

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Rhaisa Bernardes Silva Dias

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DE
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM *Lactuca sativa*
L. (ASTERACEAE)**

DISSERTAÇÃO

JUIZ DE FORA

2021

RHAISA BERNARDES SILVA DIAS

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DE
NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM *Lactuca sativa*
L. (ASTERACEAE)**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Saulo Marçal de Sousa

Coorientadora: Profa. Dra. Michele Munk Pereira

JUIZ DE FORA

2021

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Bernardes Silva Dias, Rhaisa.

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL CITOGENOTÓXICO DE NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM *Lactuca sativa* L. (ASTERACEAE) / Rhaisa Bernardes Silva Dias. -- 2021.

53 f.

Orientador: Saulo Marçal de Sousa

Coorientadora: Michele Munk Pereira

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2021.

1. Nanotoxicidade. 2. Dióxido de titânio. 3. *Lactuca sativa*. 4. Citogenética. 5. Meio ambiente. I. Marçal de Sousa, Saulo, orient. II. Munk Pereira, Michele, coorient. III. Título.

RHAISA BERNARDES SILVA DIAS

Avaliação do potencial citogenotóxico de nanopartículas de dióxido de titânio de *Lactuca Sativa* L. (Asteraceae)

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Genética e Biotecnologia.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Juliana Mainenti Leal Lopes

Dra. Michele Munk Pereira

Dr. Saulo Marçal de Sousa

Juiz de Fora, 15 de Setembro de 2021

AGRADECIMENTO

A realização desse sonho se concretizou com o auxílio de pessoas maravilhosas. Em primeiro lugar, dedico essa conquista à minha mãe Ana Maria e ao meu pai Jânio, por permanecerem ao meu lado e por todo apoio incondicional. Ao meu noivo, Dylan, por me incentivar a ir em busca dos meus sonhos. Aos meus familiares que sempre vibraram com minhas conquistas.

Agradeço aos meus orientadores Saulo e Michele pela oportunidade e por todo aprendizado. Agradeço aos colegas de Laboratório, Elyabe, Victória, Ana Luiza, Marinna, Rafael, Juliana Mainenti, Laís, Juliana e Aryane por todo apoio dedicado a mim sempre.

E agradeço aos órgãos de fomento CAPES, FAPEMIG, CNPq e as instituições parceiras.

RESUMO

O dióxido de titânio (TiO_2) é um óxido metálico, amplamente encontrado na natureza, biologicamente inerte em humanos e animais e muito utilizado devido sua capacidade fotocatalítica e sua capacidade de oferecer brancura e opacidade. Com o advento da nanotecnologia, nos últimos anos, o uso do TiO_2 na forma de nanopartícula (NP) cresceu consideravelmente. Esse nanomaterial vem sendo utilizado como aditivo em tintas, na produção de papel, borracha, medicamentos, produtos alimentícios e cosméticos. Em consequência do aumento da utilização e do crescimento da produção das nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2 NPs), há maior liberação dessas nanopartículas no meio ambiente e, com isso, se intensificam as preocupações em relação ao potencial tóxico desses nanomateriais nos ecossistemas, surgindo a necessidade de conhecer seu comportamento e seus riscos. Assim, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial citogenotóxico de nanopartículas de dióxido de titânio no modelo vegetal *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). Para isso, as TiO_2 NPs (JRCNM01001a, União Europeia) foram caracterizadas por Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e pelo Potencial Zeta para identificarmos o tamanho hidrodinâmico, o índice de polidispersão e a carga superficial. Em seguida, foram realizados ensaios para análise de fitotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade. Para os experimentos, sementes de *Lactuca sativa* L. foram submetidas à germinação em placas de petri contendo TiO_2 NPs nas concentrações de 10; 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, por 72h, a 25°C e no escuro. Os dados da fitotoxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade foram analisados estatisticamente por ANOVA e as médias comparadas por teste Tukey, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os dados obtidos pelo DLS indicaram tamanho hidrodinâmico médio de 505,33 nm. Ainda que as nanopartículas de TiO_2 se agreguem e formem aglomerados com um tamanho maior, como encontrado, os tamanhos das partículas primárias continuam sendo uma característica significativa, podendo causar toxicidade. O PDI médio de 0,353 encontrado indica uma amostra com média polidispersão, uma vez que a força aplicada pelo sonicador pode não ser suficiente para quebrar ligações rígidas entre agregados, superando apenas as forças de van der Waals dos aglomerados. Potencial Zeta de -27,57 mV, sendo próximo à uma condição estável de $\pm 30\text{mV}$. A análise da taxa de germinação e alongamento radicular indicou que as TiO_2 NPs não são fitotóxicas para células meristemáticas de *L. sativa*, nas concentrações e condições experimentais testadas. No entanto, a análise citogenética mostrou que as concentrações de 10; 100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$ de TiO_2 NPs apresentam citogenotoxicidade.

Palavras-chave: Nanotoxicidade. Dióxido de titânio. *Lactuca sativa*. Citogenética. Meio ambiente.

ABSTRACT

Titanium dioxide (TiO₂) is a metallic oxide, found in nature, biologically inert in humans and animals and widely used due to its photocatalytic capacity and its ability to offer whiteness and opacity. With the advent of nanotechnology, in recent years, the use of TiO₂ in the form of nanoparticle (NP) has grown considerably. This nanomaterial has been used as an additive in paints, in the production of paper, rubber, medicines, food products and cosmetics. As a result of the increased use and growth in the production of titanium dioxide nanoparticles (TiO₂NPs), there is greater release of these nanoparticles into the environment and, as a result, concerns are intensified in relation to the toxic potential of these nanomaterials in ecosystems, resulting in want to know its behavior and its risks. Thus, the aim of the present work was to evaluate the cytogenotoxic potential of titanium dioxide nanoparticles in the plant model *Lactuca sativa* L. (Asteraceae). For this, TiO₂NPs (JRCNM01001a, European Union) were characterized by Dynamic Light Scattering (DLS) and by Zeta Potential to identify the hydrodynamic size, polydispersion index and surface charge. Then, tests were carried out to analyze phytotoxicity, cytotoxicity and genotoxicity. For the experiments, seeds of *Lactuca sativa* L. were germinated in petri dishes containing TiO₂NPs in the number of 10; 100 and 1000 µg / mL, for 72h, at 25°C and in the dark. Phytotoxicity, cytotoxicity and genotoxicity data were statistically presented by ANOVA and as means compared by Tukey test, p values <0.05 were considered. The data obtained by DLS indicated an average hydrodynamic size of 505.33 nm. Even though TiO₂ nanoparticles aggregate and form agglomerates with a larger size, as found, primary particle sizes still remain a significant feature and can cause toxicity. The average PDI of 0.353 found indicates a sample with average polydispersion, since the force applied by the sonicator cannot be sufficient to break rigid bonds between aggregates, surpassing only the van der Waals frames of the agglomerates. Zeta potential of -27.57 mV, being close to a stable condition of ± 30 mV. An analysis of the germination rate and along the root surface indicated that TiO₂NPs were not phytotoxic to *L. sativa* meristematic cells, under the experimental conditions and conditions tested. However, a cytogenetic analysis revealed that the rules of 10; 100 and 1000 µg / mL of TiO₂NPs show cytogenotoxicity.

Keywords: Nanotoxicity. Titanium dioxide. *Lactuca sativa*. Cytogenetics. Environment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A Taça de Lycurgus. (A) Cor verde atribuída ao espalhamento de luz por dispersões coloidais de nanopartículas de prata (>40nm). (B) Cor vermelho-púrpura como resultado da absorção de luz (~520nm) pelas partículas de ouro. Fonte: BAYDA et al., 2020.....12

Figura 2 – Estruturas tetragonais de formas cristalinas de rutilo, anatase e brookite TiO₂ NPs (esferas: vermelho - O₂, cinza - Ti). Fonte: WÓJCIK et al., 2019.17

Figura 3 – Índice mitótico em células meristemáticas de *Lactuca sativa* expostas a diferentes concentrações de TiO₂NP. Dados apresentados por média ± desvio padrão.26

Figura 4 – Índice de anormalidades cromossômicas em células meristemáticas de *Lactuca sativa* expostas a diferentes concentrações de TiO₂NP. Dados apresentados por média ± desvio padrão.27

Figura 5 – Frequência de micronúcleo em células meristemáticas de *Lactuca sativa* expostas a diferentes concentrações de TiO₂NP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si. Dados apresentados por média ± desvio padrão.....28

Figura 6 – Fases do ciclo celular e aberrações cromossômicas observadas em células de meristema radicular de *Lactuca sativa* expostas à TiO₂NP. (a) prófase normal. (b) pró-metáfase. (c) metáfase normal. (d) metáfase com aderência. (e) e (f) metáfase com cromossomo fragmentado. (g) anáfase normal. (h) anáfase com cromossomo tardio (i) anáfase com ponte. (j) anáfase com cromossomo quebrado. (k) telófase

normal. (l) telófase com ponte. Aumento de 100x.....	29
--	----

Figura 7 – Intérfase e aberrações cromossômicas observadas em células de meristema radicular de *Lactuca sativa* expostas à TiO₂NP. (a) intérfase normal. (b) e (c) interfase com micronúcleo. (d), (e) e (f) comunicação entre núcleos interfásicos. Aumento de 100x.....29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resultados obtidos por DLS na concentração de 100 µg/ml de TiO₂NP. Tamanho hidrodinâmico, PDI e potencial zeta.24

Tabela 2 – Germinação de sementes de *Lactuca sativa* expostas à nanopartícula de dióxido de titânio (TiO₂NP). Dados apresentados por média ± desvio padrão.25

Tabela 3 – Comprimento de raiz de *Lactuca sativa* expostas à nanopartícula de dióxido de titânio (TiO₂NP). Dados apresentados por média ± desvio padrão.25

Tabela 4 – Tipos de aberrações cromossômicas analisadas em células de meristema radicular de *Lactuca sativa* expostas à TiO₂NP. Os dados são expressos em frequência (%). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si. Apenas a análise de micronúcleo apresentou diferença estatística significativa (p<0,05). Dados apresentados por média ± desvio padrão.....28

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

AC – Aberração Cromossômica

Ag – Prata

ANOVA – Análise de Variância

Au – Ouro

Cu - Cobre

DLS – “Dynamic Light Scattering” – Espalhamento de Luz Dinâmico

DNA – “Deoxyribonucleic Acid” – Ácido Desoxirribonucleico

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

IM – Índice Mitótico

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MFA – Microscópio de Força Atômica

mm – milímetros

mV – Milivolts

nm - Nanômetro

NPs – Nanopartículas

O₂ - Oxigênio

PDI – “Polydispersity Index” – Índice de Polidispersão

ml – Mililitro

STM - *Scanning Tunneling Microscope*

Ti - Titânio

TiO₂ – Dióxido de titânio

TiO₂NP – Nanopartícula de dióxido de titânio

v/v – volume por volume

µg – micrograma µL – microlitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA	17
2.2 NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO.....	20
2.3 NANOTOXICIDADE.....	22
2.4 MODELO DE ESTUDO DA TOXICIDADE IN VITRO	24
2.4.1 <i>Lactuca sativa</i>	25
2.6 FITOTOXICIDADE E CITOGENOTOXICIDADE	26
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 GERAL.....	29
3.2 ESPECÍFICOS	29
4 METODOLOGIA	30
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	30
4.1.1 NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO.....	30
4.1.2 DISPERSÃO DO DIÓXIDO DE TITÂNIO	30
4.1.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO	30
4.2 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	31
4.3 CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO.....	31
4.4 AVALIAÇÕES DO PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO RADICULAR	32
4.5 TESTE DE CITOGENOTOXICIDADE	32
4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	33
5 RESULTADOS.....	34
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANANOPARTÍCULAS.....	34
5.1.1 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO	34

5.2 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES E CRESCIMENTO DE RAIZ.....	35
5.3 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE.....	36
5.3.1 ÍNDICE MITÓTICO.....	36
5.3.2 ÍNDICE DE ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS	37
6 DISCUSSÃO.....	41
7 CONCLUSÕES.....	46
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia consiste em elaborar, desenvolver, sintetizar, caracterizar e utilizar produtos e materiais com, pelo menos uma de suas dimensões, entre 1 e 100 nanômetros (nm) (FAKRUDDIN et al., 2012; MORAIS et al., 2014). Os nanomateriais possuem características eletrônicas, catalíticas e ópticas diferentes de seus representantes em massa, possibilitando novas aplicações em pesquisas e desenvolvimento de tecnologias (ROBLES-GARCÍA et al., 2016). A nanotecnologia pode ser utilizada em setores industriais, tecnologia de informação, computação, eletrônica, biotecnologia, biomedicina, setor agrícola, farmacêutico, alimentício e em aplicações médicas (MORAIS et al., 2014; ROBLES-GARCÍA et al., 2016). A junção da nanotecnologia e da biotecnologia originou a nanobiotecnologia e compreende uma área multidisciplinar que abrange as ciências biológicas, químicas e físicas, aplicando conceitos e técnicas da nanotecnologia e da biologia para o desenvolvimento de novos produtos com maior aplicabilidade, mais sensíveis e com maior qualidade (TAKEDA et al., 2009; AMIN et al., 2011; FAKRUDDIN et al., 2012; MORAIS et al., 2014).

Nesse contexto, as nanopartículas de dióxido de titânio (TiO_2NPs), são os nanomateriais mais fabricados e o segundo nanomaterial mais utilizado em produtos de consumo (KIM et al., 2019). São utilizadas como pigmento branco em tintas, cosméticos e produtos alimentícios (TUCCI et al., 2013). Por apresentarem maior área superficial em relação ao volume, as TiO_2NPs têm maior atividade catalítica (SHI et al., 2013; KIM et al., 2019). Seu correspondente em massa é considerado biologicamente inerte, porém, a maior reatividade da nanopartícula causa preocupação sobre sua segurança. Devido ao tamanho reduzido, as TiO_2NPs entram nas células através da endocitose ou difusão passiva e podem produzir espécies reativas de oxigênio (EROS), causando estresse oxidativo e também podem interagir com o DNA (XIA et al., 2006; DI BUCCHIANICO et al., 2017; KIM et al., 2019).

Com o advento da nanotecnologia e a crescente produção e utilização de nanomateriais, ocorreu também o aumento da liberação desses produtos no ambiente (KIM et al., 2014; CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016). Estima-se que

em todo o mundo, em 2009, foram produzidas 4,68 milhões de toneladas de TiO₂ e, que até 2014, esse valor foi maior que 9 milhões de toneladas (KIM et al., 2019).

O comportamento e o destino final das TiO₂NPs no ambiente ainda não estão claros e não há muitas informações em relação à toxicidade dessas nanopartículas nos ecossistemas (GHOSH et al., 2010). Nesse contexto, a nanotoxicologia se tornou uma nova esfera dentro da toxicologia, objetivando elucidar a toxicidade de nanopartículas (DONALDSON et al. 2004; CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016).

Sendo assim, além de identificar as características químicas das NPs, é preciso entender os possíveis efeitos que elas podem causar aos organismos vivos (LIN & XING, 2007; ANDRADE-VIEIRA et al., 2014). Para isso, ensaios biológicos em diferentes organismos podem ser realizados para avaliar os possíveis efeitos citogenotóxicos de nanopartículas dispersas no ambiente, entre eles modelos vegetais, já que danos às plantas podem ocasionar desequilíbrios em diversos ecossistemas (MA et al. 2010).

Plantas superiores são consideradas um bom modelo para avaliação de toxicidade e são organismos indispensáveis em todos os ecossistemas. Além disso, são base da cadeia alimentar e fornecem oxigênio, por isso, danos às plantas podem ocasionar desequilíbrio em diferentes ecossistemas (MA et al., 2010). Diversas espécies de plantas podem ser utilizadas de diferentes formas para demonstrar efeitos citogenotóxicos de agentes presentes no ambiente. Usar plantas com essa finalidade possui vantagens, como custo baixo, são fáceis de manipular e analisar e apresentam boa correlação com outros biomodelos, como por exemplo, quando comparados a linfócitos humanos, bactérias lisogênicas, linha celular de hamster chinês V79 e *Allium*, em testes realizados por Fiskesjö. (FISKESJÖ, 1985; ANDRADE et al., 2008). A espécie *Lactuca sativa* L. (alface), é considerada um bom biomodelo, pois apresenta número reduzido de cromossomos, sendo $2n=18$, e com tamanho maior quando comparamos com outras espécies, facilitando observação em microscópio óptico (CAMPOS et al., 2008^a; SILVEIRA et al., 2017). Além disso, o organismo apresenta um rápido desenvolvimento, baixo custo e fácil acesso.

O comportamento das TiO₂NPs no ambiente e seu destino final, ainda estão sendo pesquisados. Existem poucas informações quanto ao efeito tóxico das

TiO₂NPs em seres humanos e menos ainda em plantas (GHOSH et al., 2010). Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo investigar o potencial fitotóxico e citogenotóxico de diferentes concentrações de TiO₂NPs, no biomodelo vegetal *Lactuca sativa* L., utilizando para isso, a avaliação da germinação de sementes e o desenvolvimento radicular, a análise do ciclo celular e a presença de aberrações cromossômicas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOCIÊNCIA E NANOTECNOLOGIA

O prefixo “nano” resulta de uma palavra grega que significa anão. Um nanômetro é equivalente a um bilionésimo do metro (10^{-9} m) (MORAIS et al., 2014). Nesse contexto, é preciso diferenciar os conceitos nanociência e nanotecnologia, visto que, a nanociência é caracterizada pelo estudo de estruturas e moléculas na escala nanométrica, que variam entre 1 e 100 nm, enquanto a tecnologia que utiliza esse estudo em nanoescala para aplicações práticas, é conceituada como nanotecnologia (BAYDA et al., 2020). Assim, a nanotecnologia pode ser definida como a elaboração, síntese, desenvolvimento, caracterização e a utilização de materiais e dispositivos constituídos, com pelo menos uma de suas dimensões, na escala nanométrica, entre 1 a 100 nanômetros (nm) (FAKRUDDIN et al., 2012; MORAIS et al., 2014). A evolução da nanociência pode ser identificada desde Demócrito, no século V a.C., época em que se considerava a matéria como contínua, infinitamente divisível em pedaços menores, ou como sendo constituída por pequenas partículas indivisíveis e indestrutíveis, que hoje conhecemos como átomos (BAYDA et al., 2020).

Uma das primeiras aplicações identificadas da nanotecnologia na história da humanidade foi a criação da Taça Lycurgus (Figura 1) no século IV d.C, pelos romanos. Considerada uma conquista importante e memorável no mundo dos vidros, o vidro dicróico presente na taça é composto por dois tipos diferentes de vidros, que

alteram suas cores em diferentes condições de iluminação (BAYDA et al., 2020). Através de análises de microscopia eletrônica de transmissão (MET), realizadas por cientistas em 1990, foi possível explicar o fenômeno do dicroísmo, que ocorre devido à presença de nanopartículas, com 50 a 100 nm de diâmetro, de prata (Ag), ouro (Au) e cobre (Cu), formando uma liga. Diante disso, a Taça Lycurgus é considerada um dos mais antigos nanomateriais produzidos (BARBER & FREESTONE, 1990; FREESTONE et al., 2007; BAYDA et al., 2020).

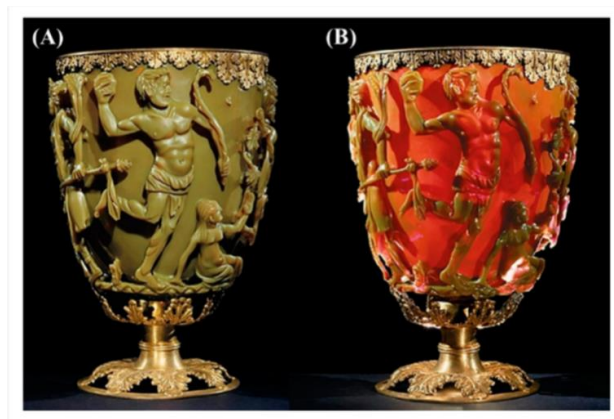


Figura 1 – A Taça de Lycurgus. (A) Cor verde atribuída ao espalhamento de luz por dispersões coloidais de nanopartículas de prata (>40nm). (B) Cor vermelho-púrpura como resultado da absorção de luz (~520nm) pelas partículas de ouro. Fonte: BAYDA et al., 2020.

Em 1959, o físico americano Richard Feynman, ganhador do Prêmio Nobel de Física em 1965, apresenta pela primeira vez a definição de nanotecnologia, sendo considerado o pai da nanotecnologia (FEYNMAN, 1960). Em 1974, Norio Tanigushi, cientista japonês, definiu a nanotecnologia como a separação, consolidação e deformação de materiais por um átomo ou molécula (BAYDA et al., 2020). A partir das primeiras propostas de Feynman, aconteceu uma grande evolução da nanotecnologia. Em 1981, Gerd Binnig e Heinrich Rohrer criaram o *Scanning Tunneling Microscope* (STM), conhecido como microscópio de tunelamento, que permite a obtenção de imagens de átomos e moléculas (BINNING, et al., 1982). Em 1986, Binnig e Rohrer receberam o Prêmio Nobel de Física pela descoberta do STM, invenção que levou ao desenvolvimento do Microscópio de Força Atômica (MFA) (BINNING, et al., 1986). Nos anos seguintes, diferentes nanopartículas foram projetadas e estudadas, até que no início do século XXI houve um aumento no interesse pelas áreas da nanociência e da nanotecnologia (BAYDA et al., 2020).

Em outubro de 2011, a União Europeia, caracterizou os nanomateriais como materiais acidentais, naturais ou produzidos, que possuem partículas livres ou formando agregados, sendo que 50% ou mais dessas partículas devem apresentar uma ou mais dimensões entre 1 a 100 nm (SHI et al., 2013). Os materiais na escala nanométrica ocorrem naturalmente, através de emissões vulcânicas e queimadas e, também como consequência de atividades industriais e através da combustão de automóveis. Contudo, esses nanomateriais, também são desenvolvidos de forma intencional para diferentes aplicações. Materiais nessa escala apresentam propriedades eletrônicas, catalíticas e ópticas diferentes das micropartículas, evidenciando características únicas, permitindo, assim, novas perspectivas em pesquisas e desenvolvimento de tecnologias (KESSLER, 2011; CLARK & PAZDERNIK, 2015; ROBLES-GARCÍA et al., 2016).

Duas das tecnologias mais promissoras do século XXI são a nanotecnologia e a biotecnologia, que emprega os fundamentos e técnicas da biologia para manipular recursos moleculares, celulares e genéticos, com a intenção de desenvolver produtos e serviços (FAKRUDDIN et al., 2012). Assim, a nanobiotecnologia consiste na junção da nanotecnologia e da biotecnologia, sendo uma área multidisciplinar entre as ciências químicas, físicas e biológicas, com a finalidade de aplicar conceitos e técnicas da nanoescala e da biologia para compreensão e produção de novas ferramentas e sistemas com maior aplicabilidade, mais precisos e com maior qualidade (TAKEDA et al., 2009; AMIN et al., 2011; FAKRUDDIN et al., 2012; MORAIS et al., 2014).

Sendo assim, a nanotecnologia abrange aplicações em diferentes setores de bens de consumo, como em setores industriais, tecnologia de informação, computação, eletrônica, biotecnologia, biomedicina, setor agrícola, farmacêutico, alimentício e aplicações médicas (MORAIS et al., 2014; ROBLES-GARCÍA et al., 2016). Dentre esses setores, as nanopartículas vêm sendo utilizadas em *drug delivery*, em terapias gênicas, na produção de embalagens de alimentos e na atividade antibacteriana em alimentos. A nanopartícula de dióxido de titânio (TiO₂NP), por exemplo, é utilizada na produção de cosméticos, tintas, plásticos, além de ter aplicação como nanosensor na indústria alimentícia para controle de qualidade em alimentos e para purificação de água (TUCCI et al., 2013; MORAIS et al., 2014; ROBLES-GARCÍA et al., 2016).

2.2 NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO

O dióxido de titânio (TiO_2), é um óxido natural, inorgânico, proveniente do elemento titânio, que é o nono elemento mais abundante encontrado na crosta terrestre, biologicamente e quimicamente inerte em humanos e animais, termicamente estável e não inflamável, que se apresenta como um pó fino, branco, cristalino e inodoro (IAVICOLI et al., 2012; SHI et al., 2013; TUCCI et al., 2013; GRANDE & TUCCI, 2016; KIM et al., 2019). O TiO_2 pode ser encontrado nas formas de anatase, rutilo e brookite (Figura 2), sendo que os tipos anatase e rutilo apresentam maior importância industrial, enquanto a brookite é dificilmente utilizada (SHAH et al., 2017). Os tipos anatase e rutilo são formados por um átomo de titânio (Ti) envolto por seis átomos de oxigênio (O_2), em uma conformação octaédrica. A principal diferença entre esses tipos é a orientação espacial dos octaedros, os comprimentos e os ângulos das ligações entre o átomo de titânio e os átomos de carbono (DIEBOLD, 2003; QIN et al., 2011). As diferenças existentes entre anatase e rutilo vão interferir na superfície, banda elétrica, capacidade de transferência e potenciais redox (QIN et al., 2011). No mundo todo, em 2009, foram produzidas 4,68 milhões de toneladas de TiO_2 e, até 2014, esse valor era maior que 9 milhões de toneladas (KIM et al., 2019).

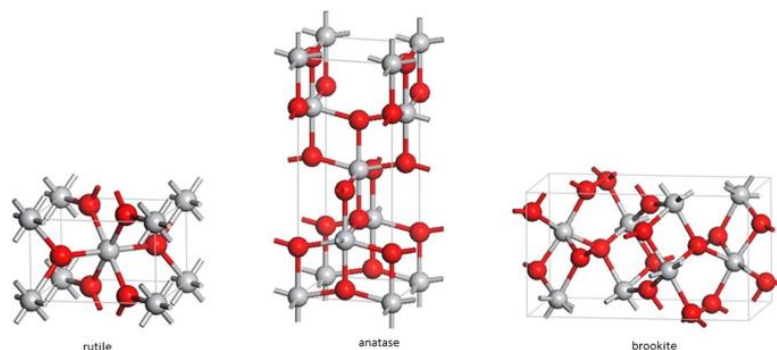


Figura 2 – Estruturas tetragonais de formas cristalinas de rutilo, anatase e brookite TiO_2 NPs (esferas: vermelho - O_2 , cinza - Ti). Fonte: WÓJCIK et al., 2019.

A partir de 1972, o TiO_2 começou a ser bastante estudado depois que Fujishima e Honda notaram que, sob irradiação UV, o uso de um eletrodo de TiO_2 em uma célula eletroquímica induzia a dissociação da água, mesmo sem

a aplicação de uma força externa (NASR et al., 2018; FUJISHIMA & HONDA, 1972). Desde então, vem sendo utilizado devido à sua grande capacidade fotocatalítica, pois é um material fotoativo por apresentar potencial oxidante. Além disso, por apresentar baixo custo e grande estabilidade química, o TiO_2 tem sido muito utilizado como pigmento branco em tintas, corantes alimentares, cosméticos, cremes dentais e excipiente em produtos farmacêuticos (TUCCI et al., 2013; Yin et al., 2013; GRANDE & TUCCI, 2016; NASR et al., 2018).

Contudo, com o advento da nanotecnologia, o uso do TiO_2 em sua forma nanoparticulada, cresceu consideravelmente (TUCCI et al., 2013). Nos dias de hoje, as nanopartículas de TiO_2 (TiO_2NPs) são os nanomateriais mais produzidos e o segundo nanomaterial mais empregado em produtos de consumo. Estima-se uma produção anual de aproximadamente 4 milhões de toneladas de TiO_2 , sendo 3 mil toneladas na forma de nanopartícula (KIM et al., 2019; HU et al., 2020). Essas nanopartículas são utilizadas como aditivo em tintas, tintas de impressão, borracha, papel, protetores solares, açúcar, cimento, creme dental, embalagens antimicrobianas, além disso, são usadas em produtos para limpeza de ar, processos fotocatalíticos industriais e decomposição de matérias orgânicas em águas residuais (IAVICOLI et al., 2012; TUCCI et al., 2013). Através de sua capacidade fotocatalítica, as TiO_2NPs são utilizadas na área médica, como fotossensibilizadores em terapia fotodinâmica, inclusive para o tratamento do câncer (Yin et al., 2013; KIM et al., 2019).

Pelo fato de as TiO_2NPs apresentarem tamanho na faixa de 1 a 100 nm, suas características físico-químicas são diferentes quando comparadas ao seu correspondente na forma à granel. Ademais, em razão de sua maior área superficial em relação ao volume, essas nanopartículas apresentam uma maior atividade catalítica, podendo, assim, apresentar maior atividade biológica (SHI et al., 2013; KIM et al., 2019). Apesar de sua forma à granel ser considerada segura e inerte biologicamente, a maior reatividade das TiO_2NPs gera dúvidas em relação à sua segurança (KIM et al., 2019). As TiO_2NPs entram nas células por endocitose e difusão passiva e, quando dentro das células, as nanopartículas podem provocar estresse oxidativo ao estimular a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), e, além disso, podem interagir com o DNA, causando genotoxicidade (XIA et al., 2006; DI BUCCHIANICO et al., 2017; KIM et al., 2019). Com isso, devido à

grande utilização das TiO₂NPs, há um aumento à exposição humana e liberação ambiental, proporcionando um potencial risco à saúde humana e aos ecossistemas (SHI et al., 2013).

2.3 NANOTOXICIDADE

Com o surgimento dos nanomateriais, sua crescente produção e utilização industrial, houve também um aumento na liberação desses compostos no meio ambiente, gerando problemas éticos, sociológicos e, possivelmente ambientais (KIM et al., 2014; FOLTÊTE et al., 2015; CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016). Liberados no ambiente por meio de resíduos domésticos e industriais, os nanomateriais podem prejudicar a microflora do solo e da água e, assim, modificar a cadeia alimentar e afetar a produtividade das plantas e prejudicar organismos aquáticos (GHOSH et al., 2010). Conforme as pesquisas e aplicações biomédicas de nanomateriais crescem, surgem preocupações sobre o potencial toxicológico desses produtos para o meio ambiente e para o ser humano (KIM et al., 2014). Donaldson et al. (2004), evidenciaram, pela primeira vez, a expressão Nanotoxicologia, sendo uma nova categoria da toxicologia, que tem como objetivo esclarecer sobre a toxicidade causada por nanopartículas (CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016). Os possíveis efeitos prejudiciais relacionados aos nanomateriais diferem e dependem de alguns fatores, como as características físico-químicas dos nanomateriais e as condições de exposição (CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016). Pesquisas que envolvem nanotoxicologia mostram que interação nanomateriais e sistemas biológicos é muito complexa (GERLOFF et al., 2017).

Nas pesquisas em nanotoxicologia, uma das maiores dificuldades é levar em consideração a constituição química e as características físicas das nanopartículas. Por isso, em estudos quem têm a finalidade de avaliar a nanotoxicidade de algum nanomaterial, existem algumas propriedades que devem ser consideradas, tais como, a composição química, forma, superfície, cristalinidade, tamanho e estado de agregação (CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016). A composição química é uma característica que pode influenciar na

toxicidade do nanomaterial, visto que os elementos manifestam reatividade e toxicidade químicas distintas em meios biológicos (KIM et al., 2014). O tamanho e a forma estabelecem os mecanismos preferenciais de internalização e a eficiência da absorção das nanopartículas e existem algumas técnicas analíticas capazes de determinar essas características, como por exemplo, microscopia eletrônica de transmissão, microscopia eletrônica de varredura, e microscopia eletrônica de força atômica (PARK et al., 2009). As características da superfície das nanopartículas, ou seja, a área superficial e a carga definem sua interação com a membrana da célula, sendo uma forma de citotoxicidade (ARAJ et al., 2015). A cristalinidade das nanopartículas possui um papel importante no comportamento físico-químico e no resultado toxicológico, pois orientações diferentes dos átomos podem alterar a estabilidade química das nanopartículas (NPs) e, conseqüentemente, modificar a resposta biológica (CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016). Dependendo das características do meio, como o pH, a temperatura, presença de moléculas, como proteínas, e a força iônica, podem ocorrer mudanças na carga superficial efetiva (Potencial Zeta), no estado de dispersão e agregação, estabilidade e características de dissolução das nanopartículas (SIGMUND et al., 2005).

O comportamento das TiO₂NPs no ambiente e seu destino final, ainda estão sendo pesquisados. Existem poucas informações quanto ao efeito tóxico das TiO₂NPs em humanos e menos ainda em plantas (GHOSH et al., 2010). Segundo Foltête et al. (2015), as propriedades fotocatalíticas das TiO₂NPs podem ser um problema quando esses materiais são dispensados no meio ambiente, pois produzem espécies reativas de oxigênio (EROs) quando expostos à radiação ultravioleta. De acordo com alguns estudos que pesquisam sobre a nanotoxicidade das TiO₂NPs, resultados mostram que essas nanopartículas podem induzir processo inflamatório, citotoxicidade e genotoxicidade (DIAMOND et. al., 2017; SONG et. al., 2016; TROUILLER et. al., 2009; WU et. al., 2009). Porém, existem informações conflitantes à cerca da resposta toxicológica das TiO₂NPs, que podem ser resultantes da utilização desse material com diferentes propriedades, químicas e físicas (IAVIACOLI et. al., 2011). Diante do exposto, há uma grande preocupação em relação à atividade tóxica e os impactos ambientais causados pelos nanomateriais, principalmente as TiO₂NPs (SANTOS FILHO et al., 2019).

2.4 MODELO DE ESTUDO DA TOXICIDADE IN VITRO

Com o progresso no desenvolvimento da nanotecnologia, houve um aumento de suas aplicações comerciais, compreendendo grande diversidade de nanopartículas (NPs) produzidas. O uso desses produtos pode resultar na liberação desses materiais no meio ambiente (MONICA & CREMONIN, 2009). Desse modo, há uma grande preocupação em relação às consequências ambientais que as NPs podem causar, em especial a TiO_2NP , uma vez que são os nanomateriais mais produzidos e o segundo nanomaterial mais empregado em produtos de consumo (KIM et al., 2019; SANTOS FILHO et al., 2019). Além de compreender as características químicas das NPs, é necessário entender os possíveis efeitos que elas podem provocar em organismos vivos (LIN & XING, 2007; ANDRADE-VIEIRA et al., 2014). Elucidar os efeitos tóxicos de um composto químico, ou uma substância simples, por meio de bioensaios em modelos biológicos, é uma boa forma de acrescentar aos dados físico-químicos de tais compostos (BADERNA et al., 2011). Para avaliar possíveis efeitos tóxicos e genotóxicos de variados detritos ambientais, os ensaios biológicos podem ser feitos em diversos organismos, procariontes, como as bactérias, e eucariontes, como linhagens celulares, animais e plantas, viabilizando a identificação de possíveis danos com uma abrangência maior, englobando mutações gênicas, anomalias cromossômicas, estruturais e numéricas (HOUK, 1992).

Há uma preocupação em relação aos possíveis impactos toxicológicos das NPs em organismos, como as plantas, que podem ser destino dessas NPs através do ar, água e solo (SANTOS FILHO et al., 2019). Plantas superiores são consideradas um bom modelo para avaliar toxicidade ambiental e, além disso, são organismos essenciais em todos os ecossistemas. Sendo assim, estudos de fitotoxicidade são importantes, pois as plantas são a base da cadeia alimentar, fornecem oxigênio e estão presentes em diferentes ambientes, tanto terrestre quanto aquático. Sendo assim, danos às plantas podem ocasionar um desequilíbrio nos diferentes ecossistemas (MA et al., 2010).

Usar vegetais como sistema de testes toxicológicos apresenta muitas vantagens, como baixo custo, não exige aprovação em comissões éticas, as plantas

são organismos eucariotos e têm meios de processar moléculas complexas e têm correlação apropriada com outros biomodelos, como o animal, inclusive células humanas (FISKESJÖ, 1985; ANDRADE-VIEIRA et al., 2014; SILVEIRA et al., 2017).

Inúmeras espécies de plantas apresentam diferentes formas de serem utilizadas para evidenciar efeitos mutagênicos e citogenotóxicos de agentes presentes no ambiente. A avaliação citogenética em plantas possibilita economia de recursos, uma vez que o custo é baixo, praticidade na manipulação e análises, tendo boa correlação com dados obtidos em outros biomodelos (ANDRADE et al., 2008). A primeira região da planta a entrar em contato com os possíveis agentes tóxicos é a raiz, sendo assim, a ponta da raiz, região meristemática, é a mais exposta, por entrar em contato com as substâncias presentes na água e no solo (ANDRADE et al., 2008; FISKEJÖ, 1988). Avaliar a região meristemática é uma forma rápida e significativa para o monitoramento ambiental, compreendendo duas condições de análise, a nível macroscópico, avaliando crescimento e a nível microscópico, observando comportamento celular (ANDRADE et al., 2008; FISKEJÖ, 1988). A região meristemática é formada por células em intensa divisão, sendo assim, a avaliação do ciclo celular possibilita entender como os cromossomos se organizam e a forma como eles comportam durante a divisão celular, podendo também ser utilizada para estabelecer a toxicidade de compostos químicos dispersos no ambiente (RODRIGUES & KERBAUY, 2009; GRANT, 1994).

Nesse contexto, a espécie *Lactuca sativa* L. (alface), uma eudicotiledônea pertencente à família Asteraceae, é considerada um bom modelo vegetal para ser utilizado em estudos micro e macroscópicos de toxicidade de substâncias químicas (SILVEIRA et al., 2017).

2.4.1 *Lactuca sativa*

A alface, é uma espécie que possui características fisiológicas, moleculares e respostas ambientais conhecidas e bem descritas (FERREIRA, 2007; MONTEIRO et al., 2009). Espécie modelo usada em estudos macroscópicos que abrangem

análises de germinação e desenvolvimento inicial da plântula, além de trabalhos microscópicos que avaliam efeitos citotóxicos e genotóxicos de diferentes poluentes ambientais (LIMA et al., 2019).

Como características cromossômicas, a espécie *Lactuca sativa* possui pequeno número cromossômico ($2n = 2x = 18$), variando seu tamanho entre 2,8 a 5,5 μm , possibilitando uma fácil visualização, apresentando quatro pares submetacêntricos, um par submetacêntrico/subtelocêntrico, um par metacêntrico/submetacêntrico e três pares metacêntricos (LIMA et al., 2019). Além disso, essa espécie fornece uma grande quantidade de pequenas sementes, aumentando a área de superfície que entra em contato com o composto químico analisado, boa sensibilidade e germina de forma rápida e fácil e, quando comparada a outros modelos vegetais, apresenta um baixo custo, curto ciclo de vida e muitas variedades disponíveis (ANDRADE et al., 2010; ARAGÃO et al., 2015; PINHEIRO et al., 2015; SILVEIRA et al., 2017).

2.5 FITOTOXICIDADE E CITOGENOTOXICIDADE

Fitotoxicidade pode ser entendida como um evento onde um composto disperso no ambiente pode gerar uma reação tóxica, prejudicando o crescimento e desenvolvimento de plantas. Sendo assim, é possível avaliar a fitotoxicidade através da taxa de germinação de sementes, crescimento e desenvolvimento radicular (ANDRADE et al., 2010; BERNARDES et al., 2015). Além do fato de a raiz ser o primeiro órgão do vegetal a entrar em contato com agentes tóxicos, tanto no ambiente aquático, quanto terrestre, tornando-se assim, um método rápido e sensível para o monitoramento de fitotoxicidade ((ANDRADE-VIEIRA et al., 2012; SILVEIRA et al., 2017).

Um outro mecanismo de toxicidade relacionado às nanopartículas se dá a partir da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são produtos de estresse oxidativo, sendo esse, um estado de desequilíbrio redox, onde a produção de espécies reativas de oxigênio supera a capacidade de defesa antioxidante da célula, provocando consequências biológicas adversas (XIA et al, 2006).

Características específicas dos nanomateriais estão envolvidas com a capacidade da geração de EROs, como tamanho, forma, superfície da partícula, cargas da superfície, dissolução de partículas, liberação de íons metálicos, agregação e modo de interação com as células (FU e. al., 2014; AZEVEDO et al., 2018). A grande quantidade de EROs oxida macromoléculas como DNA, proteínas e lipídeos, podendo causar mutações, prejuízos a organelas celulares e morte celular em condições mais extremas (CHE et al., 2016).

Nos últimos anos, diferentes técnicas da citogenética vêm sendo utilizadas para analisar a toxicidade de compostos químicos e, também, nanomateriais (BALAJEE & HANDE, 2018). No Teste *Allium cepa* a análise citogenética possibilita avaliar características como índice mitótico, anormalidades cromossômicas e nucleares. Tais avaliações podem ser obtidas para qualquer modelo vegetal, inclusive em *Lactuca sativa* (LEME e MARIN-MORALES, 2009).

Um indicador muito utilizado citogeneticamente é o Índice Mitótico (IM), sendo o número total de células que estão em divisão no ciclo celular. Havendo aumento ou redução desse índice, pode-se indicar possível citotoxicidade de um determinado composto (FERNANDES et al., 2007).

Outro parâmetro eficiente utilizado por análise citogenética é a avaliação de aberrações cromossômicas (AC), considerada muito relevante em avaliações de genotoxicidade. Essas aberrações cromossômicas podem se apresentar como alterações estruturais em cromossomos e também como variações numéricas dos cromossomos (RUSSEL, 2002). Diferentes aberrações cromossômicas podem ser avaliadas nas fases do ciclo celular, podendo ser identificadas aderências cromossômicas e, ainda, cromossomos quebrados e perdidos, células aneuploides, poliploides e outras (LEME & MARIN-MORALES, 2009; HINTZSCHE et al., 2017).

2.6 CARACTERIZAÇÃO DE NANOMATERIAIS

Características dos nanomateriais como: composição química, forma, tamanho, carga superficial, estado de agregação e aglomeração apresentam grande

importância em ensaios de nanotoxicidade (GUNSOLUS & HAYNES, 2016). Assim, a Técnica de DLS (Espalhamento de Luz Dinâmico), permite a caracterização físico-química das nanopartículas, permite conhecer o tamanho hidrodinâmico, Potencial Zeta, índice de Polidispersão e a possibilidade de formação de agregados.

Nessa técnica, um feixe de luz irradia uma partícula e as ondas dissipadas pela partícula são captadas por um detector, gerando um sinal. Conforme a partícula se movimenta na solução, as ondas dissipadas podem modificar o sinal captado. As variações de intensidade de luz geram informações sobre o movimento das partículas (ATKINS & DE PAULA, 2011). Essa análise permite a identificação do estado de agregação/aglomeração, homogeneidade e tamanho das nanopartículas em suspensão (CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016).

O Potencial Zeta, determinado através do emprego de um campo elétrico, possibilita a medida da velocidade que as partículas carregadas se movimentam em direção ao eletrodo do equipamento (PONS et al., 2006; SAPSFORD et al., 2011). O Potencial Zeta com valor ± 30 mV é atribuído para inferir a estabilidade das partículas, onde o valor em módulo maior que 30 mV sugere uma condição estável, enquanto um valor menor que 30 mV, indica instabilidade e tendência à agregação/aglomeração (SAPSFORD et al., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar o potencial citogenotóxico de nanopartículas de dióxido de titânio no modelo *Lactuca sativa* L. (Asteraceae).

3.2 ESPECÍFICOS

- Caracterizar a estrutura físico-química das nanopartículas de dióxido de titânio;
- Avaliar fitotoxicidade *in vitro* das nanopartículas de dióxido de titânio;
- Investigar, *in vitro*, o potencial citotóxico e genotóxico das nanopartículas de dióxido de titânio.

4 METODOLOGIA

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.1.1 NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO

A TiO₂NP utilizada foi um material de referência, procedente da Joint Research Centre (JRC) (NM01001a, União Europeia), e foi disponibilizado para estudos interlaboratoriais do projeto NANoREG. Esse material foi primeiramente caracterizado pelo próprio fornecedor por microscopia eletrônica de transmissão e a partícula possui como tamanho primário de 5-6 nm, 95% das partículas menor que 100 nm, 77% menor que 50 nm e 11% menor que 10 nm. Essas nanopartículas são do tipo anatase e apresentam área superficial de 170/316 m²/g (JRC Nanomaterials Repository, 2014).

4.1.2 DISPERSÃO DO DIÓXIDO DE TITÂNIO

Para a realização do trabalho, as TiO₂NPs foram dispersas em água deionizada para alcançar uma concentração final de 1000 µg/mL e sonicadas (UP200S, Hielscher, Teltow, Alemanha) por 1 minuto em amplitude de 70% e ciclo de 0,5 Hz. Em seguida, a suspensão foi diluída e obteve-se as concentrações de 10 µg/mL, 100 µg/mL e 1000 µg/mL.

4.1.3 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

Empregou-se a técnica DLS (Espalhamento de Luz Dinâmico), para obtenção de características como o tamanho hidrodinâmico, índice de polidispersão

(PDI - do Inglês Polydispersity Index) e Potencial Zeta, utilizando-se o equipamento Malvern 3000 Zetasizer NanoZS (Malvern, Reino Unido) localizado no Laboratório de Nanotecnologia Aplicada a Saúde e Produção Animal da Embrapa Gado de Leite. Foi avaliada a suspensão na concentração de 100 µg/mL em água deionizada com pH 6,5, sonicada (UP200S, Hielscher, Teltow, Alemanha) por 1 minuto em amplitude de 70% e ciclo de 0,5 Hz (parâmetros estipulados para o experimento).

4.2 MATERIAL VEGETAL

Como modelo biológico, foram utilizadas sementes de *Lactuca sativa* L. var. Grand Rapids TBR (alface), da marca Feltrin Sementes, lote 0002301710000020, com 96% de germinação e pureza de 99,9%, adquiridas em agropecuária.

4.3 CONDIÇÕES DE EXPOSIÇÃO

Sementes de *Lactuca sativa* L. foram dispostas aleatoriamente em placas de petri de poliestireno forradas com papel filtro imerso em água destilada (grupo controle) ou suspensão de TiO₂NPS em três diferentes concentrações, 10 µg/mL, 100 µg/mL e 1000 µg/mL. Na sequência, as sementes foram cultivadas por 72 horas, à 25°C e no escuro. A cada 24 horas a água destilada, as suspensões de TiO₂NPs e o papel filtro foram trocados para garantir disponibilidade para todas as sementes. O processo obedeceu ao delineamento experimental inteiramente casualizado (DIC), com três repetições para cada tratamento.

4.4 AVALIAÇÕES DO PERCENTUAL DE GERMINAÇÃO E CRESCIMENTO RADICULAR

Após 72 horas de germinação, foi avaliado o percentual de sementes que germinaram em cada placa. Em seguida, as raízes foram fixadas em Carnoy (etanol: ácido acético, 3:1 v/v). Das raízes fixadas de cada repetição, mediu-se 30 com o auxílio de um paquímetro digital (mtx® Matrix Tools for eXistence – 150 mm).

4.5 TESTE DE CITOGENOTOXICIDADE

As raízes fixadas em Carnoy foram utilizadas para preparo de lâminas de citogenética. A região meristemática foi isolada e utilizando-se solução enzimática contendo 20% de pectinase (Sigma) e 2% de celulase (Serva-Onozuka R- 34 10) por 3 horas e 10 minutos a 37°C, obteve-se a digestão da parede celular, as lâminas foram preparadas por esmagamento (GUERRA & SOUZA, 2002). As células foram fixadas com nitrogênio líquido e coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich, 0.4% w/v em Metanol) 5% (v/v) por 15 minutos.

Para avaliar o potencial citogenotóxico das TiO₂NPs, foram verificadas alterações no índice mitótico (IM) e a classificação de diferentes aberrações cromossômicas (AC). Para isso, as lâminas foram avaliadas em microscópio óptico (Olympus BX41) e contabilizadas 5 mil células por repetição (três repetições por tratamento). Em seguida foram aplicadas as seguintes equações:

Equação para calcular índice mitótico (IM):

$$IM = \frac{\text{n}^{\circ} \text{ de células em divisão}}{\text{n}^{\circ} \text{ total de células analisadas}} \times 100$$

Equação para calcular índice de aberrações cromossômicas (AC):

$$AC = \frac{\text{n}^\circ \text{ de células com AC}}{\text{n}^\circ \text{ total de células em divisão}} \times 100$$

4.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados obtidos a partir das avaliações do percentual de germinação e crescimento radicular, assim como os dados obtidos com os testes de citogenotoxicidade, analisados através do índice mitótico e da classificação das diferentes aberrações cromossômicas foram submetidos à análise estatística por ANOVA e as médias comparadas por teste Tukey, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANANOPARTÍCULAS

5.1.1 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

De acordo com os resultados do potencial zeta, realizado na concentração de 100 µg/mL, com suspensão em água deionizada com pH de 6,5, os valores tiveram uma média de -27,57 mV, mostrando-se próxima de uma condição estável ± 30 mV, como mostra a tabela 1.

O valor médio do índice de polidispersão (PDI) foi 0,353 (Tabela 1), na concentração de 100 µg/mL, em suspensão com água deionizada com pH de 6,21, indicando população com média polidispersão.

Nas suspensões de água deionizada, os tamanhos hidrodinâmicos de TiO₂NP variaram de 490,6 nm a 862,5 nm, em pH 6,21, com média de 505,33 nm. (Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados obtidos por DLS na concentração de 100 µg/mL de TiO₂NP. Tamanho hidrodinâmico, PDI e potencial zeta.

	100 µg/mL
Tamanho Hidrodinâmico (nm)	505, 33 \pm 12, 42
PDI	0, 353 \pm 0, 025
Potencial Zeta (mV)	-27, 57 \pm 0, 709

5.2 GERMINAÇÃO DAS SEMENTES E CRESCIMENTO DE RAIZ

Em relação ao percentual de sementes que germinaram após 72 horas de exposição, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os tratamentos com nanopartícula e o grupo controle, como apresentado na tabela 2.

Tabela 2 - Germinação de sementes de *Lactuca sativa* expostas à nanopartícula de dióxido de titânio (TiO_2NP). Dados apresentados pela média do número de sementes que germinaram \pm desvio padrão. Resultados expressos em porcentagem.

Controle	100 \pm 0,00
10 $\mu\text{g/mL}$	98,33 \pm 2,89
100 $\mu\text{g/mL}$	97,67 \pm 3,21
1000 $\mu\text{g/mL}$	98,67 \pm 1,53

Os resultados para tamanho de raízes mostraram que as concentrações das nanopartículas de dióxido de titânio testadas não alteram o crescimento radicular em comparação ao grupo controle, como mostrado na tabela 3.

Tabela 3 - Comprimento radicular de *Lactuca sativa* exposta à nanopartícula de dióxido de titânio (TiO_2NP). Dados apresentados pela média do comprimento das raízes \pm desvio padrão. Tamanhos em mm.

Controle	9,9 \pm 1,13
10 $\mu\text{g/mL}$	9,24 \pm 0,51
100 $\mu\text{g/mL}$	9,35 \pm 0,52
1000 $\mu\text{g/mL}$	9,03 \pm 0,20

5.3 ANÁLISE DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE

5.3.1 ÍNDICE MITÓTICO

Os resultados das análises de células do meristema radicular de *Lactuca sativa* expostas á TiO₂NP mostraram aumento significativo ($p < 0,05$) no índice mitótico na concentração de 10 µg/mL (Figura 3), indicando que as TiO₂NPs foram citotóxicas nessa concentração.

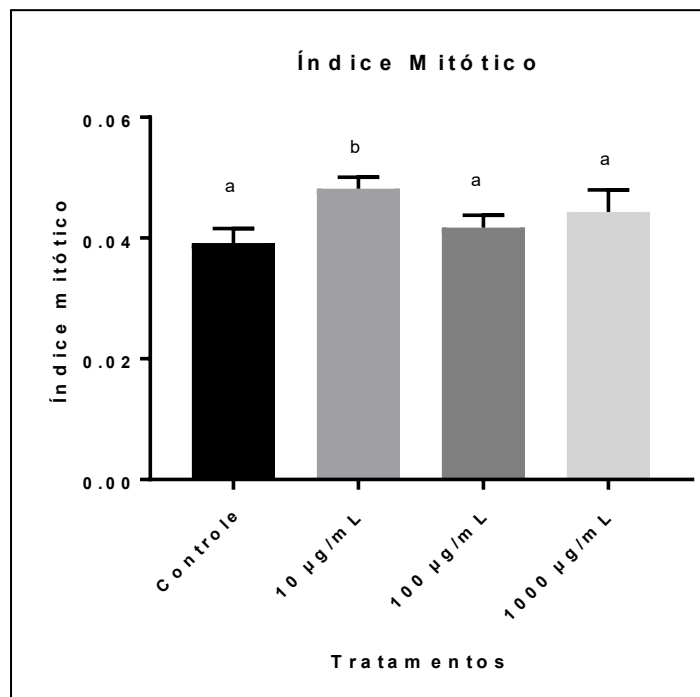


Figura 3 - Índice mitótico em células meristemáticas de *Lactuca sativa* expostas a diferentes concentrações de TiO₂NP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si. Dados apresentados por média ± desvio padrão.

5.3.2 ÍNDICE DE ANORMALIDADES CROMOSSÔMICAS

Os resultados da análise de exposição à TiO₂NPs mostram que essas nanopartículas induziram um aumento significativo ($p < 0,05$) de aberrações cromossômicas nas concentrações 100 µg/mL e 1000 µg/mL, como indicado na Figura 4.

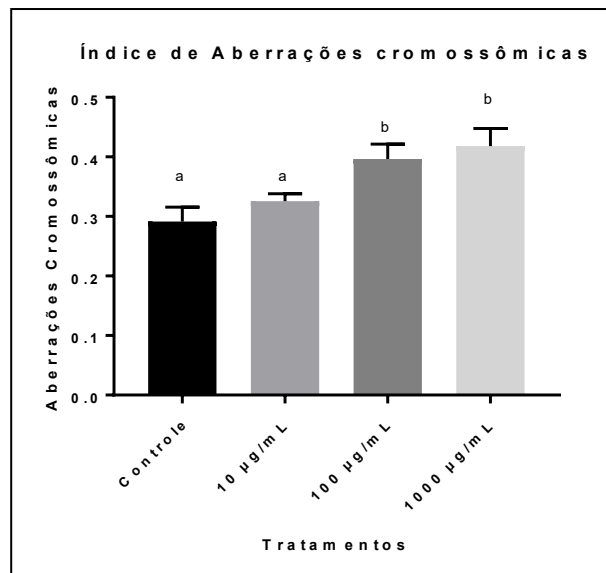


Figura 4 - Índice de aberrações cromossômicas em células meristemáticas de *Lactuca sativa* expostas a diferentes concentrações de TiO₂NP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si. Dados apresentados por média \pm desvio padrão.

Algumas das aberrações cromossômicas encontradas em células meristemáticas de *Lactuca sativa* expostas à TiO₂NP estão apresentadas na tabela 4 e figuras 6 e 7. Dentre as aberrações destacam-se fragmentos cromossômicos, onde foi possível observar diferença significativa ($p < 0,05$) na concentração de 1000 µg/mL. Além disso, foi possível observar aumento na frequência de micronúcleos com diferença significativa ($p < 0,05$) em todas as concentrações testadas em relação ao controle (10 µg/mL, 100 µg/mL, 1000 µg/mL), como mostra a Figura 5.

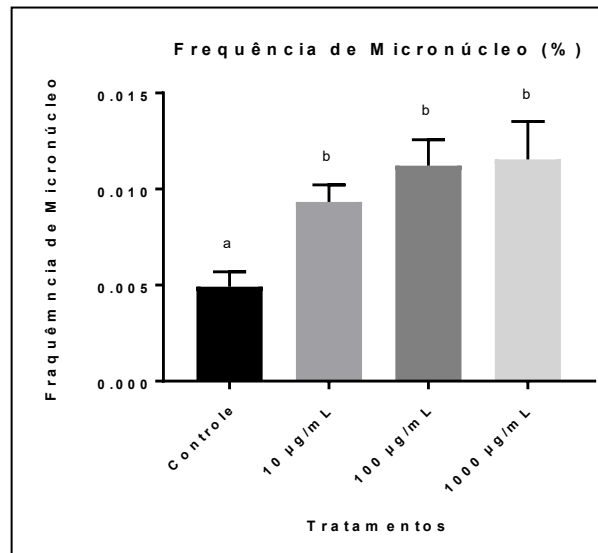


Figura 5 – Frequência de micronúcleo em células meristemáticas de *Lactuca sativa* expostas a diferentes concentrações de TiO₂NP. Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si. Dados apresentados por média ± desvio padrão.

Tabela 4 - Tipos de aberrações cromossômicas analisadas em células de meristema radicular de *Lactuca sativa* expostas à TiO₂NP. Os dados são expressos em frequência (%). Médias seguidas de mesma letra não diferem significativamente entre si (p<0,05).

	Controle	10 µg/mL	100 µg/mL	1000 µg/mL
Clastogênico				
Cromossomo Quebrado	2,7 ± 0,007 a	3,8 ± 0,013 a	4,0 ± 0,002 a	5,0 ± 0,007 b
Ponte	4,4 ± 0,0123	2,4 ± 0,0034	3,2 ± 0,0095	4,0 ± 0,016
Aneugênico				
Cromossomo Aderente	4,53 ± 0,0065	4,8 ± 0,0094	3,7 ± 0,0024	4,5 ± 0,016

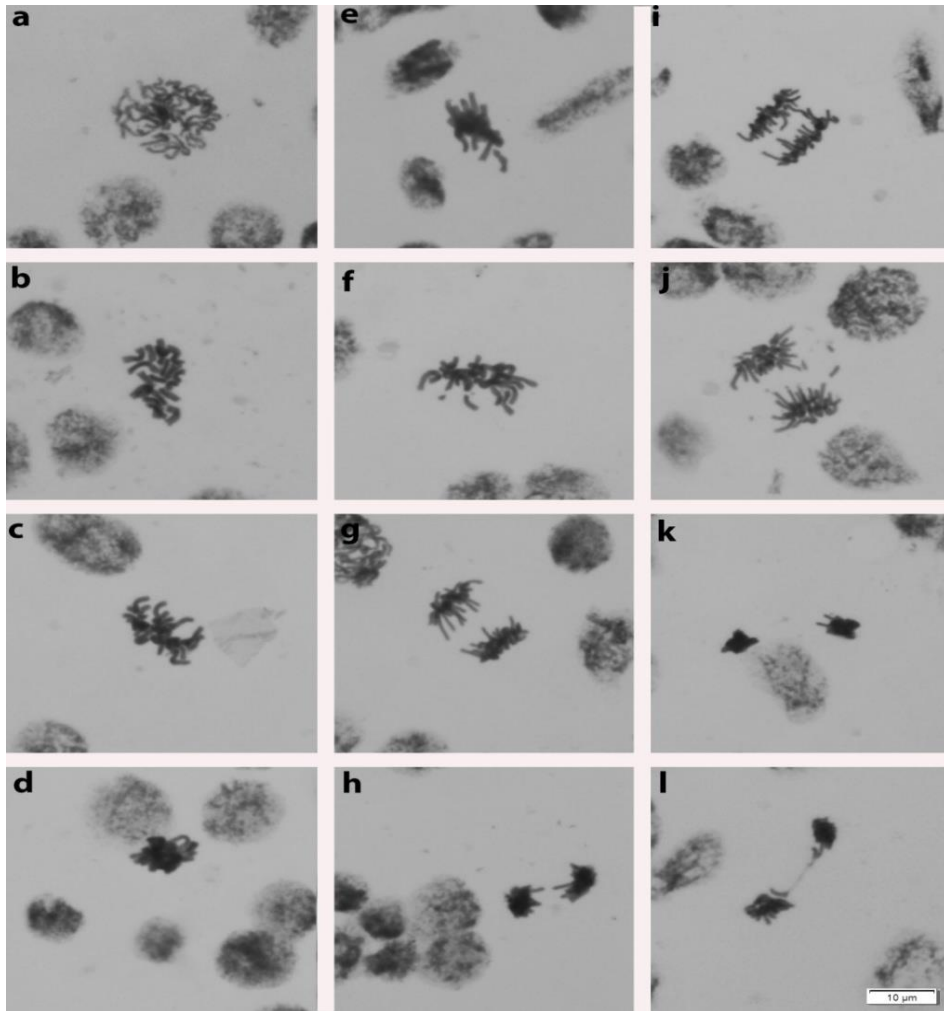


Figura 6 - Fases do ciclo celular e aberrações cromossômicas observadas em células de meristema radicular de *Lactuca sativa* expostas à TiO_2NP . (a) prófase normal. (b) c-metáfase. (c) metáfase normal. (d) metáfase com aderência. (e) e (f) metáfase com cromossomo quebrado. (g) anáfase normal. (h) anáfase com cromossomo tardio (i) anáfase com ponte. (j) anáfase com cromossomo fragmentado. (k) telófase normal. (l) telófase com ponte.

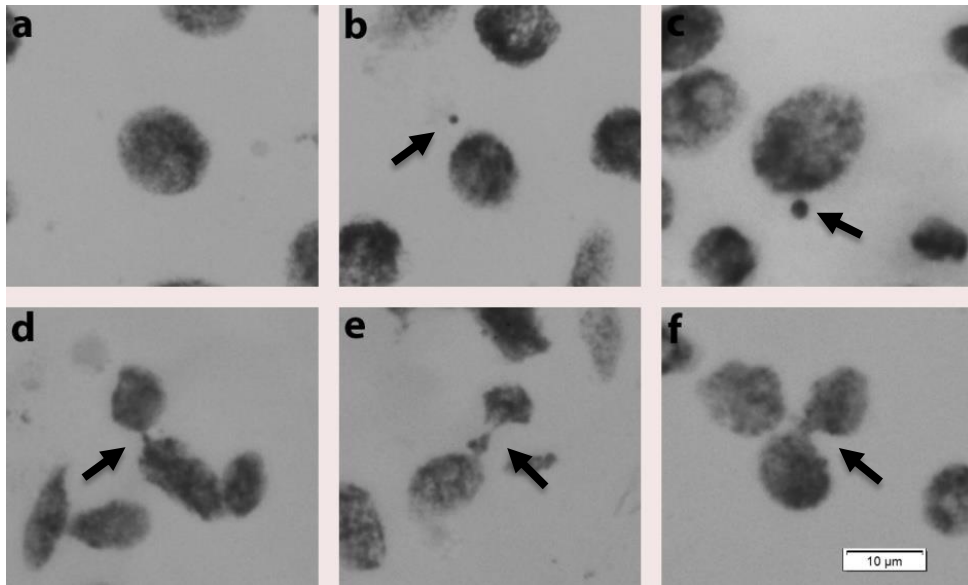


Figura 7 – Intérfase e aberrações cromossômicas observadas em células de meristema radicular de *Lactuca sativa* expostas à TiO_2NP . (a) intérfase normal. (b) e (c) intérfase com micronúcleo. (d), (e) e (f) comunicação entre núcleos interfásicos.

6 DISCUSSÃO

Com a crescente produção e utilização industrial dos nanomateriais, houve também um aumento na liberação desses compostos no meio ambiente (KIM et al., 2014; FOLTÊTE et al., 2015; CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016). Assim, há intensa preocupação em relação ao potencial de toxicidade e os impactos ambientais causados pelos nanomateriais, principalmente as TiO₂NPs (SANTOS FILHO et al., 2019). Conhecer a forma, tamanho, carga superficial, composição, estado de agregação e aglomeração e o meio de dispersão dessas nanopartículas, é extremamente importante para se entender a interação, absorção e a toxicidade desses nanomateriais (ROSE et al., 2012; ZHU et al., 2013; GATOO et al., 2014). Nesse estudo, realizamos a caracterização das TiO₂NPs através do Espalhamento da Luz Dinâmico (DLS), que nos possibilita reconhecer a forma, tamanho, carga superficial e do comportamento dos TiO₂NPs em suspensão. De acordo com os dados apresentados na tabela 1, o Potencial Zeta encontrado na concentração de 100 µg/mL, em suspensão de água deionizada e pH de 6,5, foi de -27,5mV, sendo próximo à uma condição estável ± 30 mV. Em estudo anterior, utilizando suspensão de TiO₂NPs em água Milli-Q, na concentração de 100 µg/mL, foi observada uma estabilização eletrostática consistente, com um valor de Potencial Zeta de - 31,7 mV, inibindo a formação de agregados, diminuindo a eficiência de fixação de partículas em colisão em suspensão (MANESH et al., 2018).

O PDI (índice de polidispersividade) mede a heterogeneidade de uma amostra, com base no tamanho das nanopartículas presentes. A polidispersão pode acontecer em razão do tamanho, agregação ou aglomeração da amostra (MUDALIGE et al., 2019). Ainda de acordo com a tabela 1, o PDI encontrado de 0,353, na concentração de 100 µg/mL, indica uma amostra com média polidispersão. Geralmente as amostras de nanopartículas que são utilizadas em estudos de toxicologia se apresentam na forma de pó, então, dispersá-los é necessário para testes *in vitro*, e, para isso, utiliza-se uma força externa que supere as forças de van der Waals, podendo ser feito através da ultrassonicação, que dispersa os aglomerados, mas, as forças aplicadas não são suficientes para quebrar as ligações rígidas presentes nos agregados (JIANG et al., 2009).

O tamanho hidrodinâmico das suspensões de nanopartículas pode determinar um efeito incerto na forma como um organismo reage à exposição (JIANG et al., 2009). Como mostrado, ainda na tabela 1, em suspensão de água deionizada, os tamanhos hidrodinâmicos de TiO₂NP variaram de 490,6 nm a 862,5 nm, em pH 6,21. A carga superficial e o tamanho hidrodinâmico podem ser alterados dependendo do pH da suspensão. As características de superfície influenciam na aglomeração, dispersão e tamanho hidrodinâmico das nanopartículas (JIANG et al., 2009). Portanto, em um pH próximo ao ponto isoelétrico, as cargas superficiais são menores, diminuindo a repulsão entre as nanopartículas e, conseqüentemente aumentando a agregação e aglomeração do material na amostra. Além disso, essas informações indicam que não há completa homogeneidade das partículas o que pode gerar danos aos organismos, considerando a existência de partículas em nanoescala na amostra (SANTOS FILHO et al., 2019). Ainda que as nanopartículas de TiO₂ se agreguem e formem aglomerados com um tamanho maior, os tamanhos das partículas primárias continuam sendo uma característica significativa, o que pode causar toxicidade (TROUILLER et al., 2009).

Para se avaliar possível fitotoxicidade de algum composto geralmente considera-se o percentual de germinação e alongamento radicular (SANTOS FILHO et al., 2019). De acordo com os resultados encontrados, é possível observar que nenhuma das três concentrações de TiO₂NPs testadas interferiu na germinação e no crescimento das raízes de alface. Em estudo anterior, realizado em cebola (*Allium cepa*), nas mesmas condições experimentais, nas mesmas concentrações, utilizando TiO₂NPs diferente (Sigma-Aldrich®), Santos Filho et al. (2019) mostraram que as TiO₂NPs inibiram levemente germinação e o crescimento radicular (SANTOS FILHO et al., 2019). Porém, outros autores encontraram alguns resultados contraditórios testando-se outras concentrações de TiO₂NPs, em outras espécies. Manesh et al. (2018), encontraram em teste utilizando sementes de espinafre (*Spinacia oleracea*), expostas a TiO₂NPs na concentração de 2 µg/mL, um aumento na taxa de germinação (MANESH et al., 2018). Em trabalho realizado por Yang e colaboradores (2015), não foi observado efeito na germinação de sementes de milho (*Zea mays*) e arroz asiático (*Oryza sativa*) expostas a uma concentração de 2000 µg/mL de TiO₂NPs. Em relação ao alongamento radicular, em estudo realizado por Manesh e colaboradores (2018), o comprimento da raiz (mm) de sementes de nabo expostas a TiO₂NPs apresentou

aumento significativo. Sementes expostas a 10 µg/mL, 200 µg/mL e 1000 µg/mL de TiO₂NPs apresentaram o maior comprimento de raiz, quando comparadas ao grupo controle (MANESH et al., 2018). Na literatura à cerca da fitotoxicidade de TiO₂NPs encontramos resultados divergentes, de acordo com a espécie utilizada, as concentrações testadas e as condições de exposição. Por isso, não se pode generalizar os efeitos encontrados em relação à germinação e o alongamento radicular, é preciso testar diferentes condições experimentais e diferentes espécies (MANESH et al., 2018).

Já foram relatados, em estudos prévios, danos ao DNA de células vegetais causados por nanopartículas (KLANCNIK et al., 2010; CASTIGLIONE et al., 2016; SANTOS FILHO et al., 2019). Índice mitótico é o número total de células que estão em divisão durante o ciclo celular, sendo que, alterações nesse índice, tanto aumento quanto redução, indicam citotoxicidade de algum composto (FERNANDES et al., 2007). No presente trabalho, de acordo com a figura 3, observamos aumento no índice mitótico na concentração de 10 µg/mL. Em estudo anterior, realizado em *Allium cepa*, foi encontrada redução do índice mitótico nas concentrações de 100 µg/mL e 1000 µg/mL (SANTOS FILHO et al., 2019).

Danos ao DNA causados por agentes genotóxicos podem sofrer reparo, pelos próprios mecanismos de reparo celular, ou serem estabelecidos gerando comprometimento da célula, que pode se manifestar como alterações cromossômicas (FERNANDES et al., 2007; MAURO et al., 2014). Neste Estudo foi possível observar aumento de aberrações cromossômicas, mostrado na figura 4, nas concentrações de 100 µg/mL e 1000 µg/mL, diferença significativa ($p < 0,05$), quando comparadas ao grupo controle. Corroborando com Santos Filho et al. (2019), que encontraram frequências aumentadas de anormalidades cromossômicas dose-dependente em células meristemáticas de *A. cepa* expostas a TiO₂NPs, o que indica a internalização das nanopartículas (SANTOS FILHO et al., 2019). Além disso, nesse trabalho foram encontrados diferentes tipos de anormalidades cromossômicas, mas apenas a frequência de micronúcleo e de cromossomo fragmentado apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratados e o controle. Santos Filho et al. (2019) observaram frequência aumentada de micronúcleo de maneira dose-dependente em células meristemáticas de *A. cepa* expostas às mesmas concentrações de TiO₂NPs, corroborando com achados deste trabalho.

Existem diversos parâmetros que podem ser monitorados durante a divisão celular meristemática, entre elas as anormalidades cromossômicas e a frequência de micronúcleos, sendo que, os micronúcleos são estimados por muitos autores como o mais simples e mais eficaz parâmetro em análises de mutagenicidade de determinados compostos, porque eles são originados a partir de danos não reparados ou reparados de forma incorreta nas células parentais (MIGID et al., 2007; LEME & MARIN-MORALES 2009). Agentes externos podem originar quebras cromossômicas, acometendo a dinâmica da cromatina e prejudicando o processo de reparo (TERZOUDI et al., 2011).

Os microtúbulos são responsáveis por formar o fuso mitótico, que exerce função importante durante o ciclo celular. Quando há modificação na polimerização e despolimerização desses microtúbulos, ou quando eles não se ligam aos cromossomos devido a algum problema na região centromérica, pode afetar a segregação dos cromossomos para as células filhas e, com isso, há interrupção do ciclo celular em metáfase, dando origem à c-metáfase (Figura 6b); ou ainda segregação anormal ou tardia dos cromossomos, ou cromátides, em anáfase e telófase (Figura 6h) (FREITAS et al., 2016; SANTOS FILHO et al., 2019). Substâncias tóxicas podem agir diretamente no cromossomo e causar quebras, e, com isso ocasionar perda de telômeros, cuja função é garantir proteção e estabilidade ao cromossomo (Figura 6f e 6j) (TERZOUDI et al., 2011). Quando há perda dessa estabilidade cromossômica, a parte terminal de dois cromossomos podem se fundir, e quando ocorre a divisão celular, observa-se pontes em anáfase e telófase (Figura 6i e 6l) (SANTOS FILHO et al., 2019).

Estudo anterior mostrou que as TiO₂NPs apresentam efeito inibitório na polimerização da tubulina, em experimento *in situ*, quando testados órgãos e células humanas. Além disso, as TiO₂NPs interagem com a tubulina e o microtúbulo, o que resulta em alteração da função dessas proteínas. A tubulina é uma proteína importante e apresenta diversas funções, de divisão celular à manutenção da forma celular. Essas nanopartículas podem entrar e permanecerem nas células, onde há aumento de sua concentração e interação com essas proteínas citoplasmáticas (GHESHLAGHI et al., 2008).

O fragmento acêntrico, originado pelas perdas e quebras cromossômicas, contem partes do material genético, são reconhecidos pelas células e envolvidos por uma membrana durante a divisão celular, originando os micronúcleos (Figura 7b e 7c). Além disso, compostos tóxicos podem provocar formação de cromossomos aderentes (Figura 6d), originados por complexos com grupos fosfato do DNA, intra e inter cromatídicas e condensação do DNA, ocasionando formação de aglomerados (BABICH et al., 1997; EL-GHAMERY et al., 2003). Sendo que a aderência cromossômica é considerada uma mutação ocasionada devido à grande toxicidade, impedindo a segregação das cromátides e a continuidade normal da divisão celular, podendo acarretar com a evolução de morte celular (ANDRADE-VIEIRA et al., 2008). Assim, essas alterações de genotoxicidade podem ser classificadas como clastogênicas, quando há quebras cromossômicas e pontes, e aneugênicas quando há inativação de estrutura celular ou inativação da região centromérica, com cromossomos não orientados, atrasados e c-metáfases (LEME et al., 2008; LEME et al., 2009; FENECH, 2000, FREITAS et al., 2016).

7 CONCLUSÕES

De acordo com as condições experimentais deste estudo, as TiO₂NPs demonstraram potencial citotóxico para células meristemáticas de *Lactuca sativa* L., induzindo aumento do índice mitótico observado na concentração de 10 µg/mL. Além disso, os efeitos genotóxicos das TiO₂NPs podem ser pelo aumento de aberrações cromossômicas nas concentrações de 100 µg/mL e 1000 µg/mL.

A taxa de germinação e alongamento radicular não foram alterados com a exposição à TiO₂NP, o que indica que essas NPs não têm potencial fitotóxico para células meristemáticas de *L. sativa* nas condições experimentais deste trabalho.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIN, R.; HWANG, S.; PARK, S. H. Nanobiotechnology: an interface between nanotechnology and biotechnology. **Nano**, v. 06, n. 2, p. 101-111, 2011.

ANDRADE, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Cytogenetic alterations induced by SPL (spent potliners) in meristematic cells of plant bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. San Diego, v. 71, n. 3, p. 706–710, 2008.

ANDRADE, L. F.; DAVIDE, L. C.; GEDRAITE, L. S. The effect of cyanide compounds, fluorides, aluminum, and inorganic oxides present in spent pot liner on germination and root tip cells of *Lactuca sativa*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 73, n. 4, p. 626–631, 2010.

ANDRADE-VIEIRA, L. et al. Effects of *Jatropha curcas* oil in *Lactuca sativa* root tip bioassays. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 1, p. 373-382, 2014.

ANDRADE-VIEIRA, L. F.; CAMPOS, J. M. S.; DAVIDE, L. C. Effects of Spent Pot Liner on mitotic activity and nuclear DNA content in meristematic cells of *Allium cepa*. **Journal of Environmental Management**, v. 107, p. 140-146, 2012.

ARAGÃO, F. B. et al. Phytotoxic and cytotoxic effects of eucalyptus essential oil on lettuce (*Lactuca sativa* L.). **Allelopathy Journal**, v. 35, n. 2, p. 259–272, 2015.

ARAJ, Y., MIYAYAMA, T., HIRANO S. Difference in the toxicity mechanism between ion and nanoparticle forms of silver in the mouse lung and in macrophages. **Toxicology**, v. 328, p. 84-92, 2015.

ATKINS, P. & DE PAULA, J. **Physical chemistry for the life sciences**. Oxford University Press, USA, 2011.

AZEVEDO, C.; MACEDO, M. H.; SARMENTO, B. Strategies for the enhanced intracellular delivery of nanomaterials. **Drug discovery today**, v. 23, n. 5, p. 944-959, 2018.

BABICH, H.; SEGALL, M. A.; FOX, K. D. The *Allium* test – A simple, eukaryote genotoxicity assay. **The American Biology Teacher**, v. 59, n. 9, p. 580-583, 1997.

BADERNA, D. et al. A combined approach to investigate the toxicity of an industrial landfill's leachate: chemical analyses, risk assessment and in vitro assays. **Environmental Research**, v. 111, n. 4, p. 603–613, 2011.

BALAJEE, A. S.; HANDE, M. P. History and evolution of cytogenetic techniques: Current and future applications in basic and clinical research. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 836, n. June, p. 3–12, 2018.

BARBER, D.; FREESTONE, I. An investigation of the origin of the colour of the Lycurgus Cup by analytical transmission electron microscopy. **Archaeometry**, v. 32, p. 33–45, 1990.

BAYDA, S.; ADEEL, M.; TUCCINARDI, T.; CORDANI, M.; RIZZOLIO, F. The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, v.25, n. 1, p. 112-126, 2020.

BERNARDES, P. M. et al. Toxicity of difenoconazole and tebuconazole in *Allium cepa*. **Water, Air and Soil Pollution**, v. 226, n.207, p. 1-11, 2015.

CABALLERO-DÍAZ, E. & CASES, M.V. Analytical methodologies for nanotoxicity assessment. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 84, p. 160-171, 2016.

CAMPOS, J. M. S., SOARES, G. L. G., VICCINI, L. F. Mutagenic effects due to allelopathic action of fern (Gleicheniaceae) extracts. **Allelopathy Journal**, v. 22, n.1, p. 143-152, 2008a.

CASTIGLIONE, M. R. et al. Root responses to different types of TiO₂ nanoparticles and bulk counterpart in plant model system *Vicia faba L.* **Environmental and Experimental Botany**, v. 130, p. 11-21, 2016.

CHE, M., WANG, R., LI, X., WANG, H.-Y., & ZHENG, X. F. S. Expanding Roles Of Superoxide Dismutases In Cell Regulation And Cancer. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 1, p. 143-149, 2016.

CLARK, D.P. & PAZDERNIK, N. J. **Biotechnology**. Newnes, 2015

DIAMOND, S. A.; KENNEDY, A.J.; MELBY, N.L.; MOSER, R.D.; PODA, A.R.; WEISS, J.; BRAME, J.A. Assessment of the potential hazard of nano-scale TiO₂ in photocatalytic cement: application of a tiered assessment framework. **NanoImpact**, v.8, p. 11-19, 2017.

DI BUCCHIANICO, S. et al. Genotoxicity of TiO₂ nanoparticles assessed by mini-gel comet assay and micronucleus scoring with flow cytometry. **Mutagenesis**, v. 32, n. 1, p. 127-137, 2017.

DIEBOLD, U. The surface science of titanium dioxide. **Surface Science Reports**, v. 48, n. 2, p. 53-229, 2003.

DONALDSON, K. et al. Free radical activity associated with the surface of particles: a unifying factor in determining biological activity? **Toxicology Letters**, v. 88, n. 1-3, p. 293-298, 1996.

DONALDSON, K. et al. Evaluation of cytological effects of Zn²⁺ in relation to germination and root growth of *Nigella sativa L.* and *Triticum aestivum L.* **Mutation Research**, v. 537, n. 1, p. 29-41, 2003.

FAKRUDDIN, M.; HOSSAIN, Z.; AFROZ, H. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. **Journal of nanobiotechnology**, v. 10, n. 1, p. 31, 2012.

FENECH, M., The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, n. 1, p. 81-95, 2000.

FERREIRA, A. L. N. **Exposição de Crómio em alface: acumulação e efeitos na fisiologia e genotoxicidade**. Dissertação (Mestrado em Toxicologia e Ecotoxicologia). Universidade de Aveiro. Aveiro, Portugal, 2007.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 88, n. 3, p. 252–259, 2007.

FEYNMAN, R. There's plenty of room at the bottom. **Eng. Sci.**, v. 23, p. 22–36, 1960.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, v. 102, n. 1, p. 99-112, 1985.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test: an alternative in environmental studies: the relative toxicity of metal ions. **Mutation Research**, v. 197, n. 2, p. 243-260, 1988.

FOLTÊTE, A-S. et al. Environmental impact of sunscreen nanomaterials: Ecotoxicity and genotoxicity of altered TiO₂ nanocomposites on *Vicia faba*. **Environmental Pollution**, v. 159, p. 2515e2522, 2011.

FREESTONE, I.; MEEKS, N.; SAX, M.; HIGGITT, C. The Lycurgus Cup—A Roman nanotechnology. **Gold Bull**, v.40, p. 270–277, 2007.

FREITAS, A. S., CUNHA, I. M. F., ANDRADE-VIEIRA, L. F., TECHIO, V. H. Effect of SPL (Spent Pot Liner) and its main components on root growth, mitotic activity and phosphorylation of Histone H3 in *Lactuca sativa* L. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 124, p. 426- 434, 2016.

FUJISHIMA, A., HONDA, K. Electrochemical Photolysis of Water at a Semiconductor Electrode. **Nature**, v. 238, p. 37–38, 1972

FU, P. P., XIA, Q., HWANG, H-M., RAY, P. C., & YU, H. Mechanisms Of Nanotoxicity: Generation Of Reactive Oxygen Species. **Journal Of Food And Drug Analysis**, v. 22, n. 1, p. 64-75, 2014.

GATOO, M. A. et al. Physicochemical properties of nanomaterials: Implication in associated toxic manifestations. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

GERLOFF, K. et al. The Adverse Outcome Pathway approach in nanotoxicology. **Computational Toxicology**, v. 1, p. 3–11, 2017.

GHESHLAGHI et al. Toxicity and interaction of titanium dioxide nanoparticles with microtubule protein. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 40, n. 9, p. 777-782, 2008.

GHOSH, M., BANDYOPADHYAY, M., MUKHERJEE, A. Genotoxicity of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles at two trophic levels: Plant and human lymphocytes. **Chemosphere**, v. 81, p. 1253–1262, 2010.

GILMOUR, P. et al. Surface free radical activity of PM10 and ultrafine titanium dioxide: a unifying factor in their toxicity? **The Annals of Occupational Hygiene**, v. 41, n. 1, p. 32–38, 1997.

GRANDE, F., TUCCI P. Titanium Dioxide Nanoparticles: a Risk for Human Health?. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 9, p. 762-769, 2016.

GRANT, W.F. The present status of higher plant bioassays for the detection of environmental mutagens. **Mutation Research**, v. 310, n. 2, p. 175-185, 1994.

GUERRA, M. S. Os Cromossomos Metafásicos e o Ciclo Celular. In: GUERRA, M. dos S. (Ed.) **Introdução à Citogenética Geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 1, p. 8-12, 1988.

GUERRA, M., SOUZA, M. J. Como observar cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana. Ribeirão Preto: **FUNPEC**, 2002. 191p.

GUNSOLUS, I. L.; HAYNES, C. L. Analytical Aspects of Nanotoxicology. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 451–479, 2016.

HINTZSCHE, H. et al. Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 85–98, 2017.

HOUK, V. S. The genotoxicity of industrial wastes and effluents: a review. **Mutation Research**, v. 277, n. 2, p. 91-138, 1992.

HU, J. et al. TiO₂ nanoparticle exposure on lettuce (*Lactuca sativa* L.): dose-dependent deterioration of nutritional quality. **Environmental Science: Nano**, v. 7, p. 501–513, 2020.

Iavicoli, I., LESO, V., BERGAMASCHI, A. Toxicological Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles: A Review of *In Vivo* Studies. **Journal of Nanomaterials**, v. 2012, 36 p., 2012.

JIANG, J., OBERDÖRSRER, G., BISWAS, P. Characterization of size, surface charge, and agglomeration state of nanoparticle dispersions for toxicological studies, **Journal of Nanoparticle Research**, V. 11, p. 77-89, 2009.

JRC Nanomaterials Repository, Titanium dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM104, NM-105. **Publications Office of the European Union**, 2014, disponível em: <[www. publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC86291](http://www.publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC86291)>

KESSLER, R. Engineered Nanoparticles in Consumer Products: Understanding a New Ingredient. v. 119, n. 3, 2011.

KIM, K.M. et al. Physicochemical analysis methods for nanomaterials considering their toxicological evaluation. **Molecular and Cellular Toxicology**, v.10, p.347-360, 2014.

KIM, H. et al. Titanium dioxide nanoparticles induce apoptosis by interfering with EGFR signaling in human breast cancer cells. **Environmental Research**, v. 175, p. 117-123, 2019.

KLANCNIK, K., DROBNE, D., VALANT, J., KOCE, J. D. Use of modified *Allium* test with nano TiO₂. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 74, p 85-92, 2010.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. *Mutation Research*, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009.

LIMA, M.G.F.. et al. Effects of three antimetabolic agents on karyotype of *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L.: two plant model species for cytogenotoxic assessments. **South African Journal of Botany**, v. 125, p; 244-250, 2019.

LIN, D., XING., B. Phytotoxicity of nanoparticles: Inhibition of seed germination and root growth. **Environmental pollution**, v. 150, p. 243-250, 2007.

MA, X., LEE, J. G., DENG, Y., KOLMARKOV, A. Interactions between engineered nanoparticles (ENPs) and plants: phytotoxicity, uptake and accumulation. **Science of the Total Environment**, v. 408, p. 3053-3061, 2010.

MANESH, R. R. et al. Co-exposure to titanium dioxide nanoparticles does not affect cadmium toxicity in radish seeds (*Raphanus sativus*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.148, p. 359-366, 2018.

MAURO, M. O. et al. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture. **Genetics and Molecular Research**, v. 13, n. 3, p. 4808-4819, 2014.

MIGID, H. M. A.; AZAB, Y. A.; IBRAHIM, W. M. Use of plant genotoxicity bioassay for the evaluation of efficiency of algal biofilters in bioremediation of toxic industrial effluent. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, v. 66, p. 57-64, 2007.

MONICA, R. C., CREMONINI, R. Nanoparticles and higher plants. **Caryologia**, v. 62, n. 2, p. 161-165, 2009.

MONTEIRO, M. S. et al. Microsatellite instability in *Lactuca sativa* chronically exposed to cadmium. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 672, n. 2, p. 90–94, 2009.

MORAIS, M.G.; MARTINS, V.G.; STEFFENS, D.; COSTA, J.A.V. Biological applications of nanobiotechnology. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 14, n. 1, p. 1007- 1017, 2014.

MUDALIGE, T., QU, H., HAUTE, D. V., ANSAR, S. M., PAREDES, A., INGLE, T. Characterization of Nanomaterials: Tools and Challenges. In *Nanomaterials for Food Applications*. **Micro and Nano Technologies**, chap. 11, p. 313-353, 2019.

NASR, M., EID, C., HABCHI, R., MIELE, P., BECHELANY, M. Recent Progress on Titanium Dioxide Nanomaterials for Photocatalytic Applications. **ChemSusChem**, v. 11, n. 18, p. 3023-3047, 2018.

PARK, M. V. D. Z. et al. In vitro developmental toxicity test detects inhibition of stem cell differentiation by silica nanoparticles. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 240, n. 1, p. 108-116, 2009.

PINHEIRO, P. F. et al. Phytotoxicity and Cytotoxicity of Essential Oil from Leaves of *Plectranthus amboinicus*, Carvacrol, and Thymol in Plant Bioassays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 41, p. 8981–8990, 2015.

PONS, T. et al. Hydrodynamic dimensions, electrophoretic mobility, and stability of hydrophilic quantum dots. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 110, n. 41, p. 20308–20316, 2006.

QIN, Y.; SUN, L.; XIXUAN, L.; QINGQING, C.; WANG, H.; TANG, X.; YE, L. Highly waterdispersible TiO₂ nanoparticles for doxorubicin delivery: Effect of loading mode on therapeutic efficacy. **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, n. 44, p. 18003-18010, 2011.

RANK, J.; NIELSEN, M. H. Allium cepa anaphase–telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide, and ethyl methanesulfonate. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 390, n. 1, p. 121- 127, 1997.

ROBLES-GARCÍA, M. A. et al. Applications of nanotechnology in the agriculture, food, and pharmaceuticals. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 8, p. 8188-8207, 2016.

RODRIGUES, M. A., KERBAUY, G. B. Meristemas: fonte de juventude e plasticidade no desenvolvimento vegetal. **Hoehnea**, v. 36, n. 4, p. 525-549, 2009.

ROSE, J. et al. Physical-chemical properties of nanoparticles in relation with toxicity. **Encyclopedia of Nanotechnology**, n. January, 2012.

RUSSEL, P. J. Chromosomal mutation. B. Cummings (Ed.), **Genetics, Pearson Education Inc.**, San Francisco, pp. 595-621, 2002.

SANTOS FILHO, R. et al. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles and triggering of defense mechanisms in Allium cepa. **Genetics and Molecular Biology**, v. 42, n. 2, p. 425-435, 2019.

SAPSFORD, K. E. et al. Analyzing nanomaterial bioconjugates: A review of current and emerging purification and characterization techniques. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 4453–4488, 2011.

SAYES, C. et al. Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. **Toxicological Sciences**, v.92, n. 1, p.174–185, 2006.

SHAH, S. N. A., SHAH, Z., HUSSAIN, M., KHAN, M. Hazardous Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles in Ecosystem. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2017, 12 p., 2017.

SHI, H., MAGAYE, R., CASTRANOVA, V., ZHAO, J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 10, p. 15-46, 2013.

SIGMUND, W.; PYRGIOTAKIS, G.; DAGA, A. 11 Theory and Applications of Colloidal Processing. **Chemical Processing of Ceramics**, p. 269, 2005.

SILVEIRA, G. L., LIMA, M. G. F., REIS, G. B., PALMIERI, M. J., ANDRADE-VIEIRA, L. F. Toxic effects of environmental pollutants: Comparative investigation using *Allium cepa* L. and *Lactuca sativa* L. **Chemosphere**, v. 178, p. 359-367, 2017.

SONG, B.; ZHANG, Y.; LIU, J.; FENG, X.; ZHOU, T.; SHAO, L. Unraveling the neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles: focusing on molecular mechanisms. **Beilstein J. Nanotechnol**, v. 7, p. 645–654, 2016.

TAKAEDA, Y.; MAE, S.; KAJIKAWA, Y.; MATSUSHIMA, K. Nanobiotechnology as an emerging research domain from nanotechnology: A bibliometric approach. **Scientometrics**, v. 80, n. 1, p. 25-40, 2009.

TERZOUDI, G. I., HATZI, V. I., BAKOYIANNI, C. D., PANTELIAS, G. E. Chromatin dynamics during cell cycle mediate conversion of DNA damage into chromatid breaks and affect formation of chromosomal aberrations: Biological and clinical significance. **Mutation Research**, v.711, p. 174-186 2011.

TROUILLER, B. et al. Titanium Dioxide Nanoparticles Induce DNA Damage and Genetic Instability In vivo in Mice. **Cancer Research**, v. 69, n. 22, p. 8784-8789, 2009.

TUCCI, P., PORTA, G., AGOSTINI, M. et al. Metabolic effects of TiO₂ nanoparticles, a common component of sunscreens and cosmetics, on human keratinocytes. **Cell Death & Disease**, v. 4, p. 549-559, 2013.

WÓJCIK, E. B., et al. Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Exposure on Human Health - a Review. **Biological Trace Element Research**, v. 193, p. 119-129, 2019.

WU, J.; LIU, W.; XUE, C.; ZHOU, S.; LAN, F.; BI, L.; XU, H.; YANG, X.; ZENG, F. D. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. **Toxicology letters**. v. 191, n. 1, p. 1-8, 2009.

XIA, T. et al. Comparison of the abilities of ambient and manufactured nanoparticles to induce cellular toxicity according to an oxidative stress paradigm, **Nano Letters**, v. 6, n. 8, p. 1794-1807, 2006.

YANG, Z. et al. Assessment of the Phytotoxicity of Metal Oxide Nanoparticles on Two Crop Plants, Maize (*Zea mays* L.) and Rice (*Oryza sativa* L.). **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v.12, n.12, p.15100-15109, 2015.

YIN, Z. F.; WU, L.; YANG, H. G.; SU, Y. H. Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide. **Physical chemistry chemical physics**, v. 15, n. 14, p. 4844-4858, 2013.

ZHU, M. et al. Physicochemical properties determine nanomaterial cellular uptake, transport, and fate. **Accounts of Chemical Research**, v. 46, n. 3, p. 622–631, 2013.