UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Milena Duarte

Influência da biocorona proteica formada em soro fetal bovino nas propriedades físico-químicas e nos efeitos citogenotóxicos de nanopartículas de óxido de zinco *in vitro*

Juiz de Fora
2026

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

Duarte, Milena.
Influência da biocorona proteica formada em soro fetal bovino nas propriedades físico-químicas e nos efeitos citogenotóxicos de nanopartículas de óxido de zinco in vitro / Milena Duarte. -- 2026.
67 f.

Orientador: Michele Munk
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2026.

1. Células CHO. 2. Nanossegurança. 3. Toxicidade in vitro. I. Munk, Michele, orient. II. Título.

Milena Duarte

Influência da biocorona proteica formada em soro fetal bovino nas propriedades físico-químicas e nos efeitos citogenotóxicos de nanopartículas de óxido de zinco *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do Título de Mestra em Ciências Biológicas, área de concentração Genética & Biotecnologia:

Aprovada em 20 de agosto de 2026

BANCA EXAMINADORA

Profª. Drª. Michele Munk Pereira - Orientadora
Universidade Federal de Juiz de Fora

Prof. Dr. Carlos Magno da Costa Maranduba
Universidade Federal de Juiz de Fora

Profª. Drª.Ariane de Jesus Sousa Batista
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Juiz de Fora, 30/07/2026.

Documento assinado eletronicamente por **Michele Munk Pereira**, **Professor(a)**, em 20/08/2026, às 15:45, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Carlos Magno da Costa Maranduba**, **Professor(a)**, em 20/08/2026, às 16:17, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Ariane de Jesus Sousa Batista**, **Usuário Externo**, em 26/08/2026, às 15:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **3113936** e o código CRC **348F9157**.

Dedico este trabalho aos meus pais que me ajudaram, incentivaram e me auxiliaram na realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me sustentado até aqui, pelas oportunidades que colocou no meu caminho, por me dar forças e sabedoria para continuar perseverante na vida acadêmica. A virgem Maria por sempre interceder a Jesus por mim.

Aos meus pais e namorado por me incentivarem, pelo suporte e paciência.

À professora Dra. Michele pela orientação, pela oportunidade de fazer o Mestrado, pela ajuda, conhecimento e paciência. Me mostrando como evoluir sendo aluna e pesquisadora.

Aos colegas de trabalho, Anna Clara, Caroline, Carlos, Clarrisa, Geovana e Lorena, pelo apoio, ajuda, compreensão, ensinamentos, distrações quando ficava pesado o ambiente de trabalho, risadas e outros momentos de convivência.

À Universidade Federal de Juiz de Fora pelo acolhimento e fornecimento de equipamentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e por todos que fazem parte para a melhoria do programa.

Agradeço às agências de fomento à pesquisa CNPq (305109/2024-3), FAPEMIG (APQ-01855-23, RED00081- 23), CAPES e pelo fornecimento financeiro que proporcionou a realização deste projeto.

À banca, pela atenção, disponibilidade, troca de conhecimentos, ajudando na melhoria da minha dissertação.

Aos que me ajudaram em experimentos fora do nosso laboratório, a professora Dra. Celly, David, Laura, Vivian, Dr. Humberto, Pedro, Dr. Rafael. Agradeço a todos de coração.

.

RESUMO

As nanopartículas de óxido de zinco (NPs de ZnO) são aplicadas nos setores cosmético, farmacêutico, alimentício, têxtil, eletrônico e agrícola devido às suas propriedades físico-químicas. Entretanto, podem interagir com sistemas biológicos e induzir efeitos citotóxicos e genotóxicos. Em fluidos biológicos, proteínas adsorvem-se à superfície das NPs e formam uma biocorona capaz de modificar sua identidade biológica. Este estudo avaliou a formação da biocorona após a incubação de NPs de ZnO com soro fetal bovino (SFB) e sua influência sobre a citotoxicidade e a genotoxicidade *in vitro* em células de ovário de hamster chinês (CHO). As NPs foram avaliadas nas concentrações de 0, 1, 10 e 100 µg/mL, com ou sem incubação prévia com SFB. As dispersões foram caracterizadas por espalhamento de luz dinâmico, espectroscopias FTIR e Raman e SDS-PAGE. A atividade metabólica celular foi avaliada pelos ensaios de MTT e Alamar Blue, associados à análise morfológica por microscopia de luz invertida. O dano ao DNA foi investigado pelo ensaio cometa. Os dados foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas, adotando-se nível de significância de 5%. Na concentração de 100 µg/mL, a incubação com SFB reduziu o diâmetro hidrodinâmico médio das NPs de 1.247 ± 250 para 123 ± 3 nm, enquanto o potencial Zeta variou entre −10,0 ± 5,1 e −13,4 ± 0,9 mV. A SDS-PAGE demonstrou a associação de proteínas às NPs, com predominância de bandas entre 25 e 35 kDa. Os espectros de FTIR apresentaram bandas entre 456 e 683 cm^{-1}, compatíveis com vibrações da ligação Zn–O, enquanto os sinais Raman entre 1.075 e 2.337 cm^{-1} foram associados a componentes orgânicos presentes nas amostras incubadas com SFB. Nos ensaios de MTT, após 24 h, houve redução da atividade metabólica nas concentrações de 10 e 100 µg/mL, tanto na ausência quanto na presença de incubação prévia com SFB, em comparação com o controle ($p < 0,05$). Em 1 µg/mL, as NPs incubadas com SFB apresentaram maior atividade metabólica do que as NPs sem incubação com SFB ($p < 0,05$) e não diferiram do controle ($p > 0,05$). Após 48 h, apenas a concentração de 100 µg/mL reduziu a atividade metabólica, independentemente da incubação com SFB ($p < 0,05$). No ensaio de Alamar Blue, após 24 h, as NPs sem SFB reduziram a atividade metabólica em 10 e 100 µg/mL, enquanto as NPs incubadas com SFB produziram redução apenas em 100 µg/mL ($p < 0,05$). Em 10

μg/mL, as NPs incubadas com SFB apresentaram maior atividade metabólica do que as NPs sem SFB ($p < 0,05$) e não diferiram do controle ($p > 0,05$). Após 48 h, apenas a concentração de 100 μg/mL reduziu a atividade metabólica, independentemente da incubação com SFB ($p < 0,05$). No ensaio cometa, o percentual de DNA na cauda não diferiu entre os grupos ($p > 0,05$). Entretanto, o Olive Tail Moment aumentou nas células expostas a 1 e 100 μg/mL de NPs incubadas com SFB, tanto em relação ao controle quanto às respectivas concentrações sem SFB ($p < 0,05$). Os resultados demonstram que a adsorção de proteínas do SFB modificou as propriedades físico-químicas e os efeitos biológicos das NPs de ZnO. Portanto, a presença da biocorona proteica deve ser considerada na caracterização das dispersões de nanomateriais e na interpretação dos ensaios de nanotoxicologia *in vitro.*

Palavras-chave: nanosegurança, toxicidade *in vitro;* células CHO-K1.

ABSTRACT

Zinc oxide nanoparticles (ZnO NPs) are used in the cosmetic, pharmaceutical, food, textile, electronics, and agricultural sectors because of their physicochemical properties. However, they may interact with biological systems and induce cytotoxic and genotoxic effects. In biological fluids, proteins adsorb onto the NP surface and form a protein corona that can modify their biological identity. This study evaluated protein corona formation following the incubation of ZnO NPs with fetal bovine serum (FBS) and its influence on in vitro cytotoxicity and genotoxicity in Chinese hamster ovary (CHO) cells. The NPs were evaluated at concentrations of 0, 1, 10, and 100 µg/mL, with or without prior incubation with FBS. The dispersions were characterized by dynamic light scattering, Fourier-transform infrared spectroscopy, Raman spectroscopy, and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Cellular metabolic activity was assessed using the MTT and Alamar Blue assays, together with morphological analysis by inverted light microscopy. DNA damage was investigated using the comet assay. Data were analyzed using the Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple-comparison test, with a significance level of 5%. At 100 µg/mL, incubation with FBS reduced the mean hydrodynamic diameter of the NPs from 1,247 ± 250 to 123 ± 3 nm, while the Zeta potential ranged from −10.0 ± 5.1 to −13.4 ± 0.9 mV. SDS-PAGE demonstrated protein association with the NPs, with predominant bands between 25 and 35 kDa. The FTIR spectra showed bands between 456 and 683 cm^{-1}, consistent with Zn–O bond vibrations, whereas Raman signals between 1,075 and 2,337 cm^{-1} were associated with organic components in the samples incubated with FBS. In the MTT assay, after 24 h, metabolic activity was reduced at 10 and 100 µg/mL, both with and without prior incubation with FBS, compared with the control ($p < 0.05$). At 1 µg/mL, NPs incubated with FBS resulted in higher metabolic activity than NPs without prior incubation with FBS ($p < 0.05$) and did not differ from the control ($p > 0.05$). After 48 h, only the concentration of 100 µg/mL reduced metabolic activity, regardless of prior incubation with FBS ($p < 0.05$). In the Alamar Blue assay, after 24 h, NPs without FBS reduced metabolic activity at 10 and 100 µg/mL, whereas NPs incubated with FBS reduced metabolic activity only at 100 µg/mL ($p < 0.05$). At 10 µg/mL, NPs incubated with FBS resulted in higher metabolic activity than NPs without FBS ($p < 0.05$) and did not differ from the control ($p > 0.05$). After 48 h, only the concentration

of 100 μg/mL reduced metabolic activity, regardless of prior incubation with FBS ($p < 0.05$). In the comet assay, the percentage of DNA in the tail did not differ among the groups ($p > 0.05$). However, the Olive tail moment increased in cells exposed to 1 and 100 μg/mL of NPs incubated with FBS compared with both the control and the corresponding concentrations without FBS ($p < 0.05$). The results demonstrate that the adsorption of FBS proteins modified the physicochemical properties and biological effects of ZnO NPs. Therefore, protein corona formation should be considered when characterizing nanomaterial dispersions and interpreting in vitro nanotoxicology assays.

Keywords: nanosafety; *in vitro* toxicity; CHO cells.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Raman e FTIR 36
Figura 2	MEV 37
Figura 3	AFM 38
Figura 4	SDS-PAGE.....39
Figura 5	Morfologia celular.....41
Figura 6	Morfologia celular.....42
Figura 7	MTT 24H.....43
Figura 8	MTT 48H.....44
Figura 9	Alamar Blue 24H..... 45
Figura 10	Alamar Blue 48H..... 46
Figura 11	Tail DNA % 47
Figura 12	Oliver Moment 48
Figura 13	Cometa imagens 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Espalhamento de Luz Dinâmico.....35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
AFM	Microscópico de força atômica
CHO	Células de Ovário de Hamster Chinês
cm^{-1}	Centímetro inverso
CO_2	Gás Carbônico
DLS	Espalhamento de luz dinâmico
DMEM/F12	*Dulbecco's Modified Eagle's Medium – F12*
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
EUA	Estados Unidos da América
FTIR-ATR	*Fourier Transform Infrared – Attenuated Total Reflectance*
h	Hora
IPD	Índice De Polidispersão
kDa	Kilodalton
kV	Kilovolt
mA	Miliampere
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MTT	Ensaio De Metil Tiazol Tetrazólio
mV	Milivolt
NaCl	Cloreto de Sódio
NM	Nanomaterial
nm	Nanômetro
NP	Nanopartícula

NP ZnO	Nanopartícula de óxido de zinco
º C	Graus Celsius
PBS	*Phosphate Buffered Saline*
pH	Potencial de hidrogeniônico
rpm	Rotações por minuto
SDS-PAGE	*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*
SFB	Soro Fetal Bovino
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
V	Volts
v/v	Volume por volume
Zn	Zinco
ZnO	Óxido de zinco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 17
2 HIPÓTESE 20
3 OBJETIVOS 21
3.1 OBJETIVO GERAL 21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 21
4 REVISÃO DE LITERATURA 22
4.1 NANOPARTÍCULAS DE ZnO 22
4.2 BIOCORONA PROTEICA 23
4.3 CÉLULAS CHO 25
4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA 26
4.5 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE 27
4.6 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE 28
5 MATERIAL E MÉTODOS 30
5.1 PREPARO DAS NPs ZnO REVESTIDAS COM BIOCORONA PROTEICA 30
5.2 PREPARO DAS NPs ZnO EM MEIO BASAL (SEM BIOCORONA) 30
5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS REVESTIDA COM PROTEÍNA CORONA 31
5.3.1 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) 31
5.3.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN E INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR-ATR) 31
5.3.3 ELETROFORESE EM GEL (SDS-PAGE) 32
5.3.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM) 32
5.3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) 33
5.4 AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE BIOCORONA PROTEICA 33
5.4.1 CULTIVO CELULAR 33
5.4.2 MICROSCOPIA DE LUZ 34
5.4.3 ENSAIO DE METIL TIAZOL TETRAZÓLIO (MTT) 34
5.4.4 ALAMAR BLUE 35
5.5 ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE BIOCORONA 36
5.5.1 ENSAIO COMETA 36

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS 37
6 RESULTADOS 38
6.1 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS) 38
6.2 ESPECTROSCOPIA 39
6.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV) 40
6.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM) 42
6.5 ELETROFORESE EM GEL (SDS-PAGE) 43
6.6 ANÁLISE DO CRESCIMENTO E DA MORFOLOGIA CELULAR 44
6.7 ENSAIO DE MTT 46
6.8 ENSAIO DE ALAMAR BLUE 49
6.9 ENSAIO COMETA 51
7 DISCUSSÃO 55
8 CONCLUSÃO 61
REFERÊNCIAS 62

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e a aplicação de nanomateriais (NMs) têm crescido significativamente nas últimas décadas, impulsionando avanços em diferentes setores, como agronegócio, cosméticos, medicina e indústria farmacêutica. As propriedades diferenciadas desses materiais decorrem principalmente de suas dimensões nanométricas, que lhes conferem elevada área superficial e maior reatividade química em comparação aos materiais convencionais (Bogdan et al., 2017). Como consequência, as nanopartículas (NPs) podem interagir com estruturas biológicas em escala molecular, modificando processos celulares e desencadeando respostas biológicas específicas (Menon et al., 2023; El Yamani et al., 2024).

Entre os NMs de maior interesse destacam-se as NPs de óxido de zinco (NPs ZnO), amplamente utilizadas devido às suas propriedades ópticas, antimicrobianas e de absorção da radiação ultravioleta. Essas características favorecem sua aplicação em cosméticos, fertilizantes, aditivos alimentares, revestimentos de implantes e biomateriais destinados à regeneração óssea, além de diversas outras aplicações biomédicas e industriais (Youn et al., 2022; Wen et al., 2023; Zhou et al. 2023, Akhtar et al., 2024).

Embora o óxido de zinco em sua forma micrométrica seja considerado um material de baixa toxicidade, estudos recentes demonstram que suas nanoformas podem induzir efeitos adversos em sistemas biológicos (Karlsson et al., 2009; Caron et al., 2024). Essas respostas estão relacionadas às propriedades físico-químicas características da escala nanométrica, como o aumento da área superficial, da reatividade química e da capacidade de interação com biomoléculas, tornando necessária a avaliação de sua segurança para a saúde humana e para o meio ambiente (Mohr et al., 2017; Akhtar et al., 2024).

Além da elevada reatividade superficial, as NPs apresentam tendência à agregação e à interação com componentes presentes nos meios biológicos, fatores que podem influenciar sua biodisponibilidade e seu potencial tóxico. Entre os efeitos descritos destacam-se alterações na viabilidade celular, indução de estresse oxidativo e danos ao material genético. Nesse contexto, os ensaios *in vitro* representam ferramentas importantes para a triagem inicial da toxicidade de NMs, permitindo a

investigação rápida e controlada dos mecanismos envolvidos na resposta celular à exposição (Awashra e Mlynarz, 2023; Burgum et al., 2024; El Yamani et al., 2024).

Quando entram em contato com fluidos biológicos, as NPs adsorvem espontaneamente biomoléculas em sua superfície, formando uma camada denominada biocorona proteica. Essa camada passa a constituir a interface entre o NM e o sistema biológico, modificando sua identidade original e influenciando processos como estabilidade coloidal, biodistribuição, reconhecimento celular, captação pelas células e resposta imunológica (Vilanova et al., 2016; Wang et al., 2024). Em experimentos *in vitro*, o soro fetal bovino (SFB) é uma das principais fontes de proteínas para a formação da biocorona, sendo capaz de alterar o comportamento das NPs durante a exposição celular (Miao et al., 2024).

O efeito da biocorona proteica sobre a toxicidade das NPs ainda permanece controverso. Dependendo da composição e da conformação das proteínas adsorvidas, essa camada pode atuar como uma barreira física, reduzindo a dissolução de íons e atenuando os danos celulares. Por outro lado, também pode favorecer a internalização das NPs e intensificar seus efeitos tóxicos, modificando sua interação com diferentes tipos celulares (Bai et al., 2021).

Para investigar esses efeitos, a linhagem celular de ovário de hamster chinês (CHO) constitui um modelo experimental amplamente utilizado em estudos de toxicidade e genotoxicidade. Suas características de crescimento estável em monocamada, elevada reprodutibilidade experimental e sensibilidade à detecção de danos cromossômicos justificam seu emprego em estudos toxicológicos. Além disso, a linhagem é recomendada pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) para ensaios de micronúcleo *in vitro*, sendo amplamente utilizada na avaliação da genotoxicidade de substâncias químicas e NMs (OECD TG 487, 2016; Wagner et al., 2017).

Apesar dos avanços na compreensão da interação entre NMs e sistemas biológicos, ainda são limitados os estudos que investigam como a biocorona formada a partir da interação entre o SFB e as NPs ZnO influencia a citogenotoxicidade em células CHO. Considerando que a composição da biocorona pode modificar as propriedades físico-químicas das NPs e alterar sua interação com as células, torna-

se necessário compreender seu papel na modulação das respostas biológicas induzidas por esses NMs. Dessa forma, o presente estudo busca contribuir para o entendimento da influência da biocorona proteica sobre a citotoxicidade e a genotoxicidade das NPs ZnO, fornecendo informações relevantes para a avaliação de sua segurança e para o desenvolvimento de aplicações mais seguras na área da nanotecnologia.

2 HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que a adsorção de proteínas do soro fetal bovino (SFB) na superfície das nanopartículas de óxido de zinco (NPs de ZnO) forma uma biocorona que modifica suas propriedades físico-químicas e influencia seus efeitos citotóxicos e genotóxicos em células CHO *in vitro*.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência da biocorona proteica formada após a incubação com soro fetal bovino (SFB) sobre as propriedades físico-químicas e os efeitos citotóxicos e genotóxicos das nanopartículas de óxido de zinco (NPs de ZnO) em células de ovário de hamster chinês (CHO) *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar as propriedades físico-químicas e morfológicas das NPs de ZnO antes e após a incubação com SFB por espalhamento de luz dinâmico (DLS), espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espectroscopia Raman, microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- Analisar a adsorção de proteínas do SFB na superfície das NPs de ZnO e caracterizar o perfil proteico da biocorona por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE).
- Avaliar a influência da biocorona sobre a atividade metabólica e a morfologia das células CHO expostas às NPs de ZnO por meio dos ensaios de MTT e Alamar Blue e da análise por microscopia de luz invertida.
- Avaliar a influência da biocorona sobre o dano ao DNA induzido pelas NPs de ZnO em células CHO por meio do ensaio cometa.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 NANOPARTÍCULAS DE ZnO

O Zinco (Zn) é um elemento-traço essencial para os organismos vivos e participa de diversos processos fisiológicos, incluindo o crescimento, a cicatrização de feridas, a regulação da resposta imune e o metabolismo celular. Além disso, atua como cofator de numerosas enzimas envolvidas na defesa antioxidante, contribuindo para a proteção das células contra os efeitos dos radicais livres (Kujur *et al*., 2016). Na produção animal, o Zn é amplamente utilizado como aditivo alimentar para melhorar o desempenho zootécnico e a saúde dos animais. Esse elemento pode ser fornecido por fontes orgânicas, como lactato de zinco, complexos com aminoácidos e quelatos, ou por fontes inorgânicas, entre as quais se destacam o sulfato de zinco e o óxido de zinco (Saptarshi *et al*., 2015).

Na escala nanométrica, as nanopartículas de óxido de zinco (NPs ZnO) apresentam propriedades físico-químicas distintas daquelas observadas no material em escala convencional, o que amplia suas possibilidades de aplicação. Essas NPs têm sido empregadas na medicina e na produção animal, contribuindo para o diagnóstico e o tratamento de doenças, além de favorecerem a digestibilidade dos alimentos e a saúde dos animais (Banumathi et al., 2017; Bogdan et al., 2017). Atualmente, as NPs ZnO estão entre os NMs mais utilizados em produtos industriais e de consumo, com aplicações em revestimentos, cosméticos e protetores solares (Rahman et al., 2022).

As NPs ZnO apresentam atividade antioxidante por diferentes mecanismos, tanto em ambientes extracelulares quanto intracelulares. Embora ainda não existem evidências conclusivas de que promovam a neutralização direta de espécies reativas de oxigênio (EROs) no interior das células, sua ação está associada principalmente à modulação dos sistemas enzimáticos de defesa antioxidante (Das et al., 2013). Além disso, propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias têm sido descritas para essas NPs, o que justifica o interesse em seu uso em aplicações biomédicas relacionadas à cicatrização de feridas, à modulação da resposta imune e à proteção contra danos oxidativos (Yang; Xiong; Long, 2025).

As NPs ZnO são encontradas em produtos de cuidados pessoais, especialmente em cosméticos e protetores solares, devido à sua elevada capacidade de absorver radiação ultravioleta enquanto mantêm alta transparência à luz visível. Essa combinação de propriedades é característica das partículas em escala nanométrica e não é observada nas formas micro ou submicrométricas do óxido de zinco, tornando esses NMs particularmente adequados para aplicações que exigem proteção solar sem alteração significativa da aparência do produto (Yin *et al*., 2015).

4.2 BIOCORONA PROTEICA

Ao entrarem em contato com meios biológicos, as NPs interagem com biomoléculas presentes no sangue, no fluido intersticial e no ambiente intracelular, principalmente proteínas, mas também lipídios e metabólitos. Em razão da elevada energia superficial das NPs, essas interações ocorrem por forças de van der Waals, ligações eletrostáticas, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, promovendo a adsorção espontânea de biomoléculas e a formação da biocorona, que é predominantemente proteica (Mahmoudi, 2022).

A composição da biocorona depende tanto da abundância das biomoléculas presentes no meio quanto da afinidade dessas moléculas pela superfície da NP. Em ensaios realizados *in vitro*, o soro fetal bovino (SFB) representa a principal fonte de proteínas para sua formação, sendo a albumina e as imunoglobulinas algumas das proteínas mais frequentemente adsorvidas (Mahmoudi, 2022).

A formação da biocorona modifica as propriedades biológicas das NPs e influencia processos como a biodistribuição, a captação celular e a interação com o sistema imunológico. Ao revestir a superfície da NP com biomoléculas do meio biológico, a biocorona passa a constituir a interface efetivamente reconhecida pelas células, podendo reduzir o reconhecimento pelo sistema imune, aumentar a biocompatibilidade, prolongar o tempo de circulação e alterar a resposta celular frente ao NM (Mayordomo *et al*., 2025).

A adsorção de proteínas em superfícies expostas a fluidos biológicos foi descrita inicialmente por Vroman em 1962 (Vroman, 1962). Desde então, diversos estudos demonstraram que essa camada biomolecular determina, em grande parte,

o comportamento das NPs no ambiente biológico. Dessa forma, a estrutura, a composição e a dinâmica da biocorona influenciam diretamente a interação entre as NPs e os sistemas celulares (Mayordomo et al., 2025).

As características da superfície das NPs também exercem papel importante na formação da biocorona. Superfícies hidrofóbicas ou apolares tendem a estabelecer interações mais fortes e estáveis com as proteínas adsorvidas. Durante esse processo, algumas proteínas podem sofrer alterações conformacionais, com exposição de regiões hidrofóbicas anteriormente ocultas, o que pode resultar em desenovelamento parcial ou desnaturação e modificar sua atividade biológica (Miao et al., 2024; Lundqvist et al, 2011).

Estruturalmente, a biocorona é composta por duas camadas principais, denominadas coroa dura (hard corona) e coroa mole (soft corona), cuja formação depende da afinidade e da estabilidade das biomoléculas associadas à superfície da NP. A coroa dura é formada por proteínas fortemente adsorvidas por interações eletrostáticas, hidrofóbicas e outras forças intermoleculares, apresentando baixa taxa de troca e elevada estabilidade (Shannahan, 2017). Em contraste, a coroa mole é constituída por biomoléculas fracamente ligadas, que permanecem em equilíbrio dinâmico com o meio e podem ser facilmente substituídas por outras proteínas presentes no ambiente biológico (Lundqvist et al, 2011).

A elevada estabilidade da coroa dura permite que as NPs sejam submetidas a etapas de centrifugação e lavagem para remoção das proteínas fracamente adsorvidas sem comprometer sua estrutura. Por esse motivo, a hard corona é frequentemente utilizada para estudos de caracterização da biocorona e para a investigação de seus efeitos sobre o comportamento biológico das NPs (Mayordomo et al., 2025).

A adsorção de proteínas à superfície das partículas de ZnO pode alterar seu comportamento coloidal, com modificações no tamanho hidrodinâmico e no potencial Zeta. Estudos realizados em meios biológicos simulados contendo proteínas plasmáticas relataram redução do tamanho hidrodinâmico após 24 h de incubação. Esse resultado foi associado à estabilização coloidal promovida pelas proteínas adsorvidas e à redução da aglomeração das partículas (Vranic et al., 2017; Churchman et al., 2013). Entretanto, alterações no tamanho hidrodinâmico e no potencial Zeta não comprovam, isoladamente, a formação da biocorona, que deve ser confirmada por métodos de detecção e caracterização das proteínas adsorvidas.

Em meios aquosos sem proteínas, as NPs de ZnO podem formar aglomerados devido à elevada energia superficial e às interações entre as partículas. A presença de albumina sérica bovina pode modificar esse comportamento, pois sua adsorção à superfície das NPs altera a carga superficial e as interações entre as partículas. Em determinadas condições experimentais, esse processo resulta em menor tamanho hidrodinâmico, compatível com a redução da aglomeração e o aumento da estabilidade coloidal (Sasidharan, Chandran e Khan, 2013; Yu et al., 2017). Esse efeito depende da concentração de proteínas, do pH, da força iônica, do tempo de incubação e das características das NPs.

A formação da biocorona também pode modificar a interação das nanopartículas com a membrana celular e sua internalização. Entretanto, a direção e a intensidade desse efeito dependem da composição da biocorona, das propriedades das nanopartículas e do tipo celular. Estudos prévios demonstraram que proteínas distintas adsorvidas à superfície das nanopartículas podem exercer efeitos diferentes sobre a captação celular (Ritz et al., 2015).

4.3 CÉLULAS CHO

A linhagem celular CHO-K1 é uma linhagem imortalizada derivada do ovário de hamster chinês (*Cricetulus griseus*) adulto e foi descrita originalmente por Puck et al. (1958). Desde então, tornou-se um dos sistemas celulares mais utilizados na indústria biofarmacêutica para a produção de proteínas recombinantes em larga escala, incluindo anticorpos monoclonais, vacinas e produtos destinados à terapia gênica (Mattson et al., 2025).

As células CHO apresentam elevada capacidade de adaptação a diferentes condições de cultivo, podendo crescer tanto em suspensão quanto em aderência, característica que contribui para sua ampla utilização como sistema de expressão de proteínas complexas (Tihanyi & Nyitray, 2020). Além disso, protocolos de transfecção, amplificação gênica e seleção clonal estão bem estabelecidos para essa linhagem, permitindo a obtenção de clones altamente produtivos.

Outra característica importante das células CHO é a capacidade de realizar modificações pós-traducionais semelhantes às observadas em células humanas,

especialmente processos de glicosilação. Essas modificações influenciam diretamente a atividade biológica, a estabilidade e a meia-vida das proteínas recombinantes, além de contribuírem para a redução da imunogenicidade e para a segurança dos produtos biotecnológicos (Meeson et al., 2025). O amplo histórico de utilização industrial e as sucessivas aprovações regulatórias reforçam sua confiabilidade para a produção de biofármacos (Lim et al., 2010).

Além das aplicações biotecnológicas, a linhagem CHO-K1 é amplamente empregada em estudos toxicológicos e genotoxicológicos. As diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) recomendam essa linhagem como modelo para o ensaio de micronúcleo *in vitro* (OECD Test Guideline 487), um dos principais métodos para avaliação de danos cromossômicos induzidos por agentes químicos e NMs. Por essa razão, as células CHO-K1 são frequentemente utilizadas em estudos que investigam o potencial genotóxico de NPs e outros compostos de interesse biomédico (Jiang et al., 2013).

4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA

A caracterização físico-química dos NMs é uma etapa fundamental em estudos de nanotoxicologia, pois suas propriedades influenciam diretamente o comportamento em sistemas biológicos e, consequentemente, os efeitos tóxicos observados. A composição química, o tamanho, a forma, a carga superficial e o estado de agregação ou aglomeração determinam a reatividade dos NMs, sua estabilidade no meio de exposição e sua interação com células e biomoléculas (Gunsolus & Haynes, 2016).

Dessa forma, a interpretação dos resultados obtidos em ensaios biológicos deve ser acompanhada de uma caracterização detalhada das NPs, considerando parâmetros como composição química, tamanho, área superficial, morfologia, estrutura cristalina, rugosidade, potencial Zeta, revestimento superficial, taxa de dissolução, dispersão, estabilidade no meio de ensaio e formação da biocorona. Essas características podem modificar a captação celular, favorecer ou dificultar processos de endocitose e alterar a biodisponibilidade e a toxicidade das NPs (Landsiedel et al., 2022).

Entre as técnicas mais empregadas para a caracterização físico-química

destaca-se o Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), utilizado para determinar o tamanho hidrodinâmico, o índice de polidispersão e o potencial Zeta, parâmetros relacionados à estabilidade coloidal das dispersões. A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e a Microscopia de Força Atômica (AFM) são amplamente utilizadas para avaliar o tamanho, a morfologia e a topografia das NPs, fornecendo informações complementares sobre sua estrutura.

Já a espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) e a espectroscopia Raman permitem identificar grupos funcionais e alterações na composição química da superfície das NPs. A espectroscopia Raman investiga os modos vibracionais das moléculas, fornecendo informações complementares. Os espectros Raman de proteínas apresentam bandas associadas à cadeia principal peptídica, às cadeias laterais aromáticas ou às cadeias laterais contendo enxofre. Em pesquisas é preferida para a análise dos espectros Raman de complexos proteína–nanopartícula em solução aquosa; além disso, os espectros Raman tendem a ser mais simples do que os espectros de infravermelho, uma vez que as vibrações localizadas de ligações duplas ou triplas, ou de grupos ricos em elétrons, produzem bandas mais intensas do que as vibrações de ligações simples ou de grupos pobres em elétrons (Pederzoli et al., 2017).

Em conjunto, essas técnicas fornecem informações essenciais para compreender o comportamento dos NMs em meios biológicos e estabelecer relações entre suas propriedades físico-químicas e os efeitos observados em estudos de citotoxicidade e genotoxicidade.

4.5 AVALIAÇÃO DE CITOTOXICIDADE

A avaliação da citotoxicidade constitui uma etapa fundamental nos estudos de nanotoxicologia, pois permite determinar os efeitos das NPs sobre a viabilidade, a morfologia e o metabolismo celular.

A microscopia de luz invertida representa uma abordagem simples para a avaliação inicial da citotoxicidade, permitindo a observação direta das células e a identificação de alterações morfológicas decorrentes da exposição às nanopartículas. Entre essas alterações destacam-se mudanças na forma celular, retração

citoplasmática, perda de adesão ao substrato, vacuolização e alterações nucleares (Liu et al., 2010). Embora essa análise seja predominantemente qualitativa, ela fornece informações importantes sobre a integridade celular e complementa os resultados obtidos pelos ensaios quantitativos de viabilidade.

Além da avaliação morfológica, a viabilidade celular pode ser estimada por ensaios que mensuram a atividade metabólica das células. Esses métodos baseiam-se na capacidade de células viáveis reduzirem compostos indicadores por meio de reações enzimáticas, permitindo uma estimativa indireta do número de células metabolicamente ativas presentes na amostra (Thorn, 2016).

O ensaio de metil tiazol tetrazólio (MTT) é um dos métodos mais utilizados para esse fim. Nesse ensaio, o sal de tetrazólio 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo, de coloração amarelo-pálida, é reduzido por enzimas oxidoredutoras presentes em células metabolicamente ativas, formando cristais insolúveis de formazan de coloração azul-escura ou púrpura. Após su a solubilização, a quantidade de formazan produzida é determinada por espectrofotometria e apresenta relação direta com a atividade metabólica e com o número de células viáveis presentes na amostra (Lewinski et al., 2008).

Outro método amplamente empregado é o ensaio de resazurina (Alamar Blue), que avalia a atividade metabólica por meio da redução da resazurina, um composto azul não fluorescente, em resorufina, de coloração rosa e altamente fluorescente. Essa conversão ocorre pela ação de cofatores reduzidos, como NADH e $FADH_2$, produzidos durante o metabolismo celular, sendo proporcional à atividade metabólica das células viáveis. Assim, a intensidade da fluorescência ou da absorbância obtida reflete indiretamente a viabilidade celular (Lewinski et al., 2008; Shvedova et al., 2003).

4.6 AVALIAÇÃO DE GENOTOXICIDADE

As NPs podem induzir genotoxicidade por diferentes mecanismos. Entre eles destacam-se a interação direta com o DNA, a interferência em proteínas envolvidas nos processos de replicação, transcrição e reparo do material genético e a indução de estresse oxidativo pela geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Jiang et al.,

2013). Além disso, processos inflamatórios desencadeados pela exposição às NPs podem aumentar secundariamente a produção de EROs e contribuir para o surgimento de lesões no DNA (Landsiedel et al., 2009). Grande parte dos danos genotóxicos associados às NPs ocorre por mecanismos indiretos, envolvendo alterações em organelas como lisossomos e mitocôndrias, que culminam em desequilíbrio redox e danos ao material genético (Landsiedel et al., 2022).

A capacidade das nanopartículas de interagir com componentes celulares depende de características como tamanho, composição química, carga superficial e estado de agregação. Esses fatores influenciam sua internalização e distribuição intracelular. Em geral, partículas com dimensões reduzidas apresentam maior facilidade para atravessar barreiras biológicas e alcançar compartimentos intracelulares por diferentes mecanismos de transporte.

Estudos demonstram que NPs com aproximadamente 100 nm podem ser eficientemente internalizadas por endocitose, enquanto partículas menores que 10 nm podem atravessar membranas celulares por difusão passiva ou outros mecanismos de transporte (Drescher et al., 2011; Schulz et al., 2012). Além disso, NP com dimensões inferiores a aproximadamente 39 nm podem alcançar o núcleo celular por meio de poros nucleares utilizando mecanismos dependentes de sinalização (Panté & Kann, 2002).

A avaliação da genotoxicidade de NPs é realizada por diferentes métodos capazes de detectar danos ao DNA e alterações cromossômicas. Destaca-se o ensaio cometa em células de mamíferos, ambos amplamente utilizados devido à elevada sensibilidade e à capacidade de identificar diferentes tipos de lesões genéticas (Landsiedel et al., 2009; Kisin et al., 2007). O ensaio cometa, também conhecido como eletroforese em gel de célula única, permite detectar quebras simples e duplas nas fitas de DNA, além de sítios álcali - lábeis, sendo considerado um dos métodos mais sensíveis para a identificação precoce de danos genéticos.

Durante o procedimento, células submetidas à eletroforese apresentam migração do DNA fragmentado, formando uma estrutura semelhante a um cometa, cuja intensidade da cauda é proporcional ao grau de dano genético. Apesar de sua ampla utilização em estudos experimentais e de sua elevada sensibilidade para avaliação da genotoxicidade de NPs, ainda não existe um protocolo completamente harmonizado para sua aplicação por todas as agências reguladoras internacionais (Kim et al., 2013).

5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido de quatro etapas, conforme ilustrado na Figura 1: 1) dispersão das NP e com ou sem pré-incubação com SFB para a formação da corona proteica; 2) caracterização físico-química; 3) avaliação da citotoxicidade e 4) análise da genotoxicidade. Para as análises biológicas foi utilizada a linhagem celular de ovário de hamster chinês CHO-K1 (ATCC).

As concentrações de NPs ZnO foram selecionadas com base em estudos prévios que demonstraram sua relevância para a investigação das interações entre NPs, biomoléculas e efeitos biológicos (Franqui et al., 2019; Fayer et al., 2019). A metodologia para formação da biocorona proteica foi adaptada de Tekie et al. (2020) e Zhang et al. (2024), consistindo na incubação das NPs ZnO com 10% de SFB sob agitação magnética a 35 °C durante uma hora. Foram estabelecidos sete grupos experimentais para comparar os efeitos das três concentrações de NPs ZnO (1, 10 e 100 µg/mL), na presença e na ausência da biocorona proteica.

5.1 PREPARO DAS NPs ZnO REVESTIDAS COM BIOCORONA PROTEICA

A solução estoque de NPs ZnO (<50 nm, >97%, Sigma-Aldrich, Alemanha) revestidas com corona proteica foi preparada dispersando-se 0,001 g do NM em 900 µL de meio de cultura DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, Sigma Aldrich, Alemanha) sem suplementação. A dispersão foi realizada em sonicador de ponteira (UP200S, Hielscher) com um ciclo de 0,8 e amplitude de 8 por 1 minuto. Na sequência, a suspensão foi imediatamente suplementada com 10% de SFB (Nova Biotecnologia, Brasil) e incubada a 35°C por 1 hora sob agitação magnética para permitir a formação da corona proteica na superfície das NPs. A partir desta solução estoque, foram preparadas as diluições correspondentes às concentrações finais de 1, 10 e 100 µg/mL utilizadas nos experimentos.

5.2 PREPARO DAS NPs ZnO EM MEIO BASAL (SEM BIOCORONA)

A solução estoque de NPs ZnO em meio basal foi preparada de forma análoga ao procedimento descrito para os grupos com biocorona, porém sem a adição de SFB e sem a etapa de agitação magnética. Para isso, 0,001 g das NPs ZnO (< 50 nm, > 97%, Sigma-Aldrich, Alemanha) foram dispersos em 900 µL de meio DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12, Sigma-Aldrich, Alemanha) por sonicação em sonicador de ponteira UP200S (Hielscher), utilizando ciclo de 0,8 e amplitude de 8, por 1 minuto. Subsequentemente, a partir desta solução estoque, foram preparadas as diluições nas concentrações finais de 1, 10 e 100 µg/mL.

5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS REVESTIDA COM PROTEÍNA CORONA

5.3.1 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

A estabilidade coloidal das NPs ZnO (com e sem corona proteica) foi avaliada pela determinação de três parâmetros: o tamanho hidrodinâmico, o índice de polidispersão (IPD) e o potencial Zeta. As análises foram conduzidas por espalhamento de luz dinâmico (DLS) para a medição de tamanho e IPD, e por mobilidade eletroforética para o cálculo do potencial Zeta (Zhou et al., 2022). Todas as medições foram realizadas em um equipamento Malvern 3000 ZetaSizer NanoZS (Malvern Instruments, Reino Unido) no Laboratório de Nanotecnologia para Saúde e Produção Animal da Embrapa Gado de Leite.

5.3.2 ESPECTROSCOPIA RAMAN E INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR-ATR)

A caracterização estrutural das NPs ZnO foi realizada utilizando as amostras

na forma de pó, tanto na ausência quanto na presença da biocorona proteica, uma vez que a presença de água e dos componentes do meio de cultura pode interferir nas análises espectroscópicas. Para a análise Raman, as amostras em pó foram depositadas sobre uma lâmina e secas previamente à análise. Os espectros foram obtidos em um espectrômetro Bruker Senterra (Bruker, EUA) com os seguintes parâmetros: laser de 632,8 nm, potência de 10 mV, 15s de exposição, objetiva 50x e resolução espectral de 3-5 cm^{-1}.

Os espectros de infravermelho (FTIR-ATR) foram obtidos em um equipamento Bruker Hyperion 3000 (Bruker, EUA) utilizando 64 escaneamentos para cada amostra. Ambas as análises foram conduzidas no Núcleo de Espectroscopia e Estrutura Molecular (NEEM) do Departamento de Química da UFJF.

5.3.3 ELETROFORESE EM GEL (SDS-PAGE)

A formação da biocorona proteica na superfície das NPs ZnO foi avaliada por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-Page), conforme metodologia descrita por Pourali et al. (2022). Após a incubação com SFB, o complexo NP-biocorona foi isolado por centrifugação a 15.000 rpm durante 15 minutos, sendo o sobrenadante, contendo as proteínas não adsorvidas, descartado.

Para a análise das proteínas adsorvidas, uma alíquota de 40 µL do complexo NP-biocorona foi aplicada em um gel de poliacrilamida 6% Bis-Tris (1,0 mm x 10 poços), juntamente com um marcador padrão de massa molecular (Precision Plus, Bio-Rad). A corrida eletroforética foi conduzida em um sistema Mini-PROTEAN (Bio-Rad) sob corrente constante de 32 mA por 90 minutos. Ao término da eletroforese, os géis foram corados com Coomassie Blue a 1% por 8 h e, posteriomente lavados com água ultrapura (ddH_2O) durante 1 h para a remoção do excesso de corante e visualização do perfil de bandas proteicas.

5.3.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A topografia e a rugosidade superficial das NPs ZnO, na ausência e na presença da biocorona proteica, foram analisadas por Microscopia de Força Atômica (AFM). Para as análises, as amostras na concentração de 100 µg/mL foram depositadas sobre as lâminas para microscopia Corning (Sigma-Aldrich, Alemanha) e s mantidas em dessecador de vidro por 24h para secagem.

As imagens foram obtidas em um microscópio Nanosurf easyScan 2 (Nanosurf Instruments), operando no modo intermitente (*tapping mode*). As aquisições foram realizadas com área de varredura de 5x5 µm, mantendo-se a amplitude de oscilação do cantilever em um setpoint de 50 mV. As análises foram conduzidas no Laboratório de Nanotecnologia para Saúde e Produção Animal da Embrapa Gado de Leite (Juiz de Fora, MG).

5.3.5 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

A morfologia e o tamanho das NPs ZnO na forma de pó, sem a formação da biocorona proteica, foram avaliados por por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Para a preparação das amostras, o pó foi depositado sobre fita de carbono dupla-face fixada em *stubs* de alumínio. As micrografias foram adquiridas em um microscópio Quanta 250 FEI (Thermo Fisher), operando em modo de alto vácuo com uma tensão de aceleração de 20 kV. As análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal de Juiz de Fora.

5.4 AVALIAÇÃO DA CITOCOMPATIBILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE BIOCORONA PROTEICA

5.4.1 CULTIVO CELULAR

As células CHO (ATCC CHO-K1) foram cultivadas em meio de cultura DMEM/F12 suplementado com 10% SFB (Nova Biotecnologia, Brasil) pH 7,25,

antibiótico 1% (v/v; 100 UI/mL de penicilina, 100 µg de estreptomicina mL^{-1}, LG Biotecnologia, Brasil) e 1% aminoácido não essencial (v/v; LGC Biotecnologia, Brasil). As culturas foram mantidas em incubadora umidificada a 37°C com 5% de CO_2 (Thermo Scientific Forma Series 3, EUA).

A manutenção das culturas foi realizada por meio da substituição do meio de cultura a cada 48 h e da subcultura das células quando atingiam aproximadamente 80% de confluência. Para esse procedimento, as células foram inicialmente lavadas com 500 µL de solução salina tamponada com fosfato (PBS; pH 7,2), submetidas ao desprendimento com 300 µL de tripsina (Sigma-Aldrich, Alemanha) e, em seguida, a atividade enzimática foi interrompida pela adição de meio de cultura suplementado com SFB.

5.4.2 MICROSCOPIA DE LUZ

As células CHO foram plaqueadas em placas de 96 poços na densidade de 5 x 10^3 células/poço com o meio de cultura suplementado, conforme descrito anteriormente (5.4.1). O monitoramento da morfologia, da adesão e do crescimento celular foi realizado diariamente durante todo o período de exposição às NPs, por meio de microscopia de luz invertida. As imagens foram obtidas em microscópio Zeiss PrimoVer (Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha).

5.4.3 ENSAIO DE METIL TIAZOL TETRAZÓLIO (MTT)

As células CHO foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 5 × 10^3 células por poço (n=12 para cada tratamento) com 200 µl de meio de cultivo em placa de 96 poços, por 24 h para aderência das células. Após esse tempo, 200 µl de meio de cultivo contendo diferentes concentrações de NP ZnO com e sem a biocorona proteica (1; 10 e 100 µg/mL) foram adicionados em cada poço e incubadas durante 24 h. Paralelamente, foram incluídos poços contendo apenas as suspensões de NPs ZnO nas respectivas concentrações, sem células, para serem utilizados como brancos

e permitir a correção de possíveis interferências ópticas das nanopartículas na leitura espectrofotométrica.

Após o período de exposição de 24h e 48h, o meio de cultura foi substituído por 180 µL de meio DMEM/F12 sem suplementação com SFB, acrescido de 20 µL de solução de MTT (5 mg/mL; Sigma-Aldrich, Alemanha). As placas foram incubadas por 4 h a 37 °C em atmosfera contendo 5% de CO_2 (Thermo Scientific Forma Series 3, EUA), permitindo a formação dos cristais de formazan pelas células metabolicamente ativas.

Em seguida, a solução contendo o MTT foi removida e os cristais de formazan foram solubilizados pela adição de 200 µL de álcool isopropílico acidificado em cada poço, seguida de incubação por 1 h a 37 °C. A absorbância foi determinada a 570 nm utilizando um espectrofotômetro Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific). Os valores obtidos para os poços contendo apenas as NPs foram utilizados como branco e subtraídos das respectivas leituras experimentais, minimizando possíveis interferências decorrentes da absorção ou dispersão da luz pelas NPs ZnO.

5.4.4 ALAMAR BLUE

A viabilidade celular também foi avaliada pelo ensaio fluorimétrico de Alamar Blue (resazurina). Para isso, as células CHO foram semeadas em placas de 96 poços na densidade de 5 × 10^3 células por poço e expostas aos diferentes grupos experimentais por 24 e 48 h. Paralelamente, foram preparados poços contendo apenas as suspensões de NPs ZnO nas respectivas concentrações, sem células, para serem utilizados como brancos e possibilitar a correção de eventuais interferências das NPs nas leituras espectrofotométricas e fluorimétricas.

Ao término de cada período de exposição, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. Em seguida, foram adicionados 200 µL de solução de Alamar Blue a 0,1% (v/v) em cada poço, e as placas foram incubadas por 4 h a 37 °C, em atmosfera contendo 5% de CO_2 (Thermo Scientific Forma Series 3, EUA), protegidas da luz.

Após a incubação, o sobrenadante de cada poço foi transferido para uma placa de 96 poços e a viabilidade celular foi determinada por meio da leitura da absorbância

a 600 nm utilizando um espectrofotômetro Varioskan Flash Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific). Os valores obtidos para os poços contendo apenas as NPs foram utilizados como branco e subtraídos das respectivas leituras experimentais, minimizando possíveis interferências decorrentes da absorção, dispersão da luz ou fluorescência intrínseca das NPs ZnO.

5.5 ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE DAS NANOPARTÍCULAS NA PRESENÇA OU AUSÊNCIA DE BIOCORONA

5.5.1 ENSAIO COMETA

O teste cometa foi realizado em condições alcalinas (pH> 13), de acordo com o protocolo estabelecido por Singh et al. (1998) com modificações. As células foram tripsinizadas para a montagem das lâminas. As células foram centrifugadas a 2000 rpm a 5 minutos e incorporadas com 100 µl de PBS 1X (sem cálcio e magnésio) e 60 µl agarose de baixo ponto de fusão (0,5%) sobre lâminas previamente revestidas com agarose de ponto de fusão normal (1%) e submetidas às etapas de lise resfriada (10% DMSO, 1% Triton X-100, 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA e 10 mM Tris) por 2 horas a 4°C (pH 13). Todas as etapas após a lise foram realizadas no escuro para evitar danos adicionais ao DNA causados por outros fatores. Em seguida as lâminas foram submersas a um tampão alcalino (pH >13) e submetidas a corrida de eletroforese na ausência de luz por 20 minutos a 30 V e 300 mA.

Com fragmentos de DNA danificados migrando em direção ao ânodo para formar caudas de cometa. As lâminas foram neutralizadas com três lavagens de tampão a frio (4ºC) e pH 7,5, seguidas por três lavagens com Tris-base, e secas ao ar em temperatura ambiente. Após as lâminas foram coradas com de SYBR GREEN I (15 mg/L Sigma-Aldrich®). Após coloração com SYBR Green, as imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência (Olympus CKX53 adaptado à fonte de UV Olympus U-RFL-T) e analisadas em software específico (OpenComet), sendo determinados o percentual de DNA na cauda (Tail DNA%) e o Olive Tail Moment. Aproximadamente 100 nucleoides foram analisados por amostra.

5.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos foram realizados em três repetições biológicas independentes (n = 3), e os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn para comparações múltiplas. As análises foram realizadas no software PAST, versão 4.17 (Paleontological Statistics, 2024), e valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS

6.1 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO (DLS)

A análise por DLS demonstrou que a presença de SFB influenciou o comportamento coloidal das NPs ZnO. Na ausência de SFB, observou -se um aumento progressivo do diâmetro hidrodinâmico com o incremento da concentração das NPs, passando de 611 ± 187 nm em 1 µg/mL para 771 ± 204 nm em 10 µg/mL e atingindo 1.247 ± 250 nm em 100 µg/mL, indicando maior tendência à agregação.

Por outro lado, as NPs ZnO previamente incubadas com SFB apresentaram diâmetros hidrodinâmicos menores em todas as concentrações avaliadas. Os valores diminuíram de 251 ± 52 nm em 1 µg/mL para 144 ± 65 nm em 10 µg/mL e 123 ± 3 nm em 100 µg/mL, sugerindo que a formação da biocorona proteica promoveu maior estabilidade coloidal e reduziu a formação de agregados (Tabela 1).

O índice de polidispersão (IPD) corroborou esse comportamento. Nas amostras contendo SFB, houve redução progressiva do IPD com o aumento da concentração das NPs ZnO, variando de 0,5 ± 0,2 em 1 µg/mL para 0,35 ± 0,03 em 10 µg/mL e 0,3 ± 0,02 em 100 µg/mL, indicando uma distribuição de tamanho mais homogênea nas maiores concentrações. Em contraste, as dispersões preparadas apenas em DMEM/F12 apresentaram valores relativamente estáveis de IPD, entre 0,3 ± 0,11 e 0,35 ± 0,11, sem tendência evidente de redução da heterogeneidade.

O potencial Zeta permaneceu negativo em todas as condições experimentais, variando de -10 ± 5,1 mV a -13 ± 0,9 mV para as amostras sem SFB e de -10 ± 5,1 mV a -13 ± 0,9 mV para as amostras com biocorona proteica. Esses resultados indicam que a adsorção das proteínas do SFB não promoveu alterações expressivas na carga superficial das NPs, mantendo valores semelhantes aos observados para as NPs ZnO dispersas apenas em meio basal (Tabela 1).

Tabela 1 - Diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão (IPD) e potencial Zeta das nanopartículas de óxido de zinco (NPs ZnO) dispersas em DMEM/F12 na presença ou ausência de soro fetal bovino (SFB), determinados por espalhamento de luz dinâmico (DLS). Os valores são apresentados como média ± desvio padrão.

Meio de Dispersão	Tratamentos	Diâmetro hidrodinâmico (nm)	Índice de polidispersão (IPD)	Potencial Zeta (mV)
NPs ZnO + DMEM/F12 + SFB	1 µg/mL	251 ± 52,3	0,48 ± 0,08	-12 ± 0,9
	10 µg/mL	144 ± 65,3	0,35 ± 0,03	-12 ± 1,0
	100 µg/mL	123 ± 2,6	0,27 ± 0,02	-11 ± 0,7
NPs ZnO + DMEM/F12	1 µg/mL	611 ± 186,5	0,28 ± 0,11	-10 ± 5,1
	10 µg/mL	771 ± 203,9	0,35 ± 0,11	-13 ± 0,9
	100 µg/mL	1247 ± 250,4	0,34 ± 0,11	-11 ± 2,6

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

6.2 ESPECTROSCOPIA

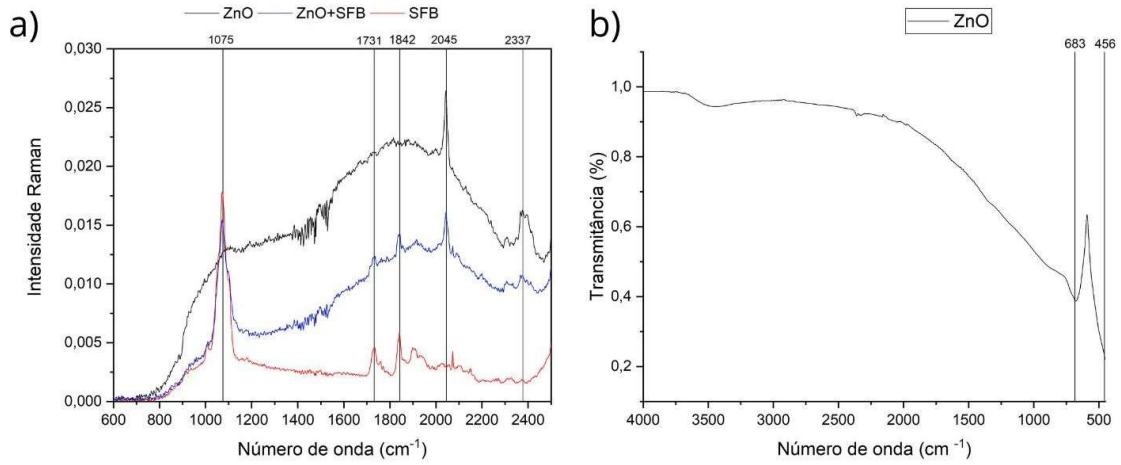
Na figura 1a as bandas de NPs ZnO pura, NPs ZnO incubada com SFB e SFB em pó foram 1075, 1731, 1842, 2045 e 2337 cm^{-1}. No trabalho de Gautam et al (2025) a análise Raman em que a faixa de absorção distinta em 482 cm^{-1} corresponde à vibração de estiramento das ligações Zn–O, confirmando a formação de nanoestruturas de ZnO. Picos de 618 e 877 cm^{-1} sugerem a presença de curvatura C–H e deformações fora do plano causadas por hidrocarbonetos derivados de fungos.

O pico intenso de 1117 cm^{-1} é atribuível ao estiramento C–O, possivelmente causado por polissacarídeos ou ligações glicosídicas. As bandas em 1395 e 1649 cm^{-1} indicam estiramento simétrico dos grupos carboxilato (COO^{-}) e das ligações amida I, respectivamente, refletindo o envolvimento de proteínas e aminoácidos na estabilização de nanopartículas. Uma ampla absorção em torno de 3381 cm^{-1} corresponde a vibrações de estiramento O–H/N–H, apoiando ainda mais o papel de compostos ricos em hidroxila e aminas na cobertura e dispersão de nanopartículas.

A análise por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) das NPs de ZnO em pó, apresentada na Figura 1b, revelou bandas em 683 e 456 cm^{-1}. A banda em 456 cm^{-1} é compatível com vibrações da ligação Zn–O, geralmente observadas na região de 400 a 600 cm^{-1}. O sinal em 683 cm^{-1} encontra-se no intervalo mais amplo atribuído por Costa et al. (2007) às vibrações do ZnO. Em conjunto, esses sinais corroboram a presença de ligações Zn–O na amostra.

Conforme descrito por Jurablu (2015), as bandas vibracionais encontradas em 2364 cm-1 são atribuídas à presença de dióxido de carbono. Similarmente, os espectros Raman (Figura 1a) foram identificadas bandas ZnO-NPs entre 440 e 1148 cm −1. Os resultados do Raman de Slekiene et al (2022) mostrou os picos significativos das proteínas adsorvinas na NP ZnO foram observados no estiramento C–C (proteínas) entre (1,100−1,200 cm−1), amida III (1,200–1,300 cm−1), e amida I (1.600–1.700 cm−1).

Figura 1 - a) Espectroscopia Raman, da nanopartícula de Óxido de Zinco, ZnO incubada com SFB e SFB em pó e b) Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) de NP ZnO em pó.



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

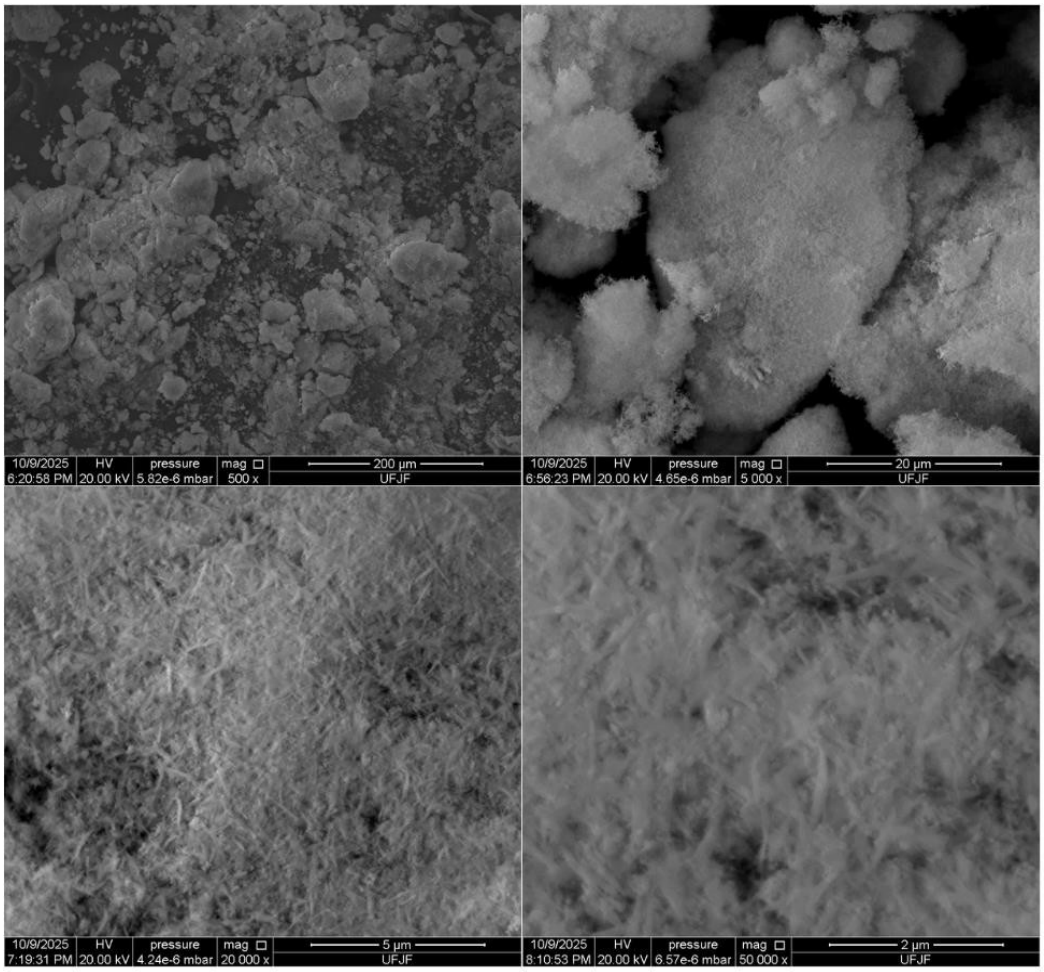
6.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura evidenciaram

que as NPs ZnO apresentaram elevado grau de agregação em todas as ampliações avaliadas (Figura 2). Nas menores ampliações (500× e 1.000×), observaram-se aglomerados micrométricos de formato irregular e aspecto compacto.

Nas ampliações de 20.000× e 50.000×, verificou-se que esses aglomerados são constituídos por estruturas menores, distribuídas de forma heterogênea, conferindo à superfície aspecto irregular e elevada rugosidade. Entretanto, devido ao intenso estado de agregação das amostras, não foi possível individualizar as nanopartículas primárias nem determinar seu tamanho diretamente por MEV.

Figura 2 - Micrografias representativas obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de nanopartículas de óxido de zinco (NPs ZnO) em pó, evidenciando elevado grau de agregação. As micrografias foram registadas em diferentes ampliações (500x, 5.000x, 20.000x e 50.000x).

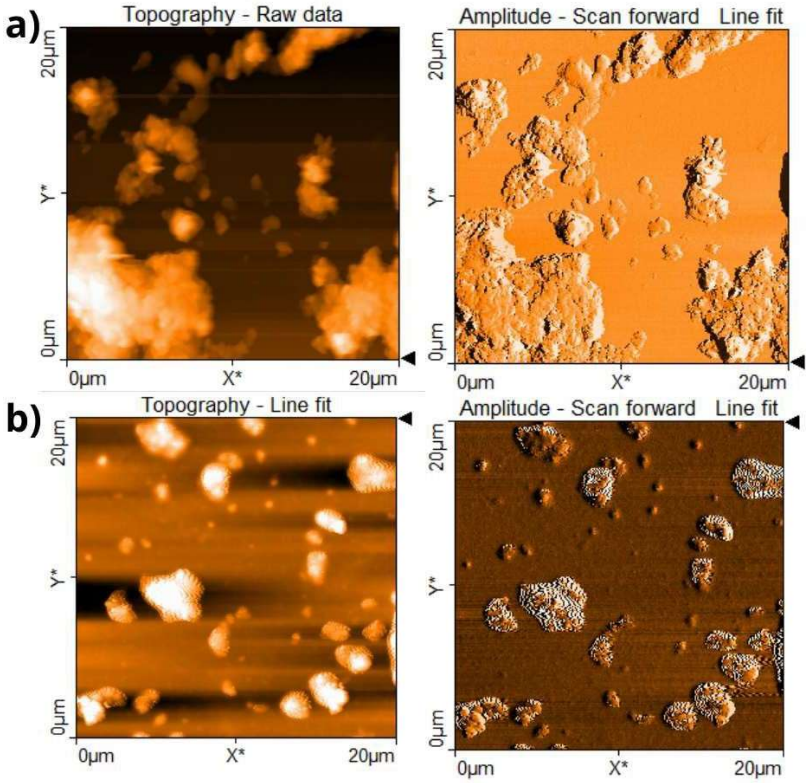


Fonte: Elaborado pela autora (2026).

6.4 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (AFM)

A morfologia superficial e o estado de agregação das NPs ZnO na concentração de 100 µg/mL foram avaliados por microscopia de força atômica (AFM), na ausência e na presença de soro fetal bovino (SFB) (Figura 3). Na ausência de SFB (Figura 3a), as imagens de topografia e amplitude evidenciaram a presença de aglomerados distribuídos de forma heterogênea sobre a superfície analisada.

Figura 3 - Imagens representativas obtidas por microscopia de força atômica (AFM) de nanopartículas de óxido de zinco (NP ZnO, 100 µg/mL) na ausência (a) e na presença (b) NP ZnO de soro fetal bovino (SFB). São apresentadas imagens de topografia (esquerda) e amplitude (direita), obtidas em área de varredura de 20 × 20 µm.



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

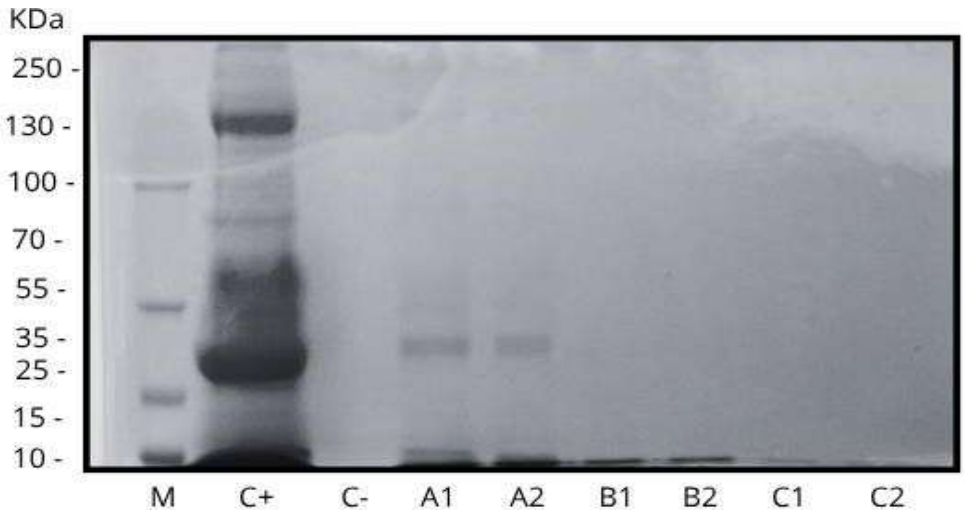
Após a incubação das NPs ZnO com SFB (Figura 3b), observou-se uma distribuição mais homogênea das estruturas na superfície, com predomínio de

aglomerados menos extensos e maior espaçamento entre eles quando comparados ao grupo sem SFB. Esse padrão foi observado tanto nas imagens de topografia quanto nas imagens de amplitude.

6.5 ELETROFORESE EM GEL (SDS-PAGE)

A análise por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) permitiu avaliar o perfil das proteínas associadas às NPs ZnO após incubação com soro fetal bovino (SFB) (Figura 4). O controle positivo (C+), constituído apenas por SFB, apresentou múltiplas bandas distribuídas em diferentes faixas de massa molecular aparente, com maior intensidade nas regiões próximas de 25, 35, 55, 70, 100 e 130 kDa, refletindo o perfil proteico do soro.

Figura 4 - Perfil eletroforético das proteínas associadas às nanopartículas de óxido de zinco (NPs ZnO) após incubação com soro fetal bovino (SFB), obtido por SDS-PAGE. M: marcador de massa molecular. C+: controle positivo (SFB). C−: controle negativo. A1 e A2: NPs ZnO a 100 µg/mL. B1 e B2: NPs ZnO a 10 µg/mL. C1 e C2: NPs ZnO a 1 µg/mL.



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Nas amostras contendo 100 µg/mL de NPs ZnO (A1 e A2), observaram-se

bandas bem definidas predominantemente na faixa entre aproximadamente 30 e 35 kDa, além de uma banda de menor intensidade próxima de 10 kDa. Nas amostras contendo 10 µg/mL de NPs ZnO (B1 e B2), foram observadas apenas bandas de baixa intensidade, enquanto nas amostras contendo 1 µg/mL (C1 e C2) não foram visualizadas bandas detectáveis após o procedimento de lavagem (Figura 4).

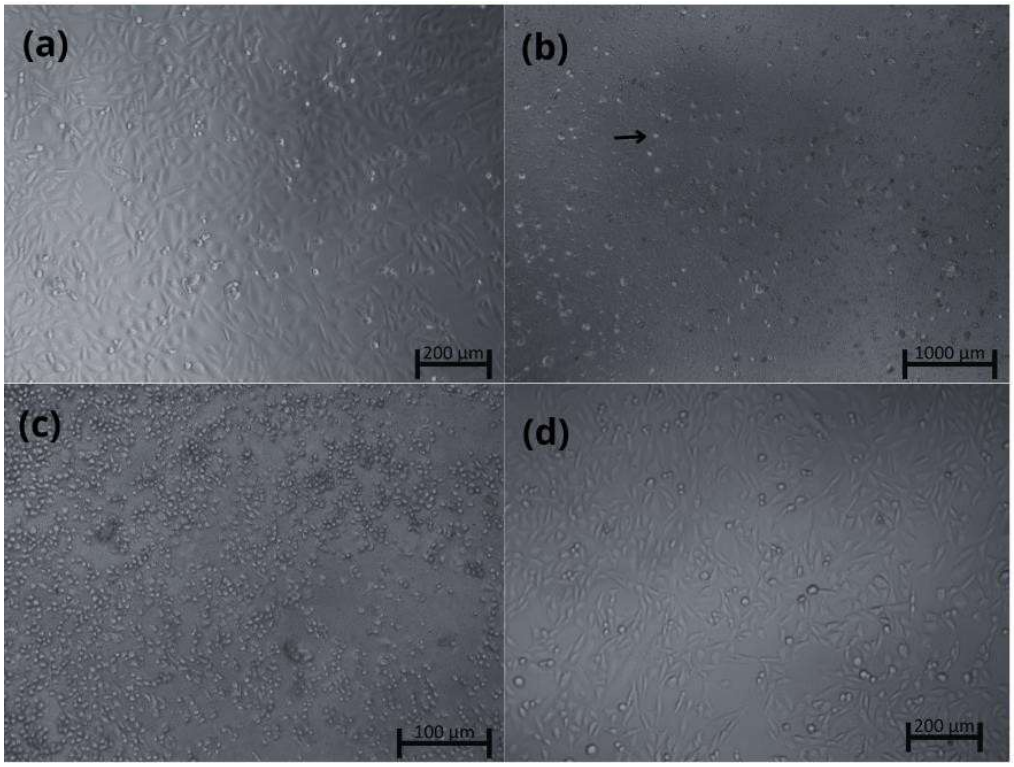
6.6 ANÁLISE DO CRESCIMENTO E DA MORFOLOGIA CELULAR

As alterações morfológicas induzidas pelas NPs ZnO, na presença ou ausência de biocorona proteica, foram avaliadas por microscopia de luz invertida após 24 horas de exposição (Figura 5). No grupo controle (Figura 5a), as células CHO apresentaram morfologia fusiforme, crescimento aderente e organização em monocamada contínua.

Na ausência de SFB, foram observadas alterações morfológicas dependentes da concentração das NPs ZnO. Na concentração de 100 µg/mL (Figura 6b), verificou -se redução da densidade celular, presença de células arredondadas e áreas com perda da monocamada aderente.

Na concentração de 10 µg/mL (Figura 5c), também foram observadas células arredondadas e desorganização parcial da monocamada, embora essas alterações fossem menos evidentes do que aquelas observadas em 100 µg/mL. Em contraste, as células expostas a 1 µg/mL (Figura 5d) apresentaram morfologia semelhante à do grupo controle, mantendo o formato fusiforme e o crescimento aderente.

Figura 5 - Análise morfológica de células CHO por microscopia de luz invertida após 24 horas de exposição às NPs ZnO. (a) Controle; (b) 100 µg/mL de NPs ZnO; (c) 10 µg/mL de NPs ZnO; (d) 1 µg/mL de NPs ZnO.

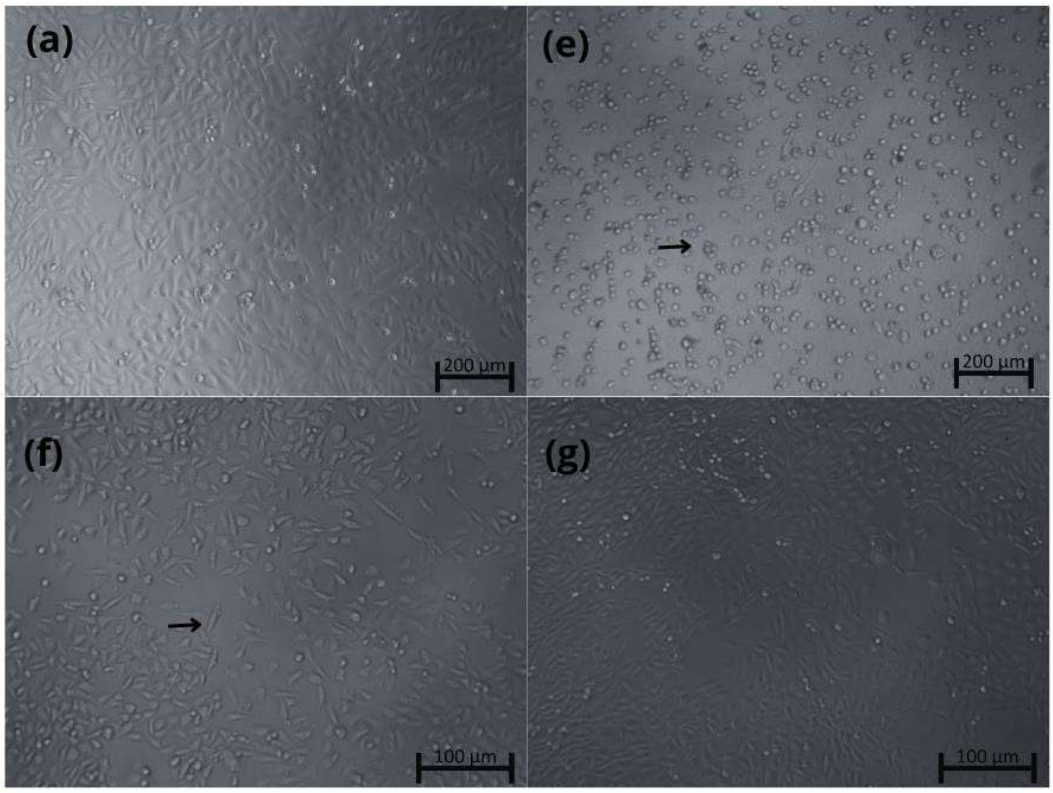


Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Nos grupos tratados com NPs ZnO previamente incubadas com SFB, as alterações morfológicas também variaram de acordo com a concentração. Na concentração de 100 µg/mL (Figura 6e), observaram-se células arredondadas, redução da densidade celular e perda parcial da monocamada aderente. Nas concentrações de 10 µg/mL (Figura 6f) e 1 µg/mL (Figura 6g), as células apresentaram morfologia predominantemente fusiforme, crescimento aderente e organização em monocamada, semelhantes às observadas no grupo controle.

Figura 6 - Análise morfológica de células CHO por microscopia de luz invertida após 24 h de exposição às NPs ZnO. (a) Controle; (e) 100 µg/mL de NPs ZnO incubadas com SFB; (f) 10 µg/mL de NPs ZnO incubadas com SFB; (g) 1 µg/mL de NPs ZnO incubadas com SFB. As setas indicam células arredondadas e desprendidas da monocamada. Barras de escala de 100 e 200 µm.

.



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

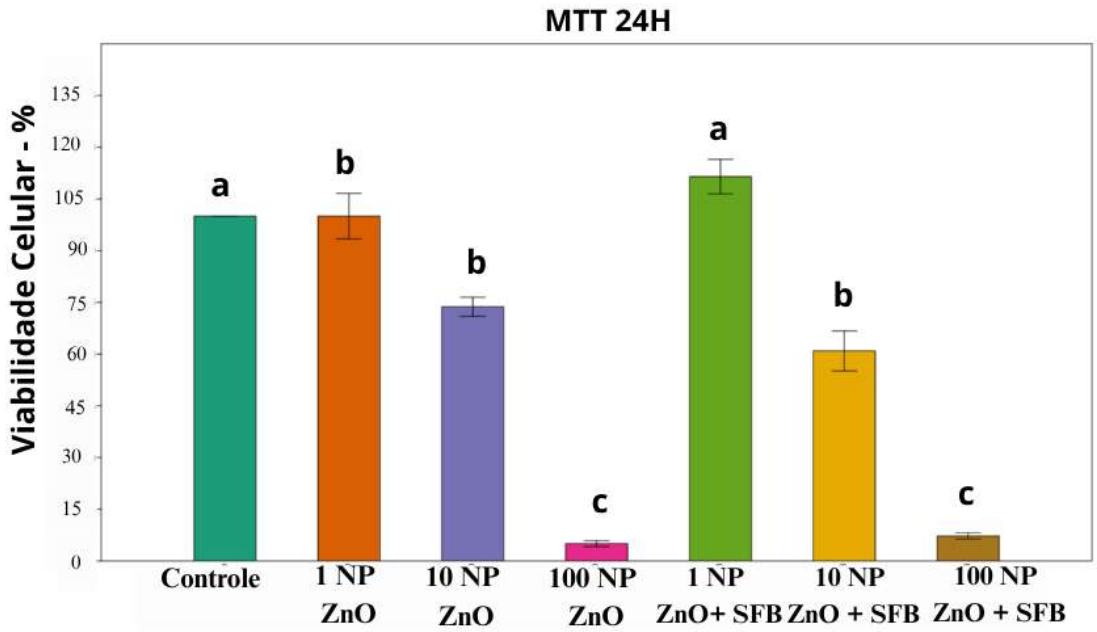
6.7 ENSAIO DE MTT

A atividade metabólica das células CHO, utilizada como indicador indireto de viabilidade celular, foi avaliada após 24 h de exposição às diferentes concentrações de NPs de ZnO, com ou sem incubação prévia das NPs com SFB, por meio do ensaio de MTT (Figura 7). O grupo controle foi utilizado como referência e normalizado para 100% de viabilidade celular.

Na ausência de incubação prévia com SFB, os grupos expostos a 1, 10 e 100 µg/mL foram diferentes do controle ($p < 0,05$). Na presença de incubação prévia com SFB, o grupo exposto a 1 µg/mL não diferiu do controle ($p > 0,05$) e apresentou maior atividade metabólica que o respectivo grupo sem SFB ($p < 0,05$).

Os grupos expostos a 10 e 100 µg/mL apresentaram menor atividade metabólica que o controle ($p < 0,05$). Nessas duas concentrações, não foram observadas diferenças entre as NPs com e sem incubação prévia com SFB ($p > 0,05$).

Figura 7 - Análise da viabilidade de células CHO, estimada pelo ensaio de MTT, após 24 h de exposição às nanopartículas de óxido de zinco (NPs de ZnO). As células foram expostas a 1, 10 ou 100 µg/mL de NPs de ZnO, com ou sem incubação prévia das NPs com soro fetal bovino (SFB). As células não expostas às NPs constituíram o grupo controle. A atividade metabólica, utilizada como indicador indireto de viabilidade, foi expressa como porcentagem em relação ao controle, definido como 100%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos biológicos independentes (n = 3). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn ($p < 0,05$).

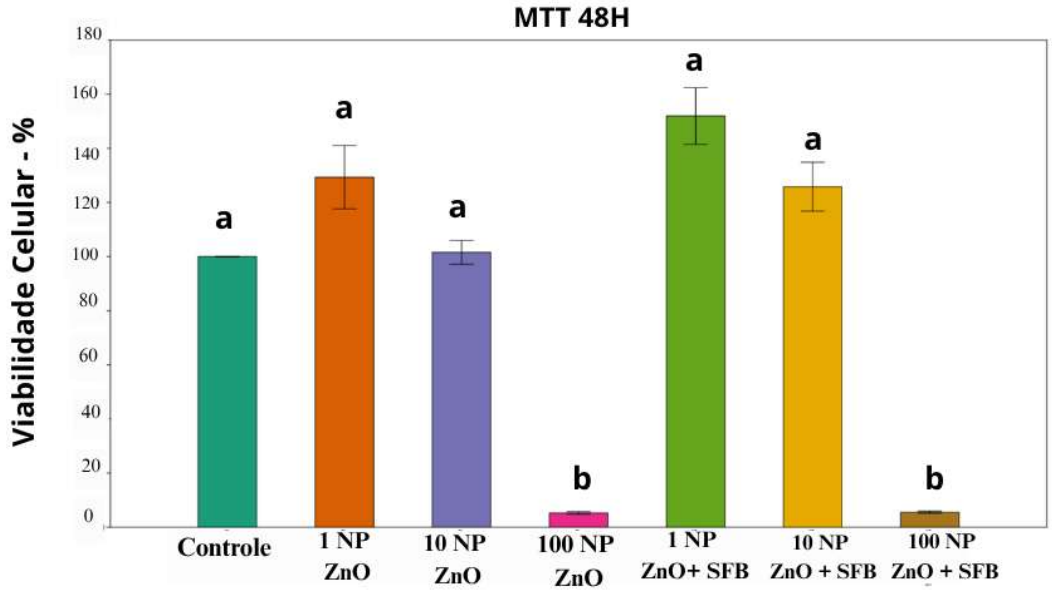


Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Após 48 h de exposição, a atividade metabólica foi novamente determinada pelo ensaio de MTT (Figura 8). Na ausência de incubação prévia com SFB, os grupos expostos a 1 e 10 µg/mL não diferiram do controle ($p > 0,05$), enquanto o grupo exposto a 100 µg/mL apresentou menor atividade metabólica ($p < 0,05$).

Na presença de incubação prévia com SFB, os grupos expostos a 1 e 10 µg/mL também não diferiram do controle ($p > 0,05$). O grupo exposto a 100 µg/mL apresentou menor atividade metabólica que o controle ($p < 0,05$).

Figura 8 - Análise da viabilidade de células CHO, estimada pelo ensaio de MTT, após 48 h de exposição às nanopartículas de óxido de zinco (NPs de ZnO). As células foram expostas a 1, 10 ou 100 µg/mL de NPs de ZnO, com ou sem incubação prévia das NPs com soro fetal bovino (SFB). As células não expostas às NPs constituíram o grupo controle. A atividade metabólica, utilizada como indicador indireto de viabilidade, foi expressa como porcentagem em relação ao controle, definido como 100%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos biológicos independentes (n = 3). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

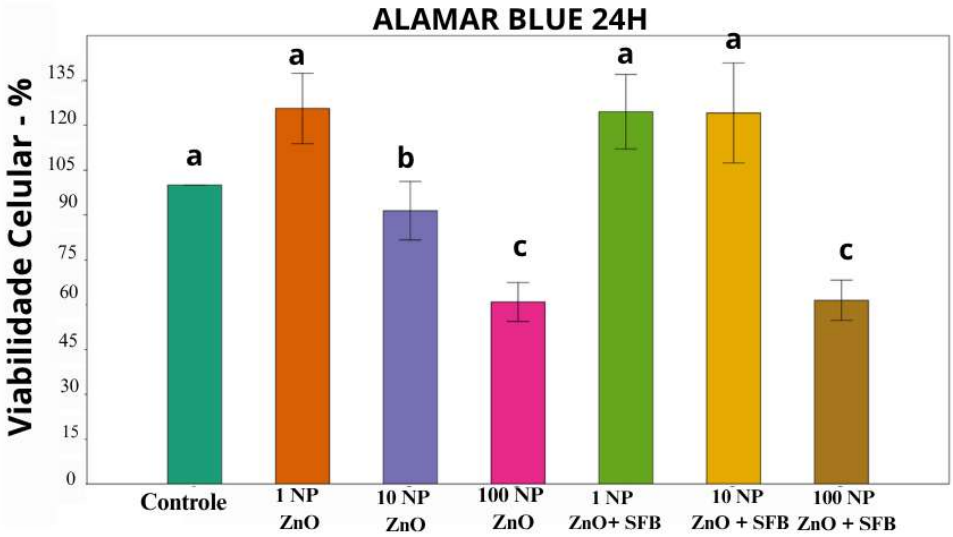
6.8 ENSAIO DE ALAMAR BLUE

A atividade metabólica das células CHO, utilizada como indicador indireto de viabilidade celular, foi avaliada após 24 h de exposição às diferentes concentrações de NPs de ZnO, com ou sem incubação prévia das NPs com SFB, por meio do ensaio de Alamar Blue (Figura 9). O grupo controle foi utilizado como referência e normalizado para 100% de atividade metabólica.

Na ausência de incubação prévia com SFB, o grupo exposto a 1 µg/mL não diferiu do controle ($p > 0,05$). Os grupos expostos a 10 e 100 µg/mL apresentaram menor atividade metabólica que o controle ($p < 0,05$).

Na presença de incubação prévia com SFB, os grupos expostos a 1 e 10 µg/mL não diferiram do controle ($p > 0,05$). O grupo exposto a 100 µg/mL apresentou menor atividade metabólica que o controle ($p < 0,05$). Em 10 µg/mL, as NPs incubadas com SFB apresentaram maior atividade metabólica que as NPs sem SFB ($p < 0,05$).

Figura 9 - Análise da viabilidade de células CHO, estimada pelo ensaio de Alamar Blue, após 24 h de exposição às nanopartículas de óxido de zinco (NPs de ZnO). As células foram expostas a 1, 10 ou 100 µg/mL de NPs de ZnO, com ou sem incubação prévia das NPs com soro fetal bovino (SFB). As células não expostas às NPs constituíram o grupo controle. A atividade metabólica, utilizada como indicador indireto de viabilidade, foi expressa como porcentagem em relação ao controle, definido como 100%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos biológicos independentes (n = 3). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn ($p < 0,05$).

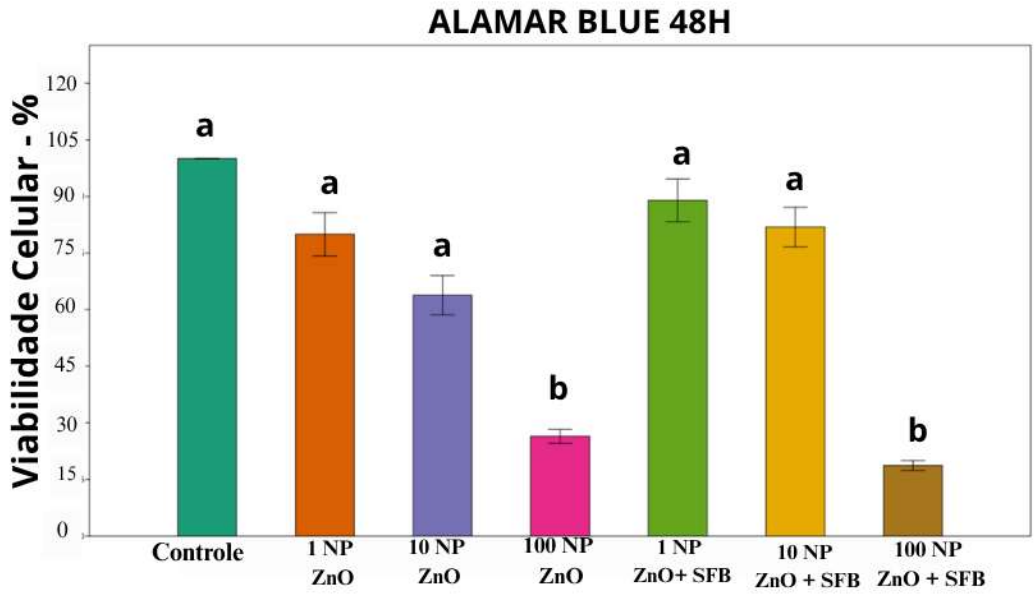


Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Após 48 h de exposição, a atividade metabólica também foi determinada pelo ensaio de Alamar Blue (Figura 10). Na ausência de incubação prévia com SFB, os grupos expostos a 1 e 10 µg/mL não diferiram do controle ($p > 0,05$), enquanto o grupo exposto a 100 µg/mL apresentou menor atividade metabólica ($p < 0,05$).

Na presença de incubação prévia com SFB, os grupos expostos a 1 e 10 µg/mL também não diferiram do controle ($p > 0,05$). O grupo exposto a 100 µg/mL apresentou menor atividade metabólica que o controle ($p < 0,05$).

Figura 10 - Análise da viabilidade de células CHO, estimada pelo ensaio de Alamar Blue, após 48 h de exposição às nanopartículas de óxido de zinco (NPs de ZnO). As células foram expostas a 1, 10 ou 100 µg/mL de NPs de ZnO, com ou sem incubação prévia das NPs com soro fetal bovino (SFB). As células não expostas às NPs constituíram o grupo controle. A atividade metabólica, utilizada como indicador indireto de viabilidade, foi expressa como porcentagem em relação ao controle, definido como 100%. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos biológicos independentes (n = 3). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn ($p < 0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

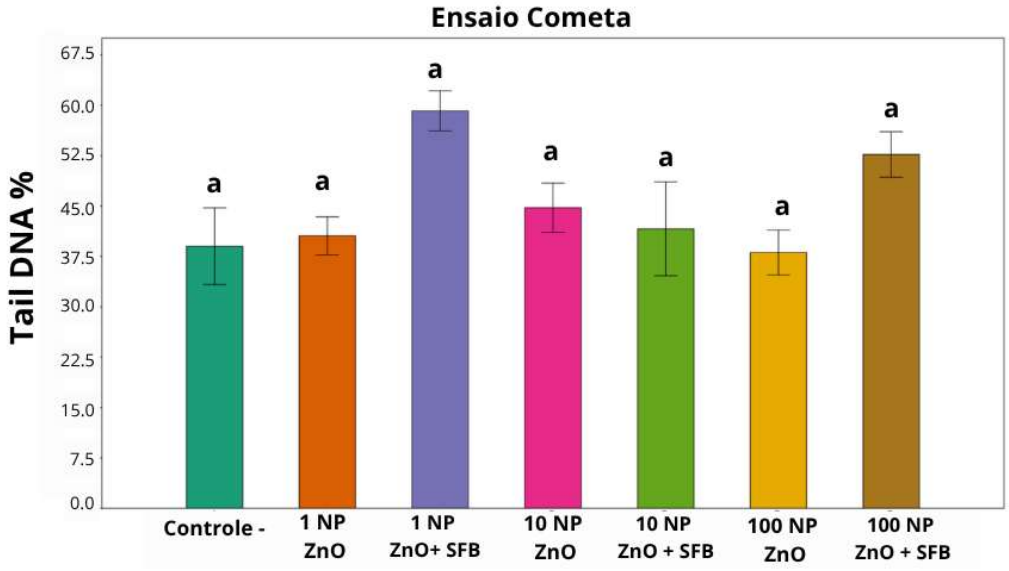
6.9 ENSAIO COMETA

O dano ao DNA das células CHO foi avaliado pelo ensaio cometa após 24 h de exposição às NPs de ZnO, utilizando o percentual de DNA na cauda, Tail DNA (%), e o Olive Tail Moment como parâmetros (Figuras 11 e 12). O controle negativo

correspondeu às células não expostas às NPs.

Para o parâmetro Tail DNA (%) (Figura 11), não foram observadas diferenças entre o controle negativo e os grupos expostos a 1, 10 ou 100 µg/mL de NPs de ZnO, com ou sem incubação prévia com SFB ($p > 0,05$).

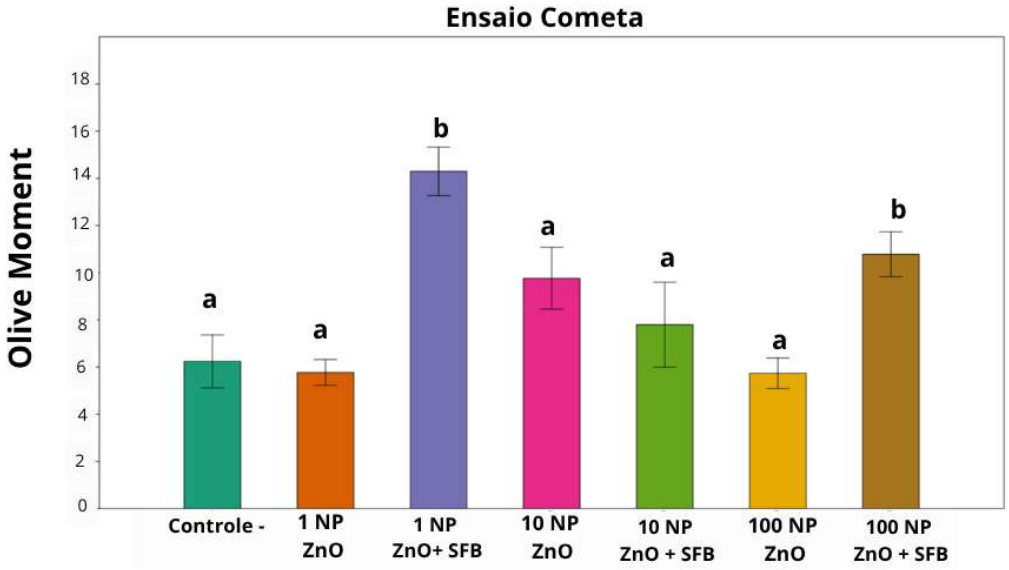
Figura 11 - Avaliação do dano ao DNA em células CHO pelo ensaio cometa, utilizando o percentual de DNA na cauda (Tail DNA, %) como parâmetro. As células foram expostas durante 24 h a 1, 10 ou 100 µg/mL de NPs de ZnO, com ou sem incubação prévia das NPs com SFB. As células não expostas às NPs constituíram o controle negativo. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos biológicos independentes (n = 3). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos pelo teste de Kruskal-Wallis ($p>0,05$).



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A análise do Olive Tail Moment (Figura 12) mostrou que os grupos expostos a 1 e 100 µg/mL de NPs previamente incubadas com SFB apresentaram valores superiores aos observados no controle negativo e nos respectivos grupos sem SFB ($p < 0,05$). Os grupos expostos a 1, 10 e 100 µg/mL de NPs sem SFB e a 10 µg/mL de NPs incubadas com SFB não diferiram do controle negativo ($p > 0,05$).

Figura 12 - Avaliação do dano ao DNA em células CHO pelo ensaio cometa, utilizando o Olive Tail Moment como parâmetro. As células foram expostas durante 24 h a 1, 10 ou 100 µg/mL de nanopartículas de óxido de zinco (NPs de ZnO), com ou sem incubação prévia das NPs com soro fetal bovino (SFB). As células não expostas às NPs constituíram o controle negativo. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão de três experimentos biológicos independentes (n = 3). Letras minúsculas diferentes indicam diferenças estatisticamente significativas entre os grupos, conforme o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Dunn ($p < 0,05$).



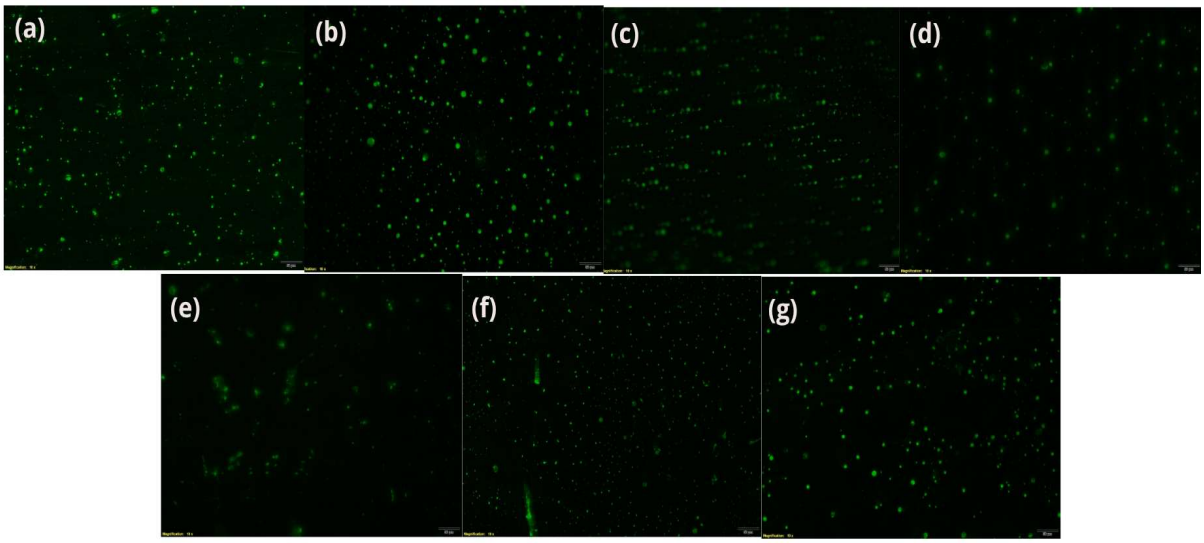
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

As fotomicrografias apresentadas na Figura 13 constituem registros qualitativos dos nucleoides avaliados pelo ensaio cometa e complementam os resultados quantitativos de Tail DNA (%) e Olive Tail Moment. Os painéis correspondem a (a) controle negativo, (b) NPs de ZnO a 1 µg/mL, (c) NPs de ZnO incubadas com SFB a 1 µg/mL, (d) NPs de ZnO a 10 µg/mL, (e) NPs de ZnO incubadas com SFB a 10 µg/mL, (f) NPs de ZnO a 100 µg/mL e (g) NPs de ZnO incubadas com SFB a 100 µg/mL.

As imagens ilustram as condições experimentais, mas a interpretação do dano ao DNA baseia-se nos parâmetros quantitativos apresentados nas Figuras 11 e

12.

Figura 13 - Fotomicrografias representativas de nucleoides de células CHO avaliadas pelo ensaio cometa após 24 h de exposição às nanopartículas de óxido de zinco (NPs de ZnO). As células foram expostas às NPs com ou sem incubação prévia com soro fetal bovino (SFB). (a) controle negativo, constituído por células não expostas às NPs; (b) NPs de ZnO, 1 µg/mL; (c) NPs de ZnO incubadas com SFB, 1 µg/mL; (d) NPs de ZnO, 10 µg/mL; (e) NPs de ZnO incubadas com SFB, 10 µg/mL; (f) NPs de ZnO, 100 µg/mL; e (g) NPs de ZnO incubadas com SFB, 100 µg/mL. O DNA foi corado com SYBR Green e visualizado por microscopia de fluorescência.



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

7 DISCUSSÃO

A interação entre NPs e sistemas biológicos inicia-se após o contato com fluidos biológicos e envolve a adsorção de proteínas à superfície das partículas, formando a biocorona proteica. Essa camada modifica a interface entre o nanomaterial e o meio biológico e pode alterar o comportamento coloidal, o reconhecimento celular e a resposta biológica. Neste estudo, a incubação prévia das NPs de ZnO com SFB modificou parâmetros físico-químicos das dispersões e esteve associada a alterações específicas nas respostas celulares.

A caracterização por DLS mostrou que, na ausência de SFB, as NPs de ZnO apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de aproximadamente 1.247 nm na concentração de 100 µg/mL. Esse valor indica a presença de estruturas particuladas maiores que o tamanho primário esperado para as NPs, compatíveis com aglomeração ou agregação em suspensão. Após a incubação com SFB, o diâmetro hidrodinâmico médio foi reduzido para aproximadamente 123 nm. Essa redução é compatível com menor associação entre as partículas na condição avaliada.

Deng et al. (2009) observaram a formação de agregados de NPs de TiO_2, SiO_2 e ZnO em diferentes meios de dispersão, com diâmetros hidrodinâmicos entre 300 e 450 nm. Nesse estudo, o aumento do tempo de sonicação e a diluição em PBS não foram suficientes para reduzir a associação entre as partículas. A presença de PBS aumentou o tamanho hidrodinâmico, efeito atribuído à maior força iônica e à compressão da dupla camada elétrica, com redução da repulsão eletrostática (Deng et al., 2009). Esses resultados demonstram que o comportamento coloidal depende das propriedades do nanomaterial e da composição do meio.

As análises morfológicas complementaram a caracterização das NPs. As imagens de MEV mostraram aglomerados micrométricos constituídos por partículas menores. As imagens de AFM indicaram estruturas menores e mais dispersas após a incubação com SFB. Vranic et al. (2017) relataram redução da agregação e da toxicidade de NPs de TiO_2 em meio suplementado com soro. Os autores associaram esses efeitos à adsorção de proteínas e à modificação da interface entre as partículas e o meio biológico. Embora esse estudo forneça suporte para a influência da biocorona sobre o comportamento coloidal, a extrapolação para NPs de ZnO deve considerar diferenças de composição, dissolução e reatividade superficial entre

os nanomateriais.

O potencial Zeta fornece informações sobre a contribuição eletrostática para a estabilidade de sistemas particulados. Sapsford et al. (2011) descrevem que valores absolutos inferiores a aproximadamente 30 mV estão associados a menor repulsão eletrostática. Neste estudo, os valores entre aproximadamente −10 e −13 mV indicam baixa estabilização eletrostática. A redução do diâmetro hidrodinâmico após a incubação com SFB, sem alteração acentuada do potencial Zeta, é compatível com uma contribuição estérica das proteínas adsorvidas.

A caracterização espectroscópica confirmou a identidade química das NPs ZnO utilizadas neste estudo. No espectro de FTIR, a banda intensa observada entre 683 e 456 cm^{-1} foi atribuída às vibrações características da ligação Zn–O. Esse resultado está de acordo com Akhtar et al. (2024), que descreveram bandas características de Zn–O entre 620 e 680 cm^{-1}. Da mesma forma, Janaki et al. (2015) relataram que bandas situadas entre aproximadamente 549 e 621 cm^{-1} correspondem aos modos vibracionais de estiramento e deformação da ligação Zn–O, enquanto os sinais observados entre 865 e 3836 cm^{-1} estão associados a grupos funcionais como C–H, C–OH, CH_2–OCH_3, CH_2–CH_3 e hidroxilas presentes na superfície das nanopartículas. Vale ressaltar que os valores exatos dessas atribuições dependem, além da composição, do método de síntese.

A SDS-PAGE mostrou proteínas associadas às NPs incubadas com SFB, com bandas mais evidentes entre aproximadamente 25 e 35 kDa. A menor intensidade observada na região correspondente à albumina, com massa molecular próxima de 66 kDa, sugere que as proteínas mais abundantes no SFB não foram necessariamente as mais representadas na fração recuperada. Entretanto, a SDS-PAGE isoladamente não identifica proteínas nem permite afirmar que a biocorona apresentou composição seletiva ou dependente da concentração. Essas conclusões exigiriam densitometria, quantificação da proteína adsorvida e identificação por espectrometria de massas.

A substituição temporal de proteínas adsorvidas com menor afinidade por proteínas com maior afinidade é compatível com o efeito Vroman (Cedervall et al., 2007; Franqui et al., 2019). Esse mecanismo pode contribuir para a formação de uma interface proteica dinâmica. Deng et al. (2009) relataram elevada afinidade de proteínas como transferrina e α2-macroglobulina pela superfície de NPs de ZnO. Esse resultado demonstra que diferentes óxidos metálicos podem apresentar perfis

distintos de adsorção proteica. No presente estudo, entretanto, as bandas entre 25 e 35 kDa não permitem identificar essas ou outras proteínas específicas. Também não permitem estabelecer quais receptores celulares ou vias de internalização foram envolvidos. Alterações conformacionais das proteínas também podem ocorrer após a adsorção. Cagliani et al. (2019) observaram que determinadas condições de interação entre partículas e proteínas favoreceram adsorção em múltiplas camadas e redução do conteúdo de estruturas α-helicoidais. Embora essas alterações não tenham sido avaliadas neste estudo, os dados indicam que proteínas do SFB permaneceram associadas às NPs após o procedimento de isolamento da biocorona.

No presente estudo, os resultados de DLS, potencial Zeta, MEV, AFM, FTIR, Raman e SDS-PAGE indicam que a incubação com SFB modificou o estado de dispersão e a composição superficial aparente das NPs de ZnO. A SDS-PAGE confirmou a recuperação de proteínas associadas às partículas. Entretanto, a estabilidade temporal, a identidade das proteínas e suas alterações conformacionais não foram determinadas.

Os ensaios de MTT e Alamar Blue mostraram redução da atividade metabólica em função da concentração. A concentração de 100 µg/mL reduziu a atividade metabólica após 24 e 48 h nos dois ensaios, independentemente da incubação prévia com SFB. Na concentração de 10 µg/mL, os resultados variaram conforme o ensaio e o tempo. Após 24 h, a incubação com SFB esteve associada à maior atividade metabólica em 1 µg/mL no MTT e em 10 µg/mL no Alamar Blue. Essas diferenças não permaneceram após 48 h. Portanto, os dados não demonstram um efeito protetor geral da biocorona. Eles indicam modulação da resposta em condições específicas.

Fernández-Bertólez et al. (2024) observaram redução da viabilidade celular após exposição a NPs de ZnO, principalmente entre 10 e 25 µg/mL após 24 h. Os autores também relataram diminuição progressiva da viabilidade após 48 h com o aumento da concentração. Esses resultados fornecem suporte para a dependência da resposta em relação à concentração e ao tempo. Entretanto, diferenças entre linhagens celulares, composição do meio, características das NPs e dose celular efetiva limitam comparações quantitativas diretas.

Os resultados de MTT e Alamar Blue apresentaram concordância parcial. Ambos os ensaios detectaram redução acentuada da atividade metabólica em 100

µg/mL nos dois períodos. Entretanto, houve diferenças na resposta à concentração de 10 µg/mL após 24 h. O MTT depende da redução do sal de tetrazólio por sistemas celulares de oxidorredução e não deve ser atribuído exclusivamente às mitocôndrias. O Alamar Blue avalia a redução da resazurina a resorufina como indicador da capacidade redox celular (Rampersad, 2012; Lavogina et al., 2022). A concordância em 100 µg/mL sustenta a ocorrência de comprometimento metabólico. As diferenças nas demais condições mostram que os ensaios não são equivalentes e podem responder de maneira distinta à exposição.

A análise por microscopia de luz mostrou redução da confluência, arredondamento celular e perda da monocamada, principalmente em 100 µg/mL. Nas concentrações de 1 e 10 µg/mL, as células expostas às NPs incubadas com SFB apresentaram maior preservação morfológica. Esses achados são compatíveis com os resultados metabólicos, mas não demonstram isoladamente manutenção da viabilidade. Yadav et al. (2021) relataram alterações na organização do citoesqueleto e na morfologia de células CHO-K1 expostas a NPs de ZnO, fornecendo suporte para a associação entre exposição e alterações morfológicas.

A adsorção de proteínas pode modificar o contato das NPs com a membrana celular, sua sedimentação, sua internalização e sua dissolução. Entretanto, esses processos não foram mensurados no presente estudo. Caron et al. (2024) discutiram a contribuição da dissolução e dos íons Zn^{2+} para a toxicidade das NPs de ZnO. Vranic et al. (2017) observaram redução da toxicidade de nanopartículas de TiO_2 na presença de soro. Esses estudos prévios fornecem hipóteses mecanísticas, mas não demonstram que os mesmos mecanismos ocorreram nas condições avaliadas no presente estudo.

Yin et al. (2015) avaliaram células HepG2 expostas durante 24 h a NPs de ZnO entre 0 e 100 mg/L pelo ensaio CCK-8. As partículas sem revestimento reduziram a viabilidade de aproximadamente 90% para cerca de 20% entre 20 e 50 mg/L, com valores próximos de 15% em 100 mg/L. As partículas previamente revestidas mantiveram valores entre aproximadamente 85% e 95%. Esse estudo demonstra que um revestimento prévio pode modificar a citotoxicidade das NPs de ZnO. No entanto, diferenças na linhagem celular, no revestimento, no meio de exposição e no método de avaliação pode alterar as respostas biológicas.

A influência da biocorona sobre a toxicidade depende de sua composição e das características do sistema experimental. Shannahan et al. (2013) demonstraram

que proteínas adsorvidas podem modificar a internalização celular, a distribuição e os efeitos biológicos das nanopartículas. Além disso, a biocorona formada em sistemas *in vitro* pode diferir daquela formada *in vivo*.

A composição da biocorona também pode variar ao longo do tempo e durante a transferência entre microambientes. Su et al. (2025) descreveram sua remodelação durante o trânsito das NPs entre diferentes ambientes biológicos. Essa dinâmica limita a representação do processo por uma única condição de incubação e deve ser considerada na interpretação de modelos *in vitro.*

No presente estudo, os resultados de viabilidade indicam que a incubação prévia com SFB modificou a resposta metabólica das células CHO em condições específicas. Essa modulação foi observada em 1 µg/mL no MTT de 24 h e em 10 µg/mL no Alamar Blue de 24 h. A incubação com SFB não evitou a redução da atividade metabólica em 100 µg/mL. Portanto, os dados sustentam um efeito dependente da concentração, do tempo e do ensaio, mas não um efeito protetor uniforme da biocorona.

O percentual de DNA na cauda, Tail DNA (%), representa a fração de DNA que migrou em relação ao DNA total do nucleoide. O Olive Tail Moment combina a fração de DNA na cauda com a distância de migração. No presente estudo, o Tail DNA (%) não diferiu entre os grupos. Entretanto, o Olive Tail Moment aumentou nas células expostas a 1 e 100 µg/mL de NPs previamente incubadas com SFB, tanto em relação ao controle quanto às respectivas concentrações sem SFB.

Esses resultados revelam uma resposta dependente do parâmetro analisado. O aumento do Olive Tail Moment constitui evidência de maior migração do DNA nessas duas condições, embora não tenha sido acompanhado por alteração significativa no Tail DNA (%). Deste modo, apesar de ter sido detectado um sinal de dano ao DNA pelo Olive Tail Moment, não foi observada concordância com o percentual de DNA na cauda.

Guo et al. (2016) observaram danos ao DNA em células CHO-K1 expostas a NPs de prata e relacionaram os efeitos à composição, ao tamanho e ao revestimento das partículas. Como o estudo avaliou prata, sua contribuição para a discussão de NPs de ZnO é indireta. Boyadzhiev et al. (2022) demonstraram a contribuição da fração iônica liberada por NPs de ZnO para a indução de danos ao DNA. No presente estudo, entretanto, a dissolução e a concentração de Zn^{2+} não foram determinadas.

A atividade da superóxido dismutase pode contribuir para a avaliação da resposta antioxidante, mas não demonstra isoladamente a ocorrência de estresse oxidativo. A avaliação pode ser complementada por medidas de espécies reativas de oxigênio, glutationa e produtos de oxidação. O ensaio de micronúcleo permitiria investigar efeitos clastogênicos e aneugênicos. Esses ensaios poderiam esclarecer se o aumento do Olive Tail Moment está associado a alterações no equilíbrio redox e se o dano detectado progride para alterações cromossômicas.

O estado de dispersão também pode influenciar a dose efetivamente entregue às células. A formação de estruturas maiores pode reduzir a área superficial específica acessível, mas também pode aumentar a sedimentação e a deposição sobre a monocamada. Portanto, a agregação não reduz necessariamente a interação celular. Neste contexto, a biocorona pode modificar o diâmetro hidrodinâmico, a composição superficial e o reconhecimento celular. Ritz et al. (2015) demonstraram que proteínas específicas da biocorona podem aumentar ou reduzir a captação celular, dependendo da composição da camada adsorvida. Esse estudo sustenta a modulação da internalização, mas não permite inferir quais proteínas ou vias atuaram nas células CHO deste trabalho (Ritz et al., 2015). Yang et al. (2019) demonstraram que alterações conformacionais da biocorona proteica modificaram a penetração de membrana e a citotoxicidade de NPs ultrapequenas de ouro. Como esse estudo avaliou ouro, sua aplicação às NPs de ZnO é mecanisticamente indireta (Yang et al., 2019).

De modo geral, os resultados do presente estudo indicam que a incubação das NPs de ZnO com SFB modificou o estado de dispersão e esteve associada a alterações da atividade metabólica em condições específicas. No ensaio cometa, a incubação com SFB não modificou o Tail DNA (%), mas esteve associada ao aumento do Olive Tail Moment em 1 e 100 µg/mL. Assim, a biocorona proteica não apresentou efeito exclusivamente protetor. Seus efeitos variaram conforme a concentração e o desfecho avaliado.

8 CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que a incubação das NPs de ZnO com SFB modificou seu estado de dispersão, com redução do diâmetro hidrodinâmico, e promoveu a associação de proteínas à superfície das NPs. A redução do tamanho hidrodinâmico foi compatível com menor aglomeração na condição analisada.

A incubação prévia com SFB modificou a resposta metabólica das células CHO-K1 de forma dependente da concentração, do tempo de exposição e do ensaio utilizado. Após 24 h, esse efeito foi observado em 1 µg/mL pelo ensaio de MTT e em 10 µg/mL pelo Alamar Blue. A presença de SFB não evitou a redução da atividade metabólica causada pela concentração de 100 µg/mL e não produziu diferenças significativas após 48 h.

No ensaio cometa, nenhuma das condições avaliadas alterou o Tail DNA (%). Entretanto, o Olive Tail Moment aumentou após a exposição a 1 e 100 µg/mL de NPs previamente incubadas com SFB, tanto em relação ao controle negativo quanto às respectivas concentrações sem SFB.

Em conjunto, os resultados demonstram que a associação de proteínas às NPs de ZnO modifica seu estado de dispersão e sua interação com as células CHO-K1. Esses efeitos dependem da concentração, do tempo de exposição e do parâmetro biológico avaliado. Os dados reforçam a necessidade de considerar a formação da biocorona na caracterização e na avaliação nanotoxicogenética *in vitro* das NPs de ZnO.

.

REFERÊNCIAS

AKHTAR, H. *et al.* Synthesis of cerium, zirconium, and copper doped zinc oxide nanoparticles as potential biomaterials for tissue engineering applications. **Heliyon**, v. 10, n. 7, p. e29150, 2024.

AWASHRA, M.; MŁYNARZ, P. The toxicity of nanoparticles and their interaction with cells: an in vitro metabolomic perspective. **Nanoscale Advances**, v. 5, n. 10, p. 2674-2723, 2023.

BAI, X. *et al.* In vivo protein corona formation: characterizations, effects on engineered nanoparticles' biobehaviors, and applications. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 646708, 2021.

BANUMATHI, B. *et al.* Toxicidade de extratos herbais usados na medicina etnoveterinária e nanopartículas de ZnO encapsuladas em verde contra Aedes aegypti e patógenos microbianos. **Pesquisa em Parasitologia**, v. 116, n. 6, p. 1637–1651, 2017.

BOGDAN, J.; PŁAWIŃSKA-CZARNAK, J.; ZARZYŃSKA, J. Nanopartículas de titânio e óxidos de zinco como agentes inovadores no tratamento de tumores: uma revisão. **Nanoscale Research Letters**, v. 12, n. 1, p. 225, 2017.

BOYADZHIEV, A. *et al.* The high-throughput in vitro CometChip assay for the analysis of metal oxide nanomaterial induced DNA damage. **Nanomaterials**, v. 12, n. 11, p. 1844, 2022.

BURGUM, M. J. *et al.* Adapting the in vitro micronucleus assay (OECD Test Guideline No. 487) for testing of manufactured nanomaterials: recommendations for best practices. **Mutagenesis**, v. 39, n. 3, p. 205–217, 2024.

CAGLIANI, R.; GATTO, F.; BARDI, G. Protein adsorption: a feasible method for nanoparticle functionalization? **Materials**, v. 12, n. 12, p. 1991, 2019.

CARON, A. J. *et al.* Zinc oxide nanoparticles mediate bacterial toxicity in Mueller-Hinton Broth via Zn2+. **Frontiers in Microbiology**, v. 15, p. 1394078, 2024.

CEDERVALL, T. *et al.* Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, p. 2050–2055, 2007.

CHURCHMAN, A. H. *et al.* Serum albumin enhances the membrane activity of ZnO nanoparticles. **Chemical Communications**, v. 49, n. 39, p. 4172-4174, 2013.

COSTA, A. C. F. M. *et al.* Particle size evaluation of the ZnO obtained by the Pechini

method. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 14-19, 2007.

DAS, D. *et al.* Synthesis of ZnO nanoparticles and evaluation of antioxidant and cytotoxic activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 556-560, 2013.

DENG, Z. J. *et al.* Differential plasma protein binding to metal oxide nanoparticles. **Nanotechnology**, v. 20, n. 45, p. 455101, 2009.

DRESCHER, D. *et al.* Toxicity of amorphous silica nanoparticles on eukaryotic cell model is determined by particle agglomeration and serum protein adsorption effects. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 400, n. 5, p. 1367-1373, 2011.

EL YAMANI, N. *et al.* Hazard assessment of nanomaterials using in vitro toxicity assays: Guidance on potential assay interferences and mitigating actions to avoid biased results. **NanoToday**, v. 55, p. 102215, 2024.

FAYER, L. *et al.* The distinct effect of titanium dioxide nanoparticles in primary and immortalized cell lines. **Toxicology Research**, v. 10, n. 3, p. 511–522, 2021.

FERNÁNDEZ-BERTÓLEZ, N. *et al.* Toxicity of zinc oxide nanoparticles: Cellular and behavioural effects. **Chemosphere**, v. 363, p. 142993, 2024.

FLOWER, N. A. *et al.* Characterization of synthesized silver nanoparticles and assessment of its genotoxicity potentials using the alkaline comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 742, n. 1-2, p. 61-65, 2012.

FRANQUI, L. S. *et al.* Interaction of graphene oxide with cell culture medium: Evaluating the fetal bovine serum protein corona formation towards in vitro nanotoxicity assessment and nanobiointeractions. **Materials Science and Engineering: C**, v. 100, p. 363-777, 2019.

GUNSOLUS, I. L.; HAYNES, C. L. Analytical aspects of nanotoxicology. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 1, p. 451-479, 2016.

GUO, X. *et al.* Size- and coating-dependent cytotoxicity and genotoxicity of silver nanoparticles evaluated using in vitro standard assays. **Nanotoxicology**, v. 10, n. 9, p. 1373-1384, 2016.

JANAKI, A. C.; SAILATHA, E.; GUNASEKARAN, S. Synthesis, characteristics and antimicrobial activity of ZnO nanoparticles. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 144, p. 17-22, 2015.

JIANG, X. *et al.* Multi-platform genotoxicity analysis of silver nanoparticles in the

model cell line CHO-K1. **Toxicology Letters**, v. 222, n. 1, p. 55-63, 2013.

JURABLU, S.; FARAHMANDJOU, M.; FIROOZABADI, T. P. Sol-Gel Synthesis of Zinc Oxide (ZnO) Nanoparticles: Study of Structural and Optical Properties. **Journal of Sciences, Islamic Republic of Iran**, v. 26, n. 3, p. 281-285, 2015.

KARLSSON, H. L. *et al.* Size-dependent toxicity of metal oxide particles — a comparison between nano- and micrometer size. **Toxicology Letters**, v. 188, n. 2, p. 112-118, 2009.

KIM, H. R. *et al.* Appropriate in vitro methods for genotoxicity testing of silver nanoparticles. **Environmental Health and Toxicology**, v. 28, p. e2013003, 2013.

KISIN, E. R. *et al.* Single-walled carbon nanotubes: geno- and cytotoxic effects in lung fibroblast V79 cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 70, n. 24, p. 2071-2079, 2007.

KUJUR, K. *et al.* Efeito da suplementação de micronutrientes no perfil hormonal das raças locais de cabras e ovelhas de Bengala Ocidental. **Indian Journal of Animal Sciences**, v. 86, n. 2, p. 224–225, 2016.

LANDSIEDEL, R. *et al.* Genotoxicity testing of nanomaterials. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 14, n. 6, p. e1833, 2022.

LANDSIEDEL, R. *et al.* Genotoxicity investigations on nanomaterials: methods, preparation and characterization of test material, potential artifacts and limitations — many questions, some answers. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 2-3, p. 241-258, 2009.

LAVOGINA, D. *et al.* Revisiting the resazurin-based sensing of cellular viability: Widening the application horizon. **Biosensors**, v. 12, n. 4, p. 196, 2022.

LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. **Small**, v. 4, n. 1, p. 26-49, 2008.

LI, N. *et al.* Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. **Environmental Health Perspectives**, v. 111, n. 4, p. 455, 2003.

LIM, Y. *et al.* Engineering mammalian cells in bioprocessing – current achievements and future perspectives. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, v. 55, n. 4, p. 175-189, 2010.

LIU, X.; LU, Z.; SUN, Y. Orientation control of biological cells under inverted microscopy. **IEEE/ASME Transactions on Mechatronics**, v. 16, n. 5, p. 918-924,

2010.

LUNDQVIST, M. *et al.* The evolution of the protein corona around nanoparticles: a test study. **ACS Nano**, v. 5, n. 9, p. 7503-7509, 2011.

MAHMOUDI, M. The need for improved methodology in protein corona analysis. **Nature Communications**, v. 13, n. 1, p. 49, 2022.

MATTSON, N. B. *et al.* Characterization of Chemically-Induced Endogenous Retroviral Particles in the CHO-K1 Cell Line. **Viruses**, v. 17, n. 11, p. 1408, 2025.

MAYORDOMO, N. M. *et al.* The protein corona paradox: Challenges in achieving true biomimetics in nanomedicines. **Biomimetics**, v. 10, n. 5, p. 276, 2025.

MEESON, K. E. *et al.* Flux Sampling Suggests Metabolic Signatures of High Antibody-Producing CHO Cells. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 122, n. 7, p. 1898-1913, 2025.

MENON, D. *et al.* How safe are nanoscale metal-organic frameworks? **Frontiers in Toxicology**, v. 5, p. 1233854, 2023.

MIAO, Y. *et al.* Regulating protein corona on nanovesicles by glycosylated polyhydroxy polymer modification for efficient drug delivery. **Nature Communications**, v. 15, n. 1, p. 1159, 2024.

MOHR, L. C. *et al.* Efeito antimicrobiano de nanopartículas de ZnO e TiO2 frente as bactérias S. aureus e E. coli. In: **REVISTA DO CONGRESSO SUL BRASILEIRO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**. 2017.

ORGANISATION DE COOPÉRATION ET DE DÉVELOPPEMENT ÉCONOMIQUES (OECD). Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. **OECD Publishing**, 2016.

PANTÉ, N.; KANN, M. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. **Molecular Biology of the Cell**, v. 13, p. 425–434, 2002.

POURALI, P. *et al.* Investigation of Protein Corona Formed around Biologically Produced Gold Nanoparticles. **Materials**, v. 15, n. 13, p. 4615, 2022.

PUCK, T. T.; CIECIURA, S. J.; ROBINSON, A. Genética das células somáticas de mamíferos. III. Cultivo prolongado de células euploides a partir de sujeitos humanos e animais. **Journal of Experimental Medicine**, v. 108, p. 945–956, 1958.

RAHMAN, S. R. *et al.* Beneficial and toxicological aspects of zinc oxide nanoparticles

in animals. **Veterinary Medicine and Science**, v. 8, n. 4, p. 1769-1779, 2022.

RAMPERSAD, S. N. Multiple applications of Alamar Blue as an indicator of metabolic function and cellular health in cell viability bioassays. **Sensors**, v. 12, n. 9, p. 12347-12360, 2012.

RITZ, S. *et al.* Protein corona of nanoparticles: distinct proteins regulate the cellular uptake. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 4, p. 1311-1321, 2015.

SAPTARSHI, S. R.; DUSCHL, A.; LOPATA, A. L. Reatividade biológica de nanopartículas de óxido de zinco com sistemas de teste em mamíferos: uma visão geral. **Nanomedicina**, v. 10, n. 13, p. 2075–2092, 2015.

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.

SASIDHARAN, N. P.; CHANDRAN, P.; KHAN, S. S. Interaction of colloidal zinc oxide nanoparticles with bovine serum albumin and its adsorption isotherms and kinetics. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces,** v. 102, p. 195-201, 2013.

SCHULZ, M. *et al.* Investigation on the genotoxicity of different sizes of gold nanoparticles administered to the lungs of rats. **Mutation Research**, v. 745, p. 51–57, 2012.

SHANNAHAN, J. The biocorona: a challenge for the biomedical application of nanoparticles. **Nanotechnology Reviews**, v. 6, n. 4, p. 345-353, 2017.

SHANNAHAN, J. H. *et al.* Silver nanoparticle protein corona composition in cell culture media. **PloS One**, v. 8, n. 9, p. e74001, 2013.

SHVEDOVA, A. A. *et al.* Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 66, n. 20, p. 1909-1926, 2003.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 184-191, 1988.

SLEKIENE, N. *et al.* Influence of TiO2 and ZnO nanoparticles on α-Synuclein and β-Amyloid aggregation and formation of protein fibrils. **Materials**, v. 15, n. 21, p. 7664, 2022.

SU, Y. *et al.* PROTCROWN: A Manually Curated Resource of Protein Corona Data for Unlocking the Potential of Protein–Nanoparticle Interactions. **Nano Letters**, v. 25, n. 5, p. 1739-1744, 2025.

TEKIE, F. S. M. *et al.* Controlling evolution of protein corona: a prosperous approach to improve chitosan-based nanoparticle biodistribution and half-life. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 9664, 2020.

THORN, K. A quick guide to light microscopy in cell biology. **Molecular Biology of the Cell**, v. 27, n. 2, p. 219-222, 2016.

TIHANYI, B.; NYITRAY, L. Recent advances in CHO cell line development for recombinant protein production. **Drug Discovery Today: Technologies**, v. 38, p. 25-34, 2020.

VALDIGLESIAS, V. *et al.* Effects of zinc oxide nanoparticle exposure on human glial cells and zebrafish embryos. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 15, p. 12297, 2023.

VRANIC, S. *et al.* Impact of serum as a dispersion agent for in vitro and in vivo toxicological assessments of TiO2 nanoparticles. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 1, p. 353-363, 2017.

VROMAN, L. Effect of Adsorbed Proteins on the Wettability of Hydrophilic and Hydrophobic Solids. **Nature**, v. 196, p. 476–477, 1962.

WAGNER, E. D. *et al.* CHO cell cytotoxicity and genotoxicity analyses of disinfection by-products: An updated review. **Journal of Environmental Sciences**, v. 58, p. 64-76, 2017.

WANG, J. *et al.* Modulating the toxicity of engineered nanoparticles by controlling protein corona formation: Recent advances and future prospects. **Science of The Total Environment**, v. 914, p. 169590, 2024.

WEN, Z. *et al.* Mesoporous TiO2 coatings regulate ZnO nanoparticle loading and Zn2+ release on titanium dental implants for sustained osteogenic and antibacterial activity. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 15, n. 12, p. 15235-15249, 2023.

YADAV, K. *et al.* MSN, MWCNT and ZnO nanoparticle-induced CHO-K1 cell polarisation is linked to cytoskeleton ablation. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 45, 2021.

YANG, H. *et al.* Conformational-transited protein corona regulated cell-membrane penetration and induced cytotoxicity of ultrasmall Au nanoparticles. **RSC Advances**, v. 9, n. 8, p. 4435-4444, 2019.

YANG, J.; XIONG, D.; LONG, M. Zinc oxide nanoparticles as next-generation feed additives: Bridging antimicrobial efficacy, growth promotion, and sustainable

strategies in animal nutrition. **Nanomaterials**, v. 15, n. 13, p. 1030, 2025.

YIN, H. *et al.* Reducing the cytotoxicity of ZnO nanoparticles by a pre-formed protein corona in a supplemented cell culture medium. **RSC Advances**, v. 5, n. 90, p. 73963-73973, 2015.

YOUN, S. M. *et al.* Food additive zinc oxide nanoparticles: dissolution, interaction, fate, cytotoxicity, and oral toxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 11, p. 6074, 2022.

YU, J. *et al.* ZnO interactions with biomatrices: Effect of particle size on ZnO-protein corona. **Nanomaterials**, v. 7, n. 11, p. 377, 2017.

ZHANG, P. *et al.* Analysis of nanomaterial biocoronas in biological and environmental surroundings. **Nature Protocols**, v. 19, n. 10, p. 3000-3047, 2024.

ZHOU *et al.* The Formation of protein corona by nanoplastics and horseradish peroxidase. **Nanomaterials**, v. 12, n. 24, p. 4467, 2022.

ZHOU, X.-Q. *et al.* Zinc oxide nanoparticles: synthesis, characterization, modification, and applications in food and agriculture. **Processes**, v. 11, n. 4, p. 1193, 2023.