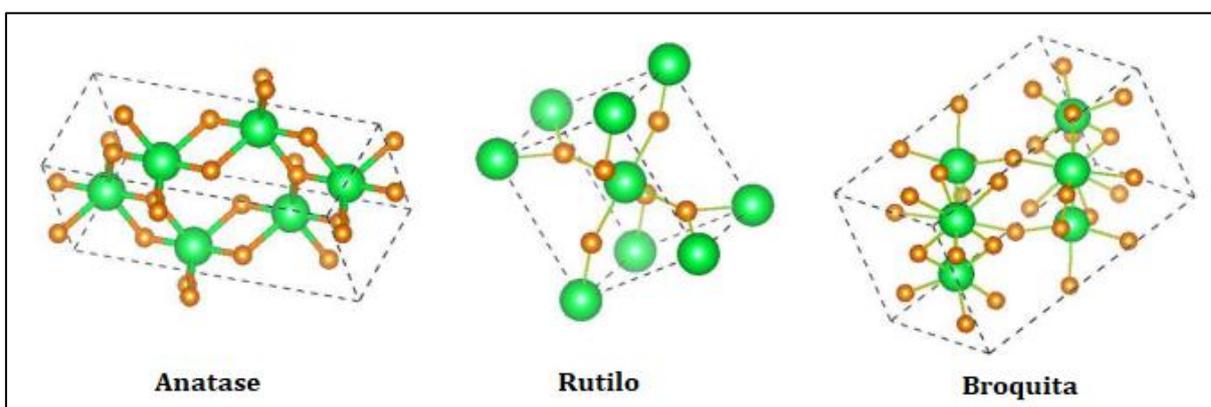
Dessa forma, a empresa Petrobras possui interesse na utilização da nanopartícula de dióxido de titânio funcionalizada com carboxilato de sódio estudada neste trabalho, para utilização na indústria petroquímica com o intuito de melhorar a eficiência de extração do petróleo residual bem como para preservação e cimentação das rochas possibilitando futuras extrações (MURTAZA; RAHMAN; AL-MAJED, 2016; SANTRA; BOUL; PANG, 2012).

1.2 Nanopartículas de dióxido de titânio

O titânio (Ti) é um metal que apresenta como características ser mais leve que o ferro, apresentar força muito próxima à do aço e ter resistência à corrosão, de maneira muito similar à platina. Além disso, é o nono elemento mais abundante da terra. Sua utilização na área industrial se dá principalmente sob a forma de óxido, cloreto e metal. Dentre os óxidos de titânio os que apresentam maior interesse econômico são a ilmenita, o leucoxênio, o rutilo, a anatase e a perovskita (AMORIM NETO; ALMEIDA, 2017).

A anatase é um dos óxidos de titânio de importantes ocorrências no Brasil, sendo o estado de Minas Gerais o que apresenta a maior reserva de minério de titânio, ocorrendo também nos estados da Paraíba, Goiás, Pernambuco e Rio de Janeiro. Ela é conhecida como octaedrita devido ao hábito octaédrico, sendo um óxido trimorfo, ou seja, é uma das três formas polimorfas do rutilo e da broquita (Figura 3), cristaliza-se no sistema tetragonal e apresenta-se na coloração castanha no estado natural. Contém de 98,4 a 99,8 % de TiO_2 , sendo que sua massa específica é de $3,9 \text{ g/cm}^3$, sua dureza varia de 5,5 a 6,0 e apresenta brilho adamantino (AMORIM NETO; ALMEIDA, 2017; MAGALHÃES BALTAR et al., 2008).

Figura 3 - Estruturas cristalinas de dióxido de titânio



Representação estrutural das formas cristalinas de dióxido de titânio - anatase, rutilo e broquita. As esferas verdes representam o elemento titânio (Ti) e as esferas laranjas representam o elemento oxigênio (O).

Fonte: Adaptado de Vitoreti et al., 2017 – *Aplicação de Dióxido de Titânio em Células Solares*.

O dióxido de titânio (TiO_2) é um composto estável, não volátil, bastante insolúvel e tem um caráter refratário devido a sua baixa condutividade térmica. Também se comporta como uma molécula anfótera, embora seja mais ácida que básica. O TiO_2 se apresenta como um óxido branco de titânio e é bastante estudado devido à sua grande aplicação em pigmentos, cosméticos (protetor solar), em processos de purificação de água, na construção civil, em medicamentos entre outros (ZOCCAL, 2010).

As nanopartículas de dióxido de titânio (NP TiO_2) são um dos cinco nanomateriais mais utilizados na indústria e em produtos de consumo nos últimos anos devido a sua alta atividade catalítica quando comparada às partículas finas de mesma composição (SHI et al., 2013). Na área cosmética são amplamente utilizadas, principalmente em protetor solar, devido a capacidade de proteção contra os raios ultravioletas (DRÉNO et al., 2019). Na indústria alimentícia participam dos processos de produção, processamento e armazenamento de alimentos, sendo adicionadas em vários gêneros incluindo queijos e molhos, leite desnatado, sorvete e produtos de confeitaria (BARANOWSKA-WÓJCIK et al., 2020; HERINGA et al., 2016).

Também são utilizadas em sistemas de remoção de resíduos em água, devido às propriedades fotocatalíticas, bem como em dispositivos de entrega direcionada de fármacos na área biomédica (PANDEY; PRAJAPATI, 2018). Na agricultura são empregadas em sensores para avaliar a qualidade do solo e na produção de pesticidas e fertilizantes contribuindo assim com melhorias no setor agrícola (RAI et al., 2015).

Devido à diversas áreas de aplicação e aos inúmeros benefícios que as nanopartículas trazem, tanto para uma grande variedade de produtos como para a sociedade, como resultado do aprimoramento e direcionamento das características da partícula, a nanotecnologia é considerada uma das tecnologias mais promissoras do século 21 (BAYDA et al., 2020). Em contrapartida, as mesmas características que tornam as NPs mais versáteis e reativas podem torná-las também mais bioativas desencadeando toxicidade (SHI et al., 2013).

A bioatividade de uma nanopartícula está fortemente relacionada às suas características, como tamanho, forma, carga de superfície, composição química, solubilidade entre outros, que variam de uma partícula para outra (ZORODDU et al., 2014). Dessa forma é de extrema importância a avaliação da toxicidade de cada nova nanopartícula sintetizada antes da sua utilização, visando a segurança humana e ambiental (ZIELIŃSKA et al., 2020).

1.3 Toxicidade das nanopartículas

Devido à ampla utilização das nanopartículas nos últimos anos, principalmente da NP de dióxido de titânio, que está entre as cinco partículas mais usadas em produtos de consumo, tem crescido o interesse sobre a segurança na utilização de tais partículas. Para essa finalidade os estudos de citotoxicidade e toxicidade sistêmica têm se apresentado de grande importância (SHI et al., 2013).

Não há, até o presente momento, uma legislação unificada quanto à segurança no uso dos nanomateriais e, dessa forma, diversos países utilizam agências reguladoras específicas. Nos Estados Unidos, a FDA (*Food and Drug Administration*) regulamenta o uso das NPs em diversos setores como alimentício, cosmético, farmacêutico e médico para segurança de possíveis efeitos tóxicos à população. Já na União Europeia a regulamentação utilizada é a mesma dos produtos químicos que podem apresentar efeitos tóxicos, e junto à Agência Europeia de Produtos Químicos, são rotulados a fim de garantir o uso seguro (HUPFFER; LAZZARETTI, 2019; LIU et al., 2022).

No Brasil ainda não há legislação específica para a segurança na utilização de nanomateriais, e dessa maneira órgãos não governamentais e internacionais norteiam os estudos de nanotoxicidade indicando as metodologias a serem utilizadas nas pesquisas, como é o caso da OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) e normas ISO (*Internacional Organization for Standardization*) (GUIDELINE; THE; OF, 2009; HUPFFER; LAZZARETTI, 2019).

Diversos estudos demonstram que as NPs apresentam a habilidade de penetrar a membrana celular, se acumulando nas células e podendo conseqüentemente induzir citotoxicidade e genotoxicidade além de toxicidade órgão-específica (NAJAH-MISSAOUI; ARNOLD; CUMMINGS, 2020).

A citotoxicidade é a capacidade de um material induzir alteração metabólica e tóxica nas células, sendo que essa observação é feita com a utilização de modelos distintos, onde se destaca o cultivo de diferentes linhagens de células em modelos *in vitro*. Existem pelo menos dois fatores relatados na literatura que determinam a citotoxicidade de diferentes tipos de nanomateriais: (1) o fato desses materiais serem internalizados pelas células e (2) a sobrecarga dos mesmos na superfície celular. Muitos estudos têm demonstrado que a internalização das nanopartículas e o excesso das mesmas na superfície da célula, podendo interferir na comunicação intercelular, são os principais desencadeadores da citotoxicidade (WANG et al., 2015).

Estudos envolvendo macrófagos alveolares e o seu efeito pró-inflamatório nos pulmões têm sugerido que estas células apresentam mecanismos específicos de captação dependendo do tamanho da nanopartícula de TiO_2 (NP TiO_2) e das suas propriedades físico-químicas (SCHERBART et al., 2011). Além disso, as NP TiO_2 podem criar poros na membrana celular sendo possível desencadear toxicidade devido a um desequilíbrio entre os íons intra e extracelulares, proteínas e outras macromoléculas importantes. Também a formação de complexos entre o nanomaterial e as macromoléculas celulares pode alterar a função celular de maneira adversa (GHOSH; CHAKRABORTY; MUKHERJEE, 2013).

A citotoxicidade via estresse oxidativo foi relatada a partir da utilização de nanopartículas de TiO_2 de diferentes tamanhos, em fibroblastos e macrófagos de camundongos (JIN et al., 2008; ZHANG et al., 2013). Também foi relatado que o estresse oxidativo está relacionado com a indução de apoptose em hepatócitos humanos após a exposição às NP TiO_2 , sendo observado dano secundário ao DNA atribuído a esse estresse oxidativo desencadeado pela presença do nanomaterial na célula (SHUKLA et al., 2013). Estudos também relacionam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que ativam neutrófilos e macrófagos durante a inflamação, ao tamanho da partícula e sua área de superfície (CHEN; YAN; LI, 2014).

Estudos demonstraram ainda que a morte celular causada pela exposição às nanopartículas de prata está associada tanto ao mecanismo de necrose quanto ao de apoptose, sendo que o grau de necrose e apoptose estavam intimamente relacionados ao tempo de exposição, à massa e ao tamanho das nanopartículas (KUMAR et al., 2015). Portanto os estudos de citotoxicidade se fazem necessários na avaliação da segurança em relação ao uso de determinada nanopartícula.

A inflamação é considerada um modulador da saúde humana, portanto é importante o conhecimento sobre o efeito que as nanopartículas têm sobre as células e o funcionamento do sistema imune (LAPPAS, 2015). Vários estudos demonstraram que as nanopartículas são capazes de iniciar uma resposta inflamatória, além de induzir o estresse oxidativo e desencadear a apoptose em leucócitos, bem como alterar o metabolismo dos macrófagos e modular a proliferação dessas no sangue (CHEN, 2010; LAPPAS, 2015; LIU et al., 2011). Além disso, Sherbart e colaboradores (2011) demonstraram que a produção de citocinas $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$ em macrófagos após exposição a diferentes NP de TiO_2 além de ser dose-dependente está relacionada com o tipo de partícula (SCHERBART et al., 2011).

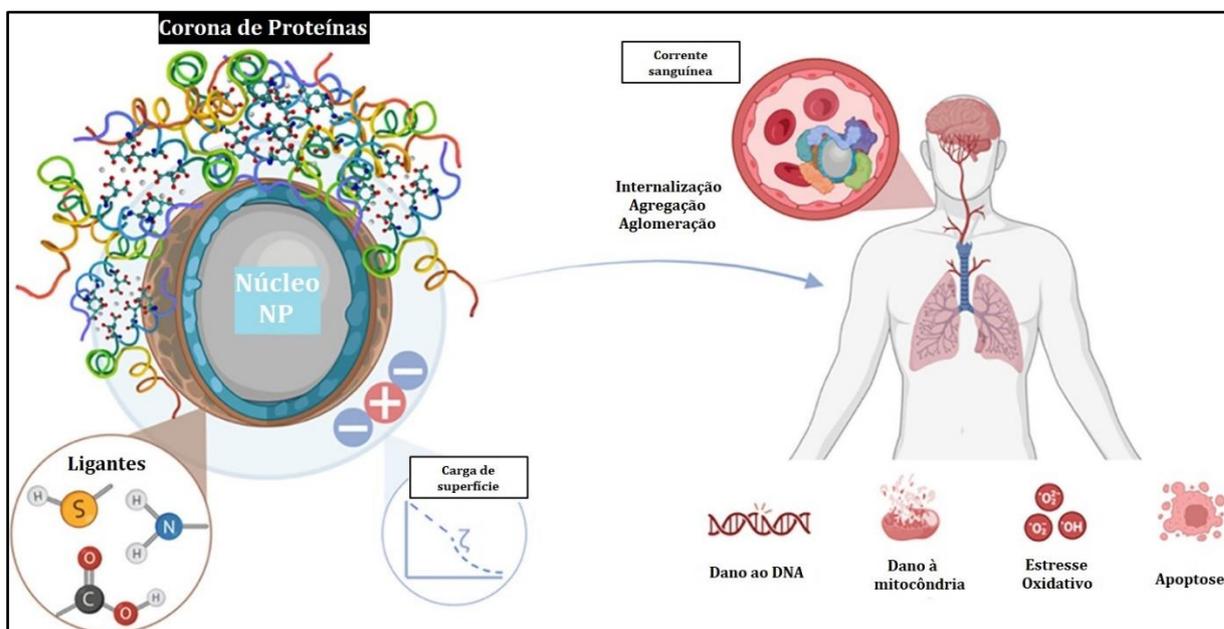
As NP de TiO_2 podem ser encontradas nas formas de aerossol, suspensão ou emulsão, sendo a inalação e a exposição dérmica as principais rotas de exposição ocupacional (SHI et al., 2013). Estudos toxicológicos e epidemiológicos têm demonstrado que a inalação dessas

nanopartículas e sua consequente deposição nos pulmões, causam efeitos adversos para o organismo principalmente no sistema respiratório e cardiovascular (SIMKÓ; MATTSSON, 2010).

Além disso, há relatos também de efeitos sobre o Sistema Nervoso Central a partir da inalação das NP TiO₂ (SIMKÓ; MATTSSON, 2010). Outros estudos sugerem também que essas nanopartículas podem ultrapassar a barreira hematoencefálica depois de serem inaladas e transportadas da cavidade nasal para o cérebro através dos nervos sensoriais olfatórios (LI et al., 2010; WANG et al., 2008).

Por meio da inalação, principal via de exposição ocupacional, essas partículas podem se acumular nos pulmões induzindo uma resposta inflamatória que desencadeia o processo de fibrose (YAZDI et al., 2010). Além disso, através do sistema circulatório as nanopartículas são levadas a outros órgãos podendo também neles se acumular e causar processo inflamatório prejudicial ao organismo (Figura 4).

Figura 4 - Transporte da NP via corrente sanguínea e possíveis efeitos ao organismo



Características da NP que influenciam no seu transporte via corrente sanguínea para os demais órgãos e seus possíveis efeitos.

Fonte: Adaptado de Sengottiyar et al., 2023 – *ACS Nano* – DOI: 10.1021/acsnano.2c06977

Huang e colaboradores relataram que a exposição às NP TiO₂ pode induzir o processo de fibrose nos rins, que são órgãos que filtram o sangue e concentram os toxicantes presentes no organismo para a excreção dos resíduos metabólicos (HUANG et al., 2015; KLAASSEN; WATKINS III, 2012). Dessa forma, uma concentração não tóxica no plasma pode alcançar

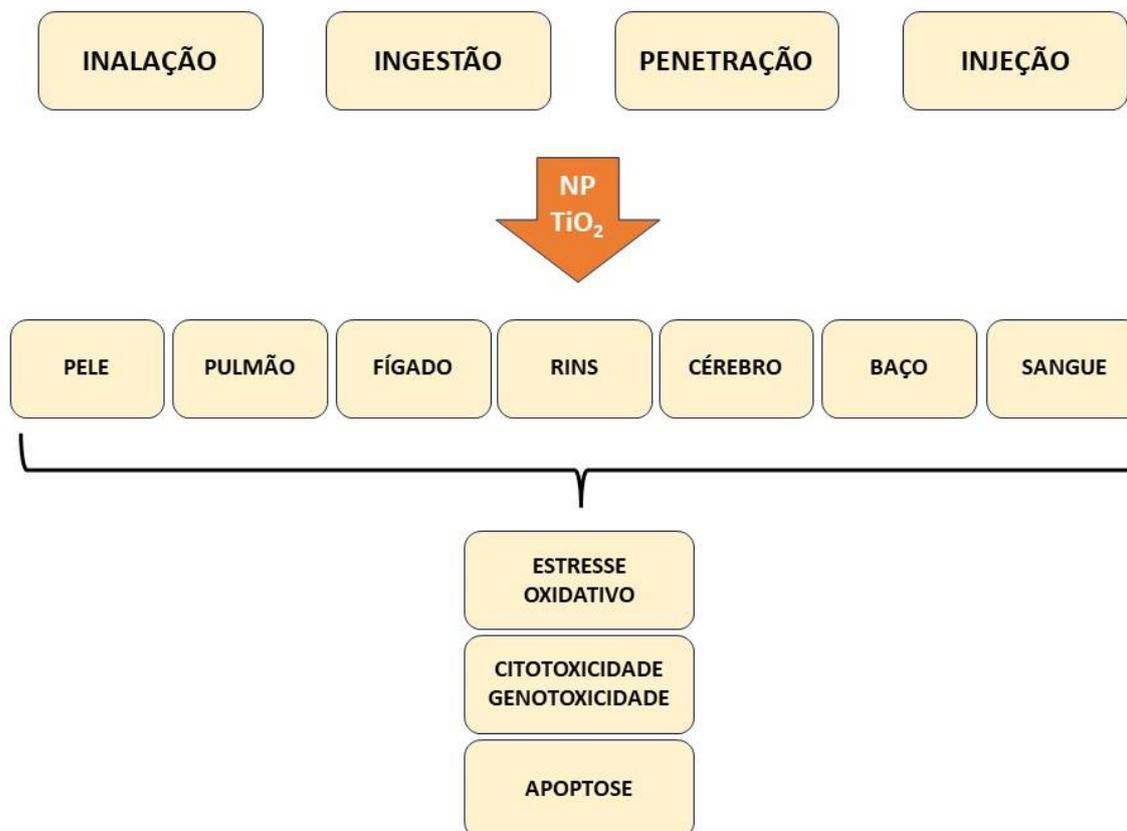
concentrações tóxicas nos rins, principalmente nos túbulos renais, contribuindo de maneira significativa para a suscetibilidade desse órgão à lesão (KLAASSEN; WATKINS III, 2012).

Em relação ao sistema imune, os nanomateriais podem induzir e estimular a produção de citocinas pró-inflamatórias pelos linfócitos T e ainda essas partículas podem se acumular em órgãos linfóides periféricos causando lesões crônicas no baço devido ao longo período de exposição (LAPPAS, 2015). Estudos com as nanopartículas de TiO_2 mostraram que as mesmas se acumulam no baço e influenciam na regulação de vias que aumentam a produção das espécies reativas de oxigênio (EROs) causando efeitos citotóxicos (WANG et al., 2011).

Park e colaboradores observaram uma elevação significativa nos níveis de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6 e $\text{TNF-}\alpha$, que se mostraram dose-dependentes após a aplicação das nanopartículas de TiO_2 em camundongos pelas primeiras 24 horas e, após a aplicação, permaneceram elevadas durante 14 dias. Também foram observados níveis elevados de citocinas Th1, como IL-12 e $\text{IFN-}\gamma$, Th2, como IL-4, IL-5 e regulatória como a IL-10. A aplicação do nanomaterial foi através de administração intra-traqueal e foi observado formação de granulomas no tecido pulmonar (LAPPAS, 2015; PARK et al., 2009).

Após a exposição à NP TiO_2 é relatado citotoxicidade via estresse oxidativo que pode desencadear a morte celular por apoptose, sendo os efeitos tóxicos dose e tempo dependentes além das características específicas de cada partícula estudada. Além disso as NP também podem causar alterações histopatológicas em diversos órgãos, como pele, pulmão, fígado, rins, cérebro e baço de mamíferos, conforme apresentado de maneira resumida na figura 5 (ZHANG; LI; YANG, 2015).

Figura 5 - Potenciais efeitos tóxicos das NP TiO₂



Órgãos e sistemas que podem ser afetados pelos potenciais efeitos tóxicos das nanopartículas de TiO₂ através de diferentes vias de exposição.

Fonte: Adaptado de Zhang et al. 2015 - *Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update*

Sendo assim, este trabalho se dedicou ao estudo da citotoxicidade e toxicidade sistêmica da nanopartícula de dióxido de titânio (NP TiO₂) funcionalizada com carboxilato de sódio para a avaliação de seus possíveis efeitos tóxicos. Como se trata de uma nanopartícula de interesse industrial é necessário que estudos direcionem se há riscos na manipulação deste nanomaterial.

Na exposição ocupacional, o trabalhador é exposto continuamente ao nanomaterial e, portanto, o ensaio de doses repetidas se faz necessário. Segundo a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), os estudos de toxicidade de doses repetidas avaliam o perfil toxicológico da substância após administração de mais de uma dose ao longo do período, permitindo avaliar os efeitos tóxicos, identificar órgãos alvo, além de efeitos fisiológicos, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos (AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2013). Para determinar esses efeitos, foi realizada a observação dos animais por 14 dias de exposição à nanopartícula, para mimetizar o tempo em que os trabalhadores ficam expostos nas plataformas da indústria petrolífera.

Para avaliação da citotoxicidade e toxicidade sistêmica dessa NP TiO₂ foram utilizados modelos *in vitro* (fibroblastos LA-9) e *in vivo* (camundongos Balb/c) já determinados pela literatura para esses ensaios (ALVES FEITOSA et al., 2022; BAHAMONDE et al., 2018; CHAN et al., 2017; GREISH et al., 2019; PEDRINO et al., 2022). Sendo assim, será possível avaliar se a utilização dessas nanopartículas de TiO₂ funcionalizadas com carboxilato de sódio é segura, principalmente para aqueles que irão manipular esse nanomaterial na rotina do seu ambiente de trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar, caracterizar e descrever os possíveis efeitos tóxicos da nanopartícula de dióxido de titânio (NP TiO₂) funcionalizada com carboxilato de sódio (-COO⁻Na⁺) de interesse para a indústria petrolífera, através de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, por determinação de citotoxicidade e toxicidade sistêmica para análise da segurança na utilização desse nanomaterial por seus manipuladores.

2.2 Objetivos específicos

Caracterização da nanopartícula de TiO₂ (NP TiO₂) funcionalizada com carboxilato de sódio, através da análise de suas características morfológicas, estruturais e físico-químicas.

In vitro:

Avaliar a citotoxicidade em fibroblastos LA-9 após exposição à NP TiO₂ através de:

- Ensaio de viabilidade celular;
- Análise de morfologia celular;
- Quantificação da produção intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs);
- Quantificação de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e TNF) no sobrenadante celular;
- Ensaio de morte celular (apoptose/necrose);
- Ensaio de clonogenicidade.

In vivo:

Avaliar a toxicidade sistêmica em camundongos Balb/c após exposição via intranasal à NP TiO₂ através de:

- Avaliação do consumo de ração e água durante o período de exposição;
- Acompanhamento do peso dos animais durante o período de exposição;
- Avaliação leucocitária no sangue, lavado broncoalveolar (LBA) e lavado da cavidade peritoneal (LCP);
- Quantificação de citocinas (INF- γ , TNF, IL-6 e IL-10) no plasma sanguíneo e lavado broncoalveolar (LBA);

- Avaliação da produção de anticorpo IgE no lavado broncoalveolar (LBA);
- Avaliação de função hepática (TGO/TGP);
- Pesagem dos pulmões;
- Análise histológica dos órgãos (encéfalo, coração, pulmões, fígado, baço e rins) para avaliação de processo inflamatório e possíveis alterações celulares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção da nanopartícula de dióxido de titânio (NP TiO₂)

A nanopartícula utilizada no presente trabalho foi cedida pelo Centro de Pesquisas, Desenvolvimento e Inovação Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES – Petrobras – Petróleo Brasileiro S.A). Trata-se de uma nanopartícula composta de núcleos de dióxido de titânio (TiO₂) sintetizada a partir da forma mineral anatase, sendo que a mesma foi recebida na forma sólida (pó). Além disso, a NP TiO₂ foi funcionalizada através de ligantes com grupos terminais de carboxilato de sódio (-COO⁻Na⁺), os quais conferem à NP a característica de formar uma dispersão homogênea em água (pH 4-10) em uma concentração de até 40% m/m de nanopartícula.

3.2 Caracterização da nanopartícula de dióxido de titânio (NP TiO₂)

3.2.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta

Esta análise de caracterização através do método de DLS foi realizada no Laboratório de Nanomedicina e Nanotoxicologia (LNN), do Instituto de Física de São Carlos (IFSC) da Universidade de São Paulo (USP). Através do DLS foi obtido o diâmetro hidrodinâmico da NP TiO₂ funcionalizada com carboxilato de sódio e sua carga superficial foi estabelecida a partir do potencial zeta. Para o ensaio, a NP TiO₂ foi suspensa (0,2 mg/mL) em água ultrapura (resistência > 18 MΩ.cm⁻¹, sistema de purificação Mega Purity - Thermo Fisher Scientific, Waltham - Massachusetts, EUA), em meio de cultivo celular DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* - Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e em solução tampão fosfato-salino (PBS 1x) sendo as amostras avaliadas por meio do espectômetro Malvern Nano-ZS (Malvern Instruments, Malvern, UK). A suspensão da NP TiO₂ em meio DMEM suplementado com SFB foi utilizada nos ensaios *in vitro* e a suspensão da mesma em PBS 1x foi utilizada nos ensaios *in vivo*. O valor do Índice de Polidispersidade (PdI) também foi descrito.

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

A análise por ATR-FTIR foi realizada para qualificar áreas específicas da NP TiO₂ bem como os seus ligantes estruturais. O ensaio foi realizado utilizando-se o equipamento Bruker Alpha P (Alemanha) equipado com janelas de cristal de diamante de 4 mm² como material reflexivo. As amostras foram analisadas na fase sólida utilizando uma resolução de 4 cm⁻¹ sendo consideradas 128 varreduras. Os dados do espectro ATR-FTIR foram analisados pelo *software* OMNIC 8.2 (Thermo Fisher Scientific) para determinação do comprimento de onda dos picos encontrados. Esta análise foi realizada no Laboratório de Superfícies e Biomateriais, do Departamento de Engenharia de Metalúrgica e de Materiais (DEMET), da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG).

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

As microfotografias da NP TiO₂ foram obtidas através de Microscopia Eletrônica de Varredura de Alta Resolução (MEV-FEG). Esta técnica fornece imagens com elevada qualidade da morfologia dos materiais, permitindo a observação da estrutura da NP TiO₂ e sua dispersão. Para esta análise foi utilizado um microscópio (Philips XL-30 FEG – *Field Emission Gun*) com ampliação de até 50.000x a uma tensão de aceleração de 25 kv (quilovolts) com um detector secundário. Esta análise foi realizada utilizando a NP TiO₂ em pó, no Laboratório de Caracterização Estrutural (LCE), do Departamento de Engenharia de Materiais (DEMA), da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

3.3 Experimentos *in vitro*

3.3.1 Fibroblastos LA-9

Os ensaios *in vitro* foram realizados utilizando fibroblastos da linhagem LA-9 obtidos no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ – código 0142). Os fibroblastos LA-9 são células aderentes oriundas do tecido adiposo conjuntivo de camundongos (*Mus musculus* da linhagem C3H/An). Os estudos foram realizados nesta linhagem celular já que os fibroblastos são células que apresentam características favoráveis para análises toxicológicas, como o fato deste tipo celular ser o principal constituinte do tecido conjuntivo, presente na maior parte dos sistemas e

órgãos dos mamíferos (ALLOUNI et al., 2012). Além disso os fibroblastos podem atuar também no sistema imune e secretar citocinas em condições inflamatórias para ampliar a imunidade (BUECHLER; TURLEY, 2018).

As células foram cultivadas em meio DMEM (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB), inativado por calor, e 1% de antibiótico (estreptomicina/penicilina 0,1 g/L) (LGC Biotecnologia) e incubadas à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. O repique foi estabelecido de acordo com o crescimento celular e confluência de 80 a 90% nos frascos de cultivo tipo T (Kasvi – 75 cm²). Para o desprendimento das células da superfície dos frascos de cultivo e posterior execução dos ensaios ou manutenção celular foi utilizado tripsina 1x (LGC Biotecnologia) por 5 minutos à 37°C.

3.3.2 Ensaio de viabilidade celular – Teste do MTT

A viabilidade celular foi determinada através do ensaio de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difeniltetrazólio) o qual se apresenta como um ensaio colorimétrico por meio do qual é possível a avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais presentes em células viáveis (MOSMANN, 1983). Para o ensaio os fibroblastos LA-9 foram cultivados em placas de 96 poços na densidade de 6x10³ células/poço e incubados à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 24h de incubação para aderência celular, os fibroblastos foram expostos à NP TiO₂ dispersa em meio DMEM nas concentrações de 250, 150 e 50 µg/mL por 24, 48 e 72 horas. Para o controle positivo as células foram expostas à solução de Extran 5% (Merck) e para o controle negativo as células foram cultivadas somente com o meio de cultivo DMEM.

Após os tempos de exposição o sobrenadante celular foi removido, a placa foi lavada 3 vezes com PBS 1x e então foram adicionados 100 µL da solução de MTT (Sigma-Aldrich®) a 0,5 mg/mL em meio DMEM, sendo as placas incubadas nas mesmas condições estabelecidas por 4 horas ao abrigo de luz. Após esse período, o sobrenadante foi novamente removido e adicionou-se 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido – Synth) sobre as células para a solubilização dos cristais de formazan gerados durante a reação e que apresentam coloração roxa.

A leitura de absorbância (densidade óptica) foi realizada em espectrofotômetro de placas (Multiskan GO - Thermo Fisher Scientific) em comprimento de onda de 570 nm. A viabilidade celular (%) foi calculada considerando-se a média do grupo controle negativo como 100%. A média da absorbância do grupo exposto à NP TiO₂ foi dividida pela média da absorbância do grupo controle negativo e multiplicada por 100. Foram realizados três experimentos independentes em quadruplicata.

3.3.3 Análise de morfologia celular

Para a análise das características morfológicas dos fibroblastos LA-9 durante a exposição à NP TiO₂, as células foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de 6x10³ células/poço e incubadas à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 24h de incubação para aderência celular, os fibroblastos foram expostos à NP TiO₂ nas concentrações de 250, 150 e 50 µg/mL por 24, 48 e 72 horas. Para o controle positivo as células foram expostas à solução de Extran 5% (Merck) e para o controle negativo as células foram cultivadas somente com o meio de cultivo DMEM. Após a exposição às diferentes concentrações de NP TiO₂, as microfotografias para observação da morfologia dos fibroblastos foram obtidas por meio de microscópio óptico invertido (Zeiss) em aumento de 100x, utilizando o *software* Future WinJoe™. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

3.3.4 Ensaio de produção intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

A produção intracelular de EROs foi avaliada pelo método descrito por Wan e colaboradores em 1993 (WAN; MYUNG; LAU, 1993) utilizando-se a sonda de fluorescência DCFH-DA (*2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate* – Diacetato de 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína) a qual é um composto estável e lipofílico que atravessa a membrana celular. No interior da célula as esterases clivam os grupos acetatos produzindo o DCFH (2',7'-Diclorodihidrofluoresceína) que devido à sua polaridade fica contido no citoplasma. Por meio da oxidação celular o DCFH é oxidado formando o produto fluorescente DCF, o qual é proporcional à capacidade oxidativa da célula (WAN; MYUNG; LAU, 1993).

Em placas pretas de microtitulação de 96 poços de fundo plano os fibroblastos LA-9 foram cultivados na concentração de 1x10⁴ células/poço dispersas em meio DMEM. As placas foram incubadas em estufa sob tensão constante de 5% de CO₂ à 37°C por 24 horas para aderência celular. Após esse período, as células foram expostas às diferentes concentrações da NP TiO₂ (250, 150 e 50 µg/mL) dispersas em meio DMEM sem fenol por 24 horas. Foram realizados controle negativo (utilizando somente DMEM sem fenol) e o controle positivo foi feito com solução de H₂O₂ (peróxido de hidrogênio) na concentração de 0,1 mM diluído em meio DMEM sem fenol pelo período de 30 minutos antes da adição da sonda de fluorescência. Também foram feitos brancos, somente contendo meio de cultivo e com meio de cultivo + NP TiO₂ para cada uma das concentrações, para se excluir possíveis interferências da autofluorescência da nanopartícula na leitura.

Após o tempo de exposição à NP o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados 2 vezes com solução PBS 1x. Adicionou-se então sobre as células a solução de 100 μM da sonda DCFH-DA (Sigma-Aldrich®) diluído em meio DMEM sem fenol e sem SFB, sendo a placa incubada ao abrigo de luz por 30 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados três vezes com solução PBS 1x para eliminar o DCFH-DA que não penetrou nas células. Após a lavagem adicionou-se 100 μL /poço de PBS 1x e foi feita a leitura de fluorescência em leitora de microplacas (Spectra MAX i3 - Molecular Devices) em 485-530 nm.

A porcentagem de produção intracelular de EROs nos grupos experimentais foi calculada usando a média de emissão de fluorescência do grupo exposto à NP TiO_2 dividida pela média de emissão do grupo controle negativo e multiplicada por 100. Foram realizados três experimentos independentes em quadruplicata.

3.3.5 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante celular – Ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA

Para a quantificação das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (Interleucina 6) e TNF (*Tumor Necrosis Factor* – Fator de Necrose Tumoral) foi realizado o ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). Os fibroblastos LA-9 foram cultivados em placas de 96 poços na densidade de 1×10^4 células/poço e incubadas à 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após 24h de incubação para aderência celular, os fibroblastos foram expostos à NP TiO_2 nas concentrações de 250, 150 e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 24 horas. Após o tempo de exposição o sobrenadante celular foi coletado.

A quantificação das citocinas IL-6 e TNF foi realizada segundo as instruções dos kits de ELISA utilizados (BD Biosciences). Inicialmente foi realizada a sensibilização das placas com 100 μL /poço de solução contendo o anticorpo monoclonal de captura (anticorpo primário) anti cada citocina, diluído em tampão carbonato 0,1 M - pH 9,5 para IL-6 e em tampão fosfato 0,2 M - pH 6,5 para TNF. As placas foram então incubadas por até 18 horas a 4°C . Após este período foi realizada a lavagem das placas, por 3 vezes com 300 μL /poço de solução de lavagem (PBS 1x + Tween 20 a 0,05%, pH 7,4). Posteriormente à lavagem foram acrescentados 200 μL /poço de solução bloqueio (PBS 1x + albumina 1%) para bloquear os sítios de ligações inespecíficas, sendo as placas incubadas por 1 hora à temperatura ambiente. Então, as placas passaram pela etapa de lavagem novamente e foram adicionados na placa 50 μL /poço das amostras do sobrenadante celular (pool de cada concentração em triplicata para cada

experimento) e 50 μL /poço da curva padrão recombinante de cada citocina, sendo a placa incubada por 2 horas em temperatura ambiente.

Após o período de incubação, foi realizada nova etapa de lavagem das placas e em seguida foram adicionados 100 μL /poço do anticorpo de detecção (anticorpo secundário biotilado) anti cada citocina com a enzima conjugada estreptavidina – HRP (*Horseradish Peroxidase*), sendo as placas incubadas por 1 hora e 30 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após este período, as placas foram lavadas e aplicou-se ao abrigo de luz, 100 μL /poço do substrato (solução 1:1 de tetrametilbenzidina - TMB e peróxido de hidrogênio - H_2O_2) e as placas foram incubadas, ainda ao abrigo de luz, de 15 a 30 minutos aproximadamente. Em seguida, a reação foi bloqueada com a aplicação de 50 μL /poço de ácido sulfúrico (H_2SO_4) 2 N. A leitura de absorbância foi realizada no comprimento de onda de 450 nm, utilizando o leitor de placas MultiSkan Go (Thermo Fisher), sendo as concentrações calculadas em pg/mL a partir da curva padrão de cada citocina. Foram realizados três experimentos em triplicata.

3.3.6 Ensaio de morte celular por citometria de fluxo

Para avaliação do mecanismo de morte celular foi realizada a análise por citometria de fluxo utilizando o kit de detecção PE Anexina V (BD Biosciences), o qual utiliza os marcadores PE Anexina V (Anexina V conjugada ao fluorocromo PE - *Phycoerythrin* – Ficoeritrina) e 7AAD (7-Aminoactinomycin D – 7-Aminoactinomicina D) para determinação da morte celular por necrose ou apoptose nos estágios inicial ou tardio. Células apoptóticas expressam a fosfatidilserina (PS – *Phosphatidylserine*) a qual possui alta afinidade à anexina V conjugada ao PE e quando as células estão em apoptose tardia as mesmas perdem a integridade da membrana celular, assim como as células necróticas, e se tornam permeáveis ao corante vital 7AAD, que é um intercalador de DNA (ZIMMERMANN; MEYER, 2011).

Para o ensaio os fibroblastos LA-9 foram cultivados em placas de 24 poços na densidade de 1×10^5 células/poço e incubadas à 37°C em atmosfera de 5% de CO_2 . Após 24h de incubação para aderência celular, os fibroblastos foram expostos à NP TiO_2 nas concentrações de 250, 150 e 50 $\mu\text{g/mL}$ por 24 horas. Para o controle positivo foram adicionados 500 μM /poço de Camptotecina (Sigma-Aldrich®). Após o tempo 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 não haver perda das células mortas que consequentemente não estariam aderidas na placa de cultivo celular. Então, aplicou-se 200 μL /poço de tampão de

ligação (kit) e adicionou-se 1 µL/poço de cada um dos marcadores, evitando luz direta sobre a placa, da seguinte forma: 7AAD + PE Anexina V para os grupos expostos à NP TiO₂ e no grupo controle de células viáveis e somente PE Anexina V para o grupo controle positivo com Camptotecina. As placas foram então incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo de luz.

Posteriormente, a placa foi centrifugada por 10 minutos, a 1500 rpm e a 4 °C. O sobrenadante foi removido e aos poços foram adicionados 300 µL de tampão de ligação. Por fim, as células foram removidas dos poços com auxílio de um raspador de células (*cell scraper*) e transferidas para microtubos que foram mantidos no gelo até o momento da análise no citômetro de fluxo (Accuri™ C6 - BD Biosciences) localizado no Laboratório de Biologia do Envelhecimento (LABEN), no Departamento de Gerontologia (DGero) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob responsabilidade da Prof.^a Dra. Márcia Cominetti.

Para o controle de células mortas, após aplicar 200 µL/poço de tampão de ligação, os fibroblastos foram cuidadosamente removidos dos poços com auxílio do raspador de células e foram transferidos para microtubos e aquecidos a 80 °C, através de banho seco, por 2 horas. Após resfriamento, foram adicionados os marcadores: 1 µL/poço de 7AAD (para os controles de 7AAD) e 1 µL/poço de PE Anexina V (para os controles de PE Anexina V) sendo os microtubos incubados por 15 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo de luz. Após esse período, os microtubos foram centrifugados por 5 minutos a 1500 rpm e a 4°C. Então o sobrenadante foi removido e adicionou-se 300 µL de tampão de ligação, sendo os microtubos mantidos no gelo. Também foi realizado controle negativo de células sem adição de marcadores que foi utilizado para calibração do equipamento.

A análise no citômetro de fluxo foi realizada considerando-se 10.000 eventos por *gate* e utilizando o *software* FlowJo™ versão 10 (BD Biosciences). Os dados foram demonstrados num representativo em *dot plot* no qual cada quadrante (Q) representa respectivamente: Q1 – células necróticas (PE - / 7AAD +), Q2 – células em apoptose tardia (PE + / 7AAD +), Q3 – células viáveis (PE - / 7AAD -) e Q4 – células em apoptose inicial (PE + / 7AAD -). Foram realizados dois experimentos independentes em quadruplicata.

3.3.7 Ensaio de Clonogenicidade

O ensaio clonogênico foi realizado para observação de possíveis efeitos citotóxicos aos fibroblastos LA-9 num período maior após as 24h de exposição à NP TiO₂. Este ensaio foi descrito pela primeira vez em 1956 (PUCK; MARCUS, 1956) e permite observar a integridade

reprodutiva celular, ou seja, se a célula após a exposição a determinado agente é capaz de se dividir e produzir um grande número de progênie (colônia), não se limitando a uma ou duas mitoses somente (FRANKEN et al., 2006; MUNSHI; HOBBS; MEYN, 2005).

Para o ensaio os fibroblastos LA-9 foram cultivados em placas de 6 poços na densidade de 100 células/poço e incubadas à 37°C em atmosfera de 5% de CO₂. Após 24h de incubação para aderência celular, os fibroblastos foram expostos à NP TiO₂ nas concentrações de 250, 150 e 50 µg/mL por 24 horas. Para o controle negativo as células foram cultivadas somente com o meio de cultivo DMEM. Após o período de exposição, o sobrenadante celular foi descartado e a placa foi lavada 3 vezes com PBS 1x. Adicionou-se então meio DMEM fresco e suplementado com 10% de SFB e as placas foram incubadas nas mesmas condições.

Após 7 dias, as células foram fixadas com 1 mL/poço de metanol (CH₃OH - Synth) gelado por 5 minutos. O metanol foi então removido e adicionou-se 1 mL/poço de solução de cristal violeta (C₂₄H₂₈N₃Cl – 0,1% - Synth) por 1 minuto para coloração das colônias celulares. Após esse período, o cristal violeta foi removido e os poços foram lavados com água destilada para que a coloração de fundo fosse removida e apenas as colônias celulares permanecessem coradas. Os poços foram então fotografados e as colônias foram contadas utilizando o *software* ImageJ 1.53a. (Wayne Rasband, *National Institutes of Health*, EUA).

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 a exposição à NP. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata. Os cálculos foram realizados utilizando as seguintes fórmulas:

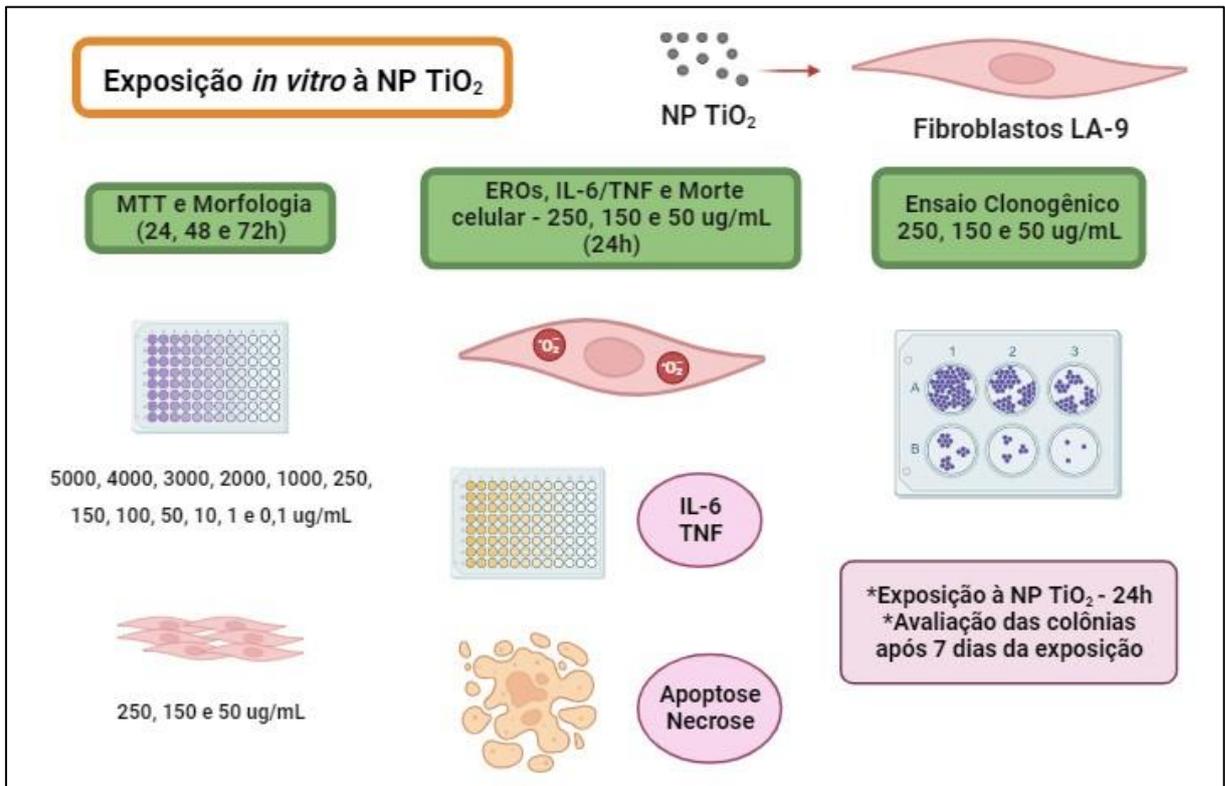
$$PE \text{ (Eficiência de plaqueamento)} = \frac{\text{n}^\circ \text{ de colônias formadas}}{\text{n}^\circ \text{ de células semeadas inicialmente}} \times 100$$

$$SF \text{ (Fração de Sobrevivência)} = \frac{PE \text{ médio dos grupos experimentais}}{PE \text{ médio do controle negativo}} \times 100$$

3.3.8 Resumo gráfico do delineamento experimental *in vitro*

O resumo gráfico do delineamento experimental *in vitro*, contendo a linhagem celular, os ensaios realizados bem como as concentrações da NP TiO₂, o tempo de exposição e de análise, pode ser observado na figura 6.

Figura 6 - Delineamento experimental *in vitro*



Fonte: Elaborado pela autora em BioRender.com

3.4 Experimentos *in vivo*

O delineamento experimental *in vivo* se pautou nas recomendações dos Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos, sob parecer nº 9954280318 (Anexo A e B).

3.4.1 Animais

Foram utilizados camundongos fêmea da linhagem Balb/c com idade entre 8 e 10 semanas, pesando de 18 a 22 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo (USP), campus de Ribeirão Preto. Esses animais apresentam o certificado *Specified Pathogen Free* - SPF, o que garante que os mesmos são livres de patógenos. Todos os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia e Patologia da Universidade Federal de São Carlos (DMP - UFSCar), sendo alocados em isoladores ventilados (20 trocas de ar/hora - ALESCO) com livre acesso à água e ração para roedores, sob ciclo claro/escuro de 12 horas e temperatura entre 20 e 24°C. Somente após o período de ambientação dos animais, em torno de 2 a 3 semanas, é que se iniciaram os experimentos.

3.4.2 Exposição à nanopartícula de TiO₂

Os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos contendo 6 animais em cada grupo para o protocolo experimental de 14 dias: grupo controle negativo (C -) que não foi exposto à NP e recebeu somente PBS 1x estéril, solução na qual a NP foi dispersa (G1); grupo exposto à 500 µg da NP TiO₂ (G2); grupo exposto à 250 µg da NP TiO₂ (G3); grupo exposto à 100 µg da NP TiO₂ (G4) e grupo exposto à 50 µg da NP TiO₂ (G5). A via de exposição à NP foi a intranasal (ilustrada na figura 7), por ser tratar de uma NP em pó e por esta via permitir que a NP passe pela cavidade nasal e, dessa forma, na região olfativa, há a possibilidade da mesma ser transportada para o sistema nervoso central (ERDÓ et al., 2018) permitindo avaliar o potencial efeito neurotóxico já relatado para outras nanopartículas de TiO₂ (SONG et al., 2015).

A exposição foi realizada em quatro doses, considerando a exposição no ambiente de trabalho da indústria petrolífera: 1º dia, 4º dia, 8º dia e 12º dia. Em cada uma das doses, foi aplicado a quantidade estabelecida da NP TiO₂ para cada grupo experimental (500, 250, 100 e 50 µg) suspensa em PBS 1x estéril, sendo aplicado 40 µL de solução por animal. Foram realizados dois experimentos independentes, totalizando um n = 12 animais para cada grupo experimental, para avaliação da reprodutibilidade dos dados, sendo utilizado um único lote da NP TiO₂ em ambos os experimentos para determinar suas variabilidades de forma segura e com intervalo de confiança.

Figura 7 - Via intranasal

Ilustração da via intranasal, utilizada para a exposição à NP TiO₂.

Fonte: Manual de Cuidados e Procedimentos com Animais de Laboratório do Biotério de Produção e Experimentação da FCF-IQ/USP (2013)

3.4.3 Consumo de ração e água e verificação do peso dos animais durante a exposição à NP TiO₂

Durante o período de exposição à NP foram investigados sinais indicativos de toxicidade sistêmica nos animais, tais como alterações no consumo de ração e água e variação no peso. A avaliação do peso corporal foi realizada no início do protocolo experimental, após 7 dias e ao término da exposição à NP TiO₂ (dias 1, 7 e 14). Já a quantidade de ração e o volume de água consumido pelos diferentes grupos experimentais foram mensurados durante o período de exposição da seguinte maneira: no 1º dia de experimentação foram disponibilizadas quantidades definidas de ração (100 g) e de água (300 mL) e nos dias de limpeza dos isoladores dos camundongos (2 vezes por semana) as quantidades de ração e água foram repostas e registradas para os cálculos de consumo.

3.4.4 Avaliação leucocitária no sangue, lavado broncoalveolar (LBA) e lavado da cavidade peritoneal (LCP)

No 14º dia os animais foram previamente anestesiados por meio de inalação por Isoflurano (BioChimico) e a coleta de sangue foi obtida por meio de punção da veia braquial esquerda utilizando-se EDTA (*Ethylenediamine tetraacetic acid* - Ácido etilenodiamino tetraacético) como anticoagulante na concentração final de aproximadamente 0,3 M. O plasma, utilizado nos ensaios de função hepática (TGO e TGP) e quantificação de citocinas (ELISA) foi obtido após a centrifugação do sangue total, a 1500 rpm por 15 minutos. Após a coleta de

sangue, os animais foram eutanasiados por sangria total para coleta dos lavados (LBA e LCP) e retirada dos órgãos. Na recuperação do LBA e do LCP utilizou-se respectivamente 1 mL e 3 mL de PBS, contendo 0,5% de citrato de sódio (PBS/Citrato).

Para a contagem do número global de leucócitos, o sangue e os lavados foram diluídos (1:20) em solução de Turk (ácido acético 3% e azul de metileno 1%) e a contagem foi realizada em câmara de Neubauer, obtendo-se o número de leucócitos por milímetro cúbico (mm^3). Para a contagem diferencial dos leucócitos foram feitas lâminas de esfregaço sanguíneo e lâminas realizadas em cytopspin (Serocito® modelo 2400) em rotação de 1500 rpm durante 3 minutos. As lâminas foram coradas utilizando o kit Panótico Rápido (Laborclin) e a contagem foi feita através de microscópio óptico (Nikon YS2) em aumento de 1000x.

3.4.5 Quantificação de citocinas no plasma sanguíneo e lavado broncoalveolar (LBA) e anticorpo IgE no LBA – Ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA

A partir do plasma e do LBA dos animais foram quantificadas as citocinas INF- γ (interferon-gama), TNF (*Tumor Necrosis Factor* - Fator de Necrose Tumoral), IL-6 (Interleucina 6) e IL-10 (Interleucina 10). No LBA foi realizada também a detecção de anticorpos IgE (Imunoglobulina E), já que é relatado o aumento da produção deste anticorpo no LBA após exposição a nanopartículas de TiO_2 por meio de instilação intraqueal (LAPPAS, 2015; PARK et al., 2009). Todo o procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences) conforme descrito no item 3.3.5. As amostras foram analisadas em triplicata a partir de um pool/grupo. Foram realizados dois experimentos independentes.

3.4.6 Análise de função hepática por meio da Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO) e Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP)

Em busca de possíveis alterações na função hepática dos animais após exposição a NP TiO_2 , foi realizada a quantificação das transaminases oxalacética e pirúvica. O procedimento foi realizado de acordo com as instruções do fabricante (LabTest) com pequenas modificações para otimização da quantidade de amostra utilizada. Trata-se de um ensaio colorimétrico que mede de maneira indireta as enzimas transaminases TGO e TGP a partir da produção de oxalacetato e piruvato respectivamente, que em meio alcalino produzem cor.

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 (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, foram adicionados 100 µL do reagente de cor e incubou-se por 20 minutos em temperatura ambiente. Após esse período, adicionou-se 1 mL da solução de NaOH (0,4 mol/L) e aguardou-se 5 minutos. Ao final, foram transferidos 300 µL da solução contida nos tubos de ensaio para placas de microtitulação de 96 poços. A leitura foi realizada em 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 com análise individual para cada animal dos grupos e em triplicata.

3.4.7 Coleta de órgãos: pesagem dos pulmões e análise histológica

Os órgãos colhidos durante a necropsia de cada animal experimental foram: encéfalo, coração, pulmões, fígado, baço e rins; os mesmos foram previamente lavados em solução PBS 1x e cuidadosamente secos em papel toalha. Os pulmões dos camundongos de cada grupo experimental foram pesados em balança semi-analítica. A fixação dos tecidos foi realizada com formol tamponado 10% (48h) e após, mantidos em álcool etílico 70%. Três amostras teciduais de cada grupo experimental foram selecionadas e as mesmas foram conduzidas para o processamento histológico de rotina, que consistiu de etapas de desidratação dos tecidos seguido de etapa de clareamento 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 µm, através de um micrótomo. As lâminas foram coradas com HE (Hematoxilina-Eosina).

O processamento histológico dos tecidos pertencentes ao primeiro experimento, foi realizado pela técnica Ana Maria da Rocha do Laboratório de Citopatologia, do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) da Universidade de São Paulo (USP), sob à responsabilidade do Prof. Dr. Edson Soares Garcia. Já o processamento histológico dos tecidos pertencentes ao segundo experimento foi realizado no laboratório de Patologia, do Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). A leitura de todas as lâminas histopatológicas foi realizada pela médica veterinária patologista Dra. Mayara Caroline Rosolem (PatoVet – Laboratório de Patologia Veterinária), em um microscópio binocular óptico da marca Opticam (modelo O400S), na objetiva de 40x. Para cada um dos experimentos foram colhidos três fragmentos

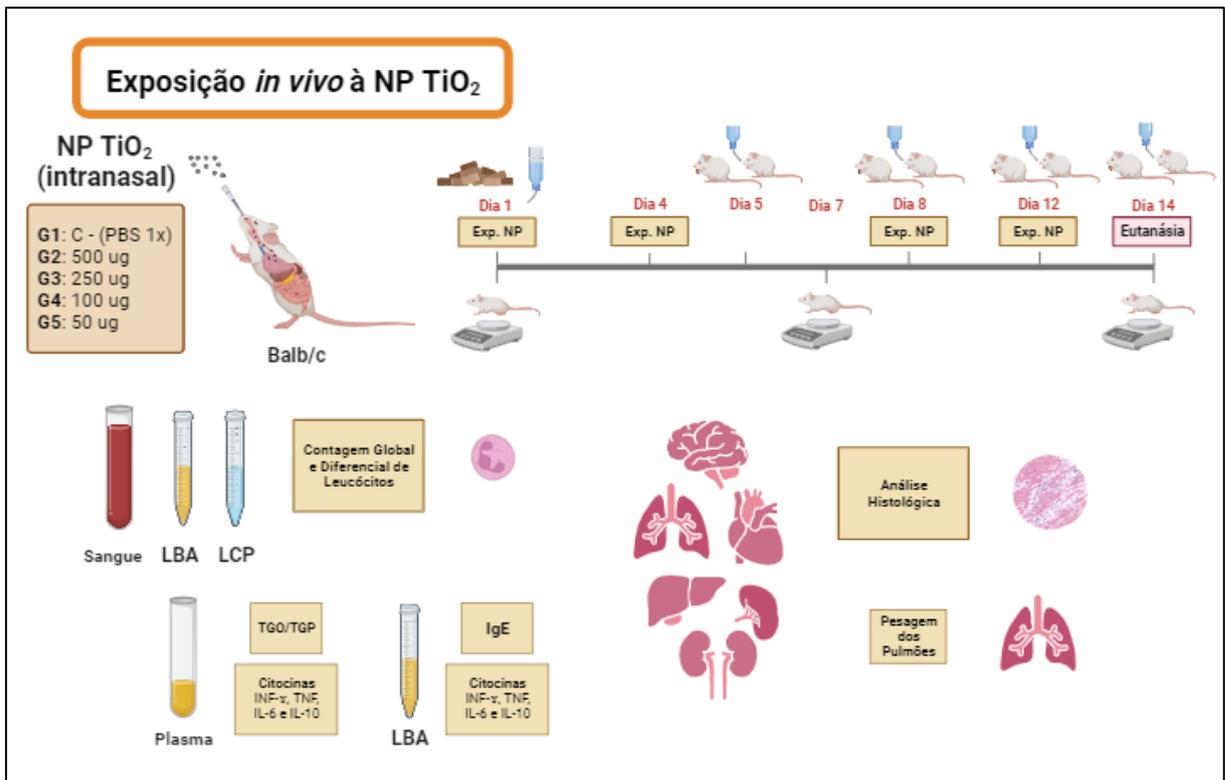
oriundos de três órgãos íntegros (colhidos às cegas e analisados em sua totalidade). A leitura buscou verificar focos de processo inflamatório, processos degenerativos celulares e necrose.

As lâminas foram escaneadas no *Pannoramic Desk*, da 3D Histech, que é um Equipamento Multiusuários (EMU) da FAPESP (2014/50256-4), localizado no Laboratório de Imunologia Aplicada, do Departamento de Genética e Evolução (DGE) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar), sob a responsabilidade do Prof. Dr. Ricardo Carneiro Borra. As imagens geradas foram feitas no programa *Pannoramic Viewer 1.15.4*, também da 3D Histech.

3.4.8 Resumo gráfico do delineamento experimental *in vivo*

O resumo gráfico do delineamento experimental *in vivo*, contendo a linhagem animal, via e protocolo de exposição bem como as concentrações da NP TiO₂ e as análises realizadas, pode ser observado na figura 8.

Figura 8 - Delineamento experimental *in vivo*



Fonte: Elaborado pela autora em BioRender.com

3.5 Análise Estatística

Os resultados foram expressos com média \pm DP (Desvio Padrão) e analisados no programa *GraphPad Prism*, versão 7 (2018). Foram aplicados os Testes de Normalidade Shapiro-Wilk, Kolmogorov Smirnov ou D'Agostino & Pearson dependendo do número de amostras analisadas. Posteriormente, para os dados paramétricos foi utilizado o teste *One-way ANOVA (One-way Analysis of Variance)* ou *Two-way ANOVA (Two-way Analysis of Variance)* e o pós-teste de Tukey (*Tukey's Multiple Comparison Test*). Já para os dados não-paramétricos foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn (*Dunn's Multiple Comparison Test*). A significância estatística foi estabelecida em valores de $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização da NP TiO₂

4.1.1 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS) e Potencial Zeta

A caracterização da NP TiO₂ em água ultrapura, meio de cultivo DMEM e PBS 1x é apresentada na tabela 1 e a figura 9 apresenta o gráfico de tamanho das dispersões da NP nos diferentes meios. O diâmetro hidrodinâmico em água foi em torno de $3,57 \pm 1,97$ nm. O potencial zeta mensurado revelou uma carga negativa de -20 ± 3 mV da NP TiO₂ na água devido aos ligantes de ácido carboxílico ($-\text{COO}^-\text{Na}^+$). Sugere-se que a dispersão da NP em meio DMEM suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) induziu a agregação das nanopartículas e formação de uma corona proteica em sua superfície como é demonstrado com o aumento do diâmetro hidrodinâmico para $7,62 \pm 0,59$ nm. Além disso, o potencial zeta aumenta para $-11 \pm 2,6$ mV em função da adsorção de proteínas.

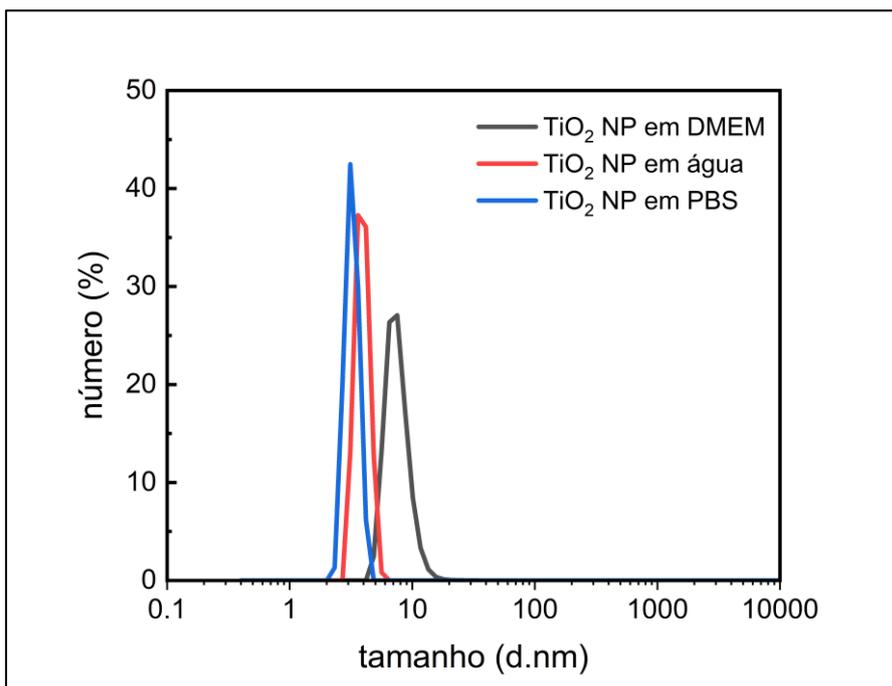
Já o diâmetro hidrodinâmico em PBS 1x foi em torno de $2,96 \pm 1,82$ nm e o potencial zeta foi de $-18 \pm 1,2$ mV, valores próximos ao encontrado para a dispersão em água. Todos os solventes revelaram valores de índice de polidispersividade em torno de 0,5 e 0,6, o qual é um indicativo de dispersão heterogênea da NP TiO₂.

Tabela 1 - Diâmetro hidrodinâmico, PDI e potencial zeta da NP TiO₂ em água ultrapura, meio de cultivo DMEM suplementado com Soro Fetal Bovino (SFB) e PBS 1x

Suspensão de NP TiO ₂	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de Polidispersividade (PDI)	Potencial Zeta (mV)
Água ultrapura	$3,57 \pm 1,97$	$0,548 \pm 0,121$	-20 ± 3
DMEM	$7,62 \pm 0,59$	$0,553 \pm 0,064$	$-11 \pm 2,6$
PBS 1x	$2,96 \pm 1,82$	$0,675 \pm 0,126$	$-18 \pm 1,2$

Os valores representam a média \pm DP obtidos através de 3 medições diferentes feitas em triplicata, sendo que para cada uma das medidas, o programa do espectômetro Malvern Nano-ZS, fornece 20 medidas, totalizando 180 medidas. Concentração da suspensão de NP TiO₂: 0,2 mg/mL.

Figura 9 - Gráfico de dispersão da NP TiO₂

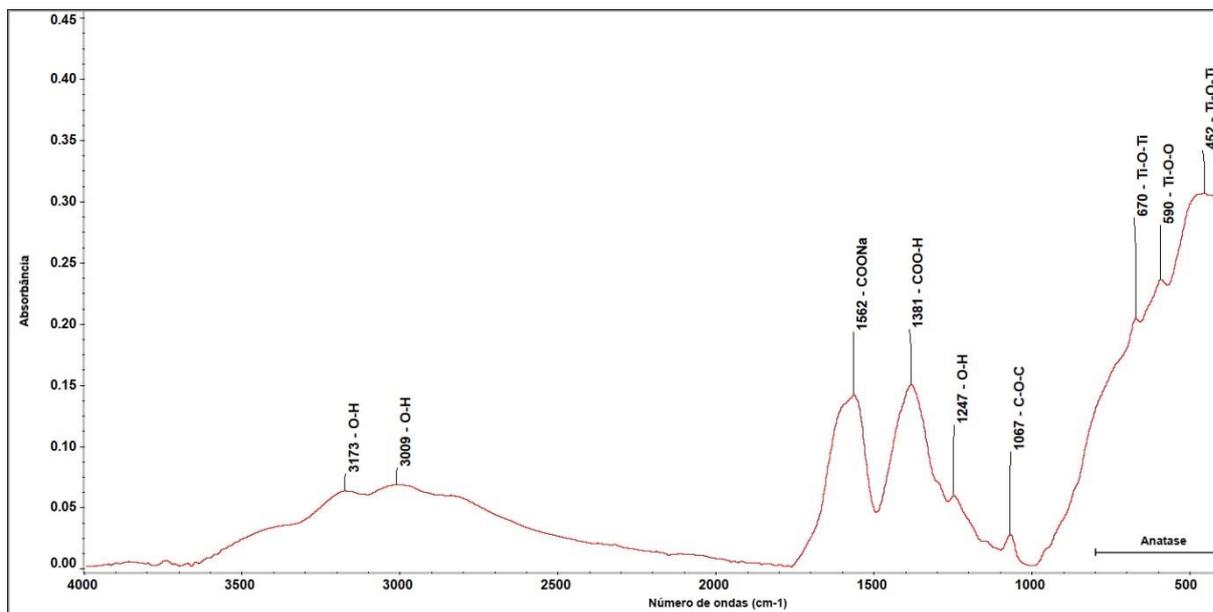


Tamanho das dispersões da NP TiO₂ em diferentes meios (DMEM, água e PBS) obtidos pela técnica de DLS.

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

A figura 10 apresenta o espectro ATR-FTIR obtido para a NP TiO₂ o qual mostra picos de 452, 590, 670, 1067, 1247, 1381, 1562, 3009 e 3173 cm⁻¹. Os picos que se encontram na faixa de 400 à 1000 cm⁻¹ estão relacionados à vibração de alongamento de Ti-O-Ti. Já os picos de 452 e 670 cm⁻¹ são picos regulares para o cristal do tipo anatase do qual a NP TiO₂ é constituída. Outros dois picos relevantes são os de 1381 cm⁻¹, associado a grupos carboxílicos (COO-H) e 1562 cm⁻¹ pico característico de COONa que demonstram a funcionalização da NP TiO₂ com grupos terminais de carboxilato de sódio (-COO⁻Na⁺). O restante dos picos representa: 590 cm⁻¹ (ligação Ti-O-O), 1067 cm⁻¹ (vibração de alongamento C-O-C), 1247 cm⁻¹ (vibração de alongamento O-H), e de 3000 a 3600 cm⁻¹ (vibração de alongamento O-H livre ou ligado a grupos hidroxil).

Figura 10 - Espectroscopia de Infravermelho (ATR-FTIR) da NP TiO₂

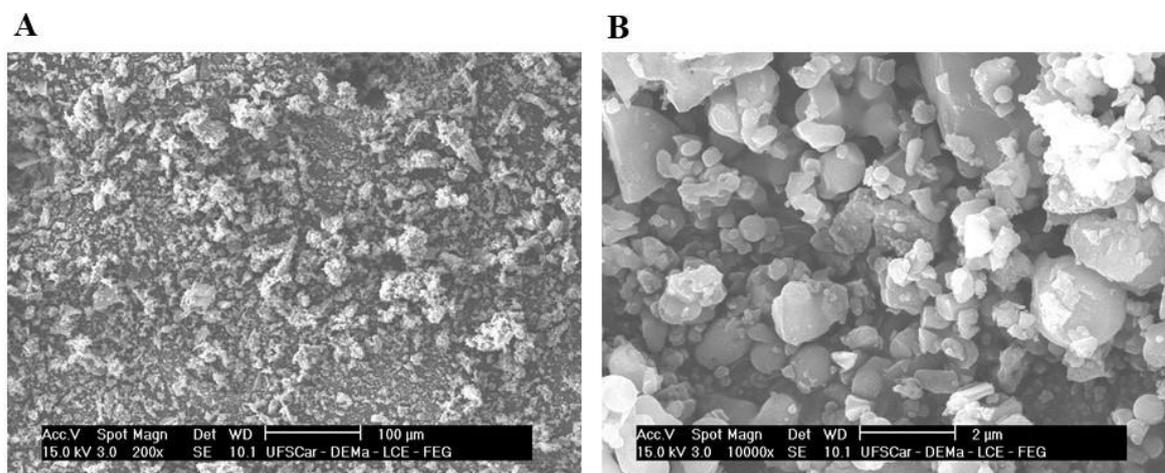


Espectros ATR-FTIR da NP TiO₂ com identificação de cada pico pela fórmula molecular.

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

A figura 11 apresenta as microfotografias da NP TiO₂ através de microscopia eletrônica MEV-FEG. É possível observar a estrutura da NP, que se sugere ser uma estrutura cristalina, devido a análise de espectroscopia de infravermelho, bem como a sua distribuição heterogênea, corroborada pelos índices de polidispersividade, e presença de aglomerados.

Figura 11 - Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV-FEG) da NP TiO₂



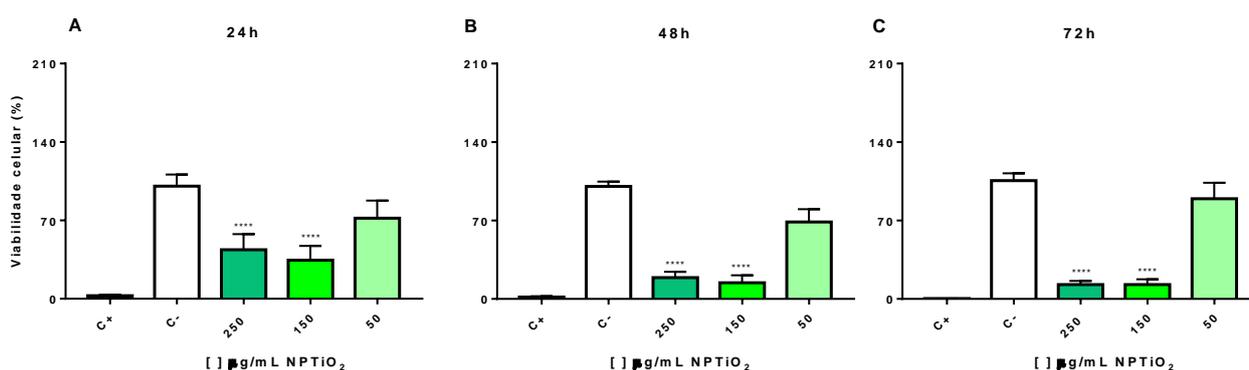
Microfotografias da NP TiO₂ em pó obtida através de MEV-FEG em 200x (A) e 10000x (B).

4.2 *In vitro* – Fibroblastos LA-9

4.2.1 Viabilidade celular

O ensaio de viabilidade celular de fibroblastos LA-9 após exposição à NP TiO₂ apresentou redução (abaixo de 70%) da porcentagem da viabilidade celular em função das concentrações de NP e períodos de exposição (Figura 12A, 12B e 12C). Para as concentrações de 250 e 150 µg/mL de NP TiO₂, ocorre redução significativa da viabilidade celular nos três períodos (24, 48 e 72h) a qual se acentua ao longo do tempo. Para o período de 24h (12A), a média da porcentagem de viabilidade celular é de 43,79% ± 13,96 para a concentração de 250 µg/mL, 34,4% ± 12,77 para a de 150 µg/mL e 71,89% ± 15,77 para a de 50 µg/mL de NP TiO₂, quando comparadas ao grupo controle negativo C- (100% ± 11,38). Para o período de 48h (12B), a média da porcentagem de viabilidade celular é de 18,98% ± 5,21 para a concentração de 250 µg/mL, 14,47% ± 6,58 para a de 150 µg/mL e 68,76% ± 11,37 para a de 50 µg/mL de NP TiO₂, quando comparadas ao grupo controle negativo C- (100% ± 4,35). E para o período de 72h (12C), a média da porcentagem de viabilidade celular é de 12,81% ± 3,23 para a concentração de 250 µg/mL, 12,81% ± 4,72 para a de 150 µg/mL e 89,37% ± 14,28 para a de 50 µg/mL de NP TiO₂, quando comparadas ao grupo controle negativo C- (100% ± 6,63).

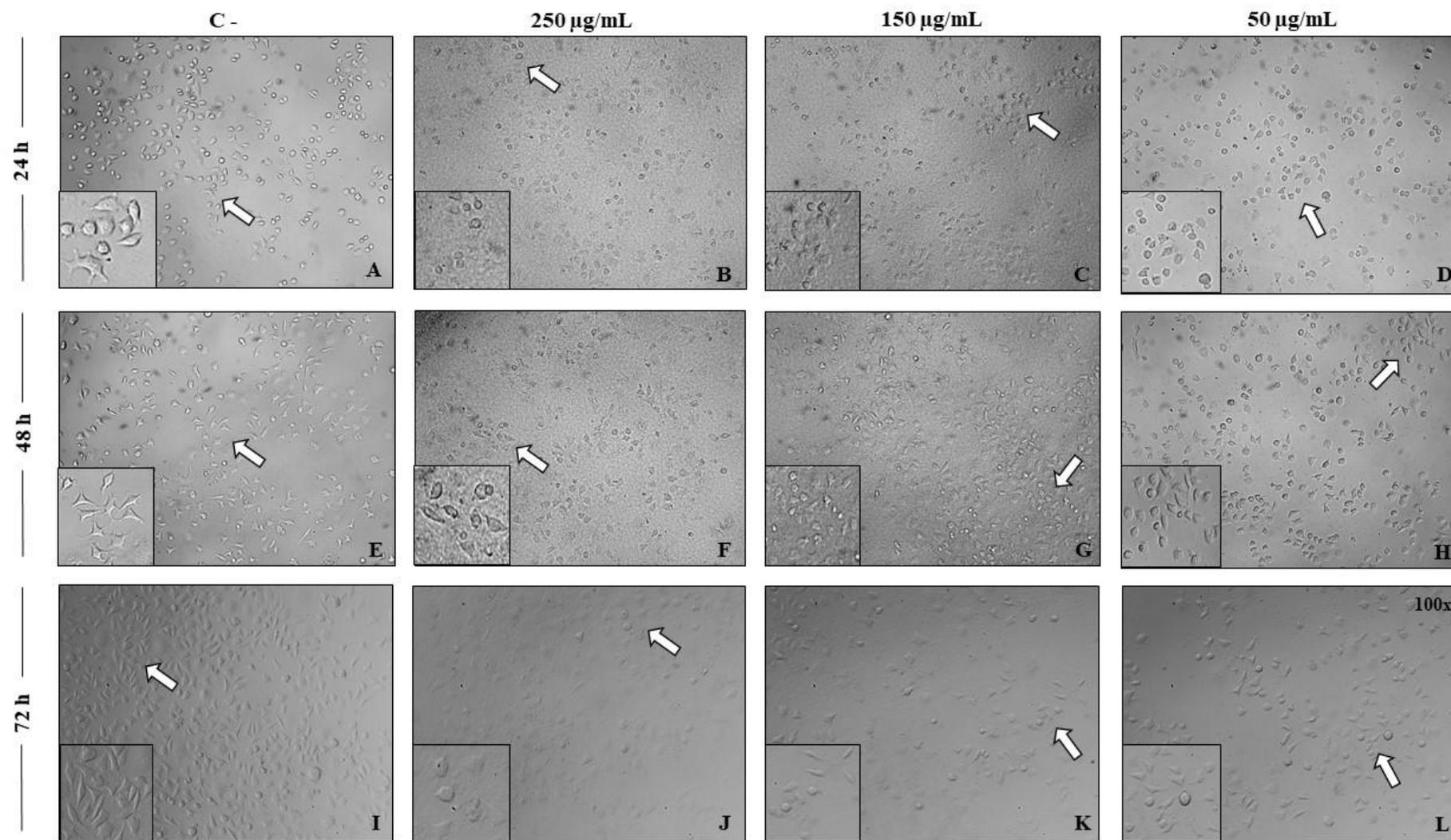
Figura 12 - Viabilidade celular de fibroblastos LA-9



Viabilidade celular (%) de fibroblastos LA-9 após exposição a diferentes concentrações da NP TiO₂ em 24h (A), 48h (B) e 72 horas (C). C⁻ – representa o controle negativo e C⁺ o controle positivo (Extran 5%). Os dados representam a média ± DP de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. O símbolo **** p<0,0001 representa a diferença significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP quando comparado ao grupo controle negativo (C⁻).

4.2.2 Morfologia celular

Os fibroblastos são células que apresentam formato fusiforme e alongado. Através da observação da morfologia celular de fibroblastos LA-9 (Figura 13) é possível notar que o controle negativo (13A, 13E e 13I) apresentou morfologia e crescimento normais. Entretanto, para as concentrações de 250 $\mu\text{g/mL}$ (13B, 13F e 13J) e 150 $\mu\text{g/mL}$ de NP TiO_2 (13C, 13G e 13K) há menor densidade de células alongadas (morfologia característica da célula fibroblástica) passando as mesmas a ter formato circular quando comparadas ao controle negativo C-, para os três períodos de exposição (24, 48 e 72h). Além disso, para as concentrações de 250 (13B, 13F e 13J) e 150 $\mu\text{g/mL}$ (13C, 13G e 13K), é possível observar um acúmulo da NP TiO_2 ao fundo do poço o qual não se nota no controle negativo C- (13A, 13E e 13I) e também na concentração mais baixa, de 50 $\mu\text{g/mL}$ (13D, 13H e 13L), que não apresentou redução na porcentagem de viabilidade celular.

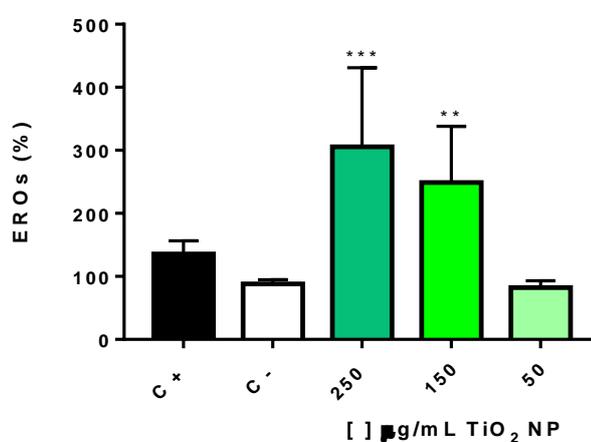
Figura 13 - Morfologia celular de fibroblastos LA-9

Representativo da morfologia dos fibroblastos LA-9 do grupo controle negativo (C -) e dos grupos expostos à NP TiO₂ após 24h (A, B, C e D), 48h (E, F, G e H) e 72 horas (I, J, K e L). Análise qualitativa de 3 experimentos diferentes. Aumento de 100x. As setas indicam as áreas de ampliação representadas no canto esquerdo de cada imagem.

4.2.3 Estresse oxidativo - produção intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

Para avaliação do estresse oxidativo foi realizado a dosagem do percentual da produção intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) após a exposição por 24h à NP TiO₂ (Figura 14). Para as concentrações de 250 e 150 µg/mL de NP TiO₂ houve aumento significativo da produção de EROs quando comparadas ao grupo controle negativo (C-), o qual não foi exposto à NP.

Figura 14 - Produção Intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs)

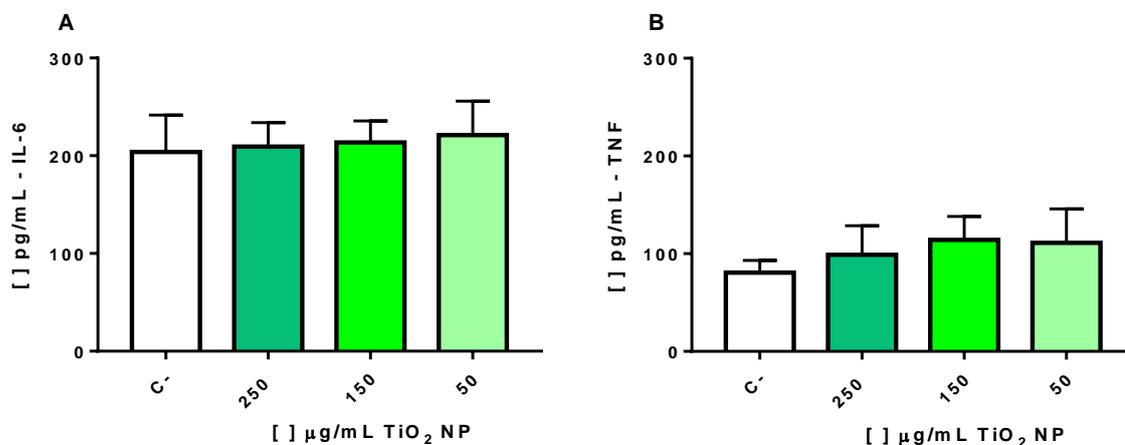


Produção intracelular de Espécies Reativas de Oxigênio – EROs (%) em fibroblastos LA-9 após exposição à NP TiO₂ pelo período de 24 horas. C – representa o controle negativo e C + o controle positivo (H₂O₂ a 0,1 mM). Os dados representam a média ± DP de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Os símbolos ** p<0,01 e *** p<0,001 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos à NP quando comparado ao grupo controle negativo (C-).

4.2.4 Quantificação de citocinas pró-inflamatórias no sobrenadante celular

A figura 15 apresenta a dosagem das citocinas pró-inflamatórias IL-6 (15A) e TNF (15B) no sobrenadante dos fibroblastos após 24h de exposição à NP TiO₂. Para ambas as citocinas não houve diferença estatística significativa entre os grupos expostos à NP e o grupo controle negativo (C-).

Figura 15 - Citocinas (IL-6 e TNF) no sobrenadante celular

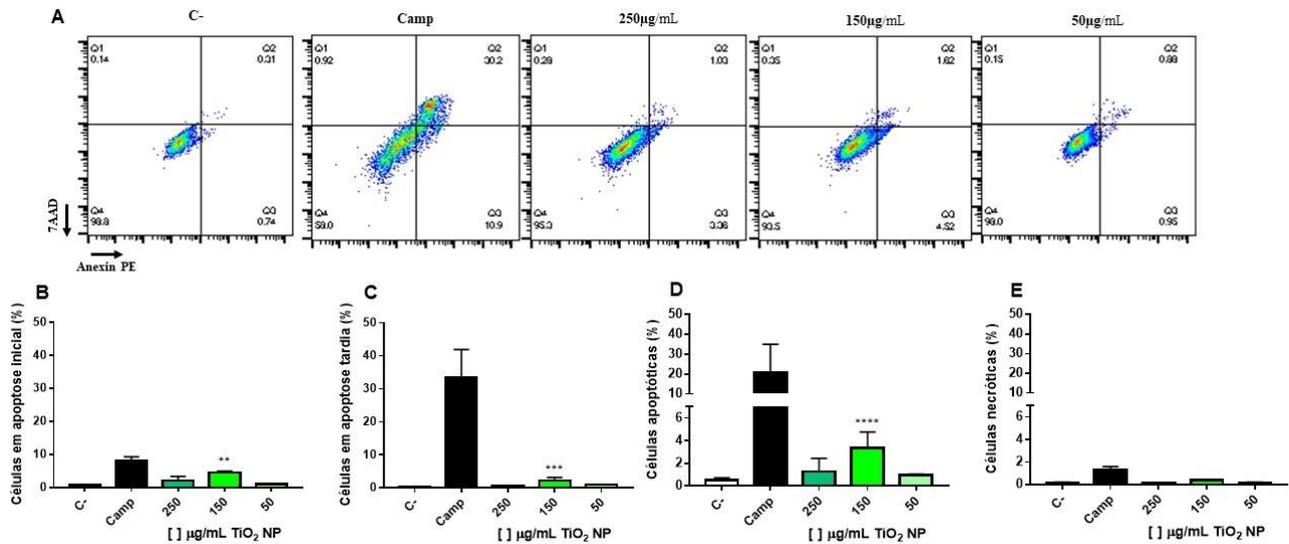


Concentrações de IL-6 (A) e TNF (B) em pg/mL no sobrenadante de fibroblastos LA-9 após exposição à NP TiO₂ pelo período de 24 horas. C – representa o controle negativo. Os dados representam a média ± DP de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste paramétrico *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. Não houve diferença estatística significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos à NP TiO₂ quando comparados ao grupo controle negativo (C -).

4.2.5 Determinação de morte celular

Através da análise por citometria de fluxo foi possível avaliar o processo de morte celular após a exposição por 24h à NP TiO₂, apresentado na figura 16. O representativo bidimensional que apresenta as frações de células vivas, apoptóticas e necróticas é observado em 16A. As células que foram expostas à concentração de 150 µg/mL apresentaram aumento significativo da porcentagem de células apoptóticas quando comparado ao grupo controle negativo (C-) (16D). Observa-se que neste mesmo grupo (150 µg/mL) há aumento na porcentagem de células apoptóticas tanto iniciais (16B) quanto tardias (16C), o qual se mostra um indício de que o processo apoptótico tenha seguido seu curso e resultado na efetiva morte celular. Não houve aumento na porcentagem de células necróticas para nenhum dos grupos expostos à NP quando comparado ao grupo controle negativo (16E).

Figura 16 - Determinação de morte celular em fibroblastos LA-9

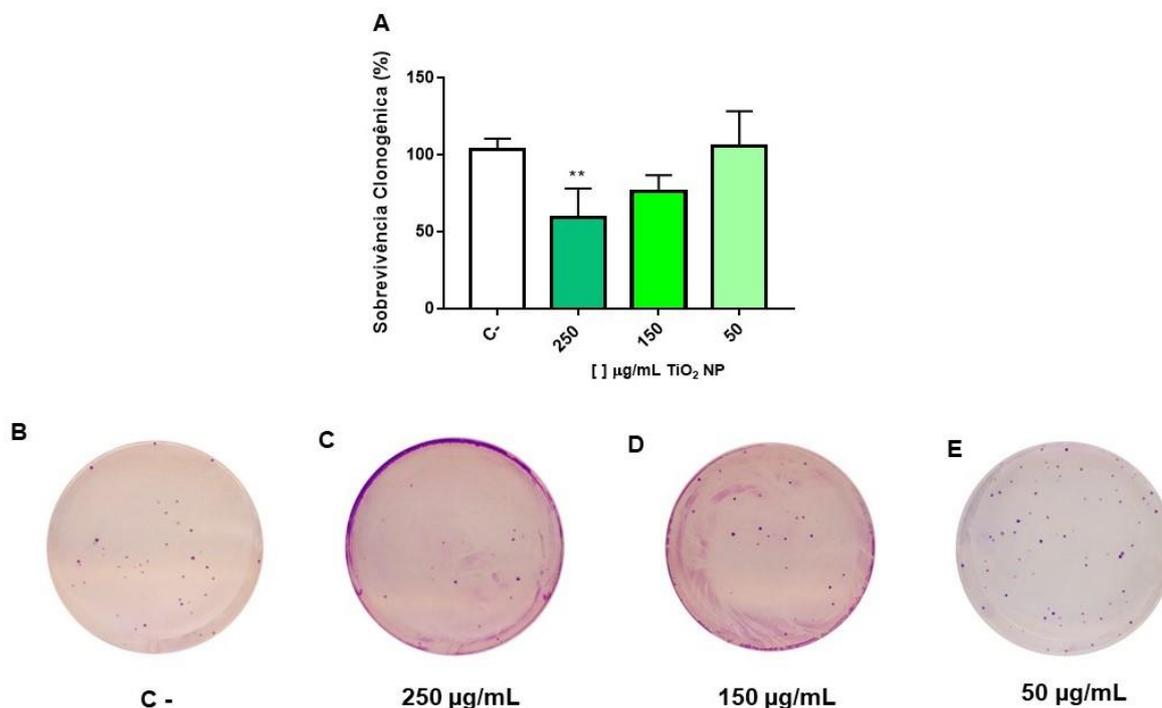


Determinação de morte celular (apoptose e necrose) por citometria de fluxo de fibroblastos LA-9 após exposição à NP TiO₂ pelo período de 24 horas. C – representa o controle negativo e Camp o controle positivo para apoptose (Camptotecina a 0,5 mM). (A) Representativo bidimensional para determinar as frações de células vivas, apoptóticas e necróticas; (B) Porcentagem de células em apoptose inicial; (C) Porcentagem de células em apoptose tardia; (D) Porcentagem de células apoptóticas (apoptose inicial + tardia) e (E) Porcentagem de células necróticas. Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn. Os símbolos ** p<0,01, *** p<0,001 e **** p<0,0001 representam a diferença significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP quando comparado ao grupo controle negativo (C-).

4.2.6 Clonogenicidade

Realizou-se o ensaio de sobrevivência clonogênica, apresentado na figura 17, no qual observou-se a formação de colônias celulares após exposição por 24h dos fibroblastos à NP TiO₂ e análise 7 dias após a exposição. A concentração mais alta (250 µg/mL) apresentou redução significativa no número de colônias quando comparada ao grupo controle negativo, o qual não foi exposto à NP (15A). Nas figuras 15B, 15C, 15D e 15E é possível observar o representativo dos poços contendo as colônias celulares de cada um dos grupos experimentais.

Figura 17 - Clonogenicidade em fibroblastos LA-9



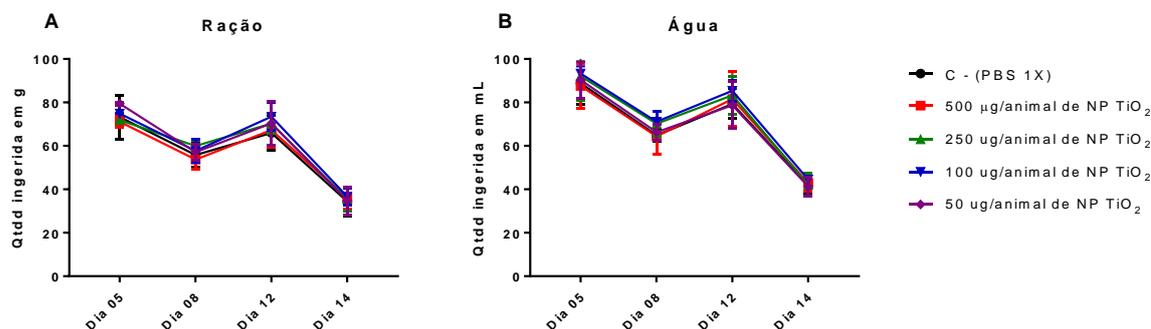
Sobrevivência Clonogênica (%) de fibroblastos LA-9 após exposição à NP TiO_2 pelo período de 24 horas e incubação por 7 dias (A); e representativo dos poços contendo as colônias celulares de cada grupo experimental: (B) C - ; (C) 250 $\mu\text{g/mL}$; (D) 150 $\mu\text{g/mL}$ e (E) 50 $\mu\text{g/mL}$. C - representa o controle negativo. Os dados representam a média \pm DP de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi realizada pelo teste paramétrico *One-way* ANOVA e pós-teste de Tukey. O símbolo ** $p < 0,01$ representa a diferença significativa entre os resultados obtidos no grupo expostos à 250 $\mu\text{g/mL}$ da NP quando comparado ao grupo controle negativo (C-).

4.3 *In vivo* – Camundongos Balb/c

4.3.1 Consumo de ração e água pelos animais durante a exposição à NP TiO_2

A figura 18 apresenta a variação no consumo de ração (18A) e água (18B) por grupo dos animais, avaliados nos dias 05, 08, 12 e 14 durante o período de exposição à NP TiO_2 por via intranasal. Não houve diferenças estatísticas significativas tanto no consumo de ração quanto no de água pelos animais expostos à NP TiO_2 quando comparados ao grupo controle negativo (PBS 1 x).

Figura 18 - Consumo de ração e água

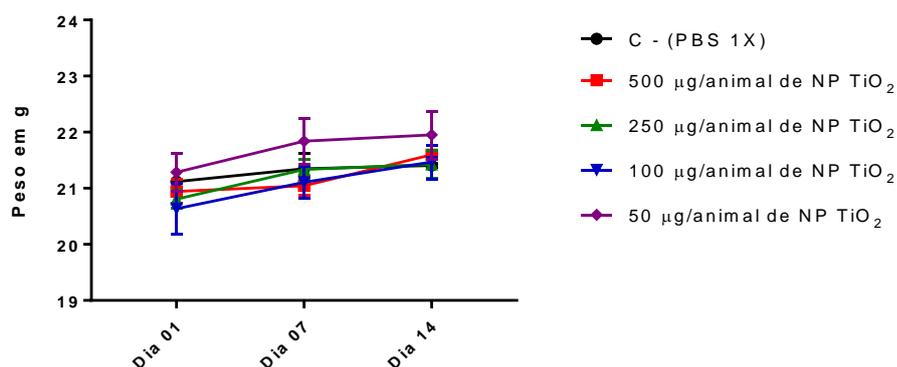


Consumo de ração em gramas (A) e de água em mL (B) por grupo dos animais ao longo do período de exposição à NP TiO_2 . C – representa o controle negativo. Os dados representam a média \pm DP de 2 experimentos independentes (n total = 12 animais/grupo). A análise estatística foi realizada utilizando o teste paramétrico *Two-way* ANOVA e o pós-teste de Tukey. Não houve diferença estatística significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP de TiO_2 quando comparado ao grupo controle negativo (C -).

4.3.2 Variação do peso dos animais durante a exposição à NP TiO_2

A figura 19 apresenta a variação da média de peso dos animais durante o período de exposição à NP TiO_2 nos dias 01, 07 e 14. Novamente não houve diferenças estatísticas significativas no peso dos animais ao longo do período em que os mesmos foram expostos à NP TiO_2 quando comparados ao grupo controle negativo.

Figura 19 - Peso dos animais

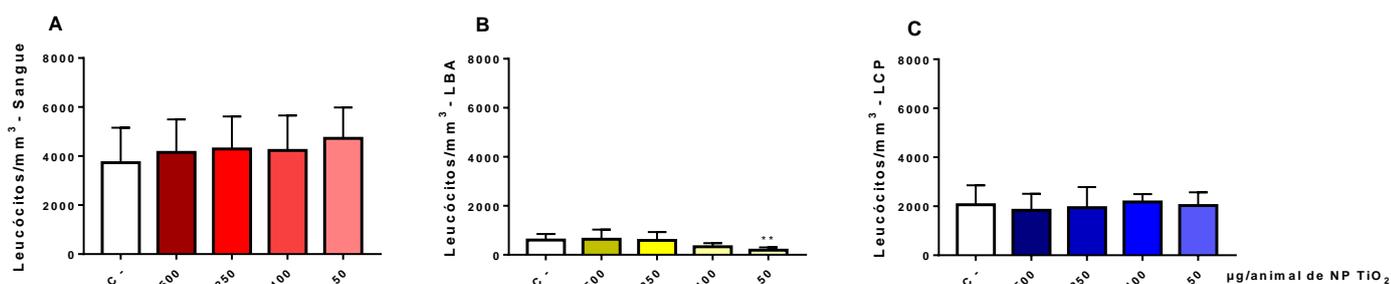


Média do peso dos animais em gramas (g) ao longo do período de exposição à NP TiO_2 . C – representa o controle negativo. Os dados representam a média \pm DP de 2 experimentos independentes (n = 12). A análise estatística foi realizada utilizando o teste paramétrico *Two-way* ANOVA e o pós-teste de Tukey. Não houve diferença estatística significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP de TiO_2 quando comparado ao grupo controle negativo (C-).

4.3.3 Leucócitos totais no sangue, no Lavado Bronco Alveolar (LBA) e no Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) após a exposição à NP TiO₂

A figura 20 mostra a contagem de leucócitos totais no sangue (20A), no Lavado Bronco Alveolar (LBA) (20B) e no Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) (20C) após a exposição à NP TiO₂. Não houve diferenças estatísticas significativas no número de leucócitos no sangue e no LCP nos grupos dos animais expostos à NP TiO₂ quando comparados ao grupo controle negativo. Entretanto é possível observar diminuição significativa dos leucócitos no LBA no grupo dos animais que receberam 50 µg da NP TiO₂ quando comparado ao grupo controle negativo.

Figura 20 - Leucócitos totais no sangue, LBA e LCP



Número de leucócitos/mm³ dos animais após exposição à NP de TiO₂ no sangue (A), no LBA (B) e no LCP (C). No C- (controle negativo) os animais receberam PBS 1x. Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos independentes (n = 12), sendo realizada análise individual. Para dados paramétricos, a análise estatística foi realizada utilizando o teste *One-way* ANOVA e o pós-teste de Tukey e para dados não paramétricos, a análise foi realizada utilizando o teste Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. O símbolo ** p<0,01, representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo exposto à concentração de 50 µg da NP de TiO₂ quando comparado ao grupo controle negativo (C-).

4.3.4 Contagem diferencial de leucócitos no sangue, no Lavado Bronco Alveolar (LBA) e no Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) após a exposição à NP TiO₂

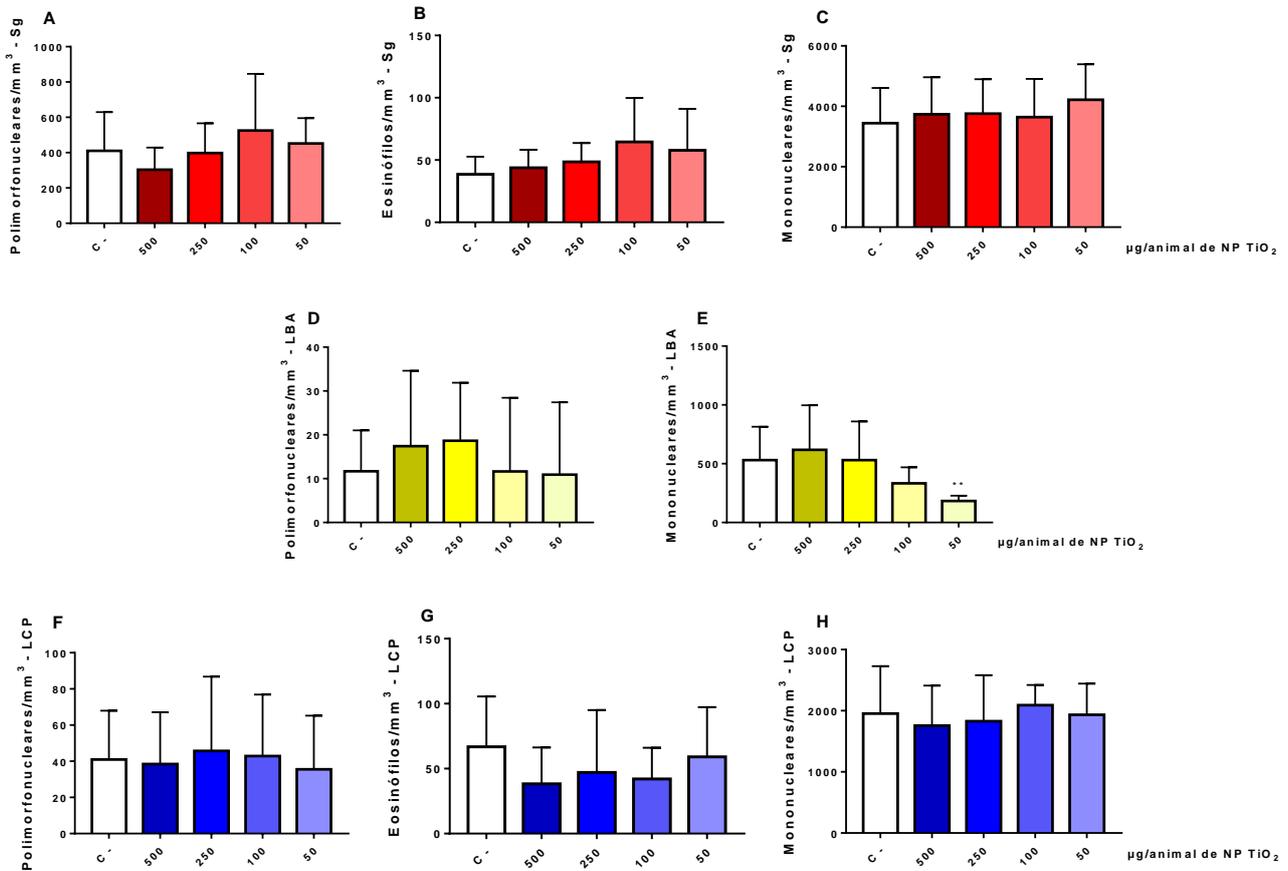
A figura 21 mostra a contagem diferencial de leucócitos no sangue (polimorfonucleares - 21A; eosinófilos - 21B e mononucleares - 21C), no Lavado Bronco Alveolar (LBA) (polimorfonucleares - 21D e mononucleares - Figura 21E) e no Lavado da Cavidade Peritoneal (LCP) (polimorfonucleares - 21F; eosinófilos - 21G e mononucleares - 21H) após a exposição à NP TiO₂.

No sangue (21A, 21B e 21C) é possível observar que não houve diferença estatística significativa entre os grupos dos animais que foram expostos à NP TiO₂ quando comparados ao grupo controle negativo, para todos os tipos celulares avaliados.

Já no LBA não houve diferenças estatísticas significativas no número de polimorfonucleares (21D) nos grupos dos animais expostos à NP TiO₂ quando comparados ao grupo controle negativo. Entretanto é possível observar diminuição significativa dos mononucleares (21E) no grupo dos animais que receberam 50 µg da NP TiO₂ quando comparado ao grupo controle negativo.

No LCP (21F, 21G e 21H) também não houve diferença estatística significativa entre os grupos dos animais que foram expostos à NP TiO₂ quando comparados ao grupo controle negativo, para todos os tipos celulares avaliados.

Figura 21 - Contagem diferencial de leucócitos no sangue, LBA e LCP



Número de leucócitos/mm³ dos animais após exposição à NP de TiO₂ no sangue (A – polimorfonucleares; B – eosinófilos; C - mononucleares), no LBA (D – polimorfonucleares; E - mononucleares) e no LCP (F – polimorfonucleares; G – eosinófilos; H - mononucleares). No C- (controle negativo) os animais receberam PBS 1x. Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos independentes (n = 12), sendo realizada análise individual. Para dados paramétricos, a análise estatística foi realizada utilizando o teste *One-way* ANOVA e o pós-teste de Tukey e para dados não paramétricos, a análise foi realizada utilizando o teste Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. O símbolo ** p<0,01, representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo exposto à concentração de 50 µg da NP de TiO₂ quando comparado ao grupo controle negativo (C-).

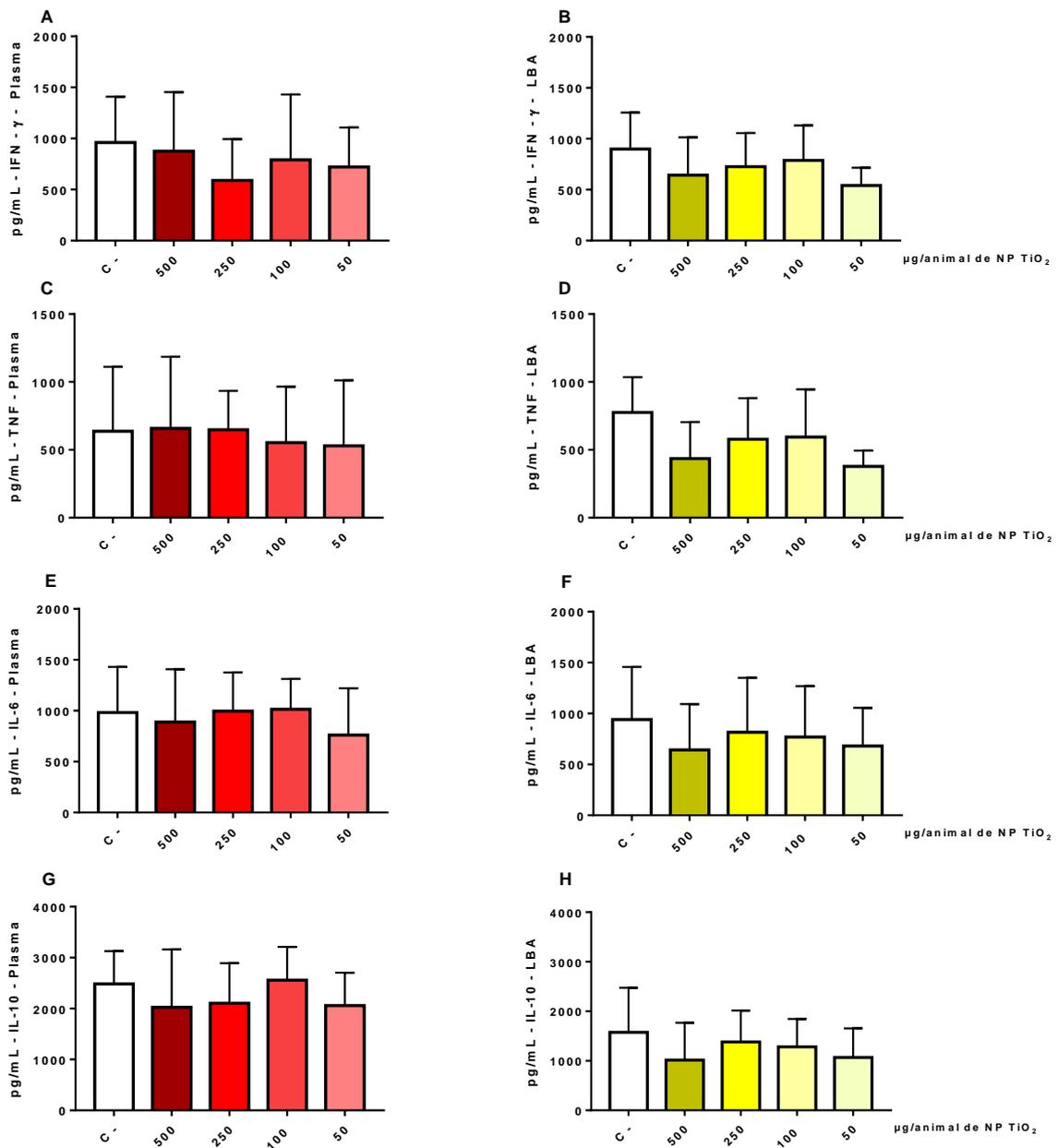
4.3.5 Dosagem das citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 no plasma sanguíneo e no Lavado Bronco Alveolar (LBA) após a exposição à NP TiO₂

Em busca de analisar o perfil inflamatório circulante e também no local alvo da via de administração *in vivo* (intranasal) da NP TiO₂, foi realizada a dosagem de citocinas tanto no plasma sanguíneo, quanto no Lavado Bronco Alveolar (LBA) dos animais.

A figura 22 mostra a produção das citocinas IFN- γ (22A e 22B), TNF (22C e 22D), IL-6 (22E e 22F) e IL-10 (22G e 22H) tanto no plasma sanguíneo quanto no LBA. Tanto para o plasma quanto para o LBA não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos

dos animais que foram expostos à NP TiO₂ quando comparados ao grupo controle negativo, para todas as citocinas avaliadas.

Figura 22 - Citocinas IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10 no plasma e LBA

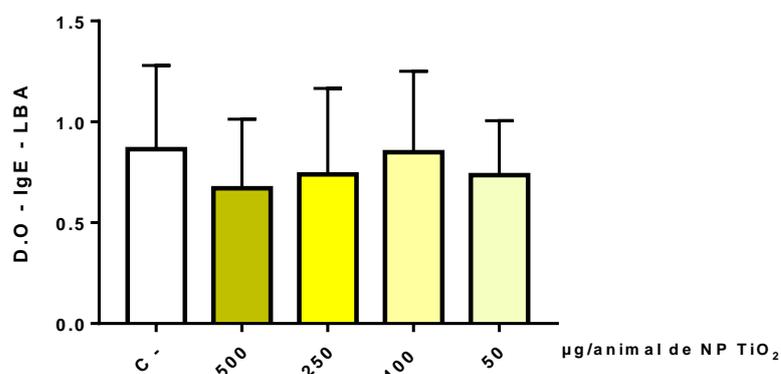


Concentrações em pg/mL de IFN- γ (A e B), TNF (C e D), IL-6 (E e F) e IL-10 (G e H) no plasma e no Lavado Bronco Alveolar (LBA) dos animais após a exposição à NP de TiO₂. No C- (controle negativo) os animais receberam PBS 1x. Os dados representam a média \pm DP de 2 experimentos independentes (pool/grupo), sendo realizada análise em triplicata. Para dados paramétricos, a análise estatística foi realizada utilizando o teste *One-way* ANOVA e o pós teste de Tukey e para dados não paramétricos, a análise foi realizada utilizando o teste Kruskal-Wallis e o pós teste de Dunn. Não houve diferença estatística significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP de TiO₂ quando comparado ao grupo controle negativo (C-).

4.3.6 Dosagem do anticorpo IgE no Lavado Bronco Alveolar (LBA) após a exposição à NP TiO₂

À procura de uma possível resposta alérgica no local alvo da via de administração *in vivo* (intranasal) da NP TiO₂, foi realizado a dosagem do anticorpo IgE, a qual é uma classe de anticorpos que são produzidos durante os processos alérgicos, no Lavado Bronco Alveolar (LBA) dos animais. A figura 23 mostra a produção do anticorpo IgE no LBA. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos expostos à NP TiO₂ quando comparado ao grupo controle negativo.

Figura 23 - Anticorpo IgE no LBA



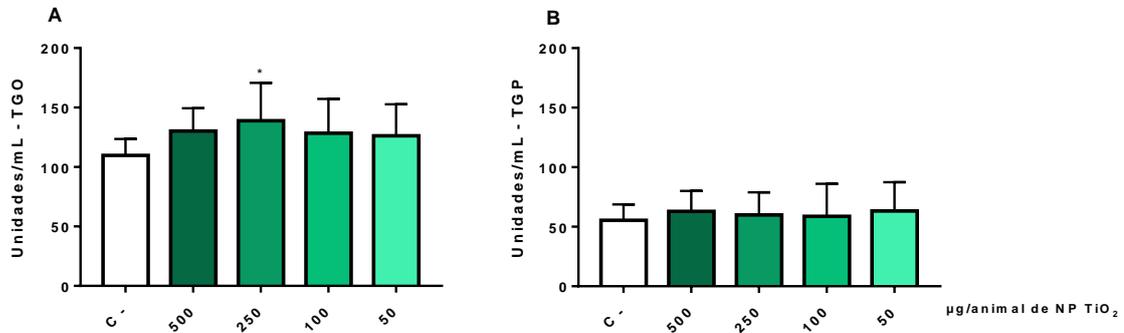
Comparativo de IgE através da D.O (Densidade Óptica) no Lavado Bronco Alveolar (LBA) dos animais após exposição à NP de TiO₂. No C- (controle negativo) os animais receberam PBS 1x. Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos independentes (pool/grupo), sendo realizada análise em triplicata. A análise estatística foi realizada utilizando o teste paramétrico *One-way* ANOVA e o pós-teste de Tukey. Não houve diferença estatística significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP de TiO₂ quando comparado ao grupo controle negativo (C).

4.3.7 Função hepática – Dosagem dos níveis de Transaminase Glutâmico Oxalacética (TGO) e Transaminase Glutâmico Pirúvica (TGP) após a exposição à NP TiO₂

A figura 24 apresenta a dosagem das transaminases hepáticas, TGO (Transaminase Oxalacética) (24A) e TGP (Transaminase Pirúvica) (24B), no plasma dos animais após a exposição à NP TiO₂. É possível observar que houve aumento significativo na quantidade de TGO no grupo dos animais que receberam 250 µg da NP TiO₂ quando comparado ao grupo controle negativo. Já para a quantidade de TGP não houve diferença estatística significativa nos grupos expostos à NP TiO₂ quando comparados ao grupo controle negativo. Há maior

quantidade de TGO em relação à TGP, porém esse padrão é esperado em qualquer organismo, mesmo sem alterações fisiológicas.

Figura 24 - Dosagem de TGO e TGP

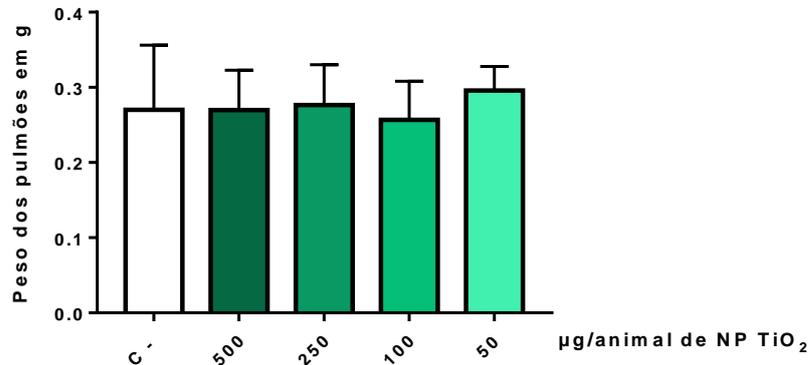


Dosagem de TGO (Transaminase Oxalacética) e TGP (Transaminase Pirúvica) no plasma dos animais após exposição à NP de TiO₂ (A- TGO e B- TGP). No C- (controle negativo) os animais receberam PBS 1x. Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos independentes (n = 12), sendo realizada análise individual. A análise estatística foi realizada utilizando o teste Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. O símbolo * p<0,05, representa a diferença significativa entre o resultado obtido no grupo exposto à concentração de 250 µg da NP de TiO₂ quando comparado ao grupo controle negativo (C-).

4.3.8 Variação do peso dos pulmões dos animais após a exposição via intranasal à NP TiO₂

A figura 25 apresenta a variação do peso dos pulmões dos animais após a exposição intranasal à NP TiO₂. É possível observar que não houve diferença estatística significativa no peso deste órgão no grupo dos animais que foram expostos à NP quando comparados ao grupo controle negativo.

Figura 25 - Peso dos pulmões dos animais

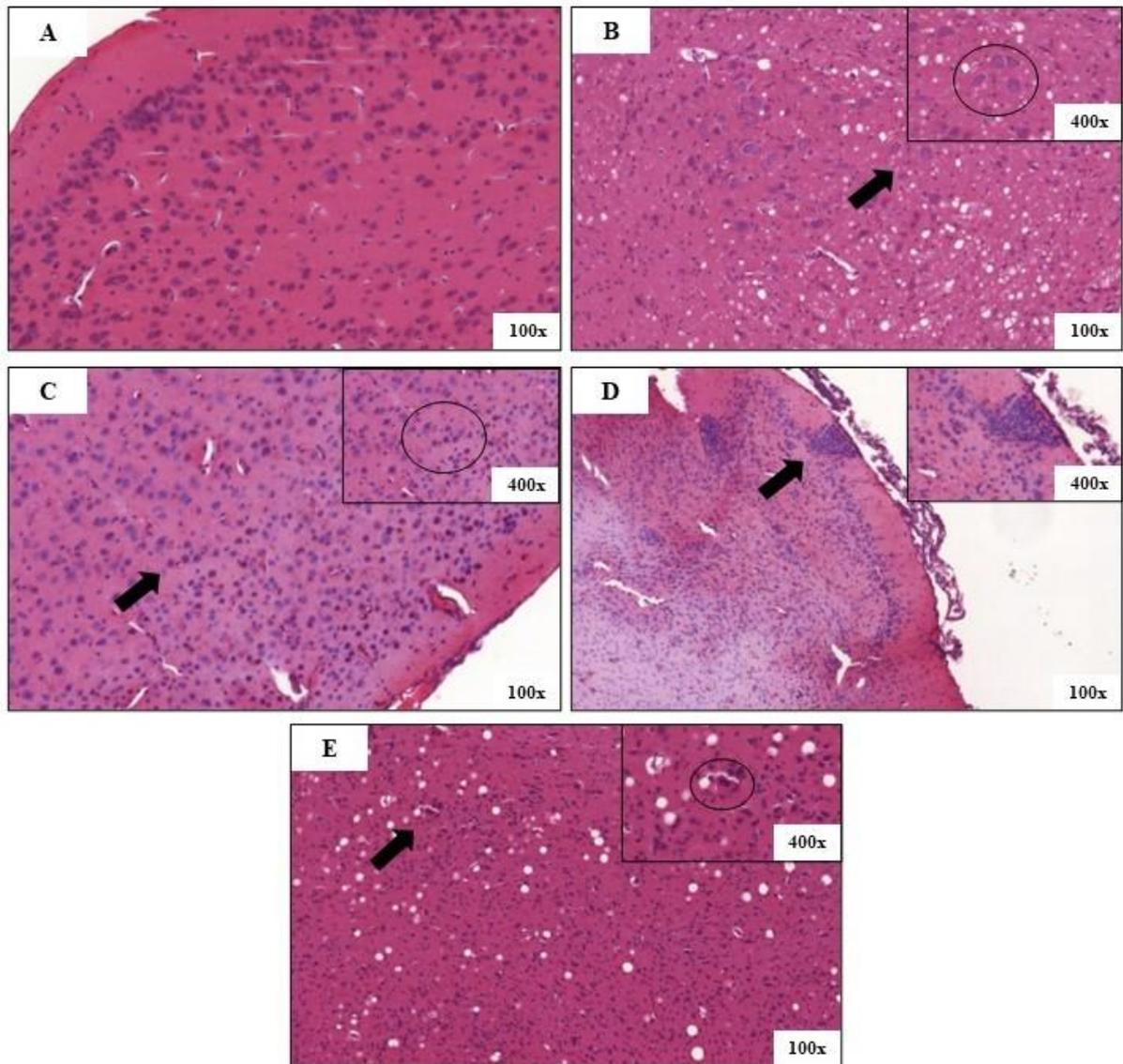


Peso (g) dos pulmões dos animais após a exposição intranasal à NP de TiO₂. No C- (controle negativo) os animais receberam PBS 1x. Os dados representam a média ± DP de 2 experimentos independentes (n = 12). A análise estatística foi realizada utilizando o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn. Não houve diferença estatística significativa entre os resultados obtidos nos grupos expostos às diferentes concentrações da NP de TiO₂ quando comparado ao grupo controle negativo (C-).

4.3.9 Análise histopatológica dos órgãos (encéfalo, coração, pulmões, fígado, baço e rins) dos animais após a exposição à NP TiO₂

A figura 26 apresenta as fotomicrografias do encéfalo dos animais, nas quais podemos observar como achados histopatológicos relevantes a presença de astrócitos gemistocíticos (presentes no córtex frontal, hipocampo e corpo caloso), bem como edemaciação difusa, manguitos perivasculares e astrocitose. Tais alterações eram de discretas a moderadas no grupo que recebeu 500 µg/animal de NP TiO₂ (Figura 26B) e de moderadas a acentuadas nos grupos que receberam 250 (26C), 100 (26D) e 50 µg/animal de NP TiO₂ (26E). O grupo que recebeu 100 µg/animal de NP TiO₂ (Figura 26D) ainda apresentou infiltrado inflamatório (composto por linfócitos, plasmócitos e neutrófilos em grau discreto e focal na pia-máter - leptomeningite).

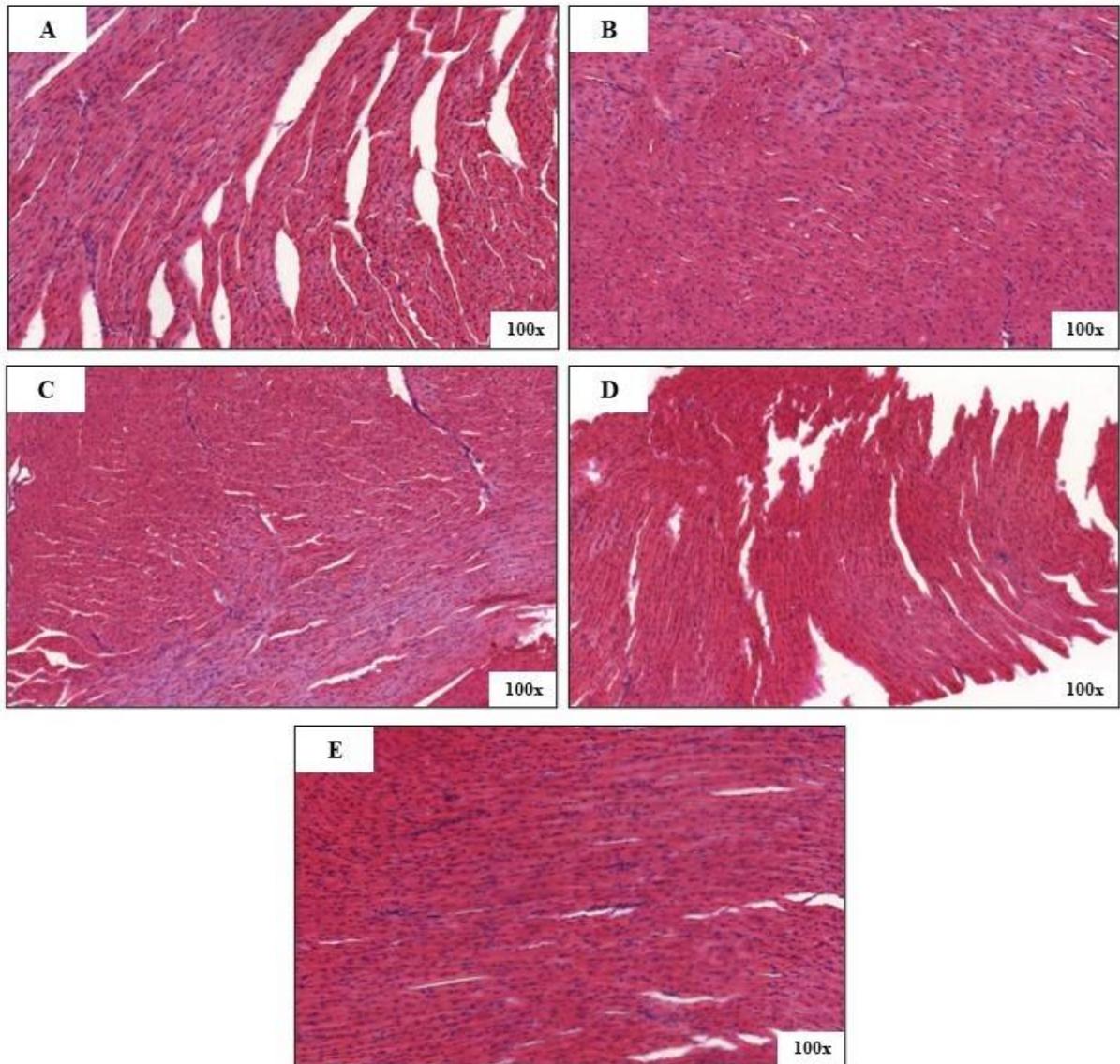
Figura 26 - Fotomicrografias de cortes histológicos do encéfalo dos animais



Fotomicrografias de cortes histológicos do encéfalo dos animais de cada grupo experimental após exposição à NP TiO₂: controle negativo (A), 500 µg/animal de NP TiO₂ (B), 250 µg/animal de NP TiO₂ (C), 100 µg/animal de NP TiO₂ (D) e 50 µg/animal de NP TiO₂ (E). Em A, um fragmento de encéfalo do grupo controle; em B, a presença de formação de vacúolos bem como a presença de astrócitos gemistocíticos (círculo); em C, a presença de astrócitos gemistocíticos (círculo); em D, a presença de infiltrado inflamatório focal na pia-máter (detalhe) e em E a presença de astrócitos gemistocíticos (círculo). Coloração: HE. Aumento de 100x e 400x.

A figura 27 apresenta as fotomicrografias do coração dos animais após a exposição à NP TiO₂, nas quais se observa que não houve alteração digna de nota em nenhum dos grupos experimentais.

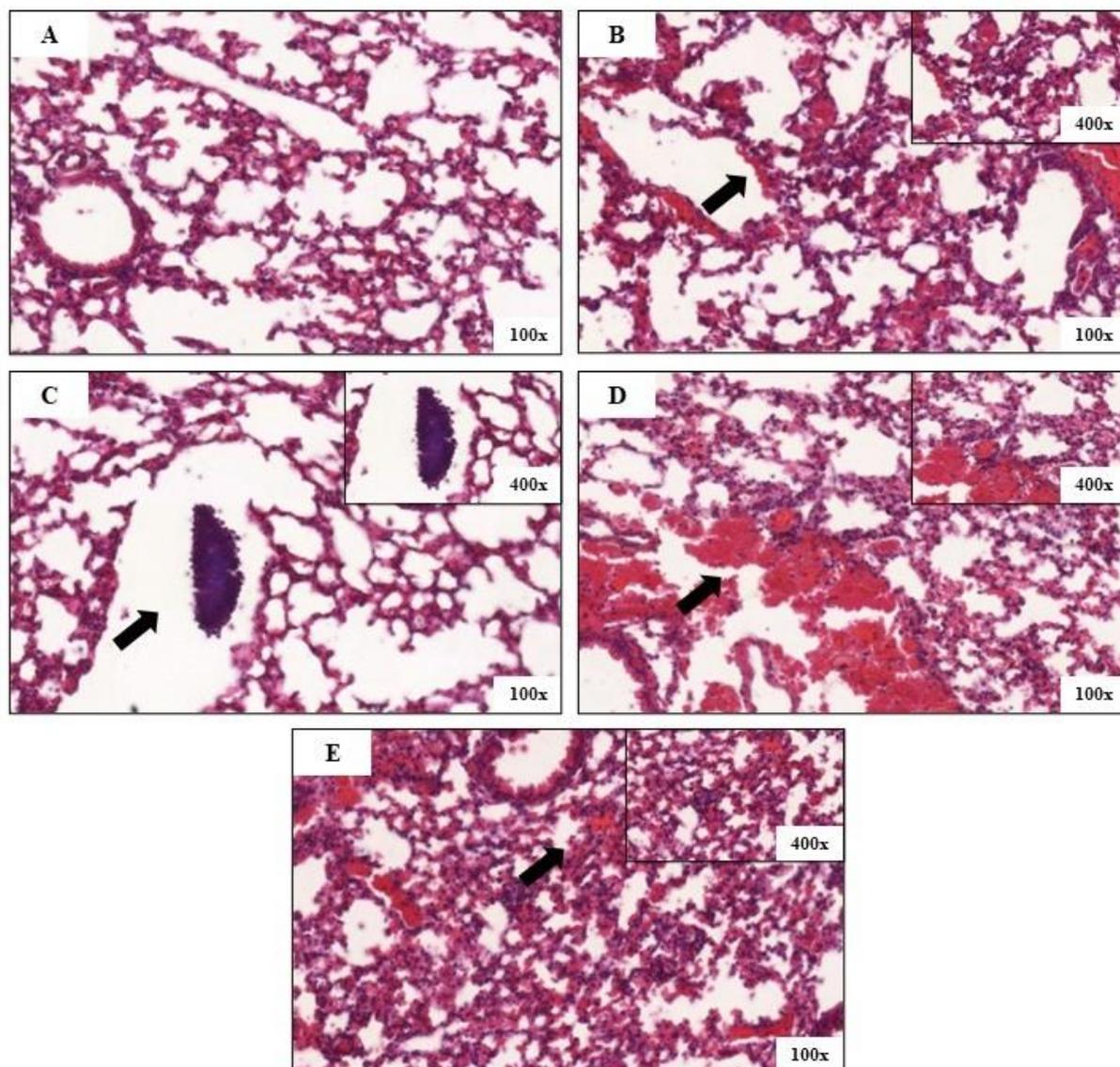
Figura 27 - Fotomicrografias de cortes histológicos do coração dos animais



Fotomicrografias de cortes histológicos do coração dos animais de cada grupo experimental após exposição à NP TiO₂: controle negativo (A), 500 µg/animal de NP TiO₂ (B), 250 µg/animal de NP TiO₂ (C), 100 µg/animal de NP TiO₂ (D) e 50 µg/animal de NP TiO₂ (E). Coloração: HE. Aumento de 100x.

A figura 28 apresenta as fotomicrografias dos pulmões dos animais, nas quais se observa focos inflamatórios (linfócitos, plasmócitos, macrófagos alveolares e neutrófilos maduros) peri-bronquial/peri-bronquiolar e intersticial com consequente espessamento de septos alveolares nos grupos que receberam 500 (Figura 28B), 250 (28C), 100 (28D) e 50 µg/animal de NP TiO₂ (28E). Além disso, foram identificados focos de hemorragia no grupo que recebeu 500 µg/animal de NP TiO₂ (28B) e nos grupos que receberam 100 (28D) e 50 µg/animal de NP TiO₂ (28E) os focos hemorrágicos eram intra-bronquiais.

Figura 28 - Fotomicrografias de cortes histológicos dos pulmões dos animais

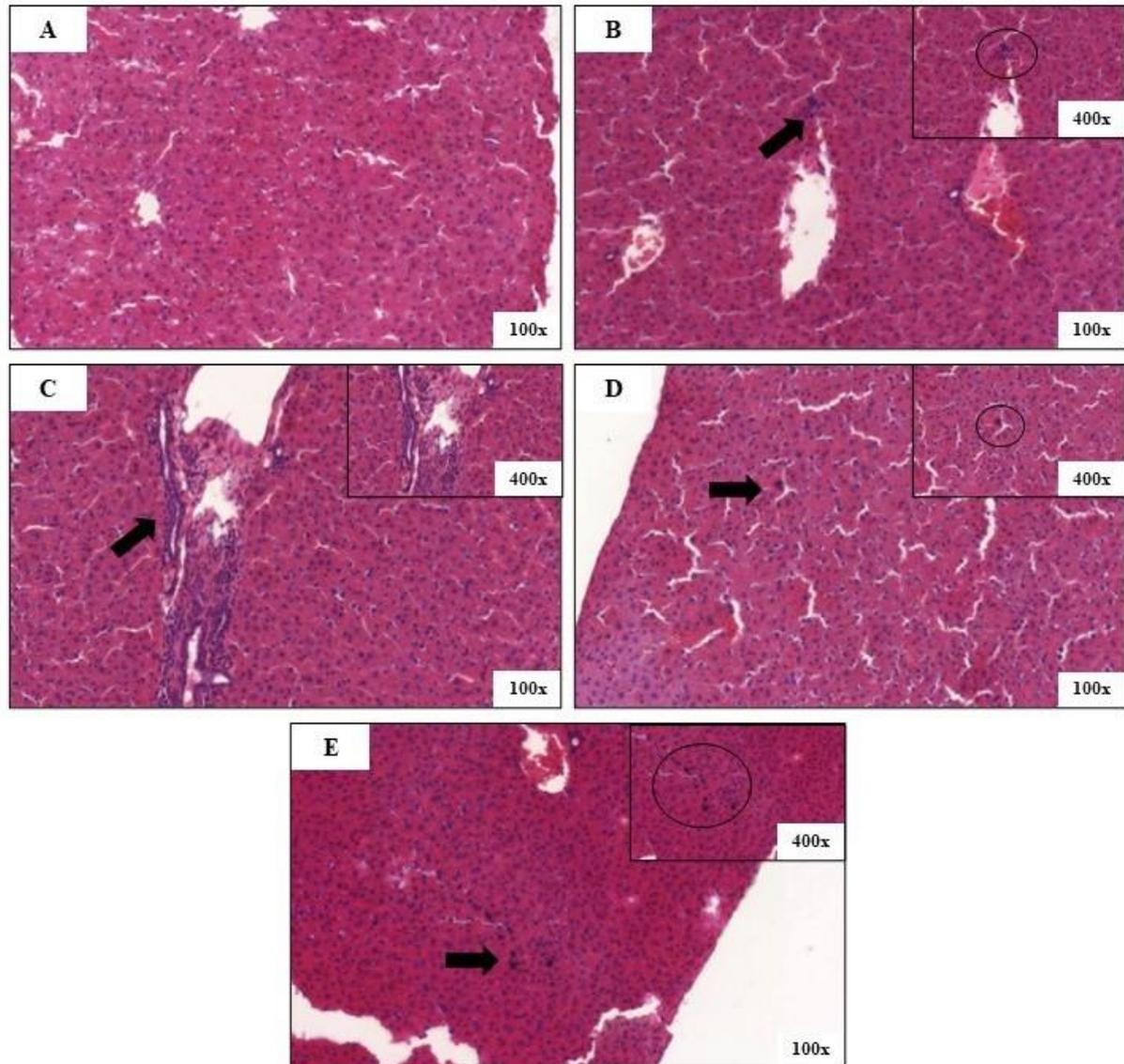


Fotomicrografias de cortes histológicos dos pulmões dos animais de cada grupo experimental após exposição à NP TiO₂: controle negativo (A), 500 µg/animal de NP TiO₂ (B), 250 µg/animal de NP TiO₂ (C), 100 µg/animal de NP TiO₂ (D) e 50 µg/animal de NP TiO₂ (E). Em A, um fragmento de pulmão do grupo controle; em B, uma área de espessamento dos septos alveolares em função de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário (detalhe); em C, um agrupamento linfoplasmocitário no interstício pulmonar (detalhe); em D, uma área hemorrágica junto a um infiltrado inflamatório linfoplasmocitário no interstício pulmonar (detalhe) e em E uma área de espessamento dos septos alveolares por infiltração linfoplasmocitária (detalhe). Coloração: HE. Aumento de 100x e 400x.

A figura 29 apresenta as fotomicrografias do fígado dos animais, nas quais se observa focos de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário perivascular e difuso pelo parênquima hepático, variando de discreto a moderado nos grupos que receberam 500 (Figura 29B), 250 (29C), 100 (29D) e 50 µg/animal de NP TiO₂ (29E). Observou-se ainda, tumefação e degeneração hidrópica dos hepatócitos de grau moderado nos mesmos grupos (500 – 29B; 250 – 29C, 100 – 29D e 50 µg/animal de NP TiO₂ – 29E). Nos grupos que receberam 100 (29D) e

50 $\mu\text{g}/\text{animal}$ de NP TiO_2 (29E) foram observados hepatócitos com pigmento intracitoplasmático enegrecido.

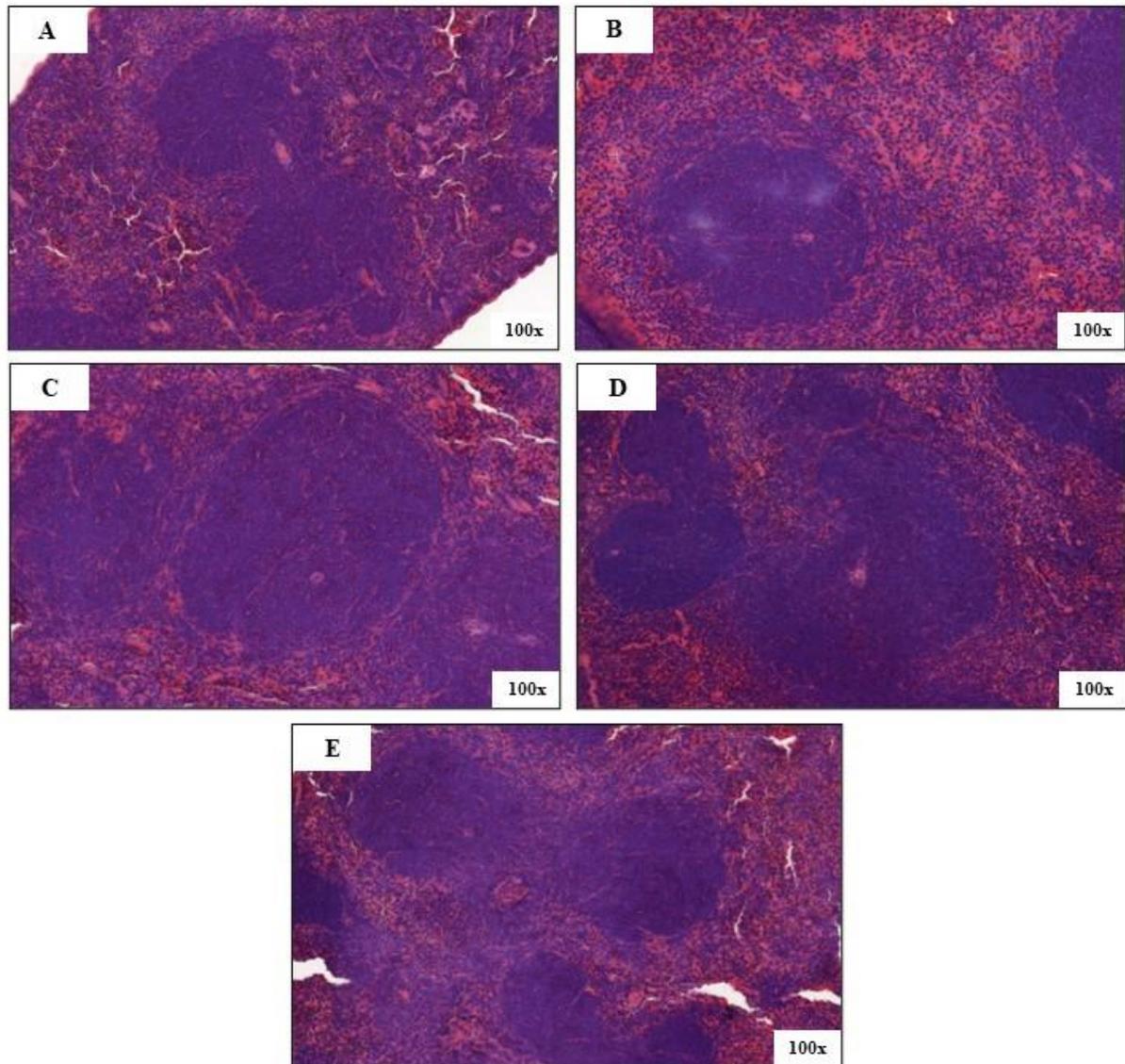
Figura 29 - Fotomicrografias de cortes histológicos do fígado dos animais



Fotomicrografias de cortes histológicos do fígado dos animais de cada grupo experimental após exposição à NP TiO_2 : controle negativo (A), 500 $\mu\text{g}/\text{animal}$ de NP TiO_2 (B), 250 $\mu\text{g}/\text{animal}$ de NP TiO_2 (C), 100 $\mu\text{g}/\text{animal}$ de NP TiO_2 (D) e 50 $\mu\text{g}/\text{animal}$ de NP TiO_2 (E). Em A, um fragmento de fígado do grupo controle; em B, um discreto foco de infiltrado linfoplasmocitário no parênquima hepático (círculo); em C, uma área de infiltrado linfoplasmocitário peri-portais (detalhe); em D, hepatócitos com pigmento intracitoplasmático enegrecido (círculo) e em E um foco com hepatócitos com pigmento intracitoplasmático enegrecido (círculo). Coloração: HE. Aumento de 100x e 400x.

A figura 30 apresenta as fotomicrografias do baço dos animais após a exposição à NP TiO_2 , nas quais se observa que não houve alteração digna de nota em nenhum dos grupos experimentais.

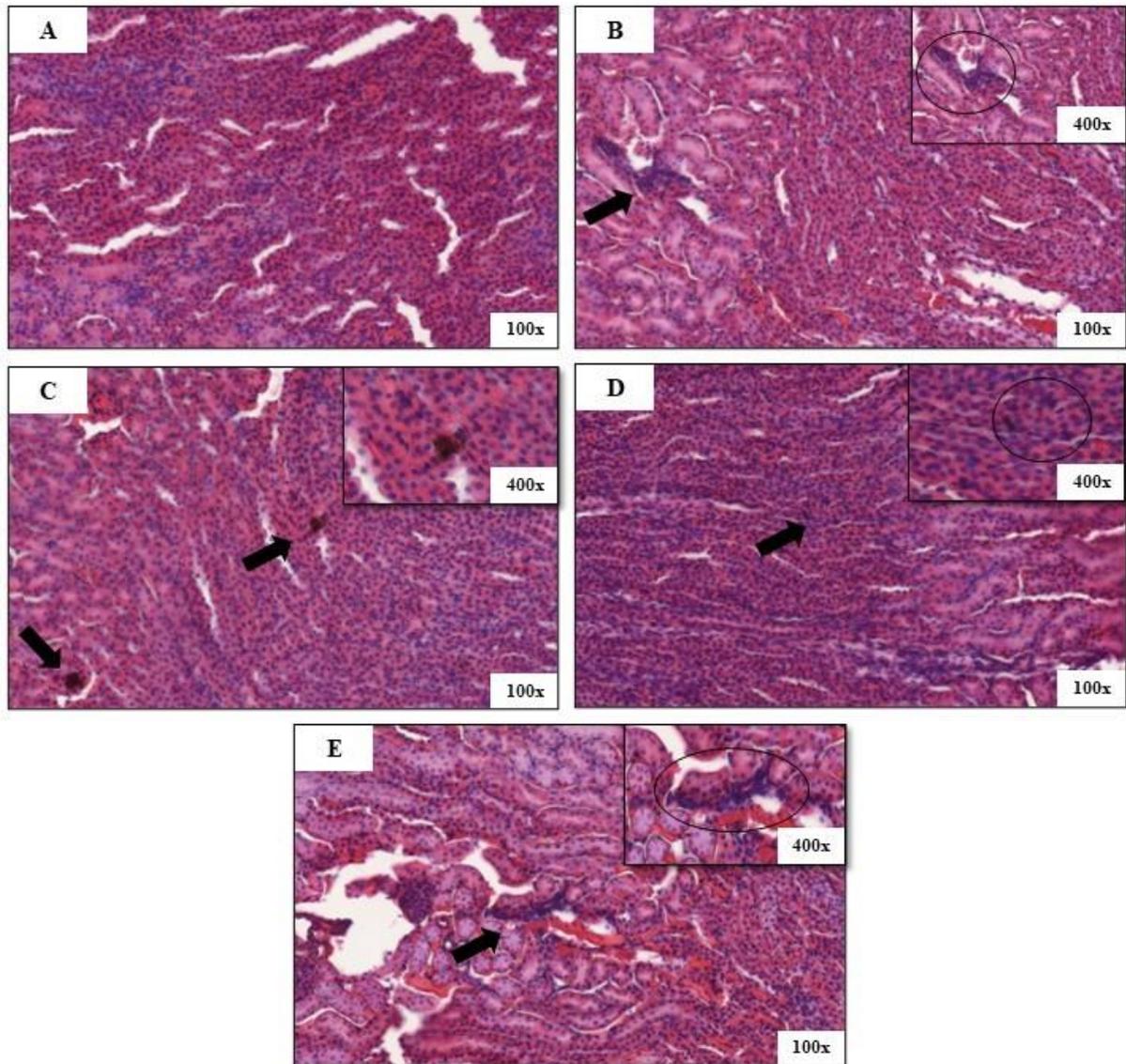
Figura 30 - Fotomicrografias de cortes histológicos do baço dos animais



Fotomicrografias de cortes histológicos do baço dos animais de cada grupo experimental após exposição à NP TiO₂: controle negativo (A), 500 µg/animal de NP TiO₂ (B), 250 µg/animal de NP TiO₂ (C), 100 µg/animal de NP TiO₂ (D) e 50 µg/animal de NP TiO₂ (E). Coloração: HE. Aumento de 100x.

A figura 31 apresenta as fotomicrografias dos rins dos animais, nas quais se observa que nos grupos que receberam 500 (Figura 31B) e 50 µg/animal de NP TiO₂ (31E) há focos de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário em zona cortical bem como focos hemorrágicos. Observou-se ainda células do epitélio tubular com pigmento intracitoplasmático enegrecido na zona medular nos grupos que receberam 250 (31B) e 100 µg/animal de NP TiO₂ (31E).

Figura 31 - Fotomicrografias de cortes histológicos dos rins dos animais



Fotomicrografias de cortes histológicos dos rins dos animais de cada grupo experimental após exposição à NP TiO₂: controle negativo (A), 500 µg/animal de NP TiO₂ (B), 250 µg/animal de NP TiO₂ (C), 100 µg/animal de NP TiO₂ (D) e 50 µg/animal de NP TiO₂ (E). Em A, um fragmento de rim do grupo controle; em B, uma área de infiltrado linfoplasmocitário em zona cortical (círculo); em C, células do epitélio tubular com pigmento intracitoplasmático enegrecido na zona medular (setas e detalhe); em D, células epiteliais tubulares da zona medular com pigmento intracitoplasmático enegrecido (círculo) e em E um foco inflamatório linfoplasmocitário na zona cortical (círculo). Coloração: HE. Aumento de 100x e 400x.

5. DISCUSSÃO

O alto e rápido crescimento da utilização das nanopartículas, principalmente nas últimas décadas, fez com que a nanociência e a nanotecnologia se expandissem de maneira importante em diferentes direções, desde a aplicação industrial até a área médica, como na indústria de alimentos, combustíveis e geração de energia limpa, bem como biosensores para diagnóstico, sistemas de entrega direcionada de fármacos e terapias contra o câncer (BAYDA et al., 2020). Particularmente as nanopartículas de TiO_2 estão dentre as nanopartículas mais utilizadas, dando destaque para a indústria petrolífera, bem como a construção civil, a medicina, a agricultura e as indústrias de alimento e cosméticos (BARANOWSKA-WÓJCIK et al., 2020).

O grande aumento da atividade catalítica do TiO_2 quando em escala nanométrica é a característica que o torna muito utilizado em diversas áreas, entretanto resultando em bioatividade singular e consequente preocupação para a saúde humana (BARANOWSKA-WÓJCIK et al., 2020; SHI et al., 2013). Sendo assim, é necessário estudar a segurança na manipulação e utilização destes nanomateriais. Dessa forma, o presente trabalho vem ao encontro dessa necessidade e apresenta o estudo dos possíveis efeitos tóxicos da nanopartícula de dióxido de titânio (NP TiO_2) através da caracterização da NP e da utilização de modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*, para determinação de citotoxicidade e toxicidade sistêmica na análise da segurança na utilização desse nanomaterial.

As propriedades físico-químicas das nanopartículas, como por exemplo, forma cristalina, tamanho, carga e ligantes de superfície, estão intimamente relacionados com os efeitos biológicos que as mesmas podem causar (AUFFAN et al., 2009; LIU; TANG, 2020; SHI et al., 2013). Além disso, as proteínas do meio podem se ligar ou serem adsorvidas na superfície da nanopartícula (NP) formando uma estrutura chamada de corona proteica, a qual pode modificar as propriedades físico-químicas das NPs e dessa maneira, também interferir nas respostas celulares, como internalização, biodisponibilidade e toxicidade (NEL et al., 2009; NGUYEN; LEE, 2017).

Tanto os fluídos biológicos como o meio de cultivo celular apresentam proteínas livres que podem se ligar à superfície da NP podendo resultar em mudanças de tamanho e de potencial zeta das mesmas (NEL et al., 2009; NGUYEN; LEE, 2017). Nossos resultados mostraram que o diâmetro hidrodinâmico da NP TiO_2 aumentou de 3,57 nm na água para 7,62 nm no meio DMEM (Tabela 1). O soro fetal bovino (SFB) utilizado na suplementação do meio, se apresenta como um fluido biológico que contém várias proteínas, as quais contribuem para o efeito corona (NGUYEN; LEE, 2017). Outros autores também demonstraram aumento no tamanho e maior

aglomeração após a dispersão em meio DMEM para a mesma NP TiO₂ (PEDRINO et al., 2022) para a NP TiO₂ comercial (P25) (TAUROZZI; HACKLEY; WIESNER, 2013) e para partículas de ouro (MAIORANO et al., 2010).

Já para os experimentos *in vivo* a NP TiO₂ foi dispersa em tampão PBS, o qual é uma solução salina bastante utilizada como veículo por ajudar a manter o pH em torno de 7,4, ou seja, dentro da faixa do pH fisiológico. O tamanho hidrodinâmico da NP TiO₂ dispersa em PBS 1x foi em torno de 2,96 nm, valor bastante próximo ao encontrado para a dispersão em água (3,57 nm). Entretanto, é relatado para outras NP de TiO₂ aumento do tamanho da partícula quando dispersa em PBS (BIHARI et al., 2008; WARHEIT et al., 2007). Pode-se sugerir que a estabilidade no tamanho da dispersão das NP TiO₂ encontrada em PBS se deve à carga proveniente da funcionalização da sua superfície com o ligante carboxilato de sódio (-COO⁻ Na⁺). Neste caso, o pH de 7,4 favorece a desprotonação dos grupos carboxílicos favorecendo assim a manutenção da carga negativa na superfície da NP mesmo em um meio com alta força iônica.

Observou-se também que a dispersão da NP TiO₂ em todos os meios analisados (água, DMEM e PBS) apresentou estabilidade mediana com base nos valores de PdI que ficaram em torno de 0,5 e 0,6, um indicativo de 50% de dispersão heterogênea da NP, revelada também pelas imagens de microscopia eletrônica (MEV-FEG).

Apesar do aumento no tamanho identificado pela possível agregação e ou formação de corona proteica, nota-se que esta NP TiO₂ ainda apresenta um tamanho considerado pequeno. NP com tamanhos abaixo de 20-30 nm tendem a apresentar alta reatividade devido a um aumento exponencial de átomos em sua superfície, gerando um excesso de energia o que as torna termodinamicamente instáveis (AUFFAN et al., 2009). Estudos demonstram que as NP TiO₂ podem ser internalizadas pelas células e este mecanismo é dependente do tamanho e da concentração de NP utilizada, em que NP com tamanhos entre 30-100 nm geralmente permanecem no citoplasma celular e NP com tamanhos abaixo de 30 nm podem atingir o núcleo (SHUKLA et al., 2011; TOMANKOVA et al., 2015).

Outra característica importante e que interfere no mecanismo de internalização celular, e conseqüente toxicidade, é a carga de superfície, devido à interação das partículas com os grupos de fosfolipídios ou domínios de proteínas presentes na superfície celular (NEL et al., 2009). As NP com carga positiva conseguem interagir mais facilmente com estes componentes (ARVIZO et al., 2010; NEL et al., 2009). O potencial zeta é uma característica relevante da partícula na medida em que apresenta sua carga e determina suas propriedades em suspensão (SINGH et al., 2005), sendo considerada estável as NPs que apresentam valores acima de ± 30

mV (NURDIN et al., 2014). O potencial zeta revelou uma carga negativa de -20 mV nas NPs TiO₂ na água devido a ligação com o ácido carboxílico (-COO⁻Na⁺). A funcionalização com ácido carboxílico torna a NP TiO₂ mais hidrofílica em relação às partículas sem essa funcionalização, podendo ocorrer dessa forma, alterações na sua bioatividade e consequente toxicidade (HAMILTON et al., 2014).

Já para a dispersão da NP TiO₂ em DMEM o potencial zeta aumentou seu valor para -11 mV em função da adsorção de proteínas, as quais possuem grupos aminas em sua estrutura, tornando a carga líquida da superfície da NP mais positiva. Para a dispersão em PBS o potencial zeta também apresentou pequeno aumento em relação à água (-18 mV), isso se deve à presença de íons positivamente carregados como Na⁺ presentes na composição do tampão fosfato quando comparado àquele. Todos os valores de potencial zeta encontrados confirmam a tendência de agregação/aglomeração da NP TiO₂ conforme já relatado também por outros autores (COCCINI et al., 2015; GHOLINEJAD; KHADEM ANSARI; RASMI, 2019; HOU et al., 2014; UBOLDI et al., 2016).

O espectro ATR-FTIR foi realizado para elucidar os grupos de superfície associados à NP TiO₂ (MUDUNKOTUWA; MINSHID; GRASSIAN, 2014). Os resultados mostraram um espectro com picos entre 400 e 1000 cm⁻¹ que são reportados como picos típicos da vibração de alongamento Ti-O-Ti (ALMEIDA et al., 2016; NADIMI et al., 2019; PRAVEEN et al., 2014). Além disso, foi observado pico de 590 cm⁻¹ e 670 cm⁻¹ que podem ser atribuídos às ligações de Ti-O-O e Ti-O-Ti respectivamente (RAJAKUMAR et al., 2012; ZHANG; HE; HE, 2009). O pico de 1067 cm⁻¹ está associado à vibração de alongamento C-O-C (MAURYA et al., 2016; SINGH; KOIRY, 2018; SUN; YANG; WANG, 2010). Enquanto o pico em torno de 1247 cm⁻¹ representa a vibração de alongamento O-H sendo uma região de absorção típica de TiO₂ (DAO et al., 2018; GUO et al., 2019; ZHUANG et al., 2017).

No espectro foi observado ainda pico de 1381 cm⁻¹, região que pode ser associada a grupos carboxílicos (PRAVEEN et al., 2014). Além disso, o pico característico de COONa é em torno de 1500 cm⁻¹ e nosso resultado demonstrou um pico na mesma região (1562 cm⁻¹) (MIRGHANI et al., 2002). Os ácidos carboxílicos estão no grupo de moléculas usadas na funcionalização de NPs que são de interesse na área de biomedicina para promover maior biocompatibilidade (ARAMI et al., 2015; MEI et al., 2009; VARANDA et al., 2019). Hamilton e colaboradores demonstraram que as NPs TiO₂ funcionalizadas por carboxilação apresentaram uma redução na toxicidade (HAMILTON et al., 2014). Finalmente a região de 3000 à 3600 cm⁻¹ representa picos característicos da vibração de alongamento O-H de grupos hidroxila livres ou ligados por hidrogênio (DAO et al., 2018; PRAVEEN et al., 2014).

A citotoxicidade está relacionada tanto com as características físico-químicas das NP como também é dependente da linhagem celular de interesse, a dose utilizada e o tempo de exposição. Além disso, biologicamente é determinada mediante modificações significativas no metabolismo celular que pode desencadear processos de estresse oxidativo e até mesmo morte celular (LIU; TANG, 2020). Nossos resultados, a partir do ensaio de MTT, mostram que houve redução da viabilidade celular dos fibroblastos LA-9 para as concentrações de 250 µg/mL e 150 µg/mL a partir de 24h de exposição à NP TiO₂, sendo esta redução acentuada com o passar do tempo (48 e 72h de exposição) o que demonstra a citotoxicidade dose e tempo dependente da nanopartícula. Outros trabalhos da literatura corroboram com nossos resultados pois também encontraram redução da viabilidade celular em concentrações próximas ou iguais a deste trabalho após 24h e 48h de exposição à NP TiO₂, como redução na concentração de 100 µg/mL para linhagem de fibroblastos de hamster (V79) (HAMZEH; SUNAHARA, 2013), redução nas concentrações de 250 e 125 µg/mL para linhagem de astrocitomas humanos (D384) (COCCINI et al., 2015) e redução nas concentrações de 100 e 50 µg/mL para linhagem de pré-adipócitos de camundongo (3T3-L1) (TRIPATHI et al., 2018).

Já Jin e colaboradores não observaram redução de viabilidade significativa em 24 horas de exposição à NP TiO₂ para a linhagem de fibroblastos L929, porém encontraram redução no período de 48 horas para a concentração de 600 µg/mL (JIN et al., 2008). Em relação ao período de 72h de exposição, Brassolatti e colaboradores observaram redução de viabilidade celular utilizando a mesma NP TiO₂, porém para altas concentrações (2000 e 1000 µg/mL para a linhagem de queratinócitos humanos – HaCaT e 2000 µg/mL para a linhagem de fibroblastos humanos – HDFn) (BRASSOLATTI et al., 2022).

Além de alterar o metabolismo mitocondrial, a exposição às NPs pode causar mudanças morfológicas nas células (LIU; TANG, 2020). Os fibroblastos são normalmente células alongadas em formato fusiforme, sendo aderentes e crescendo em monocamadas confluentes (KALLURI; ZEISBERG, 2006; LIU; TANG, 2020). Em nosso estudo foi possível observar que nas maiores concentrações testadas (250 e 150 µg/mL) houve modificações morfológicas nos fibroblastos LA-9, como presença de células com formato arredondado, o qual sugere a perda da capacidade de adesão e com isso pode haver menor atividade proliferativa, observada na diminuição da densidade celular. Além disso, foi possível verificar acúmulo de NP no fundo do poço das placas de cultivo para as mesmas concentrações. Tais achados corroboram com os relatos prévios da literatura a este respeito (ALLOUNI et al., 2012; BERNIER et al., 2012; BRASSOLATTI et al., 2022; HAMZEH; SUNAHARA, 2013; JIN et al., 2008; PEDRINO et al., 2022).

Um dos principais mecanismos de citotoxicidade associado à exposição às NP TiO₂ é o estresse oxidativo, o qual pode desencadear dano ao DNA e consequente morte celular (NEL et al., 2009; SONG et al., 2016). Vários autores têm sugerido que a NP TiO₂ induz toxicidade via estresse oxidativo e produção de EROs principalmente, já que a mesma produz radicais livres em suspensão (BRASSOLATTI et al., 2022; CHEN; YAN; LI, 2014; HIRAKAWA et al., 2004; LIU; TANG, 2020; NEL et al., 2009; SHUKLA et al., 2011; SONG et al., 2016). Os resultados do nosso trabalho mostram que houve aumento na produção de EROs intracelular nos fibroblastos LA-9 após 24h de exposição à NP TiO₂ nas concentrações de 250 e 150 µg/mL. Pedrino e colaboradores também demonstraram aumento na produção de EROs após 24h de exposição, utilizando a mesma NP TiO₂ e a mesma linhagem celular, porém em diferentes concentrações (1000 e 100 µg/mL). Além disso, observaram efeitos genotóxicos a partir da concentração de 1 µg/mL, demonstrando que o estresse oxidativo via ROS nesta linhagem celular pode causar dano ao DNA associados com o tamanho e a forma cristalina da NP (PEDRINO et al., 2022).

Outros estudos também corroboram com nossos resultados. O estudo de Gholinejad e colaboradores relatou aumento na produção de EROs intracelular após 24h de exposição à NPs TiO₂ para a concentração de 100 µg/mL em células endoteliais humanas (HUVECs), porém nenhuma alteração foi encontrada quando utilizada a concentração de 50 µg/mL (GHOLINEJAD; KHADEM ANSARI; RASMI, 2019), assim como apresentado em nosso estudo. Brassolatti e colaboradores, utilizando a mesma NP TiO₂, verificaram aumento na produção intracelular de EROs na concentração de 100 µg/mL, porém em linhagens de queratinócitos e fibroblastos de pele humana (BRASSOLATTI et al., 2022).

Além disso, a partir do aumento de ROS gerado pela exposição à TiO₂ NP, outras alterações são desencadeadas como a indução de genes e consequente secreção de fatores inflamatórios e expressão de moléculas de adesão, os quais estão relacionados a processos pró-apoptóticos (GHOLINEJAD; KHADEM ANSARI; RASMI, 2019). Estudos demonstraram aumento na expressão de genes inflamatórios e secreção de fatores pró-inflamatórios, IL-6 e TNF, em células endoteliais após exposição à NP TiO₂ de anatase (GHOLINEJAD; KHADEM ANSARI; RASMI, 2019; HAN; NEWSOME; HENNIG, 2013). Os fibroblastos são células que atuam no sistema imune e podem aumentar a secreção de IL-6 em condições inflamatórias para ampliar a imunidade, tanto inata quanto adaptativa, devido a modulação de linfócitos T e B que esta citocina promove na fase aguda (BUECHLER; TURLEY, 2018).

Ao contrário dos trabalhos com células endoteliais, nossos resultados demonstraram que não houve aumento na secreção tanto de IL-6 quanto de TNF pelos fibroblastos LA-9 após

exposição de 24h à NP TiO₂. Nossos resultados corroboram com o estudo de Bernier e colaboradores, no qual também não foi verificado aumento de IL-6 e TNF para a linhagem de fibroblastos de camundongo L929, após 24 e 48h de exposição à NP TiO₂ de anatase (BERNIER et al., 2012). Em contrapartida, em linhagens humanas de queratinócitos (HaCaT) e fibroblastos (HDFn) foi observado menor produção de IL-6 na maior concentração testada após exposição à mesma NP TiO₂ (BRASSOLATTI et al., 2022).

Embora estudos *in vitro* tenham demonstrado aumento na secreção de fatores inflamatórios e encontrado uma forte relação desses resultados com a estrutura cristalina da NP TiO₂, mostrando que a anatase tem maior papel adjuvante no processo inflamatório que o rutilo (GHOLINEJAD; KHADEM ANSARI; RASMI, 2019; HAN; NEWSOME; HENNIG, 2013; VANDEBRIEL et al., 2018), nossos resultados e de outros autores demonstram que o perfil inflamatório deve ter grande relação com a linhagem celular em questão (BERNIER et al., 2012; BRASSOLATTI et al., 2022). Além disso, cabe ressaltar que esta NP TiO₂ foi funcionalizada para reduzir os riscos de citotoxicidade o que pode ter contribuído para a não indução de uma resposta inflamatória aguda.

Como via final ao dano resultante do estresse oxidativo encontra-se o processo de morte celular advindo geralmente da apoptose (LIU; TANG, 2020; SONG et al., 2016; WANG, 2001). A apoptose é um mecanismo de morte celular programada que contribui para a homeostase, mas que também pode ocorrer como um mecanismo de defesa em resposta a algum dano celular (ELMORE, 2007). Nossos resultados mostraram que houve aumento de células apoptóticas após 24h de exposição à NP TiO₂ para a linhagem de fibroblastos LA-9 na concentração de 150 µg/mL, sendo que o mesmo não foi observado para a concentração de 250 µg/mL, a qual apresentou redução de viabilidade celular, mudanças morfológicas e aumento na produção de EROs. Além disso, esse aumento foi mais expressivo para as células em apoptose inicial. Pedrino e colaboradores, utilizando a mesma NP TiO₂ e a mesma linhagem celular, encontraram aumento de células apoptóticas iniciais para a concentração de 100 µg/mL (PEDRINO et al., 2022).

Outro estudo, utilizando células endoteliais humanas (HUVECs) também relatou aumento de células apoptóticas iniciais para as concentrações de 100 e 50 µg/mL após 24h de exposição à NP TiO₂, porém na porcentagem geral de células apoptóticas somente a concentração de 100 µg/mL continuou apresentando esse aumento (GHOLINEJAD; KHADEM ANSARI; RASMI, 2019). Por outro lado, para células de hepatoma humano (HepG2) foi demonstrado aumento tanto de células apoptóticas iniciais quanto tardias após 24h de exposição à NP TiO₂ em baixas concentrações (SHUKLA et al., 2013).

É relevante ressaltar que a apoptose em seu estágio inicial pode ser revertida quando submetida a sinais pró-apoptóticos fracos. Células em apoptose inicial que foram induzidas por p53 podem ter o mecanismo apoptótico revertido se o estímulo que desencadeou esse processo for removido (ELMORE, 2007). Nosso trabalho, assim como outros acima apresentados, avaliaram a toxicidade aguda, com exposição de 24h somente. Sugere-se que o DNA pode sofrer reparo no início do processo apoptótico induzido por p53 e que esse reparo pode ser responsável pela reversão da via de morte celular em algumas circunstâncias (ELMORE, 2007).

Devido a possibilidade de reparo do DNA o estudo foi complementado pelo ensaio clonogênico, que avalia a capacidade de sobrevivência e proliferação celular a partir da formação de colônias, após a exposição de 24h à NP TiO₂ e posterior retirada desse estímulo. Destaca-se ainda, que este ensaio é considerado padrão ouro dentre os ensaios de citotoxicidade, devido a sua maior sensibilidade (BROWNING et al., 2014; FRANKEN et al., 2006). Os resultados do nosso trabalho demonstram que houve redução significativa na formação de colônias celulares dos fibroblastos LA-9 para a concentração de 250 µg/mL, o que indica que a exposição à NP TiO₂ nessa concentração e para essa linhagem desencadeou um processo citotóxico que possivelmente não foi corrigido pelos mecanismos da maquinaria celular, acima descritos.

Já para as demais concentrações não foi observado redução no número de colônias. Este fato sugere que as células submetidas à concentração de 150 µg/mL, que apresentaram alterações na viabilidade e na morfologia celular, além de aumento na produção intracelular de EROs e aumento de células apoptóticas, foram capazes de reverter o dano após a remoção da NP, possivelmente através de vias de correção do DNA, que permitiram que as células recuperassem seus mecanismos intrínsecos de proliferação.

De maneira similar, Uboldi e colaboradores também não verificaram diminuição de colônias para a linhagem de fibroblastos de camundongos 3T3 após 24h de exposição à NP TiO₂, entretanto demonstraram redução de colônias quando as células foram expostas por 72h à NP TiO₂ de rutilo (UBOLDI et al., 2016). Para fibroblastos de pele humana (BJ) também não foi observado redução de colônias após 24h de exposição à NP TiO₂ (BROWNING et al., 2014). Em contra partida, Coccini e colaboradores observaram redução de colônias em células neuronais após exposição prolongada à baixas concentrações de NP TiO₂ demonstrando que a toxicidade está relacionada tanto ao tipo celular, a concentração e ao tempo de exposição utilizado (COCCINI et al., 2015).

Apesar da OECD (*Organisation for Economic Co-operation and Development*) ainda não ter um guia específico para testes *in vitro* para avaliação da toxicidade de nanopartículas,

as metodologias utilizadas neste trabalho para determinar a citotoxicidade são apresentadas como as mais utilizadas pela literatura (OECD, 2018).

A partir dos resultados encontrados em modelo *in vitro* é possível sugerir que esta NP TiO₂ tem efeito citotóxico para a linhagem de fibroblastos LA-9 nas maiores concentrações testadas quando em exposição aguda, gerando redução de viabilidade celular, estresse oxidativo e morte celular por apoptose. Após exposição aguda e retirada do estímulo (NP), os fibroblastos indicam uma possível recuperação para a concentração de 150 µg/mL, a qual não é observada para a concentração mais elevada (250 µg/mL) que apresentou redução significativa na capacidade de proliferação e formação de colônias. Tal fato pode estar relacionado ao mecanismo anti-oxidante presente na célula e acionado nas primeiras horas de exposição à NP TiO₂, servindo como uma proteção com sinal pró-apoptótico fraco e reparo do DNA revertendo assim a via de apoptose (ELMORE, 2007; GHOLINEJAD; KHADEM ANSARI; RASMI, 2019).

Entretanto, estudos futuros são necessários para investigar melhor os efeitos de uma prolongada exposição a esta NP TiO₂ na linhagem LA-9, afim de esclarecer se esta citotoxicidade inicial realmente perdura resultando em danos como relatam trabalhos utilizando outras NP TiO₂, em diferentes linhagens celulares com mecanismo dose e tempo dependentes, ou se tais efeitos são revertidos pelos mecanismos de proteção existentes na maquinaria celular (BRASSOLATTI et al., 2022; COCCINI et al., 2015; UBOLDI et al., 2016).

Após a penetração das NP TiO₂ no organismo é possível que ocorra, além de citotoxicidade e genotoxicidade, interação com as células do sistema imune desencadeando inflamação, neurotoxicidade e gerando danos aos órgãos, como pulmões, fígado, rins e cérebro (RASHID; FORTE TAVČER; TOMŠIČ, 2021). A principal via de penetração das nanopartículas no corpo é a inalação, sendo que após penetrar, as NP TiO₂ são transportadas até os tecidos pulmonares e alcançam os alvéolos sendo direcionadas para o coração, fígado e demais órgãos (RASHID; FORTE TAVČER; TOMŠIČ, 2021). Sendo assim, a exposição *in vivo* à NP TiO₂ foi através da via intranasal por permitir que a NP passe pela cavidade nasal e dessa forma, na região olfativa, há a possibilidade da mesma ser transportada para o sistema nervoso central (ERDŐ et al., 2018) permitindo avaliar o potencial efeito neurotóxico já relatado para outras nanopartículas de TiO₂ (SONG et al., 2015).

Nossos resultados mostraram que não houve alteração significativa quanto a ingestão de ração e água ou no peso dos animais durante o período de exposição à NP TiO₂. Younes e colaboradores avaliando toxicidade subaguda em ratos também não observou alteração no peso dos animais (YOUNES et al., 2015). Em contrapartida Ze e colaboradores observaram redução

no peso dos camundongos após exposição intranasal à NP TiO₂, porém para uma exposição prolongada de 90 dias (ZE et al., 2014).

Vários efeitos imunomodulatórios são relatados após a exposição à NP TiO₂, como acúmulo da NP em órgãos linfóides periféricos, alterações no número de células imunes, viabilidade e função, bem como o aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias (LAPPAS, 2015). Para análise leucocitária nossos resultados demonstraram que não houve aumento de leucócitos totais ou mesmo polimorfonucleares, mononucleares ou eosinófilos tanto no sangue quanto nos lavados broncoalveolar (LBA) e lavado da cavidade peritoneal (LCP) após exposição à NP TiO₂. Já Yazdi e colaboradores observaram aumento no recrutamento de neutrófilos no LBA dos camundongos após dose única (em torno de 300 µg) à NP TiO₂ por instilação intranasal (YAZDI et al., 2010). Morimoto e colaboradores também não observaram aumento nos leucócitos totais ou neutrófilos no LBA de ratos após inalação e instilação intratraqueal em baixas concentrações de NP TiO₂ (200 µg). Entretanto houve aumento de neutrófilos após exposição à alta concentração (1000 µg) em 3 dias e 1 semana após instilação (MORIMOTO et al., 2016).

Também não foi observado aumento significativo para nenhuma das citocinas avaliadas (IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-10) tanto no plasma quanto no LBA dos animais após exposição à NP TiO₂. Novamente Yazdi e colaboradores demonstraram aumento na secreção de TNF e IL-6 no LBA dos camundongos após exposição única à NP TiO₂ por instilação intranasal (YAZDI et al., 2010). Park e colaboradores também demonstraram aumento das citocinas IL-6 e IL-10 após instilação intratraqueal única à NP TiO₂ tanto no plasma quanto no LBA dos camundongos (PARK et al., 2009). Já Ze e colaboradores observaram aumento na expressão de TNF no hipocampo de camundongos, entretanto após 90 dias consecutivos de exposição nasal à NP TiO₂ (ZE et al., 2014). Hong e colaboradores demonstraram aumento da expressão proteica de IFN- γ no fígado dos camundongos, porém após 6 meses consecutivos de exposição oral à NP TiO₂ (HONG et al., 2014).

As nanopartículas de TiO₂ podem causar sensibilização alérgica com aumento dos níveis do anticorpo IgE (LARSEN et al., 2010). Park e colaboradores também relataram aumento dos níveis de IgE no soro e no LBA dos camundongos após exposição com dose única por instilação intratraqueal à NP TiO₂ e avaliação após 3, 7 e 14 dias (LAPPAS, 2015; PARK et al., 2009). Entretanto nossos resultados mostraram que não houve aumento de IgE no LBA dos animais.

O fígado é o principal tecido do organismo que tem como função a desintoxicação, sendo o mesmo ativado para eliminar os possíveis efeitos colaterais após exposição à NP TiO₂

(WANG et al., 2007). Acúmulo de nanopartículas no fígado podem causar toxicidade a qual pode ser demonstrada por distúrbios nos índices de função hepática (TGO/TGP) por exemplo (RIZK et al., 2017). Os resultados deste trabalho demonstraram aumento significativo de TGO após exposição à 250 µg da NP TiO₂. Estudos apresentam aumento nos índices de TGO/TGP nos animais, porém após exposição intraperitoneal ou administração oral à NP TiO₂ (HONG et al., 2014; RIZK et al., 2017; WANG et al., 2007). Para exposição única por instilação intratraqueal às concentrações de 1000, 400 e 100 µg aproximadamente de NP TiO₂ e avaliação após 1, 7 e 14 dias não foi observado alteração nos índices de TGO ou TGP dos camundongos (PARK et al., 2009).

Devido à exposição à NP TiO₂ ter sido por via intranasal foi avaliado o peso dos pulmões dos animais, já que este foi o órgão de primeiro contato da NP e haveria a possibilidade de acúmulo no mesmo. Sun e colaboradores observaram aumento no peso dos pulmões dos camundongos, entretanto a partir de 15 dias consecutivos de exposição intratraqueal à aproximadamente 200 µg de NP TiO₂, evidenciando acúmulo da NP neste órgão (SUN et al., 2012). Younes e colaboradores também relataram aumento no peso dos pulmões de ratos mesmo após exposição intraperitoneal por 2 dias e avaliação após 14 dias da exposição, à aproximadamente 400 µg de NP TiO₂ (YOUNES et al., 2015).

Entretanto nossos resultados não apresentaram aumento no peso dos pulmões dos animais para nenhuma das concentrações após 4 doses de exposição intranasal à NP TiO₂. Nossos resultados corroboram com o trabalho de Warheit e colaboradores na medida em que também não foi evidenciado aumento no peso dos pulmões de ratos após exposição única por instilação à NP TiO₂ e avaliação por até 3 meses após a exposição (WARHEIT et al., 2007).

Os estudos *in vivo* têm demonstrado que as NP TiO₂ são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica podendo se acumular no cérebro e causar danos aos neurônios, células da glia e como consequência gerar disfunção no sistema nervoso central (SONG et al., 2015). Nossos resultados demonstraram alterações no encéfalo dos animais, para todas as concentrações de NP TiO₂ testadas (500, 250, 100 e 50 µg), como presença de infiltrado inflamatório, edemaciação difusa, astrocitose na região do córtex e presença de astrócitos gemistocíticos. Ze e colaboradores relataram alterações na região do hipocampo de camundongos, como proliferação de células da glia e degeneração celular, após exposição nasal à NP TiO₂ por 90 dias consecutivos (ZE et al., 2014). Também após administração oral única à NP TiO₂ foi observado degeneração da região do hipocampo no encéfalo de camundongos (WANG et al., 2007).

A inalação é a principal rota de entrada das NP TiO₂ para o organismo, sendo o trato respiratório o órgão alvo das NP inaláveis (ZHANG; LI; YANG, 2015). Nossos resultados mostraram que após 4 doses de exposição intranasal à NP TiO₂ no período de 14 dias resultou em alterações pulmonares nos camundongos para todas as concentrações testadas, como presença de infiltrado inflamatório, enfisema, rompimento alveolar e hemorragia intrabronquial. Sun e colaboradores também observaram alterações histopatológicas nos pulmões de camundongos, como enfisema pulmonar, hemorragia e infiltrado inflamatório após exposição intratraqueal à NP TiO₂ por 15, 30, 45, 60, 75 e 90 dias (SUN et al., 2012). Vários trabalhos também têm demonstrado a toxicidade pulmonar das NP TiO₂ em diferentes modelos (murino e ratos), vias de exposição (nasal, intraperitoneal), tempo (aguda e crônica) e diferentes doses (CHEN et al., 2009; MORIMOTO et al., 2016; PARK et al., 2009; SUN et al., 2012; WARHEIT et al., 2007).

A análise histológica do fígado dos animais demonstrou alterações neste órgão após exposição à NP TiO₂ para todas as concentrações testadas, como focos de infiltrado inflamatório, tumefação e degeneração hidrópica dos hepatócitos. Além disso, para as concentrações de 100 e 50 µg, foram observados hepatócitos com pigmento intracitoplasmático enegrecido, que se sugere ser impregnação da NP TiO₂ no fígado, já que imagens histológicas de pulmão de ratos após exposição à NP TiO₂ demonstrou a presença de neutrófilos e macrófagos fagocitando as NPs e as mesmas tem os mesmos aspectos e coloração encontrados em nossas imagens (MORIMOTO et al., 2013). Também Oyabu e colaboradores apresentam imagens de macrófagos fagocitando as NP TiO₂ em lavado broncoalveolar de ratos e novamente o aspecto e a coloração das NPs são os mesmos dos encontros neste trabalho (OYABU et al., 2017).

O resultado de aumento de TGO encontrado para a concentração de 250 µg corrobora com as alterações histológicas do fígado dos camundongos demonstrando que distúrbios nos índices de função hepática (TGO/TGP) podem indicar toxicidade neste órgão. Outros trabalhos também demonstraram alterações hepáticas tanto em camundongos quanto em ratos após exposição à diferentes concentrações e diferentes períodos à NP TiO₂ (ALARIFI et al., 2013; CHEN et al., 2009; HONG et al., 2014; YOUNES et al., 2015).

Também foram observadas alterações histológicas nos rins dos camundongos expostos à NP TiO₂ para todas as concentrações com presença de focos de infiltrado inflamatório em zona cortical bem como focos hemorrágicos, além da presença de pigmento intracitoplasmático enegrecido na zona medular nos grupos que receberam 250 e 100 µg que se sugere ser impregnação da NP também neste órgão. Huang e colaboradores também demonstraram

acumulação de NP TiO₂ nos rins de camundongos após exposição por instilação intratraqueal com 4 doses por 4 semanas. Além disso observaram alterações histológicas bem como fibrose renal induzida devido ao estresse oxidativo (HUANG et al., 2015). Após exposição crônica à NP TiO₂ por 9 meses consecutivos por via oral, também foi observado fibrose renal em camundongos (HONG et al., 2015).

Através dos resultados apresentados no modelo *in vivo* é possível notar que, após exposição intranasal à NP TiO₂ com 4 doses no período de 14 dias, não há alterações significativas quanto à ingestão de ração e água e peso dos animais bem como no perfil celular, de citocinas e anticorpo IgE. Entretanto observa-se alteração de função hepática (TGO) para a concentração de 250 µg além de alterações histológicas no encéfalo, pulmão, fígado e rins para todas as concentrações.

Sugere-se que o mecanismo envolvido na toxicidade observada principalmente nos órgãos, mas não vista para os outros parâmetros avaliados, possa ser explicado pela eliminação pré-sistêmica ou de primeira passagem, na qual as NPs podem passar pelas células da mucosa gastrointestinal, fígado e pulmão, se acumulando nesses órgãos e reduzindo a quantidade de partículas distribuídas pela circulação sistêmica para o restante do organismo. Nesse sentido o fígado pode eliminar uma parte significativa das NPs reduzindo os efeitos tóxicos em sítios-alvo pela circulação sistêmica, mas pode contribuir para a lesão dos órgãos, principalmente pulmão, fígado e rins devido ao processo de liberação das partículas para esses locais (BARANOWSKA-WÓJCIK et al., 2020; KLAASSEN; WATKINS III, 2012; RASHID; FORTE TAVČER; TOMŠIČ, 2021).

Até o presente momento não existe um consenso sobre quais parâmetros devem ser considerados no momento de classificar uma nanopartícula como tóxica ou não, tanto para a saúde humana quanto para o meio ambiente. Além disso, é importante destacar a dificuldade na comparação dos resultados presentes na literatura devido a diversidade de nanopartículas e suas diferentes características, além dos diferentes tipos de linhagens celulares e modelos animais com diferentes vias e tempos de exposição avaliados.

Cabe ainda ressaltar que as características da NP TiO₂ utilizada neste estudo, devem ser levadas em consideração ao avaliar seus efeitos biológicos, pois apesar de se tratar de uma partícula de tamanho reduzido (em torno de 3,5 nm) o que a torna uma NP reativa, a mesma apresenta funcionalização com carboxilato de sódio, que pode contribuir para sua melhor solubilidade em água reduzindo sua toxicidade. Os achados deste trabalho contribuem para o entendimento dos efeitos agudos desta NP TiO₂, porém ainda são necessários estudos que investiguem seus efeitos em exposições prolongadas para definir quais mecanismos celulares e

sistêmicos estão envolvidos efetivamente na toxicidade desta NP. Além disso, ressaltamos a necessidade de padronizações nos estudos futuros que facilitem as análises e a comparação dos resultados e auxiliem assim a definir o grau de toxicidade ou não do material em estudo.

6. CONCLUSÕES

A NP TiO₂ utilizada no presente estudo possui funcionalização com ligantes de superfície de carboxilato de sódio, que melhoram bastante a sua dispersão, e sugere-se que apresenta forma cristalina anatase. Apresenta também dispersão heterogênea e tamanho hidrodinâmico em torno de 3,5 nm, aumentando de tamanho no meio DMEM devido ao processo de aglomeração. Para a linhagem de fibroblastos LA-9 foi observada citotoxicidade dose e tempo dependentes gerando redução de viabilidade celular, estresse oxidativo e morte celular por apoptose, sendo que para a concentração de 150 µg/mL, há indícios de uma possível recuperação celular após a retirada da NP. No modelo *in vivo*, a NP TiO₂ gerou alterações histopatológicas no encéfalo, pulmão, fígado e rins dos camundongos após exposição intranasal e avaliação no período de 14 dias. Para os outros parâmetros avaliados não foram observadas alterações, com exceção do aumento de TGO para a concentração de 250 µg, o que indica que esta NP TiO₂ pode apresentar um mecanismo de eliminação de primeira passagem, na qual a toxicidade aguda é observada pela lesão nos órgãos em detrimento de outros parâmetros avaliados reforçando a necessidade de estudos de exposição prolongada.

Em suma, a avaliação da toxicidade aguda desta NP TiO₂ demonstrou efeitos citotóxicos para a linhagem de fibroblastos LA-9 bem como efeitos tóxicos sistêmicos após exposição intranasal em camundongos Balb/c. Estudos de exposição prolongada à esta NP podem complementar o entendimento dos mecanismos de toxicidade e contribuir para a segurança na sua utilização em diversas áreas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. **Anvisa**, p. 1–48, 2013.
- ALARIFI, S. et al. Histologic and apoptotic changes induced by titanium dioxide nanoparticles in the livers of rats. **International journal of nanomedicine**, v. 8, p. 3937–43, 11 out. 2013.
- ALLOUNI, Z. E. et al. Role of physicochemical characteristics in the uptake of TiO₂ nanoparticles by fibroblasts. **Toxicology in Vitro**, v. 26, n. 3, p. 469–479, abr. 2012.
- ALMEIDA, N. A. et al. TiO₂/graphene oxide immobilized in P(VDF-TrFE) electrospun membranes with enhanced visible-light-induced photocatalytic performance. **Journal of Materials Science**, v. 51, n. 14, p. 6974–6986, 25 jul. 2016.
- ALVES FEITOSA, K. et al. Toxicological effects of the mixed iron oxide nanoparticle (Fe₃O₄ NP) on murine fibroblasts LA-9. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 85, n. 16, p. 649–670, 18 ago. 2022.
- AMORIM NETO, A. A.; ALMEIDA, A. B. L. Titânio. Em: **Departamento Nacional de Produção Mineral (DNPM), Ministério de Minas e Energia, Brasil**. [s.l.: s.n.]. p. 516–523.
- ANH, N. H. 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.
- ARAMI, H. et al. In vivo delivery, pharmacokinetics, biodistribution and toxicity of iron oxide nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 23, p. 8576–8607, 2015.
- ARFIN, T.; TARANNUM, A. Engineered Nanomaterials for Industrial Application. Em: **Handbook of Nanomaterials for Industrial Applications**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 127–134.
- ARVIZO, R. R. et al. Effect of nanoparticle surface charge at the plasma membrane and beyond. **Nano Letters**, v. 10, n. 7, p. 2543–2548, 2010.
- AUFFAN, M. et al. Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. **Nature Nanotechnology**, v. 4, n. 10, p. 634–641, 2009.
- AZAM A., A. S. Application of nanomaterials in civil engineering. Nanomaterials and their applications. *Advanced structured materials*. **Springer**, v. 84, p. 169–189, 2018.
- BAHAMONDE, J. et al. Gold Nanoparticle Toxicity in Mice and Rats: Species Differences. **Toxicologic Pathology**, v. 46, n. 4, p. 431–443, 9 jun. 2018.

- BARANOWSKA-WÓJCIK, E. et al. Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure on Human Health—a Review. **Biological Trace Element Research**, v. 193, n. 1, p. 118–129, 13 jan. 2020.
- BAYDA, S. et al. The history of nanoscience and nanotechnology: From chemical-physical applications to nanomedicine. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 1–15, 2020.
- BERNIER, M.-C. et al. Preosteoblasts and fibroblasts respond differently to anatase titanium dioxide nanoparticles: A cytotoxicity and inflammation study. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 90, n. 1, p. 68–74, fev. 2012.
- BIHARI, P. et al. Optimized dispersion of nanoparticles for biological in vitro and in vivo studies. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 5, n. 1, p. 14, 6 nov. 2008.
- BLEEKER, E. A. J. et al. Considerations on the EU definition of a nanomaterial: Science to support policy making. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 65, n. 1, p. 119–125, fev. 2013.
- BRASSOLATTI, P. et al. Functionalized Titanium Nanoparticles Induce Oxidative Stress and Cell Death in Human Skin Cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 17, p. 1495–1509, mar. 2022.
- BROWNING, C. L. et al. Titanium Dioxide Nanoparticles are not Cytotoxic or Clastogenic in Human Skin Cells. **Journal of Environmental & Analytical Toxicology**, v. 04, n. 06, 2014.
- BUECHLER, M. B.; TURLEY, S. J. A short field guide to fibroblast function in immunity. **Seminars in Immunology**, v. 35, n. September, p. 48–58, fev. 2018.
- CHAN, W.-T. et al. In vivo toxicologic study of larger silica nanoparticles in mice. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 3421–3432, abr. 2017.
- CHEN, B. The effect of magnetic nanoparticles of Fe₃O₄ on immune function in normal ICR mice. **International Journal of Nanomedicine**, p. 593, ago. 2010.
- CHEN, J. et al. *In vivo* acute toxicity of titanium dioxide nanoparticles to mice after intraperitoneal injection. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 4, p. 330–337, maio 2009.
- CHEN, T.; YAN, J.; LI, Y. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 95–104, mar. 2014.
- COCCINI, T. et al. Comparative cellular toxicity of titanium dioxide nanoparticles on human astrocyte and neuronal cells after acute and prolonged exposure. **NeuroToxicology**, v. 48, p. 77–89, maio 2015.
- DADFAR, S. M. et al. Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 138, p. 302–325, jan. 2019.

- DANIYAL, M.; AZAM, A.; AKHTAR, S. Application of Nanomaterials in Civil Engineering. **Nanomaterials and Their Applications**, p. 169–189, 2018.
- DAO, T. H. et al. Removal of antibiotic from aqueous solution using synthesized TiO₂ nanoparticles: characteristics and mechanisms. **Environmental Earth Sciences**, v. 77, n. 10, p. 359, 11 maio 2018.
- DRÉNO, B. et al. Safety of titanium dioxide nanoparticles in cosmetics. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 33, n. S7, p. 34–46, 7 nov. 2019.
- ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 25 jun. 2007.
- ERDŐ, F. et al. Evaluation of intranasal delivery route of drug administration for brain targeting. **Brain Research Bulletin**, v. 143, p. 155–170, 1 out. 2018.
- FRANKEN, N. A. P. et al. Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315–2319, 21 dez. 2006.
- GHOLINEJAD, Z.; KHADEM ANSARI, M. H.; RASMI, Y. 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, n. February, p. 27–35, jul. 2019.
- GHOSH, M.; CHAKRABORTY, A.; MUKHERJEE, A. Cytotoxic, genotoxic and the hemolytic effect of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on human erythrocyte and lymphocyte cells in vitro. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 10, p. 1097–1110, 2013.
- GREISH, K. et al. The Effect of Silver Nanoparticles on Learning, Memory and Social Interaction in BALB/C Mice. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 16, n. 1, p. 148, 8 jan. 2019.
- GUIDELINE, O.; THE, F. O. R.; OF, T. OECD Test Guideline 403 (2009). n. September, 2009.
- GUO, X. et al. A highly active nano-micro hybrid derived from Cu-bridged TiO₂/porphyrin for enhanced photocatalytic hydrogen production. **Applied Catalysis B: Environmental**, v. 243, n. August 2018, p. 1–9, abr. 2019.
- HAMEED, A. et al. **Scope of Nanotechnology in Cosmetics: Dermatology and Skin Care Products** *Journal of Medicinal and Chemical Sciences Review J. Med. Chem. Sci.* [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://jmchemsci.com>>.
- HAMILTON, R. F. et al. Synthesis, characterization, and bioactivity of carboxylic acid-functionalized titanium dioxide nanobelts. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 11, n. 1, p. 1–15, 2014.

- HAMZEH, M.; SUNAHARA, G. I. In vitro cytotoxicity and genotoxicity studies of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in Chinese hamster lung fibroblast cells. **Toxicology in Vitro**, v. 27, n. 2, p. 864–873, mar. 2013.
- HAN, S. G.; NEWSOME, B.; HENNIG, B. Titanium dioxide nanoparticles increase inflammatory responses in vascular endothelial cells. **Toxicology**, v. 306, p. 1–8, abr. 2013.
- HE, X.; HWANG, H.-M. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 24, n. 4, p. 671–681, out. 2016.
- HENDRANINGRAT, L.; TORSÆTER, O. Metal oxide-based nanoparticles: revealing their potential to enhance oil recovery in different wettability systems. **Applied Nanoscience**, v. 5, n. 2, p. 181–199, 30 fev. 2015.
- HERINGA, M. B. et al. Risk assessment of titanium dioxide nanoparticles via oral exposure, including toxicokinetic considerations. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 10, p. 1515–1525, 25 nov. 2016.
- HIRAKAWA, K. et al. Photo-irradiated Titanium Dioxide Catalyzes Site Specific DNA Damage via Generation of Hydrogen Peroxide. **Free Radical Research**, v. 38, n. 5, p. 439–447, 7 maio 2004.
- HONG, F. et al. Chronic Exposure to Nanoparticulate TiO₂ Causes Renal Fibrosis Involving Activation of the Wnt Pathway in Mouse Kidney. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 5, p. 1639–1647, 11 fev. 2015.
- HONG, J. et al. Th2 Factors May Be Involved in TiO₂ NP-Induced Hepatic Inflammation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 28, p. 6871–6878, 16 jul. 2014.
- HOU, Y. et al. Effects of mesoporous SiO₂, Fe₃O₄, and TiO₂ nanoparticles on the biological functions of endothelial cells in vitro. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 102, n. 6, p. 1726–1736, jun. 2014.
- HUANG, K.-T. et al. Titanium Nanoparticle Inhalation Induces Renal Fibrosis in Mice via an Oxidative Stress Upregulated Transforming Growth Factor-β Pathway. **Chemical Research in Toxicology**, v. 28, n. 3, p. 354–364, 16 mar. 2015.
- HULLA, J. E.; SAHU, S. C.; HAYES, A. W. Nanotechnology: History and future. **Human and Experimental Toxicology**, v. 34, n. 12, p. 1318–1321, 2015.
- HUPFFER, H. M.; LAZZARETTI, L. L. NANOTECNOLOGIA E SUA REGULAMENTAÇÃO NO BRASIL. **Revista Gestão e Desenvolvimento**, v. 16, n. 3, p. 153, 9 set. 2019.
- JIN, C.-Y. et al. Cytotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticles in Mouse Fibroblast Cells. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, n. 9, p. 1871–1877, 15 set. 2008.

- KALLURI, R.; ZEISBERG, M. Fibroblasts in cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392–401, 30 maio 2006.
- KHALIL, M. et al. Non-aqueous modification of synthesized hematite nanoparticles with oleic acid. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 453, p. 7–12, jul. 2014.
- KHALIL M, JAN BM, TONG CW, B. M. Advanced nanomaterials in oil and gas industry: design, application and challenges. **Appl Energy**, v. 191, p. 287–310, 2017.
- KLAASSEN, C. D.; WATKINS III, J. B. **Fundamentos em Toxicologia de Casarett e Doull. Toxicologia**, 2012. Disponível em: <<http://books.google.com/books?id=7QITe0DcPKsC&pgis=1>>
- KONG, X.; OHADI, M. M. **Applications of Micro and Nano Technologies in the Oil and Gas Industry-An Overview of the Recent Progress**. All Days. **Anais...SPE**, 1 nov. 2010. Disponível em: <<https://onepetro.org/SPEADIP/proceedings/10ADIP/All-10ADIP/Abu%20Dhabi,%20UAE/92871>>
- KUMAR, G. et al. Flow cytometry evaluation of in vitro cellular necrosis and apoptosis induced by silver nanoparticles. **Food and Chemical Toxicology**, v. 85, n. June, p. 45–51, 2015.
- LAPPAS, C. M. The immunomodulatory effects of titanium dioxide and silver nanoparticles. **Food and Chemical Toxicology**, v. 85, p. 78–83, 1 nov. 2015.
- LARSEN, S. T. et al. Nano Titanium Dioxide Particles Promote Allergic Sensitization and Lung Inflammation in Mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, n. 2, p. 114–117, fev. 2010.
- LI, Y. et al. Systematic Influence Induced by 3 nm Titanium Dioxide Following Intratracheal Instillation of Mice. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 10, n. 12, p. 8544–8549, 1 dez. 2010.
- LI, Y. et al. Nanoparticle-based sensors for food contaminants. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 113, p. 74–83, abr. 2019.
- LIU, N.; TANG, M. Toxic effects and involved molecular pathways of nanoparticles on cells and subcellular organelles. **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, n. 1, p. 16–36, 11 jan. 2020.
- LIU, Y. et al. Effects of DMSA-coated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles on global gene expression of mouse macrophage RAW264.7 cells. **Toxicology Letters**, v. 205, n. 2, p. 130–139, 2011.
- LIU, Y. et al. Toxicity of manufactured nanomaterials. **Particuology**, v. 69, p. 31–48, out. 2022.
- MAGALHÃES BALTAR, C. A. et al. Capítulo 37 - Minerais de Titânio. Em: **Rochas e Minerais Industriais - CETEM 2ª Edição**. [s.l: s.n.]. p. 841–863.

- MAIORANO, G. 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.
- MAO, H. et al. Hydrophobic associated polymer based silica nanoparticles composite with core-shell structure as a filtrate reducer for drilling fluid at ultra-high temperature. **Journal of Petroleum Science and Engineering**, v. 129, p. 1–14, maio 2015.
- MAURYA, I. C. et al. Callindra haematocephata and Peltophorum pterocarpum flowers as natural sensitizers for TiO₂ thin film based dye-sensitized solar cells. **Optical Materials**, v. 60, p. 270–276, out. 2016.
- MEDEIROS, A. M. M. S.; MACHADO, F.; RUBIM, J. C. Synthesis and characterization of a magnetic bio-nanocomposite based on magnetic nanoparticles modified by acrylated fatty acids derived from castor oil. **European Polymer Journal**, v. 71, p. 152–163, out. 2015.
- MEI, B. C. et al. Polyethylene glycol-based bidentate ligands to enhance quantum dot and gold nanoparticle stability in biological media. **Nature Protocols**, v. 4, n. 3, p. 412–423, 2009.
- MIRGHANI, M. E. S. et al. FTIR spectroscopic determination of soap in refined vegetable oils. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 79, n. 2, p. 111–116, fev. 2002.
- MITCHELL, M. J. et al. Engineering precision nanoparticles for drug delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 20, n. 2, p. 101–124, 4 fev. 2021.
- MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 346–356, mar. 2013.
- MORIMOTO, Y. et al. Inhalation toxicity assessment of carbon-based nanoparticles. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 770–781, 2013.
- MORIMOTO, Y. et al. Comparison of pulmonary inflammatory responses following intratracheal instillation and inhalation of nanoparticles. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 5, p. 607–618, 27 maio 2016.
- MOSMANN, T. 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, 16 dez. 1983.
- MUDUNKOTUWA, I. A.; MINSHID, A. AL; GRASSIAN, V. H. ATR-FTIR spectroscopy as a tool to probe surface adsorption on nanoparticles at the liquid–solid interface in environmentally and biologically relevant media. **The Analyst**, v. 139, n. 5, p. 870–881, 2014.
- MUNSHI, A.; HOBBS, M.; MEYN, R. E. Clonogenic Cell Survival Assay. **Methods Mol Med.**, v. 110, p. 021–028, 2005.

- MURTAZA, M.; RAHMAN, M. K.; AL-MAJED, A. A. **Mechanical and Microstructural Studies of Nanoclay Based Oil Well Cement Mix under High Pressure and Temperature Application**. Day 3 Wed, November 16, 2016. **Anais...IPTC**, 12 nov. 2016. Disponível em: <<https://onepetro.org/IPTCONF/proceedings/16IPTC/3-16IPTC/Bangkok,%20Thailand/154167>>
- 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, n. June 2018, p. 464–474, mar. 2019.
- NAJAH-MISSAOUI, W.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 1, p. 385, 31 dez. 2020.
- NEL, A. E. et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano-bio interface. **Nature Materials**, v. 8, n. 7, p. 543–557, 2009.
- NGUYEN, V. H.; LEE, B. J. Protein corona: A new approach for nanomedicine design. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 3137–3151, 2017.
- NURDIN, I. et al. Effect of nitric acid concentrations on synthesis and stability of maghemite nanoparticles suspension. **Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.
- OBERDÖRSTER, G. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, n. 1, p. 89–105, jan. 2010.
- OECD. **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**. Disponível em: <[https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO\(2018\)4&doclanguage=en](https://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=ENV/JM/MONO(2018)4&doclanguage=en)>.
- OYABU, T. et al. Biopersistence of NiO and TiO₂ Nanoparticles Following Intratracheal Instillation and Inhalation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 12, p. 2757, 19 dez. 2017.
- P. C. CAPLAN, S. et al. Sulfonated Polystyrene Nanoparticles as Oleic Acid Diethanolamide Surfactant Nanocarriers for Enhanced Oil Recovery Processes. **Polymers**, v. 11, n. 9, p. 1513, 17 set. 2019.
- PANDEY, R. K.; PRAJAPATI, V. K. Molecular and immunological toxic effects of nanoparticles. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1278–1293, fev. 2018.
- PARK, E.-J. et al. Induction of chronic inflammation in mice treated with titanium dioxide nanoparticles by intratracheal instillation. **Toxicology**, v. 260, n. 1–3, p. 37–46, 16 jun. 2009.

- PEDRINO, M. et al. Analysis of cytotoxicity and genotoxicity in a short-term dependent manner induced by a new titanium dioxide nanoparticle in murine fibroblast cells. **Toxicology Mechanisms and Methods**, v. 32, n. 3, p. 213–223, 24 mar. 2022.
- PRAVEEN, P. et al. Structural, optical and morphological analyses of pristine titanium di-oxide nanoparticles – Synthesized via sol–gel route. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 117, n. September, p. 622–629, jan. 2014.
- PUCK, T. T.; MARCUS, P. I. ACTION OF X-RAYS ON MAMMALIAN CELLS. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 103, n. 5, p. 653–666, 1 maio 1956.
- RAI, M. et al. **Nanotechnologies in Food and Agriculture**. Cham: Springer International Publishing, 2015.
- RAJAKUMAR, G. et al. Fungus-mediated biosynthesis and characterization of TiO₂ nanoparticles and their activity against pathogenic bacteria. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 91, n. June, p. 23–29, jun. 2012.
- RASHID, M. M.; FORTE TAVČER, P.; TOMŠIČ, B. Influence of Titanium Dioxide Nanoparticles on Human Health and the Environment. **Nanomaterials**, v. 11, n. 9, p. 2354, 10 set. 2021.
- RIZK, M. Z. et al. Toxicity of titanium dioxide nanoparticles: Effect of dose and time on biochemical disturbance, oxidative stress and genotoxicity in mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 466–472, jun. 2017.
- SALAMANCA-BUENTELLO, F. et al. Nanotechnology and the developing world. **PLoS Medicine**, v. 2, n. 5, p. 0383–0386, 2005.
- SANTRA, A.; BOUL, P. J.; PANG, X. **Influence of Nanomaterials in Oilwell Cement Hydration and Mechanical Properties**. All Days. **Anais...SPE**, 12 jun. 2012. Disponível em: <<https://onepetro.org/speionc/proceedings/12IONC/All-12IONC/Noordwijk,%20The%20Netherlands/158482>>
- SCHERBART, A. M. et al. Contrasting macrophage activation by fine and ultrafine titanium dioxide particles is associated with different uptake mechanisms. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 8, p. 1–19, 2011.
- SHI, H. et al. Titanium dioxide nanoparticles: A review of current toxicological data. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 10, n. 1, 2013.
- SHUKLA, R. K. et al. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 1, p. 231–241, 2011.
- SHUKLA, R. K. et al. TiO₂ nanoparticles induce oxidative DNA damage and apoptosis in human liver cells. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 1, p. 48–60, 2013.

- SIMKÓ, M.; MATTSSON, M. O. Risks from accidental exposures to engineered nanoparticles and neurological health effects: A critical review. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 7, n. 1, p. 42, 2010.
- SINGH, B. P. et al. Stability of dispersions of colloidal alumina particles in aqueous suspensions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 291, n. 1, p. 181–186, 2005.
- SINGH, L. K.; KOIRY, B. P. Natural Dyes and their Effect on Efficiency of TiO₂ based DSSCs: a Comparative Study. **Materials Today: Proceedings**, v. 5, n. 1, p. 2112–2122, 2018.
- SONG, B. et al. A review on potential neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, v. 10, n. 1, p. 342, 26 dez. 2015.
- SONG, B. et al. Unraveling the neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles: focusing on molecular mechanisms. **Beilstein Journal of Nanotechnology**, v. 7, n. 1, p. 645–654, 29 abr. 2016.
- SUN, D.; YANG, J.; WANG, X. Bacterial cellulose/TiO₂ hybrid nanofibers prepared by the surface hydrolysis method with molecular precision. **Nanoscale**, v. 2, n. 2, p. 287–292, 2010.
- SUN, Q. et al. Oxidative damage of lung and its protective mechanism in mice caused by long-term exposure to titanium dioxide nanoparticles. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 100A, n. 10, p. 2554–2562, 24 out. 2012.
- TAUROZZI, J. S.; HACKLEY, V. A.; WIESNER, M. R. A standardised approach for the dispersion of titanium dioxide nanoparticles in biological media. **Nanotoxicology**, v. 7, n. 4, p. 389–401, 20 jun. 2013.
- TINKLE, S. et al. Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1313, n. 1, p. 35–56, 27 abr. 2014.
- TOMANKOVA, K. et al. Cytotoxicity, cell uptake and microscopic analysis of titanium dioxide and silver nanoparticles in vitro. **Food and Chemical Toxicology**, v. 82, p. 106–115, 2015.
- TRIPATHI, V. K. et al. Crosstalk Between Co-Cultured 3T3-L1 and C2C12 Cells After the Exposure of Nano-Titanium Dioxide. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 6, p. 3870–3879, 1 jun. 2018.
- UBOLDI, C. et al. Role of the crystalline form of titanium dioxide nanoparticles: Rutile, and not anatase, induces toxic effects in Balb/3T3 mouse fibroblasts. **Toxicology in Vitro**, v. 31, p. 137–145, 2016.
- VANDEBRIEL, R. J. et al. The crystal structure of titanium dioxide nanoparticles influences immune activity in vitro and in vivo. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 15, n. 1, p. 9, 30 dez. 2018.

- VARANDA, L. C. et al. **Inorganic and organic-inorganic composite nanoparticles with potential biomedical applications: Synthesis challenges for enhanced performance.** [s.l.: s.n.].
- WAN, C. P.; MYUNG, E.; LAU, B. H. S. An automated micro-fluorometric assay for monitoring oxidative burst activity of phagocytes. **Journal of Immunological Methods**, v. 159, n. 1–2, p. 131–138, fev. 1993.
- WANG, J. DNA damage and apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 8, n. 11, p. 1047–1048, 30 nov. 2001.
- WANG, J. et al. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration. **Toxicology Letters**, v. 168, n. 2, p. 176–185, 30 jan. 2007.
- WANG, J. et al. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. **Toxicology**, v. 254, n. 1–2, p. 82–90, dez. 2008.
- WANG, J. et al. P38-Nrf-2 Signaling Pathway of Oxidative Stress in Mice Caused by Nanoparticulate TiO₂. **Biological Trace Element Research**, v. 140, n. 2, p. 186–197, 27 maio 2011.
- WANG, Y. 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.
- WARHEIT, D. B. et al. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: Differential responses related to surface properties. **Toxicology**, v. 230, n. 1, p. 90–104, 25 jan. 2007.
- YAZDI, A. S. et al. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 α and IL-1 β . **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 45, p. 19449–19454, 9 nov. 2010.
- YOUNES, N. R. BEN et al. Subacute toxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles in male rats: emotional behavior and pathophysiological examination. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 11, p. 8728–8737, 10 jun. 2015.
- YU, J. et al. Effect of particle hydrophobicity on CO₂ foam generation and foam flow behavior in porous media. **Fuel**, v. 126, p. 104–108, jun. 2014.
- ZE, Y. et al. TiO₂ Nanoparticles Induced Hippocampal Neuroinflammation in Mice. **PLoS ONE**, v. 9, n. 3, p. e92230, 21 mar. 2014.

- ZHANG, H.-X.; HE, X.-D.; HE, F. Microstructural characterization and properties of ambient-dried SiO₂ matrix aerogel doped with opacified TiO₂ powder. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 469, n. 1–2, p. 366–369, fev. 2009.
- ZHANG, J. et al. Cytotoxicity of different sized TiO₂nanoparticles in mouse macrophages. **Toxicology and Industrial Health**, v. 29, n. 6, p. 523–533, 2013.
- ZHANG, X.; LI, W.; YANG, Z. Toxicology of nanosized titanium dioxide: an update. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 12, p. 2207–2217, 2015.
- ZHUANG, B. et al. Assembly and electron transfer mechanisms on visible light responsive 5,10,15,20-meso-tetra(4-carboxyphenyl)porphyrin/cuprous oxide composite for photocatalytic hydrogen production. **Applied Catalysis A: General**, v. 533, p. 81–89, mar. 2017.
- ZIELIŃSKA, A. 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, 28 jun. 2020.
- ZIMMERMANN, M.; MEYER, N. Annexin V/7-AAD Staining in Keratinocytes. Em: **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**. [s.l: s.n.]. v. 740p. 57–63.
- ZOCCAL, J. V. M. **Síntese e caracterização de nanopartículas de TiO₂ pelo método do precursor polimérico**. São Carlos - SP: Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, 2010.
- ZORODDU, M. et al. Toxicity of Nanoparticles. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 33, p. 3837–3853, 1 jun. 2014.

APÊNDICE A – Artigo referente à experimentação *in vitro*: Titanium Dioxide Nanoparticle (TiO₂ NP) Induces Toxic Effects on LA-9 Mouse Fibroblast Cell Line



Cellular Physiology & Biochemistry
International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry and Pharmacology

[Home](#) [Issues](#) [Author](#) [Reviewer](#) [About](#)

Original Article - DOI:10.33594/000000616
Accepted 13 February 2023 - Published online 22 March 2023

[PDF-download](#)

Titanium Dioxide Nanoparticle (TiO₂ NP) Induces Toxic Effects on LA-9 Mouse Fibroblast Cell Line

Ana Carolina M. Fattori^a Patrícia Brassolatti^a Karina A. Feitosa^a Matheus Pedrino^a Ricardo de O. Correia^a Yulli R. Albuquerque^a Joice M. de A. Rodolpho^a Genevêva L. F. Luna^a Juliana Cancino-Bernardi^{b,e} Valtencir Zucolotto^b Carlos Speglich^c Karina N. Z. P. Rossi^d Fernanda de F. Anibal^a

^aLaboratório de Inflamação e Doenças Infecciosas, Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil, ^bGrupo de Nanomedicina e Nanotoxicologia, Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, Brazil, ^cCentro de Pesquisas, Desenvolvimento e Inovação Leopoldo Américo Miguez de Mello (CENPES/Petrobras), Rio de Janeiro, RJ, Brazil, ^dLaboratório de Patologia e Biocompatibilidade, Departamento de Morfologia e Patologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brazil, ^eDepartamento de Química, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

ANEXO A – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais – UFSCar

Pró Reitoria
Pesquisa

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



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação dos efeitos de novas nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) utilizando modelos experimentais in vitro e in vivo", protocolada sob o CEUA nº 9954280318, sob a responsabilidade de **Ana Carolina Maragno Fattori** - 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 09/05/2018.

We certify that the proposal "Evaluation of the effects of new titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles using experimental models in vitro and in vivo", utilizing 90 Isogenics mice (90 females), protocol number CEUA 9954280318, under the responsibility of **Ana Carolina Maragno Fattori** - 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 05/09/2018.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [05/2018](#) a [06/2022](#) Área: [Morfologia E Patologia](#)

Origem: [Biotério Externo](#)

Espécie: [Camundongos isogênicos](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [4 a 6 semanas](#)

N: [90](#)

Linhagem: [Balb/c](#)

Peso: [15 a 18 g](#)

Resumo: As nanopartículas, devido ao seu reduzido tamanho, apresentam maior área de superfície por unidade de volume e uma maior concentração de átomos na sua superfície. Essas características proporcionam a essas partículas maior reatividade e propriedades que diferem da partícula do mesmo tipo material, que não se apresenta em escala nanométrica. Tal característica torna essas nanopartículas importantes para determinadas aplicações, como pigmentos, cosméticos, para processos de purificação de água, na construção civil, em medicamentos, entre outros. Entretanto essa maior reatividade possivelmente faz com a mesma também tenha maior interação com o organismo e com o meio ambiente. Embora as nanopartículas já venham sendo estudadas há mais de 30 anos, o impacto ambiental e para a saúde humana a partir do uso dessas ainda é alvo de estudos e discussão. Apesar da fonte do material para síntese ser a mesma, as nanopartículas podem apresentar diferenças consideráveis entre si mesmo diferindo somente no tamanho, e, uma vez expostas a organismos vivos, podem ser nocivas aos manipuladores desses nanomateriais. Vários trabalhos têm relatado que a exposição a determinadas nanopartículas pode causar danos a vários órgãos, bem como citotoxicidade e danos ao DNA. A absorção, distribuição, metabolismo, excreção, os efeitos celulares e sobre o DNA que nanopartículas de TiO₂ podem promover são dependentes de diversos fatores, como o tamanho da partícula, a via de exposição, os ligantes de superfície e sua capacidade de aglomeração. Dessa forma o objetivo do presente estudo será avaliar os efeitos das novas nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) com 5 e 50 nm, com os ligantes citrato e grupos amina. Para isso serão utilizados ensaios que determinem a toxicidade sistêmica, citotoxicidade, genotoxicidade e imunotoxicidade, para que seja atribuído segurança na utilização desse nanomaterial, principalmente no que tange a exposição ocupacional ao mesmo em diferentes setores da indústria.

Local do experimento: Departamento de Morfologia e Patologia (DMP) - UFSCar

São Carlos, 17 de maio de 2018



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

ANEXO B – Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais – UFSCar

Pró Reitoria
Pesquisa

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



São Carlos, 24 de setembro de 2018
CEUA N 9954280318

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Ana Carolina Maragno Fattori
Área: Morfologia E Patologia
Fernanda De Freitas Anibal (orientador)

Título da proposta: "Avaliação dos efeitos de novas nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂) utilizando modelos experimentais in vitro e in vivo".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais UFSCar

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 13/setembro/2018) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "O projeto que primeiramente submeti ao CEUA previa a utilização de 4 tipos diferentes de nanopartículas de TiO₂ e dessa forma os grupos experimentais eram de acordo com o tipo de partícula. Entretanto a universidade colaboradora deste projeto, e que realiza a síntese da nanopartícula, nos enviou e sugeriu o teste de um único tipo de partícula, de TiO₂ de 2,5 a 3 nm e com o ligante carboxilato de sódio, em diferentes quantidades de exposição. Dessa forma, os grupos experimentais se mantêm, porém a partícula utilizada será a descrita acima e os grupos experimentais serão de acordo com diferentes quantidades de exposição dessa mesma partícula (50, 100, 250 e 500 µg) como é descrito no projeto alterado em anexo (Item 3.3.2). Também incluímos um ensaio piloto (descrito no projeto em anexo - Item 3.3.3) para testarmos duas quantidades de exposição à nanopartícula que estão nos extremos das quantidades escolhidas com base na literatura. Para este piloto é necessário aumentar 15 animais ao N amostral da espécie escolhida. A partir deste ensaio piloto será possível observar se há toxicidade acima ou abaixo das quantidades de exposição escolhidas, podendo ser feito, se necessário, uma alteração nas quantidades de exposição da nanopartícula nos grupos experimentais. Segundo a literatura, para teste de toxicidade, deve-se utilizar animais com um peso um pouco maior. Sendo assim, ao invés de utilizar camundongos fêmeas BALB/C de 4 a 6 semanas, utilizaremos animais de 8 a 10 semanas, pesando de 18 a 22 g para o total de animais que serão utilizados neste projeto, incluindo o ensaio piloto. "

Comentário da CEUA: "".

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

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