

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

LEONARA BEATRIZ FAYER DE ALMEIDA

**CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE
DIÓXIDO DE TITÂNIO EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

DISSERTAÇÃO

JUIZ DE FORA,
2019

LEONARA BEATRIZ FAYER DE ALMEIDA

**CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE
DIÓXIDO DE TITÂNIO EM CÉLULAS DE MAMÍFEROS**

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

Orientadora: Profa. Dra. Michele Munk Pereira
Co-orientador: Dr. Humberto de Mello Brandão

JUIZ DE FORA,
2019

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

Almeida, Leonara Beatriz Fayer de.

Citotoxicidade e genotoxicidade de nanopartículas de dióxido de titânio em células de mamíferos / Leonara Beatriz Fayer de Almeida. -- 2019.

73 p. : il.

Orientadora: Michele Munk Pereira

Coorientador: Humberto de Mello Brandão

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Nanotoxicidade. 2. Cultivo celular. 3. CHO. 4. Fibroblasto Bovino. I. Pereira, Michele Munk, orient. II. Brandão, Humberto de Mello, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTO

A realização desta conquista contou com importantes apoios e incentivos sem os quais não se teria tornado uma realidade e aos quais serei eternamente grata. Primeiramente, dedico essa conquista aos meus pais pelo apoio, esforço, amor, e exemplo de perseverança. Aos meus amados irmãos, Nathália e Alberto, pela amizade, apoio incondicional, carinho e incentivo. Ao meu amor, Paulinho, pelo companheirismo, sempre me incentivando a buscar por todos meus sonhos e vibrando comigo em todas as minhas realizações. Aos meus avós, tios, primos e amigos que compartilharam comigo dessa caminhada, bem como os momentos de alegria que guardo em meu coração.

Aos meus orientadores, Dr^a. Michele Munk e Dr. Humberto Brandão, pelo estímulo e oportunidade ao desenvolvimento deste trabalho, assim como fundamentais ensinamentos que contribuíram de forma imensurável ao longo desses anos de iniciação científica e mestrado.

A prof^a. Dr^a. Vera Peters, minha primeira orientadora, pela minha inserção no mundo científico e que nortearam o caminho que estou seguindo.

As minhas amigas Bárbara Carpinter, Jessica Ferraz e Jessica Corrêa cujo carinho e amizade estiveram presentes em todos os momentos.

As amigas do laboratório Rafaella, Camila, Danielle, Eduarda, Lívia e Juliana pela colaboração, apoio e carinho, no qual me ajudaram no desenvolvimento dessa dissertação.

E aos órgãos de fomento CAPES, FAPEMIG, CNPq, a Rede AGRONANO e a Rede Mineira de Pesquisa e Inovação para Bioengenharia de Nanossistemas (RM PI-BEN; processo No. TEC-RED-00282-16).

I am among those who think that science has great beauty. A scientist in his laboratory is not only a technician: he is also a child placed before natural phenomena which impress him like a fairy tale. We should not allow it to be believed that all scientific progress can be reduced mechanisms, machines, gearings even though such machinery also has its beauty. Neither do I believe that the spirit of adventure runs any risk of disappearing in our world. If I see anything vital around me it is precisely that spirit of adventure, which seems indestructible and is akin to curiosity.

Marie Curie, 1937

RESUMO

O dióxido de titânio (TiO_2) é um óxido metálico encontrado facilmente na natureza e amplamente utilizado em pigmentos em virtude da capacidade de oferecer brancura e opacidade. Com o progresso da nanotecnologia, o dióxido de titânio em nanoescala (TiO_2NP) também vem sendo aplicado como opacificante em tecidos, vidros, porcelana, produtos farmacêuticos e cosméticos. Além disso, tem propriedade fotocatalíticas antibacteriana. Há estudos que apontam que as TiO_2NP podem ser utilizadas como carreadores de medicamentos e aditivos para alimentação animal. Em razão ao aumento da aplicação da TiO_2NP bem como a exposição crescente, surge a necessidade de conhecer o comportamento das TiO_2NP e seus riscos. Assim, o objetivo geral desse estudo é avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* de TiO_2NP em células de mamíferos (células do epitélio do ovário de Hamster chinês - CHO e fibroblastos bovinos). As TiO_2NP (JRCNM01001a, União Europeia) foram caracterizadas por espalhamento dinâmico de luz (DLS) afim de conhecermos o Potencial Zeta, tamanho hidrodinâmico e índice de polidispersão; pela microscopia de força atômica (AFM) para conhecermos a forma e tamanho; e pela espectroscopia de infravermelho e RAMAN para a composição química. Posteriormente, foram realizados testes de citotoxicidade e genotoxicidade, tais como avaliação da morfologia celular por microscopia de luz, a viabilidade celular pelo ensaio de Metil Tiazol Tetrazólio (MTT), e estresse oxidativo pela Superóxido Dismutase (SOD) e o ensaio de micronúcleo como teste genotóxico. Em todo os ensaios foram avaliadas as concentrações de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TiO_2NP . A partir das análises feitas no DLS com TiO_2NP em água deionizada, meio de cultivo com e sem soro fetal bovino observa-se que nas soluções de água deionizada e DMEM/F-12 os tamanhos hidrodinâmicos das TiO_2NPs variaram entre 500 a 1300 nm, no entanto, quando em DMEM/F12 com SFB os tamanhos foram menores que 440 nm à 20 nm. O potencial Zeta em meio de cultivo foi em média de -14 mV, meio de cultura sem soro em média de -21,62 mV, em água deionizada média de -4,2 mV. Com relação a forma, a AFM mostrou que as TiO_2NPs se encontram sob variadas geometrias e tamanhos, desde a formas cilíndricas à cúbicas. O Infravermelho sugere a presença de superfícies hidroxiladas e no RAMAN notam-se bandas no espectro obtido em 639 cm^{-1} , 517 cm^{-1} e 395 cm^{-1} . A análise do MTT revelou que a exposição de fibroblastos bovinos às TiO_2NPs não afetaram viabilidade celular ($P>0,05$). No entanto, em células CHO a concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TiO_2NP diminuiu a viabilidade celular e induziu a formação de micronúcleos ($P<0,05$). A atividade da enzima SOD em células CHO e fibroblastos bovinos não foi alterada após exposição às TiO_2NP ($P>0,05$). Com base no ensaio de micronúcleo nenhuma das concentrações testadas foram genotóxicas para fibroblastos bovinos, no entanto para CHO 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TiO_2NP no tratamento curto e longo e 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TiO_2NP no tratamento longo aumentaram a frequência de micronúcleos. Em conclusão, as TiO_2NPs não foram citotóxicas para fibroblastos bovinos, entretanto, a concentração de 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TiO_2NP demonstrou ser cito e genotóxica (no tratamento longo e curto), bem como 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TiO_2NP foi genotóxica (tratamento longo) para células CHO por alteram a viabilidade celular e induzirem a formação de micronúcleos nessas células.

Palavras-chaves: cultivo celular, CHO, fibroblasto bovino e nanotoxicidade.

ABSTRACT

Titanium dioxide (TiO_2) is a metal oxide readily found in nature and widely used in pigments because of the ability to provide whiteness and opacity. The progress of nanotechnology, titanium dioxide at the nanoscale (TiO_2NP) has also been applied as an opacifier in fabrics, glass, porcelain, pharmaceuticals and cosmetics. In addition, it has photocatalytic and antibacterial properties. Moreover, TiO_2NP can be applied as delivery of substances, food additives to improve the growth of cattle and increase protein synthesis in animals. Due to the increased application of TiO_2NP and increasing exposure, grow the necessity to know the behavior and risk of TiO_2NP . Therefore, the objective of this study is to evaluate the in vitro toxicity of titanium dioxide nanoparticles in mammalian cells (Chinese Hamster ovary epithelium – CHO and bovine fibroblast). TiO_2NP were characterized by dynamic light scattering (DLS) in order to know the Zeta Potential, hydrodynamic size and polydispersity index; by atomic force microscopy (AFM) to know the shape and size; and by infrared and RAMAN spectroscopy for the chemical composition. Subsequently, cytotoxicity and genotoxicity tests were performed, such as cell morphology evaluation by light microscopy, cell viability by the Methyl Thiazole Tetrazolium (MTT) assay, and oxidative stress by Superoxide Dismutase (SOD) and the micronucleus assay as a test genotoxic. Concentrations of 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of TiO_2NP were evaluated in all the assays. The analyzes made in DLS with TiO_2NP in deionized water, culture medium with and without fetal bovine serum, shows that in deionized water and culture medium hydrodynamic size was around 500 and 1300 nm, however in culture medium with fetal bovine serum the size range from 440 nm to 20 nm. The zeta potential in culture medium was around – 14 mV, culture medium with fetal bovine serum was around -21,6 mV and deionized water was around – 4,2 mV. According to AFM the TiO_2NPs reveals different geometries and sizes, since cylindrical to a cubic forms. According the MTT method, the exposure of bovine fibroblasts to TiO_2NPs did not affect cell viability. We evaluated the activity of the SOD enzyme in CHO cells and bovine fibroblasts, however, none of the TiO_2NP concentrations altered the activity of this enzyme ($P > 0.05$). Based on the MN assay none of the concentrations tested were genotoxic for bovine fibroblasts, however for CHO 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TiO_2NP in the short and long treatment and 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ TiO_2NP in the long treatment increased the micronucleus frequency. TiO_2NPs were not cytotoxic to bovine fibroblasts, nevertheless, the concentration of 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of TiO_2NP was shown to be cytotoxic and genotoxic (long and short treatment) as well as 1 $\mu\text{g} / \text{mL}$ TiO_2NP was genotoxic (long treatment) for CHO cells because they alter cell viability and induce micronuclei in these cells.

Keywords: cell culture, CHO, bovine fibroblast and nanotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Esquema do tempo de exposição dos diferentes tratamento para o teste de micronúcleo, página 38.
- Figura 2** – Fórmulas utilizadas para o cálculo do CBPI e RI de acordo com o TG487-OECD, página 39.
- Figura 3** – Espectro Raman obtido para a nanopartícula de dióxido de titânio, página 41.
- Figura 4** – Espectro na região do infravermelho obtido para a nanopartícula de dióxido de titânio, página 41.
- Figura 5** – Imagem por Microscopia de Força Atômica das TiO₂NPs, página 42.
- Figura 6** – Imagem representativa da morfologia de células CHO durante 24 h de exposição aos tratamentos com TiO₂NP, controle (A), 0,1 µg/mL (B), 1 µg/mL (C), 5 µg/mL (D), 10 µg/mL (E). A seta indica os agregados. Aumento 100x, página 43.
- Figura 7** – Imagem representativa da morfologia de células fibroblasto bovino durante 24 h de exposição aos tratamentos com TiO₂NP, controle (A), 0,1 µg/mL (B), 1 µg/mL (C), 5 µg/mL (D), 10 µg/mL (E). A seta indica os agregados. Aumento 100x, página 43.
- Figura 8** – Viabilidade celular de CHO e Fibroblastos Bovinos pelo ensaio de MTT expostos as TiO₂NPs por 24 h. O dados foram avaliados por ANOVA post-hoc de Tukey (P<0,05), médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Não houve comparação entre as linhagens celulares utilizadas. Leitura realizada na absorbância de 570 nm, página 44.
- Figura 9** – Viabilidade celular de CHO e fibroblasto bovinos pelo ensaio de MTT expostas aos controles positivos do teste de micronúcleo. Os dados foram avaliados por ANOVA post-hoc de Tukey (P<0,05). Não houve comparação entre as linhagens celulares utilizadas. Leitura realizada na absorbância de 570 nm, página 45.
- Figura 10** – Ensaio para avaliar a atividade da enzima SOD em células CHO e fibroblasto bovino durante 24 h de exposição aos tratamentos de TiO₂NP. Os dados foram avaliados por ANOVA post-hoc de Tukey (P<0,05). Não houve

comparação entre as linhagens celulares utilizadas. Leitura realizada na absorvância de 570 nm, página 45.

Figura 11 – Frequência de micronúcleos em células CHO após o tratamento curto (3h) e longo. Os resultados foram analisados por teste Qui-Quadrado, com nível de significância de 5%, tendo como número amostral 2.000 células, página 47.

Figura 12 – Frequência de micronúcleos em células fibroblasto bovino após o tratamento curto (3h) e longo. Os resultados foram analisados por teste Qui-Quadrado, com nível de significância de 5%, tendo como número amostral 2.000 células, página 47.

Figura 13 - Imagens representativas do ensaio de micronúcleo de CHO. (A) 10 $\mu\text{g/mL}$ TiO_2NP + S9, aumento de 100x; (B) 0,1 $\mu\text{g/mL}$ TiO_2NP , aumento de 100x, página 48.

Figura 14 – Imagem representativa do ensaio de micronúcleo de fibroblasto bovino. (A) Controle positivo MMS, aumento 400x; (B) Controle positivo Colchicina, aumento de 100x, página 49.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Resultados obtidos pelo espalhamento de luz dinâmico nas concentrações de 0,1 µg/mL; 1 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL de TiO₂NPs suspensas em água deionizada, meio de cultivo (DMEM/F12) com e sem SFB, em todos os meios com pH 7,0, página 40.
- Tabela 2** – Dados do CBPI do tratamento curto em células CHO e fibroblasto bovino, página 46.
- Tabela 3** – Dados do CBPI do tratamento longo das células CHO e fibroblasto bovino, página 46.
- Tabela 4** – Número de Pontes e BUD contabilizadas na amostra de 2.000 células, entre os tratamentos de CHO, página 50.
- Tabela 5** – Número de Pontes e BUD contabilizadas na amostra de 2.000 células, entre os tratamentos de fibroblasto bovino, página 50.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

AFM – Microscópio de Força Atômica
ATP – Adenosina Trifosfato
BER - Incluindo Reparo De Excisão De Base
BUD – Gemas Nucleares
CBPI – Índice Proliferação de Bloqueador de Citocinese
CHO – Células de Ovário de Hamster Chinesa
Cyto β – Inibidor de polimerização de actina citocalasina β
DLS – Espalhamento de Luz Dinâmico
DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEM/F12 – Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12
DNA – Ácido Desoxirribonucleico
EROS – Espécies Reativas de Oxigênio
H₂O₂ – Peroxido de Hidrogênio
INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IPD – Índice de polidispersão
MTT – Metil Tiazol Tetrazólio
NBT – Nitroazul de Tetrazólio
NER - Reparo De Excisão De Nucleotídeos
NHEK - Recombinação Homóloga E Reparo De Junção Não Homólogo.
NIR – Infravermelho Próximo
NM – Nanomaterial
NP – Nanopartículas
OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico
RI – Índice de Replicação
SFB – Soro Fetal Bovino
SisNANO – Sistema Nacional de Laboratório em Nanotecnologias
SOD – Superóxido Dismutase
TiO₂NP – Nanopartícula de Dióxido de Titânio
UV – Ultravioleta
VDW – Van der Waals
XO – Xantina Oxidase

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1 NANOBIOTECNOLOGIA	17
2.2 NANOPARTÍCULAS DE TiO₂	18
2.3 NANOTOXICIDADE	20
2.4 MODELOS DE ESTUDO DE TOXICIDADE <i>IN VITRO</i>	22
2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS	23
2.5.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	23
2.5.2 RAMAN.....	24
2.5.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	25
2.5.4 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO	26
2.6 ENSAIOS PARA AVALIAR A CITOTOXICIDADE	27
2.6.1 ENSAIO DE REDUÇÃO DO CORANTE METIL TIAZOL TETRAZÓLIO (MTT).....	27
2.6.2 ENSAIO DA SUPEROXIDO DISMUTASE	28
2.6.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA DE LUZ	29
2.7 ENSAIOS PARA AVALIAR A GENOTOXICIDADE	30
2.7.1 ENSAIO DE MICRONÚCLEO	30
3. OBJETIVOS	32
3.1 GERAL	33
3.2 ESPECÍFICO	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	34
4.1.1 DISPERSÃO DAS NANOPARTÍCULAS	34
4.1.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO	34
4.1.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN	35
4.1.4 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO	35
4.1.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA	35
4.2 CITOTOXICIDADE	36
4.2.1 CULTIVO DAS CÉLULAS <i>IN VITRO</i>	36

4.2.2 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA DE LUZ.....	36
4.2.3 ENSAIO DE REDUÇÃO DO CORANTE METIL TIAZOL TETRAZÓLIO (MTT).....	37
4.2.4 ENSAIO DE SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD).....	37
4.3 GENOTOXICIDADE	37
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39
5. RESULTADOS	40
5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULASS	40
5.1.1 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO	40
5.1.2 RAMAN E INFRAVERMELHO	41
5.1.3 MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA.....	41
5.2 ENSAIO CITOTÓXICO	42
5.2.1 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA DE LUZ.....	42
5.2.2 MTT	44
5.2.2 SOD.....	45
5.3 GENOTOXICIDADE	46
6 DISCUSSÃO.....	51
8 CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS	59
ANEXO	68

1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia consiste no desenho, produção e aplicação de materiais na escala nanométrica, no qual apresentam propriedades físicas e químicas notáveis que diferem dos seus equivalentes em massa, com o objetivo de produzir novos materiais nanoengenheirados para serem aplicados nas mais diversas áreas como a eletrônica, medicina, química, ciência da computação, física e engenharia. Devido as suas características físico-químicas diferenciadas, surgiu um aumento das atividades de pesquisa e desenvolvimento dos nanomateriais (NMs), e atualmente são alternativas para melhorar a eficiência de produtos já existentes, bem como a criação de novos (DRASLER et al., 2017). Essa nova classe de material são estruturas projetadas com pelo menos uma dimensão menor que 100 nm (EMERICH & THANOS, 2003; THIMIRI et. al., 2016).

As nanopartículas (NPs) de óxido metálico são uma das categorias mais importantes de NMs devido a alta aplicabilidade (AITKEN et. al., 2006; AKBARI et. al., 2018), sendo a nanopartícula de dióxido de titânio (TiO_2NP) a mais utilizada em produtos industriais, como cosméticos, protetores solares, produtos alimentícios e tinturas (SHUKLA et. al., 2011). A sua alta aplicabilidade é em razão de sua baixa taxa de dissolução, alta área de superfície, propriedades anticorrosivas e fotocatalíticas. Na área biomédica, as TiO_2NPs têm potencial de aplicação na produção de materiais antimicrobianos vetores de liberação de medicamentos (LU et al., 2015; PINSIN et al., 2015; WOLFGANG et al., 2017) e tratamento de câncer (NINOMIYA, 2014).

Devido a crescente demanda do mercado, a produção anual das TiO_2NPs deve atingir cerca de 2,5 milhões de toneladas até 2025 (BAYAT et. al., 2015). Logo, a exposição humana e ambiental às TiO_2NPs tendem a aumentar. Neste contexto, surge a necessidade de conhecer o comportamento desses NMs em sistemas biológicos e seus possíveis riscos. Isso certamente contribuirá para o uso seguro das TiO_2NPs em diversos campos. Dentre as iniciativas de se estudar os possíveis riscos dos NMs para a saúde bem como estratégias para regulamentar o seu uso, destaca-se o projeto NANoREG. O NANoREG é uma proposta feita pela União Europeia e Coordenada pelo Ministério de Infraestrutura e Meio Ambiente da Holanda a fim de tratar da regulação internacional em nanotecnologia (NANoREG, 2014). Em setembro de 2014 foi oficializada a participação do Brasil neste projeto

com o objetivo de fornecer às agências reguladoras e aos legisladores do Brasil as ferramentas necessárias para que se tenha uma regulamentação em nanotecnologia embasada em conhecimentos científicos, em consonância com a regulamentação mundial e que dê segurança a trabalhadores, consumidores e ao meio-ambiente. O Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) exerce a liderança científica e tecnológica do projeto atuando em conjunto com os laboratórios do Sistema Nacional de Laboratório em Nanotecnologias (SisNANO), com as Redes de Pesquisa em Nanotoxicologia e Nanoinstrumentação, e com importantes pesquisadores na área de nanotoxicologia (Ministério da Ciências, Tecnologia e Inovação, 2017). O laboratório de Nanotecnologia da Embrapa Gado de Leite é associado a esse projeto tendo como parceira o laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF) de modo a contribuir mediante análises de alguns NMs de interesse biotecnológico (entre eles as TiO_2NPs) usando protocolos propostos pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Económico (OECD).

Na literatura há estudos avaliando os efeitos das TiO_2NPs em diferentes modelos biológicos e condições experimentais. Desse modo, há relatos sobre a toxicidade das TiO_2NPs em relação a apoptose em células da glia humana (MARQUEZ-RAMIREZ et al., 2012), alteração do citoesqueleto celular em células neuroblastoma humano (MAO et al., 2015), indução do estresse oxidativo (Hu et al., 2015) e inibição do ciclo celular em células de carcinoma alveolar de pulmão humano (KANSARA et al., 2015) e alteração na sinalização celular (NEACSU et al., 2015). Alguns estudos observaram a indução de respostas inflamatórias em células de macrófagos de camundongos (GIOVANNI et al., 2015) e autofagocitose desregulada em células de queratinócitos humanos (LOPES et al., 2016). De acordo com a Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, as TiO_2NP são um possível agente cancerígeno para humanos (IARC, 2009). No entanto, estudos avaliando a toxicidade (cito e genotoxicidade) da TiO_2NP em células bovinas ainda não foram realizados.

Dessa maneira, na tentativa de elucidar os possíveis riscos da TiO_2NP para a saúde animal, esse trabalho tem como objetivo avaliar o efeito citotóxico e genotóxico da exposição de fibroblastos bovinos cultivados *in vitro* às TiO_2NPs utilizando testes de viabilidade celular e o protocolo de genotoxicidade da OECD TG 487. Neste contexto, este estudo visa contribuir nos testes de protocolos

estabelecidos pela OECD para compor relatórios para o projeto de regulamentação de nanomateriais (NANoReg)

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NANOBIOTECNOLOGIA

Dentre as tecnologias mais promissoras do século XXI, destaca-se a nanotecnologia e a biotecnologia (EMERICH & THANOS, 2003; HUSSAIN et. al., 2015). A nanotecnologia visa desenvolver e aplicar materiais e dispositivos cuja composição apresente um material em escala nanométrica a fim de aperfeiçoar produtos existentes e gerar novas tecnologias de alto desempenho para pesquisa e indústria. Os materiais na faixa de tamanho nanométrico ocorrem tanto na natureza liberados nas queimadas e emissões vulcânicas, quanto como resultado de processos industriais tais como os processos de refinação, soldadura, produção de alimentos ou combustão de automóveis (ROBLES-GARCÍA et. al., 2016). Porém, com o surgimento da nanotecnologia os NMs vêm sendo produzidos de forma intencional pelo homem com propriedades físico-químicas relacionadas à aplicação final do produto (ROBLES-GARCÍA et. al., 2016). Na nanoescala, surgem os efeitos quânticos e os materiais geralmente se comportam de maneira diferenciada, em comparação com suas propriedades em massa (CLARK & PAZDERNIK, 2015).

A biotecnologia utiliza o conhecimento e as técnicas da biologia para manipular processos moleculares, genéticos e celulares para desenvolver produtos e serviços (FAKRUDDIN et. al., 2012; MORAIS et. al., 2014). O uso da nanotecnologia associada à sistemas biológicos resultou na emergência da nanobiotecnologia. Desse modo, a nanobiotecnologia é a fusão da biotecnologia com a nanotecnologia, a fim de expandir e implementar ferramentas úteis para a produção de produtos e bens de consumo (FAKRUDDIN et. al., 2012).

Em sistemas biológicos encontramos muitos componentes na escala nanométrica, como componentes internos das células e constituintes da matriz extracelular. Os ribossomos, por exemplo, podem ser considerados "nanomáquinas" programáveis ou "nano-montadoras", no qual todas as reações químicas operam em um nível molecular. Assim, estudiosos da área de nanobiotecnologia por meio da

biologia celular investigam os componente celulares para entender as estruturas e processos em nanoescala (CLARK & PAZDERNIK, 2015).

A combinação das duas áreas resulta na produção de novos dispositivos e sistemas multifuncionais para análise biológica e química caracterizada por melhor sensibilidade e especificidade em comparação com as alternativas atuais (NIEMEYER & MIRKIN, 2004). Assim com a nanobiotecnologia, análises de vias de sinalização podem fornecer novas compreensões sobre os processos da doença, identificação de biomarcadores mais eficientes e entendimento dos mecanismos de ação dos fármacos e estudos da interação dos nanomateriais com bactérias, toxinas, proteínas e ácidos nucleicos (JAIN & JAIN, 2017). As TiO_2NPs , por exemplo, devido a estabilidade em condições fisiológicas e biocompatibilidade, são uma alternativa para carreadores de drogas anticancerígena e genes (QIN et. al., 2011; YIN et. al., 2013; YOU et. al., 2016).

Assim, com o aumento de pesquisas na área de nanobiotecnologia novos avanços são feitos, como identificação de propriedades dos NMs e esclarecimento de processos biológicos (JAIN & JAIN, 2017). Dessa forma, o progresso da nanobiotecnologia sugere o surgimento de novas alternativas de prevenção, diagnóstico e tratamento (GILMARTIN & O'KENNEDY, 2012).

2.2 NANOPARTÍCULAS DE TiO_2

O TiO_2 existe em duas formas cristalinas, sendo elas denominadas de anatase, rutilo e brookite (o qual é o menos estudado em pesquisas científicas). Os tipos anatase e rutilo são constituído por um átomo de titânio rodeado por seis átomos de oxigênio numa configuração octaédrica, sendo a diferença encontrada na distorção de cada octaedro e o padrão de montagem das cadeias octaédricas. No rutilo, a distorção da estrutura cúbica é menor que a distorção observada em anatase, de modo que a célula unitária é esticada além de uma forma cúbica (QIN et. al., 2011). Dessa forma, essas diferenças vão refletir na superfície, banda elétrica, capacidade de transferência e potenciais redox (QIN et. al., 2011). A partir de estudos com ambas as formas, sabe-se que anatase possui alta atividade catalítica e são biologicamente mais ativas do que o rutilo (HIRAKAWA et. al., 2004; KAKINOKI et. al., 2004; SCHNEIDER et. al., 2014).

Além disso as TiO_2NP são capazes de apresentar várias formas, como nanotubos, nanofios, nanocristais, nanomateriais agregados esféricos e dendríticos (BALASUBRAMANYAM *et. al.*, 2009)

Entre as aplicações das TiO_2NP encontradas comercialmente, destaca-se a utilização em agentes de branqueamento em tintas (representando 70% do volume total de produção de pigmentos em todo o mundo) e em revestimentos cimento, plásticos e papéis em razão da capacidade de oferecer brancura e/ou opacidade (BAAN *et.al.*, 2006; DIAMOND *et al.*, 2017). Assim como, componente funcional de protetores solares por aumentar a capacidade de proteção UV dos produtos e melhorar o recurso estético de protetores solares convencionais que usam partículas de tamanho micrométrico (BERNARD, *et. al.*, 2010; WANG, *et. al.*, 2016). Podem ser aplicados como um semicondutor em vários dispositivos eletrônicos, incluindo células voláteis solares sensibilizadas por corantes (JAFARI & AFSHAR, 2016) e um crescente aumento de aplicações que aproveitam as propriedades fotodinâmicas em nanoescala, tais como sanitização fotocatalítica, degradação de substâncias orgânicas e oxidação de nitrogênio e enxofre (BAI *et al.*, 2014; BRAME *et. al.*, 2013; SCHNEIDER *et. al.*, 2014).

Estudos visando a aplicação da TiO_2NP no campo biomédico vem crescendo nos últimos anos, no qual inclui administração de medicamentos, imagem celular, terapias fotodinâmicas e biossensores (WU *et. al.*, 2011; XIE *et. al.*, 2011; PAN *et. al.*, 2015). Devido a alta relação superfície-volume e reatividade, as TiO_2NPs podem ser utilizadas para fins imunomoduladores para atender funções específicas como anti-inflamatórios, adjuvantes de vacina e drogas imunossupressoras (ELSABAHY & WOOLEY, 2013). As citocinas, por exemplo, são proteínas sintetizadas pelas células e promovem a homeostase na modulação e regulação da resposta imune. Dessa forma, as nanopartículas podem interagir com as citocinas e direcioná-las para as células e tecidos alvos (ELSABAHY & WOOLEY, 2013).

A atividade fotocatalítica das TiO_2NPs vem sendo investigada desde 1980 devido às suas aplicações em energia solar, remediação ambiental e terapia fotodinâmica (RAMACHARYULU *et. al.*, 2015; QU *et. al.*, 2013). Estudos prévios demonstraram que sob irradiação de luz, os elétrons (e^-) de banda de valência do TiO_2 ficam excitados e movidos para a banda de condução, deixando espaços positivos de carga (h^+), assim os elétrons (e^-) na banda de condução e orifícios (h^+)

na banda de valência têm a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) (YAMAGUCHI et. al., 2011; LI et. al., 2015). A geração de EROs induzida pela luz por um fotossensibilizador tem sido aplicada no tratamento de câncer, incluindo tumores em estágio inicial e lesões pré-cancerosas, e lesões neovascularização por meio da terapia fotodinâmica (CELLI et. al., 2010; AGOSTINIS et. al., 2011; KUSHIBIKI et. al., 2015). Entre os tipo de câncer que podem ser tratados com terapia fotodinâmica estão a leucemia, câncer de colo de útero, fígado e pulmão (LAGOPATI et. al., 2014; WANG et. al. 2015). No entanto, existem algumas desvantagens na aplicação das TiO₂NPs para a terapia fotodinâmica. As principais desvantagens do TiO₂ é o gap de banda larga (3.2 eV para anatase) que pode ser ativado somente na região ultravioleta (UV) e alta taxa de recombinações de elétrons que reduzem consideravelmente a eficiência fotocatalítica do TiO₂ (LANG et. al., 2016).

2.3 NANOTOXICIDADE

Os potenciais efeitos prejudiciais associados aos NMs têm demonstrado ser altamente variáveis, dependendo de múltiplos fatores, tais como características físico-químicas, tamanho e morfologia dos NMs, além das condições de exposição e sistemas biológicos. Isso pode levar a resultados equivocados e pouco conclusivos que impedem a extrapolação dos resultados para além de cada caso de estudo (CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016). Para superar esse problema, são necessários controles adequados, ensaios complementares envolvendo diferentes tipos de células além de padronização dos protocolos utilizados pelos diferentes laboratórios (CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016). Neste contexto, surge a nanotoxicologia que envolve o desenvolvimento e validação de testes e protocolos confiáveis, robustos e seguros para avaliar possíveis riscos da produção e uso de NMs (LEWINSKI et. al., 2008; DEKKERS et. al., 2016).

Uma das características críticas que influenciam a toxicidade dos NMs é a sua composição química, uma vez que os próprios elementos apresentam reatividade química e toxicidade diferentes em meios biológicos (KIM et. al., 2014). O tamanho e a forma dos NMs resultam em fatores cruciais, pois definem tanto os mecanismos de internalização, preferencialmente, quanto a eficiência de captação,

condicionando assim o comportamento toxicológico dos NMs em ambientes biológicos (MENDES et. al., 2014). As propriedades de superfície dos NMs como, área de superficial, funcionalização da superfície, forma e ângulo de curvatura, porosidade, cristalinidade da superfície, heterogeneidade, rugosidade e hidrofobicidade determinam fortemente a sua interação com membranas celulares como primeiro passo para mecanismos de citotoxicidade induzida (ARAJ et. al., 2015). A agregação dos NMs é um fenômeno bastante comum em meios biológicos contendo sais e proteínas que podem levar à formação de agregados/aglomerados com diâmetro hidrodinâmico maior, forma, superfície, estabilidade coloidal e homogeneidade muito diferentes das do material disperso (DAMOISEAUX et. al., 2011).

A interface dos NMs com os sistemas biológicos compreende em três componentes que interagem dinamicamente: a superfície dos NMs, cujas características são determinadas pela sua composição físico-química; a interface sólido-líquido e as mudanças que ocorrem quando a partícula interage com os componentes no meio circundante; e a zona de contato da interface sólido-líquido com substratos biológicos (NEL et. al., 2006; KIM et. al., 2014).

Conforme as características do meio como: força iônica, pH, temperatura, presença de grandes moléculas orgânicas (por exemplo as proteínas) e detergentes, podemos observar mudanças na carga superficial efetiva (Potencial Zeta), no estado de agregação, estado de dispersão, estabilidade, biodegradabilidade, características de dissolução, hidratação e valência da camada superficial das NPs (SIGMUND et. al., 2005). Além disso, as características das partículas contribuem ativamente para as interações com o meio através da: promoção da adsorção de íons, proteínas, materiais orgânicos naturais e detergentes; formação de dupla camada; dissolução; ou minimização da energia superficial livre por reestruturação de superfície (GILBERT et. al., 2004; MIN et. al., 2008).

Muitas dessas propriedades de partículas recém-adquiridas ou estados transformados, determinam as forças que operam na interface partícula-meio (MIN et. al., 2008). Essas forças incluem forças de longo alcance decorrentes de atrativas interações de dupla camada de Van der Waals, força eletrostáticas e forças de curto alcance decorrentes de interações de carga e solvente (MIN et. al., 2008; VELEGOL, 2007). As interações das NMs quando em meio de cultivo (por exemplo as

interações com proteínas) também poderiam induzir mudanças em larga escala, tais como lixiviação iônica, transformação de fase e aglomeração (NEL et. al., 2009).

Segundo estudos que investigam a nanotoxicidade das TiO₂NP, encontram-se resultados que indicam que essas NPs induzem inflamação, citotoxicidade e genotoxicidade (DIAMOND et. al., 2017; SONG et. al., 2016; TROUILLER et. al., 2009; WU et. al., 2009) Contudo, outros trabalhos verificaram que as TiO₂NP foram não tóxicas ou com baixa toxicidade quando em contato com fibroblastos bronquiais humanos, epitélio brônquico humano e fibroblastos de pulmão fetal humano. (BHATTACHARYA et. al., 2009). Relatórios conflitantes sobre a resposta toxicológica das TiO₂NPs podem ser decorrentes da utilização de diferentes propriedades físicas e químicas desse material (IAVIACOLI et. al., 2011).

2.4 MODELOS DE ESTUDO DE TOXICIDADE *IN VITRO*

A utilização de estudos *in vitro* para a avaliação de toxicidade de NMs permite o estudo dos efeitos primários nas células alvo na ausência de efeitos secundários causados pela inflamação ou fatores fisiológicos e compensatórios que podem confundir a interpretação, como ocorre em modelos animais (EKWALL, 1995; HUANG et al., 2010). Portanto, a avaliação da nanotoxicidade *in vitro* é importante, uma vez que as funções celulares basais suportam as funções celulares órgãos-específicas. Outras vantagens são a redução da variabilidade entre os experimentos e menor uso da substância teste, gerando menos resíduos (TAKHAR e MAHANT, 2011). Além do mais, ensaios de citotoxicidade *in vitro* são empregados como uma importante ferramenta na redução do número de animais de laboratório utilizados na avaliação de toxicidade aguda sistêmica (TAKHAR e MAHANT, 2011).

Dentre as linhagens de células existentes destacam-se a primárias e imortalizadas. Os fibroblastos bovinos são células de cultura primárias amplamente empregados na clonagem animal, o procedimento inclui a coleta de uma biópsia da pele, isolamento mecânico ou enzimático. Além disso, possuem crescimento finito e resistem a um número determinado de passagens (WAENY, 2017).

As células do epitélio do ovário de hamster chinês (CHO) é um modelo de linhagem celular de mamífero amplamente utilizadas em estudos de toxicidade *in vitro* (VIRGILIO et. al., 2010; JIANG et. al., 2015; FISCHER et. al., 2015), e por ser

de uma linhagem imortalizada suas características biológicas são bem conhecidas. Em estudos envolvendo a aplicação de protocolos padronizados como o TG 473 da OECD, o uso de linhagens imortalizadas é de suma importância para reprodutibilidade dos resultados.

2.5 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS

Em ensaios de nanotoxicologia deve se considerar a composição química e as propriedades físicas dos NMs, de modo a prever os mecanismos de interação com os sistemas biológicos e, assim, sua toxicidade, visto que apresentam reatividade química e toxicidade diferentes nos meios biológicos. Existe um conjunto mínimo de propriedades dos NMs que são comumente aceitas em estudos de caracterização para fins de avaliação de nanotoxicidade, no qual inclui: composição química, tamanho, forma, carga da superfície, cristalinidade e estado de aglomeração e agregação (GUNSOLUS & HAYNES, 2015). Assim, alguns exemplos de ensaios que podem ser utilizados para a caracterização físico-química são: para a composição química pela Espectroscopia de Infravermelho e Raman; o tamanho e forma pela Microscopia de Força Atômica (AFM); formação de agregados, tamanho hidrodinâmico, Potencial Zeta e homogeneidade pela técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).

2.5.1 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

Uma das características físico-químicas que influenciam a toxicidade das NMs é a composição química que pode ser analisada pela espectroscopia de infravermelho. Essa técnica, em linhas gerais, tem seus fundamentos baseados em efeitos de absorção da radiação na região do infravermelho, no qual devido a excitação do nível de energia vibracional há aumento do estado de energia. Logo, a radiação que incide sobre um meio será atenuada. Essa vibração proporciona informações sobre a estrutura molecular, e as bandas características da espectroscopia infravermelho representam as “impressões digitais” das moléculas (DENDISOVÁ et al., 2018).

Durante a exposição da molécula à luz infravermelho, ocorre mudança no momento dipolar elétrico da molécula devido a vibração. A molécula só pode agitar o campo eletromagnético em oscilação se tiver um momento de dipolo elétrico que oscila à medida que a molécula vibra. O movimento de alongamento de uma molécula diatômica homonuclear não altera seu momento de dipolo elétrico de zero, de modo que as vibrações de tais moléculas não absorvem nem geram radiação. Uma molécula diatômica heteronuclear, que tem um momento dipolar que muda à medida que a ligação se alonga e contrai, é ativa no infravermelho. Em altas excitações vibracionais, a oscilação dos átomos permite que a molécula explore regiões da curva de energia potencial, onde a aproximação parabólica é fraca. O movimento se torna anarmônico, no sentido de que a força resultante não é proporcional ao deslocamento. Como a curva real é menos confinante do que uma parábola, podemos antecipar que os níveis de energia se tornam menos amplamente espaçados em alta excitação. A natureza anarmônica do movimento é responsável pelo aparecimento de linhas adicionais de absorção fraca chamadas de sobretons (ATKINS & DE PAULA, 2011).

A partir do espectro gerado após a vibração no interior de um molécula de um composto químico, conhecemos suas propriedades físico-químicas pelo seu padrão de espectro e, assim, a identificamos o composto químico. Com base nas bandas que observamos nesse espectro, quando temos uma mistura é possível identificar diferentes componentes dessa mistura pelos seus respectivos padrões de banda (ATKINS & DE PAULA, 2011; RODRIGUES & GALZERANI, 2012).

2.5.2 RAMAN

Na espectroscopia Raman, uma amostra é exposta à radiação laser na faixa de ultravioleta (UV) a infravermelho próximo (NIR), assim o comprimento de onda incidente interage com as moléculas da amostra, excitando-as do estado fundamental vibracional para um estado de energia virtual, ocorrendo assim o espalhamento inelástico de luz pela matéria. Moléculas oscilantes podem se acoplar a outras moléculas e realizar vibrações adicionais, formando excitações de elétrons (MIROSLAW et al., 2018).

Quando a amostra é exposta radiação laser na faixa UV e NIR, o fóton incidente deixa um pouco de sua energia nos modos vibracionais da molécula que atinge ou acumula energia adicional de uma vibração que já foi excitada. Assim, a radiação espalhada apresentará uma frequência diferente da radiação incidida. A regra para as transições Raman vibracionais é que a polarizabilidade molecular deve mudar à medida que a molécula vibra. A polarizabilidade desempenha um papel na espectroscopia Raman vibracional pois a molécula deve ser comprimida e esticada pela radiação incidente para que uma excitação vibracional possa ocorrer durante a colisão entre fótons e moléculas (ATKINS & DE PAULA, 2011).

Baseando-se no espalhamento inelástico de luz pela matéria, obtemos os modos vibracionais da molécula, a ligação química presente, os tipos de átomos que compõem a molécula e os grupamentos moleculares (ATKINS & DE PAULA, 2011).

2.5.3 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

A microscopia de força atômica é uma ferramenta de caracterização que mede a topologia e as propriedades do material das superfícies registrando a deflexão de uma sonda metálica (ou “ponta”) à medida que ela se move sobre a superfície alvo. Por meio dessa técnica é possível obtermos imagens dos complexos biológicos, como seus padrões de montagem e capacidade de interagir com outras moléculas. Além disso, é uma técnica de pouca invasiva, pois não há necessidade de modificação química das amostras, nenhum dano mecânico e a oportunidade de varredura da mesma amostra sob condições distintas sob repetidas vezes (ATKINS & DE PAULA, 2011; GACZYNSKA & OSMULSKI, 2008).

De modo a varrer a superfície da amostra, a AFM apresenta uma ponta pequena e muito afiada montada em um cantilever o qual digitaliza a amostra e muda sua propriedade mecânica de acordo com a topografia da superfície alvo. Essas alterações, chamadas deflexão do cantilever ou modificações de suas oscilações, resultam em variações na distância entre a ponta e o objeto examinado. A distância é constantemente corrigida devido ao ciclo de feedback entre um sistema de posicionamento de amostra/ponta e um elemento pizoelétrico controlado por computador. A imagem com uma informação topográfica tridimensional é gerada plotando o sinal de correção ‘z’ (direção vertical) do loop de feedback contra o plano

'x' e 'y' (OZKAN et. al., 2016; YEOW et. al.,2017). Com base na imagem gerada após a ponta digitalizar a amostra, optemos imagens da topografia e, assim, inferirmos sobre a forma das NPs.

A AFM pode ser operado em três modos principais: no modo de contato, sem contato, e toque (contato intermitente). Em modo de contato, a ponta é arrastada diretamente sobre a superfície e se desvia em decorrência da interação Coulomb (interação eletrostática entre partículas eletricamente carregadas). No modo sem contato ela é mantida a curta distância (normalmente < 100 nm) sobre a amostra e oscila a uma frequência que depende das forças de Van der Waals que atuam sobre ela. Já quando ocorre o toque, a ponta é mantida oscilando acima da amostra, e a frequência de oscilação muda à medida que a ponta se aproxima da superfície em intervalos regulares (GIESSIBL, 2003).

2.5.4 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

O espalhamento de luz dinâmico é usado para investigar a difusão de moléculas em solução. Quando duas moléculas estão sendo irradiadas por um feixe de laser por um tempo 't', as ondas dispersas dessas partículas são notadas por um detector, resultando no surgimento de um amplo sinal. Porém, à medida que as moléculas se movem através da solução, as ondas dispersas podem interferir destrutivamente em outro momento 't-resultante' e derivar em ausência de sinal. Quando esse comportamento é estendido a um número maior de moléculas em solução, resulta em flutuações na intensidade da luz que dependem do coeficiente de difusão. Assim, a partir da análise das flutuações identificamos o coeficiente de difusão e o tamanho da molécula (ATKINS & DE PAULA, 2011).

Logo, a análise do movimento óptico das NPs suspensas possibilita a identificação de característica físico-químicas importantes, como: estado de aglomeração/agregação, tamanho hidrodinâmico, carga superficial, estabilidade coloidal e homogeneidade (CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016). Em sistemas biológicos as NPs devido a sua alta reatividade, interagem com sais e proteínas, ocasionando na formação de agregados/aglomerado (CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016).

Através do DLS é possível caracterizar sistemas biológicos de proteínas e vírus. Além disso, as medições antes da análise requerem preparações simples, como filtragem ou sonicação (ATKINS & DE PAULA, 2011).

O DLS pode mensurar a carga superficial dos NMs através do potencial elétrico na superfície de cisalhamento, no qual é chamado de potencial Zeta. O potencial Zeta é determinado pela medição da velocidade das espécies carregadas em direção ao eletrodo na presença de um campo elétrico externo através da solução da amostra (SAPSFORD et al., 2011). Dependendo do MN, o potencial Zeta pode prever como o NM está carregado e as formas de interação com as células (OH & PARK, 2014). O potencial Zeta com um valor de ± 30 mV é escolhido para inferir a estabilidade de partículas, em que o valor em módulo superior a 30 mV indica uma condição estável, enquanto um potencial Zeta inferior a 30 mV em módulo indica uma condição de instabilidade, agregação, coagulação ou floculação (SAPSFORD et al., 2011).

2.6 ENSAIOS PARA AVALIAR A CITOTOXICIDADE

A citotoxicidade pode ser avaliada por diferentes técnicas que quantificam a viabilidade celular após exposição a um agente potencialmente tóxico. Dentre os métodos existentes, destacam-se o teste de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]}, o ensaio de Superóxido Dismutase (SOD) e a avaliação da morfologia celular por microscopia de luz.

2.6.1 ENSAIO DE REDUÇÃO DO CORANTE METIL TIAZOL TETRAZÓLIO (MTT)

A análise da viabilidade e proliferação celular é a base de ensaios *in vitro* da resposta de uma população de células a fatores externos (CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016). A redução dos sais de tetrazólio é um dos mecanismos mais utilizados para a análise de proliferação e viabilidade. O MTT é um sal de tetrazólio amarelo solúvel em água para avaliar a viabilidade celular e a triagem de micotoxinas em larga escala. A ampla utilização em estudos de viabilidade celular,

proliferação e citotoxicidade *in vitro* é em razão dos sais de tetrazólio apresentarem carga líquida positiva, e ser lipofílico o que facilita que seja absorvido pelas células vivas (BERRIDGE et al., 2005).

Em células metabolicamente viáveis, as desidrogenases mitocondriais clivam o anel de tetrazólio, transformando em um composto de coloração amarela em um composto de coloração azul escuro, chamado de formazan {E,Z-1-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan}, que são cristais insolúveis em soluções aquosas. Assim sendo, a produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (RISS, 2004).

A mitocôndria é responsável pela homeostase celular, um bom alvo para interferir com a fosforilação oxidativa, apoptose, produção de espécies oxidativas, sinalização celular e metabolismo (AZEVEDO et. al., 2018). Estudos mostram que NMs de diferentes tamanhos e composições químicas se mobilizam para as mitocôndrias que são organelas redox ativas (FOLEY et. al., 2002; JIN et. al., 2016). Em razão disso, a geração de radicais livres de oxigênio nas células vem do vazamento de elétrons da cadeia de transporte de elétrons mitocondriais (JIN et. al., 2016). Em consequência disso, o estresse oxidativo é um mecanismo comum de danos celular produzido por NMs (FU et. al., 2014).

2.6.2 ENSAIO DA SUPEROXIDO DISMUTASE

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são subprodutos normais do metabolismo celular, átomo ou moléculas que possuem elétrons não pareados na última camada de valência podendo aceitar ou transferir outro elétron facilmente. Alguns EROs atuam como mediadores que regulam função celular como proliferação e apoptose agindo em alguns caminhos de sinalização intracelular e intervindo na expressão de genes relacionados a esses processos. Entre as EROs, o ânion superóxido desempenha um papel fundamental na inflamação, pois é um componente pró-inflamatório que causa danos á célula e a matriz extracelular (AFONSO et. al., 2017). Nas mitocôndrias das células, o adenosina trifosfato (ATP) é sintetizado pela redução do oxigênio molecular em água em uma sequência de reações, no entanto uma parte desse oxigênio não é reduzido completamente, resultando na formação de radicais livres ânion superóxido e outros radicais contendo

oxigênio (FU et. al., 2014). A enzima superóxido dismutase (SOD) neutraliza os ânion superóxido transformando em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio molecular de modo a prevenir a formação de componentes mais agressivos, como peroxinitrito e radical hidroxila (FU et. al., 2014; CHE et. al., 2015). O H_2O_2 é posteriormente convertido em água e oxigênio em uma reação catalisada pela catalase e peroxirredoxina (CHE et. al., 2015).

A homeostase celular das EROs é mantida pelo equilíbrio entre a produção de EROs e a atividade do sistema antioxidante. O excesso de EROs oxida macromoléculas como DNA, proteínas e lipídeos, causando mutações elevadas, danos a organelas celulares e morte celular em circunstâncias mais extremas (CHE et. al., 2015).

Um dos mecanismos de nanotoxicidade é através de EROs resultante da formação de estresse oxidativo nos tecidos. Um dos determinantes que podem afetar a geração de EROs pelas NMs incluem tamanho, forma, superfície da partícula, cargas da superfície, dissolução de partículas, liberação de íons metálicos, agregação e modo de interação com as células (FU et. al., 2014; AZEVEDO et.al., 2018)

A SOD, que catalisa a dismutação do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular, é uma das mais importantes enzimas antioxidantes. Para determinar a atividade da SOD é utilizando um sal de tetrazólio altamente solúvel em água (WST-1), no qual se converte em formazan solúvel em água após a redução com superóxido. Por esse método, a inibição da produção de cromógeno é proporcional à atividade da SOD presente na amostra. A taxa de redução com O_2 está linearmente relacionada com a atividade da xantina oxidase (XO), e é inibida pela SOD. Portanto, o IC50 (50% de atividade de inibição de SOD ou materiais semelhantes a SOD) pode ser determinado por um método colorimétrico (GUMULEC et. al., 2013).

2.6.3 AVALIAÇÃO DA MORFOLOGIA CELULAR POR MICROSCOPIA DE LUZ

A avaliação da morfologia celular por microscopia de luz é a técnica mais simples e direta usada para visualizarmos as células, no entanto deve ser

reconhecido que a plasticidade da morfologia celular esta relacionada a respostas à diferentes condições de cultura (FRESHNEY, 2015). Portanto, observações comparativas de células devem ser feitas no mesmo estágio de crescimento e densidade celular no mesmo meio (FRESHNEY, 2015). Alterações na constituição do meio e agentes citotóxico podem afetar a morfologia celular, logo, avaliações comparativas entre controle e tratamentos podem contribuir para as análises de toxicidade com um indicador direto na avaliação da citotoxicidade (DUAN et al., 2013; CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016).

Estudos prévios demonstram que tipos diferentes de NMs podem afetar a morfologia celular (SOENEN et al., 2014; HAVRDOVA et al., 2016).

2.7 ENSAIOS PARA AVALIAR A GENOTOXICIDADE

2.7.1 ENSAIO DE MICRONÚCLEO

O teste de micronúcleo *in vitro* é um teste para a detecção de micronúcleos no citoplasma de células interfásicas (FENECH, 2000; OECD TG 487, 2016). Os micronúcleos são pequenos corpos de cromatina extranucleares circundados por um invólucro nuclear, podem ser originários de fragmentos cromossômicos acêntricos (clastogênicos), ou cromossomos inteiros (aneugênicos) que não conseguiram migrar para os polos durante o estágio de anáfase da divisão celular. Esses fragmentos de cromossomos ou cromossomos inteiros são envolvidos por uma membrana nuclear, os quais são morfologicamente similares aos núcleos após à coloração nuclear convencional (HINTZSCHE et. al., 2017). Portanto, o teste de micronúcleo é um método *in vitro* que fornece uma base abrangente para investigar potenciais danos cromossômicos *in vitro* resultantes de agentes tanto aneugênicos quanto clastogênicos (KIRSCH-VOLDERS, 1997; PARRY, et. al., 1993). Agentes clastogênicos induzem fragmentos cromossômicos e agentes aneugênicos interferem no aparato mitótico e, principalmente, levam a segregação de cromátides ou cromossomos inteiros durante a mitose (HINTZSCHE et. al., 2017).

As diretrizes para o teste de micronúcleo *in vitro* para células de mamíferos (OECD TG 487) permitem o uso de protocolos com e sem o inibidor de

polimerização de actina citocalasina β (cyto β). A cyto β inibe a polimerização dos filamentos de actina, assim, durante a divisão celular inibe o processo de citocinese resultando em células binucleadas e permitindo a identificação e análise de micronúcleos apenas nas células que completaram a mitose (FENECH, 2000). Para a execução do teste sem utilizar a cyto β deve-se buscar por evidências de que a população de células analisadas tenha sofrido mitose, no entanto quando se usa a cyto β é necessário apenas contabilizar o número de células binucleadas e a incidência de células micronucleadas (OECD TG487, 2016).

Além disso, o uso de cyto β possibilita a avaliação das frequências relativas de células mononucleadas, binucleadas e multinucleadas na cultura fornece um método preciso para quantificar o efeito sobre a proliferação celular e a atividade citotóxica ou citostática de um tratamento, e assegura que apenas células divididas durante ou após o tratamento sejam classificadas. Assim, recomenda-se a medição do índice de proliferação de bloqueadores de citocinese (CBPI) e o Índice de Replicação (RI) para estimar a atividade citotóxica e citostática de um tratamento comparando os valores nas culturas tratadas com o controle (OECD TG487, 2016).

Sistemas de metabolização exógenos devem ser usados quando se empregam células com capacidade metabólica endógena inadequada, sendo o mais comumente recomendado é a fração pós-mitocondrial suplementada pelo co-fator, mix S9 (OECD TG487, 2016). O mix S9, uma fração metabólica do fígado, é usada para fornecer enzimas de metabolização de xenobióticos às células em cultura (WHALLEY et. al., 2017). Quando junto a ciclofosfamida é capaz de ativar genotóxicas (WESTERINK et. al., 2011). Este é geralmente utilizado em concentrações que variam de 1-2% (v/v) e no máximo durante 6 h de exposição às células, em virtude de ser tóxico (OECD TG487, 2016).

O teste de micronúcleo pode ser realizado em linhagens celulares imortalizadas ou linhagens primárias. Células geneticamente instáveis apresentam taxa mais altas e mais variáveis de aberrações cromossômicas (REGISTRE & PROUDLOCK, 2016). Recomenda-se a utilização de tipos celulares com uma frequência de formação de micronúcleos estável e conhecida, visto que a frequência de micronúcleos influenciará na sensibilidade do teste. As células são selecionadas quanto a sua capacidade de crescimento em cultura, estabilidade de seu cariótipo e frequência espontânea de micronúcleo (OECD TG487, 2016). As células CHO é

uma das linhagens mais utilizadas em avaliações *in vitro* de micronúcleo e recomenda pelo OECD TG 487 (BEEDANAGARI et. al., 2014; OECD TG487, 2016).

A avaliação pelo ensaio de micronúcleo é uma maneira simples e barata de se investigar casos de danos ao DNA nas células, após a exposição a um determinado tratamento e fixação em lâminas, as células binucleadas são observadas diretamente em microscópio (em aumento de 200-400x; BEEDANAGARI et. al., 2014).

Além da avaliação da frequência de micronúcleos, pode-se investigar por outros biomarcadores de eventos genotóxicos e instabilidade cromossômica tais como a constância de pontes nucleoplásmicas e gemas nucleares (BUD) (FENECH et. al., 2011). As pontes nucleoplásmicas são formadas a partir de cromossomos dicêntricos, que podem ocorrer devido a erros de quebra de DNA, fusões terminais dos telômeros e podem ser observadas quando há separação defeituosa das cromátides irmãs na anáfase. Já no caso das gemas nucleares, essas representam o processo de eliminação de DNA amplificado, complexos de reparo de DNA e possivelmente excesso de cromossomos de células aneuplóides (KIRALY et. al., 2017).

Os ensaios de micronúcleos também são amplamente utilizados no biomonitoramento humano como um indicador de exposição *in vivo* à genotoxinas e um indicador de instabilidade genômica (HINTZSCHE et. al., 2017). Associações foram descritas entre a frequência de micronúcleos em linfócitos humanos e o risco de câncer de uma população (MAFFEI et. al., 2014).

Estudos avaliando os efeitos genotóxicos das TiO₂NPs em células de mamíferos ainda são incipientes (HINTZSCHE et. al. 2017) e inexistente para fibroblastos bovinos. Portanto, é necessário investigar os efeitos da interação desses NMs com diferentes tipos celulares utilizando NMs padronizados internacionalmente.

3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* de nanopartículas de dióxido de titânio (TiO₂NP) em células de mamíferos.

3.2 ESPECÍFICO

- Caracterizar a estrutura físico-química da TiO₂NP.
- Avaliar *in vitro* a morfologia e viabilidade celular de fibroblastos bovinos e células de ovário de hamster chinês (CHO) expostos a diferentes concentrações de TiO₂NP (0,1; 1; 5 e 10 µg/mL);
 - Investigar *in vitro* o estresse oxidativo de fibroblastos bovinos e CHO expostos a diferentes concentrações de TiO₂NP (0,1; 1; 5 e 10 µg/mL);
 - Estudar *in vitro* o potencial genotóxico da TiO₂NP em células fibroblastos bovinos e CHO cultivados.

4 METODOLOGIA

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS

4.1.1 DISPERSÃO DAS NANOPARTÍCULAS

As TiO₂NPs utilizadas são um material de referência enviados para estudos interlaboratoriais do projeto NANoREG, provenientes da Joint Research Centre (JRC) (NM01001a, União Europeia). Essas NPs foram previamente caracterizada pelo fornecedor por microscopia eletrônica de transmissão e apresentam tamanho primário da partícula de 5-6 nm, distribuição do tamanho da partícula 95% menor que 100 nm, 77% menor que 50 nm e 11% menor que 10 nm, área superficial de 170/316 m²/g e são do tipo anatase (JRC Nanomaterials Repository, 2014).

Para a realização dos ensaios as TiO₂NPs foram dispersas em meio de cultura celular de acordo com a linhagem utilizada. O meio Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) (Sigma Aldrich, EUA) foi utilizado para o cultivo de CHO e Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma Aldrich, EUA) para os fibroblastos bovinos. As TiO₂NPs (1000 µg/ml) foram sonicadas por 16 min no Branson Sonifier S-450 (Branson, EUA) a 400 Watt e, posteriormente os tratamentos foram preparados nas concentrações de 0,1 µg/mL; 1µg/mL; 5 µg/mL e 10 µg/mL. Essas concentrações foram determinadas a partir do trabalho de Virgilio, et. al. (2010), no qual concentrações acima de 10 µg/mL de TiO₂NP apresentavam muitos agregados, dificultando a observação das células e impossibilitando a contagem dos micronúcleos.

4.1.2 ESPECTROSCOPIA DE INFRAVERMELHO

Os espectros de absorção na região do infravermelho foram obtidos em um espectrofômetro Bomem FTIR MB-102 (Bomem, Canadá), no Departamento de Química da UFJF. Estes foram realizados na região de 4000cm⁻¹ a 200cm⁻¹ utilizando pastilhas de KBr previamente dessecado a 500°C.

4.1.3 ESPECTROSCOPIA RAMAN

As medidas Raman foram realizadas em um espectrômetro Bruker RFS 100 (Bruker, EUA) excitado com um laser Nd³⁺/YAG a 1064 nm, equipado com um detector InGaAs arrefecido com nitrogênio líquido localizado no Departamento de Química da UFJF. Os Espectros foram adquiridos com resolução de 4 cm⁻¹ e uma média de 512 varreduras foram coletadas com uma potência de laser de 80 mW. As TiO₂NPs foram adicionadas a uma suspensão álcool isopropílico/água ultra pura e expostas a ondas ultra-sônicas. Uma gota da suspensão foi colocada na superfície de uma mica e, em seguida, foi desidratada sob atmosfera de nitrogênio antes das análises.

4.1.4 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

Características como tamanho, índice de polidispersão (IPD) e potencial Zeta das TiO₂NPs foram realizadas utilizando a técnica do DLS pelo equipamento Malvern 3000 Zetasizer NanoZS (Malvern, Reino Unido) localizado no Laboratório de Nanotecnologia Aplicada a Saúde e Produção Animal da Embrapa Gado de Leite. Foram avaliadas suspensões de TiO₂NP nas concentrações 0,1µg/mL, 1 µg/mL, 5 µg/mL e 10 µg/mL em três meios diferentes: água deionizada, DMEM-F12, e DMEM-F12 com soro fetal bovino (SFB), todos os meios testados tinham pH 7,0. Antes das análises, as TiO₂NPs foram sonicadas no meio de dispersão por 16 min a 400 Watts (BransonSonifier S-450, EUA).

4.1.5 MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA

As imagens de AFM foram obtidas via modo intermitente em aparelho Nanosurf easyScan 2 (Nanosurf Instruments, Suíça) localizado no Laboratório de Nanotecnologia Aplicada a Saúde e Produção Animal da Embrapa Gado de Leite. As análises foram realizadas em amplitudes de oscilação livres do cantilever (50

mV) e o tamanho da área de varredura da sonda do microscópio foi de 5x5 μm . A resolução da AFM foi de 512x512 pixels, e o comprimento e o raio da ponta foram de 225 μm e <10 nm, respectivamente.

4.2 CITOTOXICIDADE

4.2.1 CULTIVO DAS CÉLULAS *IN VITRO*

Nos ensaios biológicos foram utilizadas linhagens primárias de fibroblastos bovinos pertencentes a um banco de células da Embrapa Gado de Leite, gerado a partir de uma pequena porção de tecido extraído da orelha de vaca Gir, localizada no Campo Experimental José Henrique Bruschi (Embrapa Gado de Leite). As células CHO (ATCC CHO-K1) foram utilizadas como modelo biológico padrão, uma vez que são células imortalizadas padronizadas internacionalmente.

Os fibroblastos bovinos foram cultivadas em meios de cultivo DMEM e as células CHO em DMEM/F12, ambos os meios suplementados com 10% SFB (LGC biotecnologia, Brasil) e 1% de antibiótico (100 UI/mL de penicilina, 100 μg de estreptomicina mL^{-1} , LGC Biotecnologia, Brasil) em estufa com atmosfera umidificada, 5% de CO_2 a 37°C.

4.2.2 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA DE LUZ

O crescimento e a morfologia celular foram observados utilizando-se um microscópio de luz invertido (ICM 405, Zeiss, Alemanha). Utilizando placas de 24 poços, foram plaqueadas $2,5 \times 10^4$ de células CHO e fibroblasto bovino. Após avaliação da adesão das células nas placas, os meios foram trocados por meios de cultura contendo as TiO_2NPs . Foram analisados os seguintes grupos experimentais: 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (controle negativo); 0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TiO_2NPs durante 24h. Para cada tratamento haviam duas repetições.

4.2.3 ENSAIO DE REDUÇÃO DO CORANTE METIL TIAZOL TETRAZÓLIO (MTT)

O ensaio MTT foi realizado da seguinte forma, resumidamente, 6×10^3 células/poço para a linhagem de fibroblasto bovino e 12×10^3 células/poço para CHO foram plaqueados em placas de 96 poços. Após 24 h as células foram colocadas em contato com as TiO₂NPs (0,1 µg/mL; 1 µg/mL; 5 µg/mL e 10 µg/mL) durante 24 h. Sendo que para cada tratamento haviam 6 repetições e o ensaio foi realizado em duplicata. Utilizando esse mesmo ensaio e condições experimentais semelhantes, expomos ambos os tipos celulares aos controles positivos do ensaio de micronúcleo (metil metano sulfonato, ciclofosfamida e colchicina).

Após a exposição, o meio foi retirado e as células incubadas com meio de cultivo contendo MTT (Sigma Aldrich, EUA) à 10% (v/v), durante 4 h. A seguir, esse meio foi retirado para adição de Isopropanol-ácido (0,04 M HCl) a fim de diluir o formazam formado para a leitura no espectrofotômetro (Varioskan Flash Multimode Reader, Thermo Fisher Scientific, EUA) à 570 nm. Os valores de absorbância também foram corrigidos por poço contendo apenas NPs.

4.2.4 ENSAIO DE SUPEROXIDE DISMUTASE (SOD)

As células (CHO e Fibroblastos Bovinos) foram plaqueadas 2×10^4 células por poço, em placas de 24 poços e após 24 h foram expostas às TiO₂NP nas concentrações de 0 µg/mL; 0,1 µg/mL; 1 µg/mL; 5 µg/mL e 10 µg/mL, sendo 3 repetições por grupo e o ensaio em duplicata. Em seguida foi realizado o ensaio de SOD Kit 19160 (Sigma-Aldrich, EUA), conforme o protocolo para análise do SOD intracelular disponibilizado pela Sigma-Aldrich.

4.3 GENOTOXICIDADE

A fim de avaliar o potencial genotóxico das TiO₂NPs foi realizado o ensaio de micronúcleo de acordo com o protocolo da OECD (TG 487) para testes químicos *in vitro*, padronizado para as NPs, em células de mamíferos.

As células de fibroblastos bovinos e CHO foram cultivadas em meios de cultura DMEM e DMEM-F12, respectivamente, com 10% de SFB e 1% de antibiótico em placas de 6 poço, 1 x 10⁵ células por poço, em estufas com 5% de CO₂ a 37° C. Ao longo do experimento, as células foram expostas à diferentes tratamentos (figura 1). No tratamento curto de 3 h, há os grupos contendo o mix S9 (Sigma-Aldrich, EUA), no quais são: ciclofosfamida (controle positivo) (Sigma-Aldrich, EUA) e 0,1µg/mL; 1 µg/mL; 5 µg/mL e 10 µg/mL de TiO₂NP. Bem como, os grupos sem o mix S9, que são: Metil Metano Sulfonato (MMS – controle positivo) (Sigma-Aldrich, EUA), Colchicina (controle positivo) (Sigma-Aldrich, EUA), 0,1 µg/mL; 1 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL de TiO₂NP e o controle negativo (0 µg/mL de TiO₂NP). Em seguida as células foram mantidas por 24 h em meio de cultura com Cyto β a 3 µg/mL (Sigma-Aldrich, EUA).

O tratamento longo com Cyto β por 24 h de exposição aos grupos de ciclofosfamida (controle positivo, agente clastogénico), Metil Metano Sulfonato (MMS – controle positivo, agente clastogénico), Colchicine (controle positivo, agente aneugénico), TiO₂NP (0,1 µg/mL; 1 µg/mL; 5 µg/mL; 10 µg/mL) e controle negativo.



Figura 1 – Esquema do tempo de exposição dos diferentes tratamentos para o teste de micronúcleo.

Após o período de exposição, as células foram fixadas e as lâminas preparadas para posterior observação ao microscópio de luz. Inicialmente, as células cultivadas *in vitro* foram tripsinizadas e centrifugadas a 120 g por 5 min. A seguir, o sobrenadante foi descartado e adicionado 300 µL de KCl (0,075 M) e novamente centrifugado a 1000 rpm durante 5 min e o sobrenadante descartado ao final. Posteriormente, as células foram ressuspensas em 100 µL do fixador Carnoy I (etanol: ácido acético, 3:1 v/v), e a seguir o esfregamento foi realizado. Após a

secagem das lâminas, as mesmas foram colocadas por 10 seg na solução diafanizadora (45% de ácido acético em água destilada), em seguida as lâminas foram coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich, 0.4% w/v em Metanol) 5% (v/v) em água deionizada por 10 min.

Durante a análise das lâminas foi contabilizado o número de células binucleadas, mononucleadas e multinucleadas (o total de 500 células por grupo) a fim de obter o índice de Proliferação de Bloqueador de Citocinese (CBPI), o qual estima o número médio de núcleos por célula, indica se estava ocorrendo a proliferação celular e o Índice de Replicação (RI). O RI indica o número relativo de ciclos celulares por células durante o período de exposição comparadas com o controle e pode ser utilizada para calcular a porcentagem de citostasia (inibição do crescimento celular) (TG487-OECD, 2014). Enquanto para a determinação da frequência de micronúcleo, foram analisadas 2000 células binucleadas por grupo distinguindo entre com ou sem micronúcleo.

$$\text{CBPI} = \frac{((\text{N}^\circ \text{ de cél. monucleadas}) + (2 \times \text{N}^\circ \text{ de cél. binucleadas}) + (3 \times \text{N}^\circ \text{ de cél. multinucleadas}))}{(\text{N}^\circ \text{ total de células})}$$

$$\text{RI} = \frac{((\text{N}^\circ \text{ de cél. binucleadas}) + (2 \times \text{N}^\circ \text{ de cél. multinucleadas})) / (\text{N}^\circ \text{ total de células})_T}{((\text{N}^\circ \text{ de cél. binucleadas}) + (2 \times \text{N}^\circ \text{ de cél. multinucleadas})) / (\text{N}^\circ \text{ total de células})_C} \times 100$$

Figura 2 – Fórmulas utilizadas para o cálculo do CBPI e RI de acordo com o TG487-OECD.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados provenientes dos ensaios de MTT e SOD foram submetidos a análise estatística por ANOVA e as médias comparadas pelo teste de Tukey, valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados foram apresentados como médias \pm erro padrão da média. Os dados do ensaio de micronúcleo foram analisados comparando os grupos tratados com o controle pelo teste do Qui-Quadrado com nível de significância de 5%.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULASS

5.1.1 ESPALHAMENTO DE LUZ DINÂMICO

De acordo com os resultados do Potencial Zeta, em água deionizada as suspensões de TiO₂NPs se mostraram instáveis com valores próximos de zero (Tabela 1). Porém, quando as NPs foram dispersas em meio de cultura, houve um aumento dos valores de Potencial Zeta, destacando-se o DMEM/F12 sem SFB quando os valores foram em média -21,62 mV, sendo a condição onde a NP mostrou-se estar mais próximo de estável, ± 30 mV (SAPSFORD et. al., 2011).

Em alguns tratamentos, os valores de IPD foram maiores que 0,7, como em 5 $\mu\text{g/mL}$ (água deionizada), 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (DMEM/F12), 1 e 5 $\mu\text{g/mL}$ (DMEM/F12 + SFB) de TiO₂NP, indicando heterogeneidade na amostra (Tabela 1). Além disso, com 10 $\mu\text{g/mL}$ de TiO₂NP (em água deionizada e DMEM/F12) os valores foram de populações quase monodispersas. No caso das suspensões de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ (água deionizada), 5 $\mu\text{g/mL}$ (DMEM/F12), 0,1 e 10 $\mu\text{g/mL}$ (DMEM/F12 + SFB) de TiO₂NP apresentaram população com média polidispersão.

Tabela 1 – Resultados obtidos pelo espalhamento de luz dinâmico nas concentrações de 0,1 $\mu\text{g/mL}$; 1 $\mu\text{g/mL}$; 5 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$ de TiO₂NPs suspensas em água deionizada, meio de cultivo (DMEM/F12) com e sem SFB, em todos os meios com pH 7,0.

Grupos		Tamanho Hidrodinâmico (nm)	IPD	Potencial Zeta (mV)
Água Deionizada	0,1 $\mu\text{g/mL}$ TiO ₂	668,5 \pm 32,1	0,526 \pm 0,05	-3,5 \pm 0,4
	1 $\mu\text{g/mL}$ TiO ₂	576,5 \pm 28,9	0,395 \pm 0,02	-11,8 \pm 0,1
	5 $\mu\text{g/mL}$ TiO ₂	799,8 \pm 408,0	0,854 \pm 0,48	-0,1 \pm 0,5
	10 $\mu\text{g/mL}$ TiO ₂	1246,7 \pm 5,8	0,277 \pm 0,02	-1,4 \pm 0,04
DMEM/F12	0,1 $\mu\text{g/mL}$ TiO ₂	1330,3 \pm 167,1	0,753 \pm 0,11	-22,3 \pm 0,7
	1 $\mu\text{g/mL}$ TiO ₂	1184 \pm 44,5	0,530 \pm 0,01	-20,6 \pm 1,7
	5 $\mu\text{g/mL}$ TiO ₂	1145 \pm 65,1	0,352 \pm 0,08	-22,2 \pm 1,4
	10 $\mu\text{g/mL}$ TiO ₂	1226,7 \pm 5,8	0,266 \pm 0,04	-21,4 \pm 1,2
DMEM/F12 + SFB	0,1 $\mu\text{g/mL}$ TiO ₂	20,8 \pm 0,1	0,534 \pm 0,001	-15,8 \pm 2,1
	1 $\mu\text{g/mL}$ TiO ₂	57,6 \pm 7,5	0,738 \pm 0,14	-16,4 \pm 1,5
	5 $\mu\text{g/mL}$ TiO ₂	309,8 \pm 33,4	0,751 \pm 0,07	-14,2 \pm 1,8
	10 $\mu\text{g/mL}$ TiO ₂	444,8 \pm 16	0,466 \pm 0,06	-13,3 \pm 1,4

Nas suspensões de água deionizada e DMEM/F-12 os tamanhos hidrodinâmicos das TiO₂NPs variaram entre 500 e 1300 nm, no entanto, quando em DMEM/F12 com SFB os tamanhos foram menores (Tabela 1). Quando em meio

DMEM/F12 com SFB, as concentrações de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$ de TiO_2NP resultaram em valores de 20 nm e 57,6 nm, respectivamente.

5.1.2 RAMAN E INFRAVERMELHO

As bandas observadas no espectro Raman obtido em 639 cm^{-1} , 517 cm^{-1} e 395 cm^{-1} (Figura 3) podem ser atribuídas aos modos ativos B_{1g} , A_{1g}/B_{1g} e E_g , respectivamente (ARSOV et. al., 1991).

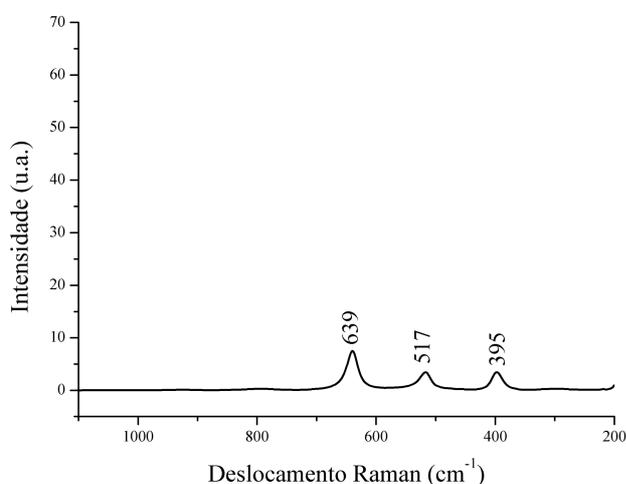


Figura 3 – Espectro Raman obtido para a nanopartícula de dióxido de titânio.

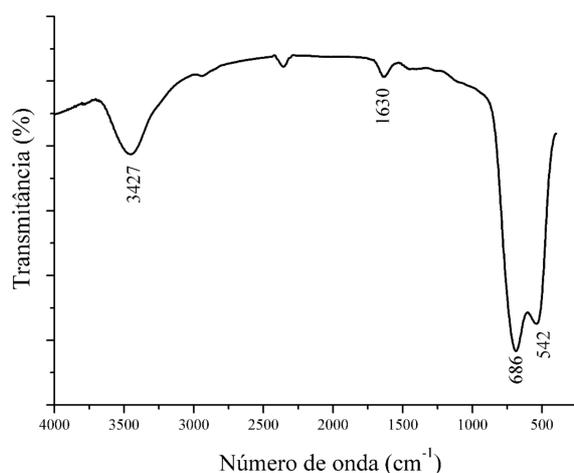


Figura 4 – Espectro na região do infravermelho obtido para a nanopartícula de dióxido de titânio.

As bandas largas observadas, no espectro obtido na região do infravermelho, em 542 cm^{-1} e 686 cm^{-1} (Figura 4) estão associadas à vibração TO das ligações Ti-O; enquanto, a banda notada em 3427 cm^{-1} , sugere a presença de superfícies hidroxiladas, causadas pelas interações de hidrogênio entre grupos OH de superfície do dióxido de titânio com oxidação +2, e a água molecular com vibrações em 1630 cm^{-1} (HUANG et. al., 2010; SCHEUERMANN et. al., 2016).

5.1.3 MICROSCÓPIO DE FORÇA ATÔMICA

De acordo com as imagens obtidas por AFM, as TiO_2NPs encontram-se sob variadas geometrias e tamanhos (Figura 5), destacando-se a formas cilíndricas, cúbicas e piramidais.

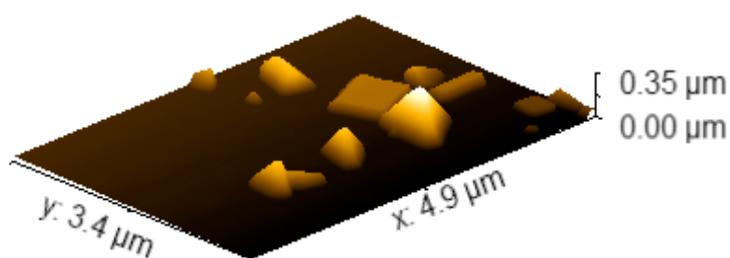


Figura 5 – Imagem representativa das TiO₂NP por meio da Microscopia de Força Atômica.

5.2 ENSAIO CITOTÓXICO

5.2.1 AVALIAÇÃO POR MICROSCOPIA DE LUZ

Nas Figuras 6 e 7 pode-se observar o crescimento e a morfologia celular dos fibroblastos bovinos e CHO após exposição as TiO₂NP nas concentrações de 0 μg/mL; 0,1 μg/mL; 1 μg/mL e 5 μg/mL. Nestes tratamentos pode-se verificar que a morfologia típica de ambas as células não foram alteradas e cresceram em monocamada aderente.

No entanto, na concentração de 5 e 10 μg/mL de TiO₂NP nota-se a presença de agregados das TiO₂NP. Bem como, a mudança na morfologia na maior concentração testada.

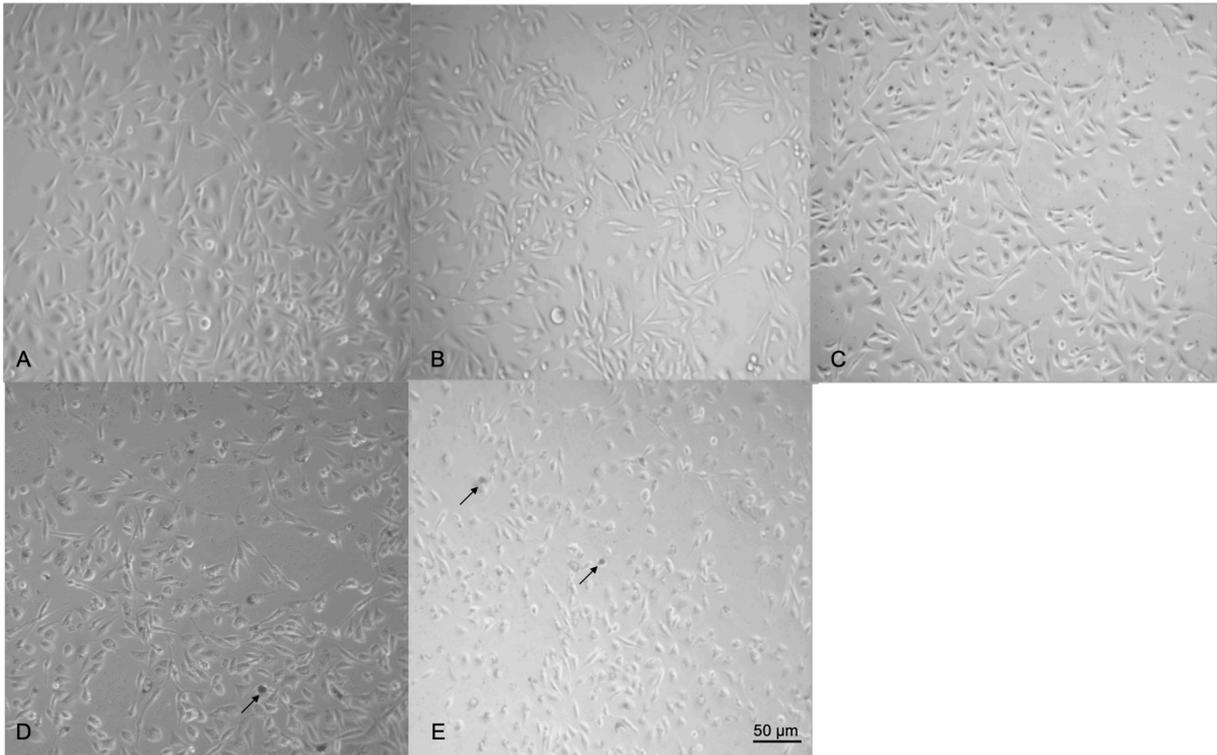


Figura 6 – Imagem representativa da morfologia de células CHO durante 24 h de exposição aos tratamentos com TiO₂NP, controle (A), 0,1 µg/mL (B), 1 µg/mL (C), 5 µg/mL (D), 10 µg/mL (E). A seta indica os agregados. Aumento 100x.

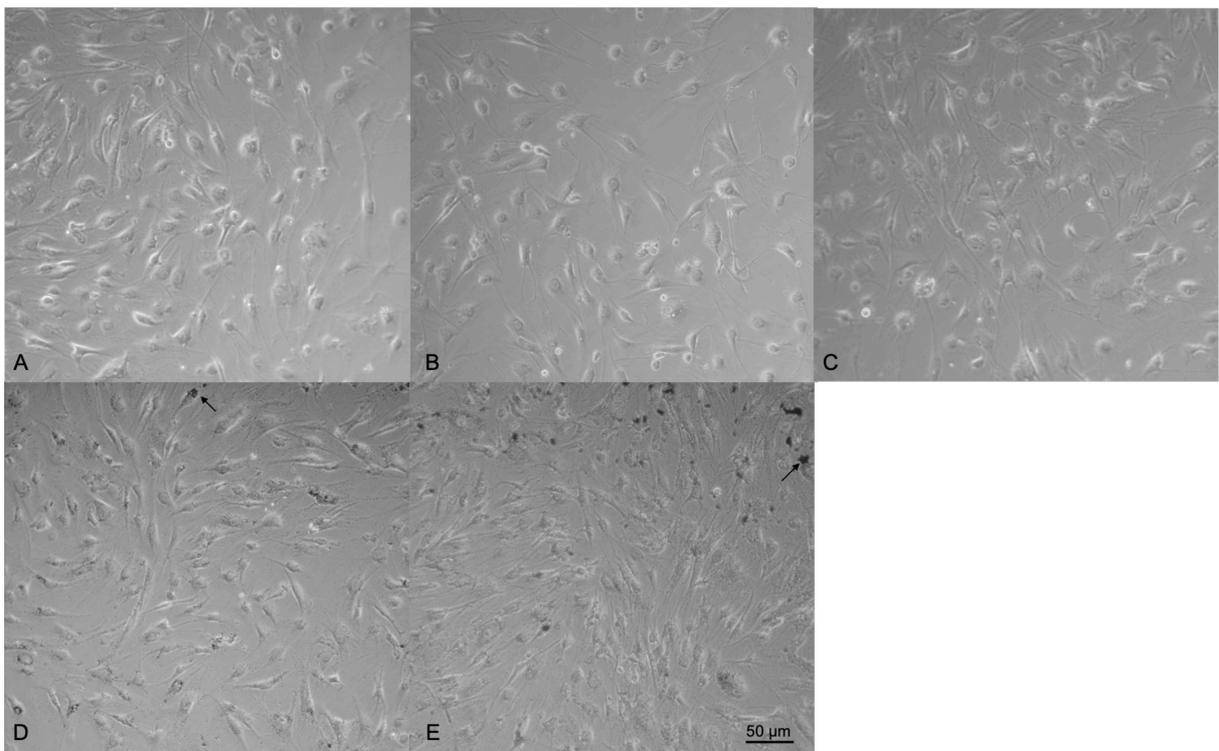


Figura 7 – Imagem representativa da morfologia de células fibroblasto bovino durante 24 h de exposição aos tratamentos com TiO₂NP, controle (A), 0,1 µg/mL (B), 1 µg/mL (C), 5 µg/mL (D), 10 µg/mL (E). A seta indica os agregados. Aumento 100x.

5.2.2 MTT

A exposição às TiO₂NPs por 24h à CHO não afetou a viabilidade celular ($P>0,05$) nas concentrações de 1, 5 e 10 µg/mL (Figura 8), contudo foi observado aumento da absorbância quando expostas a concentração de 0,1 µg/mL, em relação ao grupo controle ($P<0,05$) indicando um aumento da viabilidade celular. Em fibroblastos bovinos, as TiO₂NP nas concentrações de 0,1; 1; 5; 10 µg/mL por 24 h não alterou a viabilidade celular ($P>0,05$) (Figura 8).

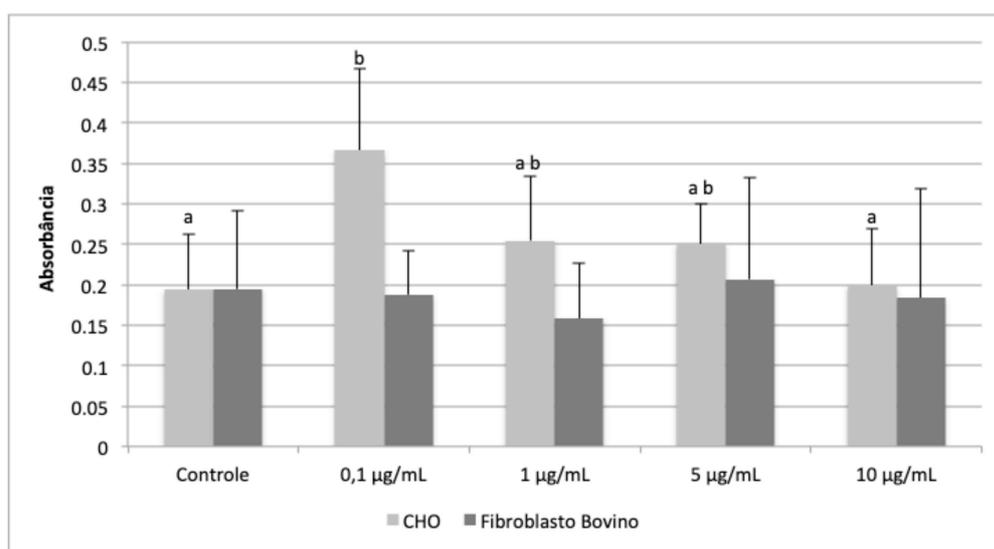


Figura 8 – Viabilidade celular de CHO e Fibroblastos Bovinos pelo ensaio de MTT expostos as TiO₂NPs por 24 h. O dados foram avaliados por ANOVA post-hoc de Tukey ($P<0,05$) entre células da mesma linhagem. Médias seguidas de mesma letra não diferem estatisticamente entre si. Leitura realizada na absorbância de 570 nm.

Posteriormente, o ensaio de MTT foi utilizado para definir quais concentrações dos controles positivos utilizados no ensaio de micronúcleo poderiam afetar a viabilidade celular (Figura 9). As concentrações escolhidas de acordo com outros estudos na literatura foram 10 e 20 µg/mL de metil metano sulfonato, 0,2 e 0,02 µg/mL de colchicina e 5 e 10 µg/mL de ciclofosfamida (GARRIOTT, et. al., 2002; PHELPS, et. al., 2002). No presente estudo, as concentrações definidas foram 10 µg/ml de MMS, 0,2 µg/mL de Colchicina e 10 µg/mL de Ciclofosmamida, já que essas não comprometeram a viabilidade celular.

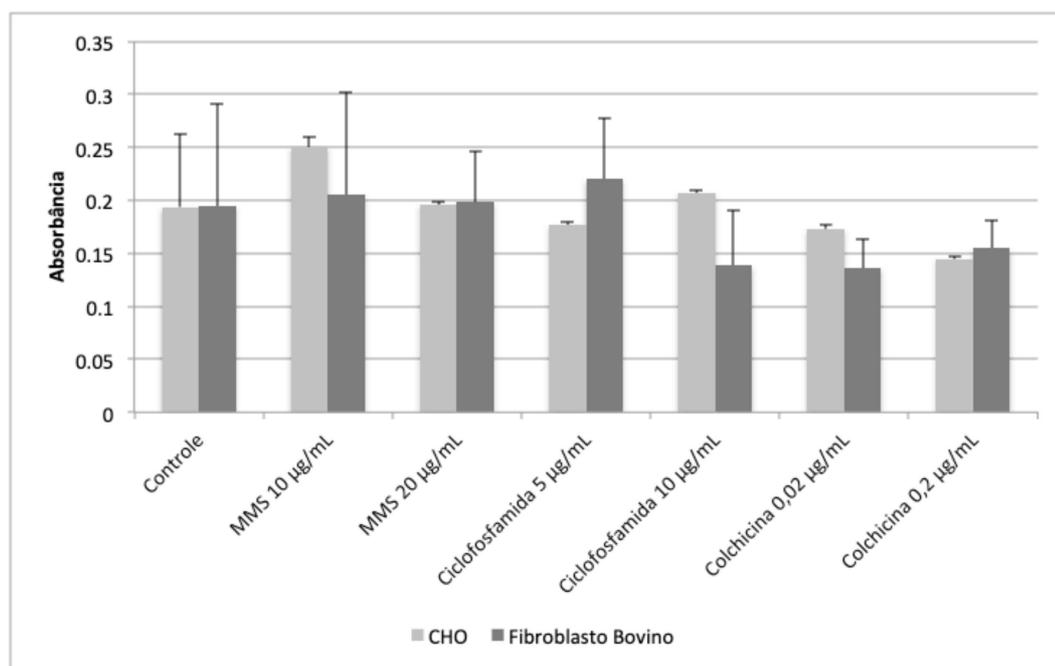


Figura 9 – Viabilidade celular de CHO e fibroblasto bovinos pelo ensaio de MTT expostas aos controles positivos do teste de micronúcleo. Os dados foram avaliados por ANOVA post-hoc de Tukey ($P < 0,05$) entre células de mesma linhagem. Leitura realizada na absorbância de 570 nm.

5.2.2 SOD

De acordo com a análise da atividade da SOD em células CHO e fibroblastos bovinos, as concentrações de 0,1; 1; 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$ de TiO_2NPs por 24h não mostraram diferenças entre os tratamentos para cada linhagem celular ($P > 0,05$; Figura 10).

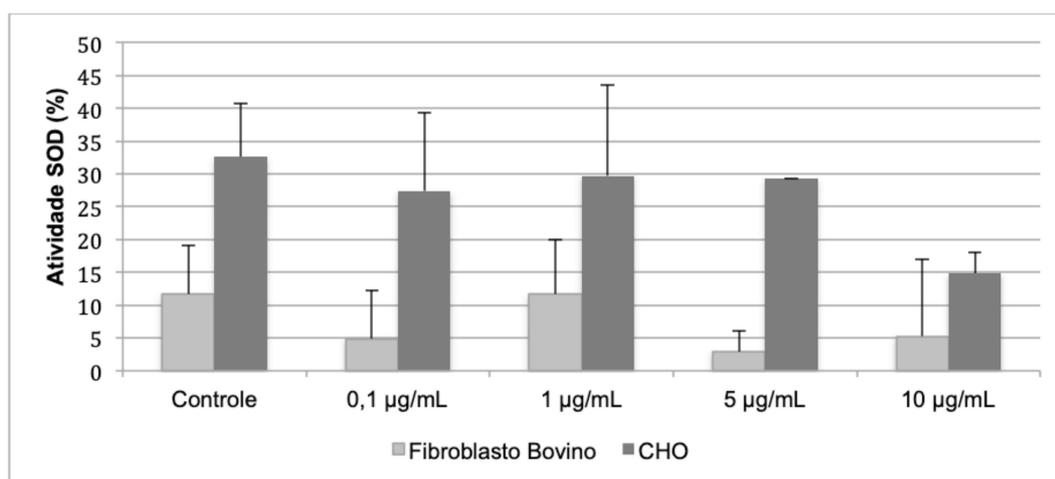


Figura 10 – Ensaio para avaliar a atividade da enzima SOD em células CHO e fibroblasto bovino durante 24 h de exposição aos tratamentos de TiO_2NP . Os dados foram avaliados por ANOVA post-hoc de Tukey ($P < 0,05$) entre células de mesma linhagem. Leitura realizada na absorbância de 570 nm.

5.3 GENOTOXICIDADE

Os valores do CBPI podem ser observados nas tabelas 2 e 3. Os dados para CBPI estão relacionados ao RI demonstrando que as células em cultivo nas diferentes concentrações testadas estavam em crescimento, já que os valores de RI foram em média de 100%, indicando que maioria das células estavam em divisão. Os valores do CBPI foram maiores que 1 (valor igual a 1 indica 100% de citostasia), sugerindo que nem todas as células analisadas eram do tipo mononucleada, ou seja, estavam em processo de divisão celular.

Tabela 2 – Dados do CBPI do tratamento curto em células CHO e fibroblasto bovino.

Grupos	CBPI	
	Fibroblasto Bovino	CHO
Colchicina	1,63	1,85
Ciclofosfamida + S9	0,00	1,75
MMS	1,57	1,78
Controle	1,65	1,87
0,1 µg/mL	1,59	1,80
1 µg/mL	1,61	2,01
5 µg/mL	1,69	1,90
10 µg/mL	1,68	1,66
0,1 µg/mL +S9		1,96
1 µg/mL +S9		1,77
5 µg/mL +S9		1,77
10 µg/mL +S9		1,86

Tabela 3 – Dados do CBPI do tratamento longo das células CHO e fibroblasto bovino.

Grupos	CBPI	
	Fibroblasto Bovino	CHO
Colchicina	1,67	1,86
Ciclofosfamida	1,73	1,85
MMS	1,60	1,87
Controle	1,59	1,87
0,1 µg/mL	1,73	1,84
1 µg/mL	1,58	1,82
5 µg/mL	1,67	1,92
10 µg/mL	1,77	1,93

Com relação a frequência de células binucleadas no tratamento curto (3h), foi observado que a concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de TiO_2NP com e sem o S9 mostrou-se ser genotóxica para as células CHO (($P < 0,05$; Figura 11). Quando expostas ao tratamento longo as concentrações de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ e 1 $\mu\text{g/mL}$ de TiO_2NP também aumentaram a frequência de micronúcleos em CHO (($P < 0,05$; Figura 11). Contudo, em fibroblastos bovinos expostos as mesmas condições (Figura 12), não foram observadas diferenças nas frequências de micronúcleos no tratamento curto ($P > 0,05$), mas no tratamento longo na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ houve redução do número de micronúcleos ($P < 0,05$).

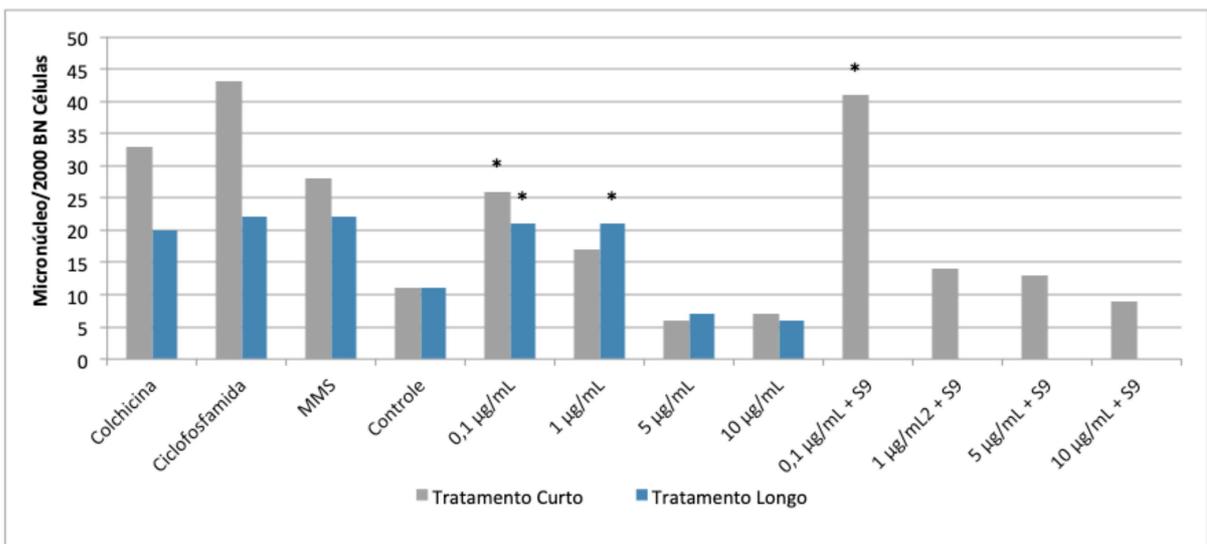


Figura 11 – Frequência de micronúcleos em células CHO após o tratamento curto (3h) e longo. Os resultados foram analisados por teste Qui-Quadrado, com nível de significância de 5%, tendo como número amostral 2.000 células.

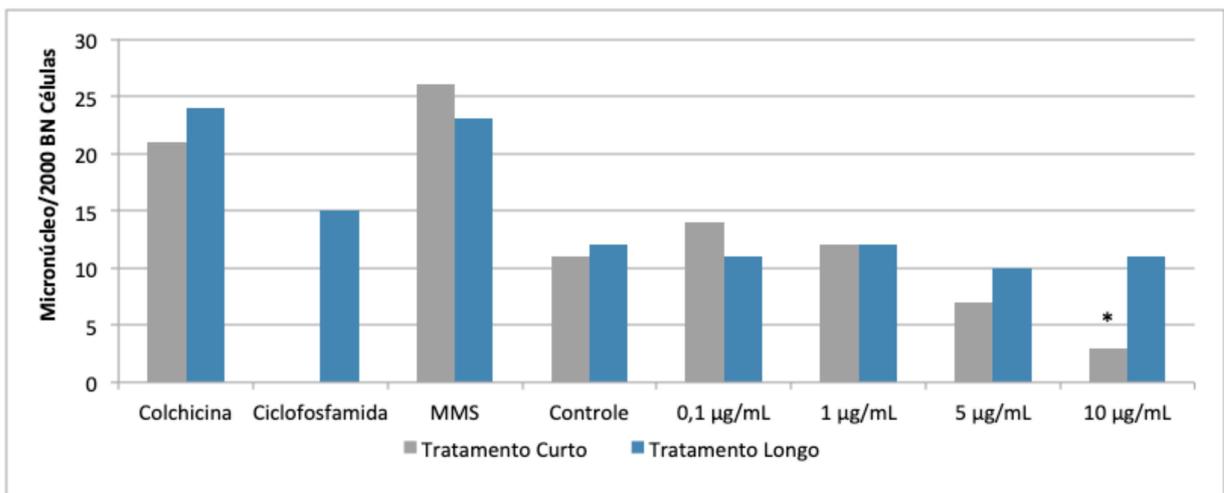


Figura 12 – Frequência de micronúcleos em células fibroblasto bovino após o tratamento curto (3h) e longo. Os resultados foram analisados por teste Qui-Quadrado, com nível de significância de 5%, tendo como número amostral 2.000 células.

Dados relativos à exposição de fibroblastos bovinos à 0,1 µg/mL, 1 µg/mL, 5 µg/mL, 10 µg/mL e ciclofosfamida (tratamento curto) contendo S9 não foram apresentados em razão da toxicidade do S9 que, possivelmente, afetou as células. Quando esses poços foram analisados por microscopia de luz as células se encontravam pouco aderidas e com morfologia alterada (dados não demonstrados).

Na figura 13, podemos observar imagens representativas de uma das lâminas analisadas, no qual destaca-se a presença de células binucleadas com micronúcleos e os agregados de NPs. Nota-se que os agregados da concentração de 10 µg/mL se localizam no citoplasma (Figura 13.A), e que se assemelham em tamanho aos micronúcleos. Entretanto esses agregados podem ser diferenciados pela cor, uma vez que os micronúcleos apresentam coloração roxa por causa da Giemsa e as NPs são pretas. Esses agregados provavelmente estão internalizados no citoplasma ou adsorvidos por proteínas na membrana.

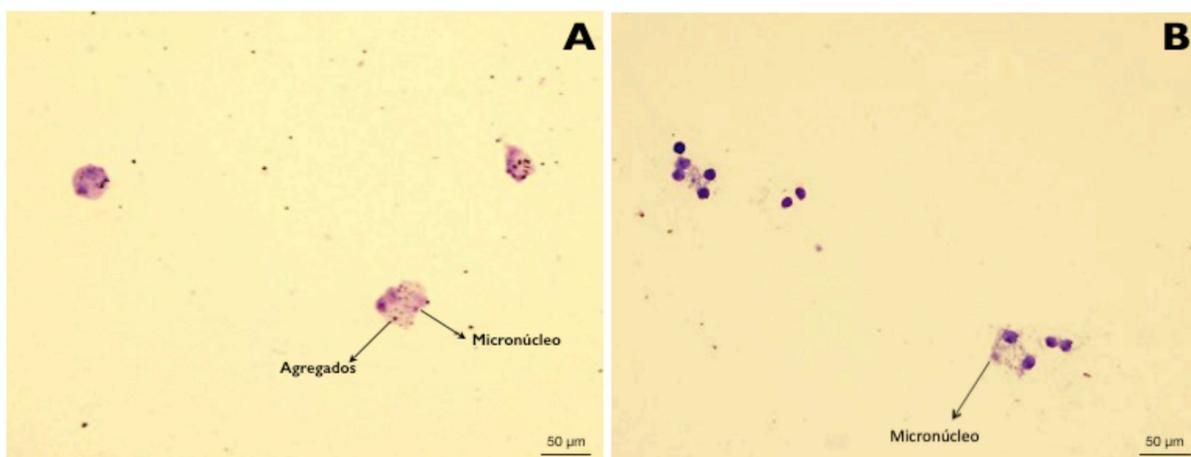


Figura 13 – Imagens representativas do ensaio de micronúcleo de CHO. (A) 10 µg/mL TiO₂NP + S9, aumento de 100x; (B) 0,1 µg/mL TiO₂NP, aumento de 100x.

Imagens do ensaio de micronúcleos de fibroblasto bovino estão representadas na figura 14, onde são observados células binucleadas e micronúcleos. Foram utilizados o mesmo protocolo de montagem de lâminas para ambos os tipos celulares e, apesar de serem de diferentes linhagens, o protocolo de montagem da lâmina utilizado foi adequado para ambas as linhagens celulares.

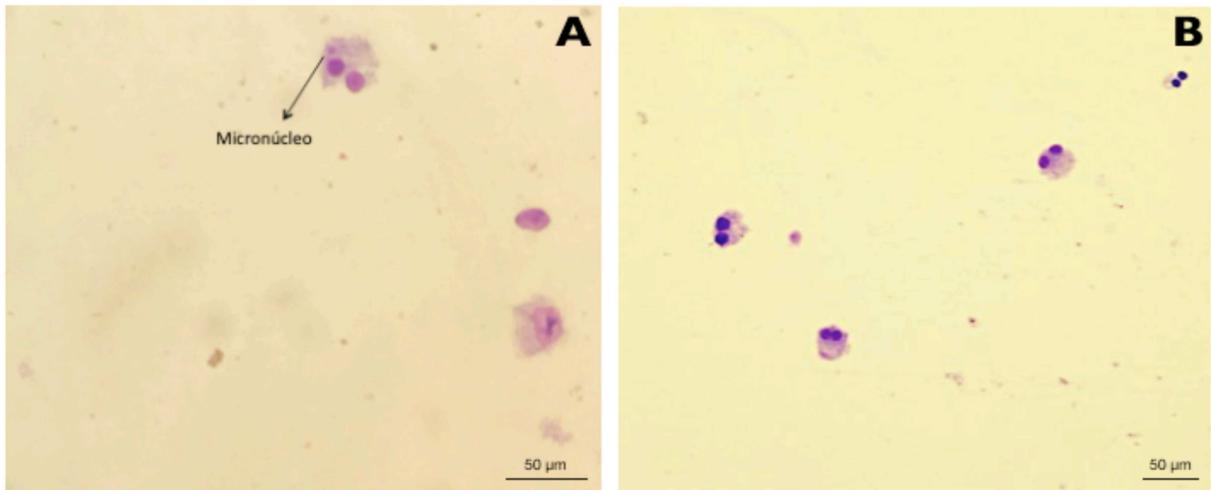


Figura 14 – Imagem representativa do ensaio de micronúcleo de fibroblasto bovino. (A) Controle positivo MMS, aumento 400x; (B) Controle positivo Colchicina, aumento de 100x.

De acordo com as tabelas 4 e 5, nota-se o número de pontes e BUD (gemas nucleares) numa amostra de 2.000 células entre os tratamentos das linhagens celulares CHO e fibroblasto bovino, respectivamente. No tratamento curto em CHO, o número de pontes mostra-se superior ao número de BUD quando comparado por grupo, exceto no grupo 1 $\mu\text{g/mL}$ + S9. Entre os valores do tratamento longo, nota-se que os valores para BUD e ponte diminuí entre os grupos, quando comparado ao tratamento curto. Além disso, o número de pontes mostra-se superior ao número de BUD quando comparado por grupo, exceto nos grupos 0,1 $\mu\text{g/mL}$, 5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, colchicina e ciclofosfamida. De modo geral, ao compararmos os valores de BUD e ponte por grupo em CHO, os valores dos números de pontes mostra-se maior na maioria dos grupos (tabela 4).

Tabela 4 – Número de Pontes e BUD contabilizadas na amostra de 2.000 células, entre os tratamentos de CHO.

Tratamento Curto	Ponte	BUD	Tratamento Longo	Ponte	BUD
0,1 µg/mL	8	6	0,1 µg/mL	6	7
1 µg/mL	11	6	1 µg/mL	5	0
5 µg/mL	8	6	5 µg/mL	1	3
10 µg/mL	11	6	10 µg/mL	0	1
0,1 µg/mL + S9	12	7	Controle	3	2
1 µg/mL2 + S9	11	13	MMS	14	3
5 µg/mL + S9	13	11	Colchicina	2	5
10 µg/mL + S9	13	8	Ciclofosfamida	4	7
Controle	10	5			
MMS	13	10			
Colchicina	12	8			
Ciclofosfamida + S9	10	6			

No tratamento curto em fibroblasto bovino (tabela 5), os maiores valores são observados na coluna de BUD quando se compara ponte e BUD nos grupos, exceto o grupo controle. Entre os grupos no tratamento longo é visualizado a prevalência de valores maiores em BUD, exceto em 1 µg/mL e ciclofosfamida.

Tabela 5 – Número de Pontes e BUD contabilizadas na amostra de 2.000 células, entre os tratamentos de fibroblasto bovino.

Tratamento Curto	Ponte	BUD	Tratamento Longo	Ponte	BUD
0,1 µg/mL	3	9	0,1 µg/mL	2	4
1 µg/mL	1	8	1 µg/mL	0	1
5 µg/mL	3	5	5 µg/mL	1	8
10 µg/mL	0	1	10 µg/mL	1	9
Controle	4	1	Controle	3	9
MMS	1	6	MMS	4	8
Colchicina	1	6	Colchicina	13	21
			Ciclofosfamida	5	1

6 DISCUSSÃO

De acordo com os tamanhos hidrodinâmicos apresentados na tabela 1, foi observado agregação das TiO₂NPs na maioria dos meios testados, exceto nas concentrações de 0,1 µg/mL (20,8 ± 0,1 nm) e 1 µg/mL (57,6 ± 7,5 nm) quando em meio de cultura suplementado com SFB. Apesar dos menores valores terem sido observados nas menores concentrações, no qual as NPs ficam mais dispersas, os constituintes do meio podem influenciar no comportamento das NPs, como agregação e dispersão (JEMEC et al., 2016; TEEGUARDEN et. al., 2007).

Como visto pelos valores do Potencial Zeta as TiO₂NPs em meio de cultura DMEM apresentaram carga negativa. Sabe-se que as NPs podem interagir com íons Ca²⁺ e Mg²⁺ contidos no meio de cultura por meio de forças eletrostáticas (HORIE, et. al., 2009). Dessa forma, os menores valores de tamanho hidrodinâmico encontrados em meio suplementado devem-se as proteínas presentes no SFB, como o caso da albumina, no qual apresenta carga negativa em meio neutro (HORIE, et. al., 2009). Assim, a albumina possivelmente interage com o íon de Ca²⁺ que se associa às TiO₂NPs por meio de forças eletrostáticas, dificultando a interação entre as TiO₂NPs pelas forças de Van der Waals, e, assim, resultando na sua dispersão. Devido a presença do SFB, as TiO₂NPs podem ser revestidas com as proteínas presente neste suplemento (efeito corona), ocasionando na alteração suas propriedades tais como cargas superficiais, agregação e tamanho hidrodinâmico (NEL et. al., 2009).

As agregações das TiO₂NPs visualizadas em água provavelmente ocorrem em razão das moléculas de água que aderem às partículas com energia suficiente para formar camadas em suas superfícies. Assim, as forças de solvatação aumentam a estabilidade "pressão de hidratação" ou "repulsão hidrofílica" (NEL et. al., 2009; LABILLE & BRANT, 2010). Contudo, a desidratação rápida e a agregação ocorrerão se a afinidade relativa de duas superfícies que interagem com as moléculas de água for muito menor do que entre as próprias moléculas de água - uma "atração hidrofóbica" ou "efeito hidrofóbico" (KIM et.al., 2007). Muitos óxidos metálicos hidrolisam na presença de água para formar camadas de hidróxido na superfície. Os grupos de hidroxilo (-OH) polares podem fazer com que a superfície atraia e absorva fisicamente uma única ou várias camadas adicionais de moléculas de água polar, o que confere um caráter hidrofílico ao óxido. Em pH baixo, as

superfícies de hidróxido absorvem os prótons e tornam-se carregadas positivamente, enquanto que em pH alto, a dessorção de prótons induz uma carga superficial negativa (LABILLE & BRANT, 2010). Portanto, os resultados de DLS observados podem ter sido influenciados pela composição dos meios de dispersão.

No presente estudo, as avaliações por espectroscopia de infravermelho confirmam que TiO₂NP apresentam caráter hidrofílico, em razão da presença da banda 3427 cm⁻¹ indicando a interação de hidrogênio dos grupos OH com a superfície do dióxido de titânio, formando várias camadas de moléculas de água.

Os valores mais próximos de ± 30 mV de Potencial Zeta (SAPSFORD et al., 2011) nos diferentes meios testados é devido a composição de íons nos diferentes meios (MURDOCK et. al., 2008; HORIE, et. al., 2009). O meio de cultura é constituído de sais minerais aniônico e catiônico (VAN DER VALK et. al., 2010) além de proteínas, vitaminas e hormônios. De acordo com a interação das NPs com esses constituintes através das forças eletrostáticas e Van der Waals (NEL et. al., 2009) o Potencial Zeta, o qual mede a carga superficial média da superfície da NP, apresentará valores estáveis ou não. No presente estudo, a adição de SFB refletiu na diminuição dos valores de Potencial Zeta. Logo, os componentes do SFB devem estar interagindo por afinidade eletrostática com os sais minerais disponíveis no meio de cultura.

Os resultados da AFM indicam que as TiO₂NPs apresentam diferentes tamanhos e formas, no qual corroboram com os resultados do DLS, onde em diferentes meios (água destilada, meio cultivo com ou sem SFB) apresentaram heterogeneidade da distribuição dos tamanhos em todas as dispersões analisadas. As diferentes formas geométricas das TiO₂NP podem implicar em diferenciadas influências destas sobre a célula sendo capaz de agir em várias vias metabólicas celulares (CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016).

As TiO₂NPs utilizadas são materiais de referência disponibilizadas pela União Europeia (JRCNM01001a). Apesar da padronização da síntese, de modo a apresentarem características uniformes, foi observado a partir da análise de AFM das TiO₂NPs, a presença de NPs com diversos tamanhos e formas. A forma da NP pode influenciar na toxicidade, visto que algumas formas, como a esfero-cilíndrica, exibem uma maior capacidade de translocação dentro das células do que as esféricas, piramidais, cúbicas e cônicas (CABALLERO-DÍAZ & CASES, 2016). Pelo motivo da forma sugerir a interação NP-célula, a variedade de formas

observadas das TiO₂NPs pode implicar em diferentes influências destas sobre a célula podendo agir em várias vias metabólicas celulares.

No presente estudo, as análises microscópicas revelaram que na concentração de 10 µg/mL de TiO₂NP ocorreu uma mudança na morfologia de ambos modelos celulares testados, bem como a formação de agregados de TiO₂NP no meio de cultura nas concentrações de 5 e 10 µg/mL. Com base na literatura, as células de fibroblasto bovino quando analisadas em microscópio de luz são bipolares ou multipolares, com forma alongada, enquanto as células CHO possuem formato poligonal e com dimensões mais regulares (FRESHNEY, 2015). A partir desses parâmetros relatados na literatura e os visualizados no grupo controle, nota-se mudanças da morfologia quando se compara a área delimitada pelas células do grupo controle com o grupo de 10 µg/mL. A mudança na morfologia na maior concentração pode ser devido a presença de agregados, uma vez que um dos determinantes críticos para a toxicidade é a agregação (SHALIGRAM & CAMPBELL, 2013) em razão da força mecânica que os agregados acabam exercendo sobre as células (NEL et. al., 2009).

Com base no ensaio de viabilidade celular pelo ensaio de MTT, a exposição às TiO₂NPs por 24h não afetou a viabilidade das células CHO nas maiores concentrações (1, 5 e 10 µg/mL; P>0,05). Contudo, a proliferação celular em baixa concentração de TiO₂NPs (0,1 µg/mL; P<0,05) foi maior quando comparada ao grupo controle. Em contrapartida, a exposição das células de fibroblastos bovinos às TiO₂NPs não afetou a viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas (P>0,05).

O contato entre as células e as NPs resultam de características intrínsecas dos NMs, como carga de superfície e tamanho. As TiO₂NP na concentração de 0,1µg/mL exibiram tamanho médio de 20 nm em meio de cultivo suplementado com SFB, assim, estariam com suas superfícies livres para interagir com as células. As NPs com pequeno tamanho apresentam maior reatividade superficial, sendo capazes de interagirem com moléculas biológicas, como proteínas (quitinas e ciclinas) e peptídeos fosforilados (ZHAO et. al., 2009). Na literatura há trabalhos que indicam a influência de TiO₂NPs na progressão do ciclo celular através da modulação dos processos de sinalização de uma maneira dependente da dose e do tempo (HUANG et. al., 2009). A sinalização MEK / ERK é uma importante via de sinalização que promove a proliferação celular e sua desregulação pode

desencadear uma proliferação celular descontrolada (HUANG et. al., 2009). As NPs podem interferir em diferentes vias de sinalização e proliferação celular, no entanto, mais estudos são necessários para investigar esses efeitos.

Alguns dos possíveis mecanismo de toxicidade das TiO₂NP são mediante a ação das EROs produzidas por esses NMs após a indução de pares de elétrons sob luz. Os radicais livres produzidos causam peroxidação lipídica da membrana celular devido a interação eletrostática das NPs com as células, desse modo pode causar danos nas membranas celulares, entrada e interação das NPs com organelas intracelulares e macromoléculas biológicas (HOU et. al., 2018). Estudos prévios demonstraram que a função mitocondrial em células epiteliais de brônquios humanos (PARK et. al., 2008) e linfócitos periféricos humanos (GHOSH et. al., 2013) foram afetadas pela produção de EROs. No entanto, no presente estudo não foram observadas alterações na atividade da enzima SOD, o qual neutraliza os ânions superóxido e atua no combate ao estresse oxidativo. Esses achados sugerem que as TiO₂NPs nas concentrações testadas não alteraram o estado redox das células CHO e de fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*.

Na literatura encontram-se alguns relatos sobre outros mecanismos de toxicidade das TiO₂NPs, os quais incluem resposta inflamatória, apoptose, genotoxicidade e comprometimento direto dos componentes celulares (FARD et al., 2015; SONG et al, 2016). Contudo, em alguns ensaios as TiO₂NPs mostraram-se não tóxicas, como é o caso de um estudo utilizando células de fígado de rato. A exposição dessas células a 10 e 50 µg/mL não comprometeram a viabilidade celular (HUSSAIN et. al., 2005). De modo semelhante, 10 µg/cm² de TiO₂NPs não foram citotóxicas para células epiteliais brônquicas humanas (BHATTACHARYA et. al., 2009).

Segundo Virgilio et. al. (2010), o efeito citotóxico das TiO₂NPs mostrou ser dependente da concentração e da composição, e diferir entre as linhagens celulares estudadas. Na literatura há estudo que demonstra que com a aumento da concentração de NPs, a toxicidade diminui (GATOO et. al., 2014). Isso ocorre em razão da diminuição da reatividade quando há a agregação das NPs (GATOO et. al., 2014; NEL et. al., 2009). Esses achados sugerem que a diferença encontrada no presente estudo pode estar relacionada às características dos tipos celulares utilizados ou pelo estado de agregação das NPs. Logo, mais estudos são necessários para se conhecer quais linhagens de células são sensíveis a exposição

às TiO₂NP, bem como os mecanismos de interação das NMs com as células.

As TiO₂NPs foram genotóxicas nas menores concentrações testadas (0,1 µg/mL e 1 µg/mL) no tratamento curto e apenas para 1 µg/mL no tratamento longo para CHO. Conforme os resultados do DLS, nas concentrações de 0,1 µg/mL e 1 µg/mL de TiO₂NP exibiram os menores tamanhos hidrodinâmico diâmetro em meio suplementado. Esse pequeno tamanho permite a manifestação do efeito nano, em que partículas com tamanho na escala nanométrica apresentam área de superfície aumentada, tornando-se mais reativas (NEL et. al., 2009). No tratamento longo a genotoxicidade poder ser atribuída ao maior tempo de exposição, no qual possibilitou maior tempo de contato e ou internalização das NPs, interferindo em organelas celulares, como os lisossomos e componentes celulares e genéticos (ARMAND et. al. 2016). Na hipótese de internalização das TiO₂NPs um mecanismo provável consiste na interação das NPs com receptores de endocitose (NEL et. al., 2009), e posteriormente, as NPs podem estar interagindo por ação física com o DNA, desestabilizando a estrutura do DNA (KAMATA et al. 2011, ZINCHENKO et al. 2014).

Outros mecanismos de genotoxicidade podem ser atribuídas a interferência das NPs no sistema de reparo do DNA. Danos ao DNA podem ser reparados por vários mecanismos, incluindo reparo de excisão de base (BER), reparo de excisão de nucleotídeos (NER), recombinação homóloga e reparo de junção não homóloga (NHEJ) (MAGDOLENOVA et. al., 2014).

Apenas alguns estudos investigaram a relação das NPs ao reparo do DNA. Segundo Jugan et al. (2011), o qual investigaram o impacto das TiO₂NPs no reparo do DNA em células A549, descobriram que as TiO₂NPs danificaram o DNA simultaneamente e prejudicam o reparo do DNA celular por meio da inativação das vias BER e NER. Além disso, um outro estudo revelou que quando o meio favorece a diminuição de agregados, as TiO₂NP tornam-se mais livres para interagirem com as células, aumentando o número de células na fase S do ciclo celular (PRASAD et. al., 2013).

No presente estudo, o ensaio de MTT a indicou que após a exposição à 0,1 µg/mL de TiO₂NP em CHO houve um aumento na absorvância, indicando o aumento na proliferação celular. Dessa forma, acredita-se que as TiO₂NP, com maior área superficial disponível para reagirem, podem estar interagindo com receptores celulares relacionados a fatores de crescimento (como receptor do fator

de crescimento epidérmico e integrinas) e regulação do ciclo celular (como as quinases) (HUANG et. al., 2009; MAGDOLENOVA et. al., 2014; PANDEY & PRAJAPATI, 2017) influenciando na proliferação celular.

Além disso, segundo Huang et al. (2009) as TiO₂NP desregulam a função da proteína PLK1 do checkpoint mitótico que controla vários processos durante a mitose, incluindo a formação de anéis contráteis e a citocinese. Portanto, essas NPs podem induzir a formação de células aneuploides ou multinucleadas. Desse modo, acredita-se que nas concentrações onde as TiO₂NP estão mais dispersas influencie na proliferação celular, mas como as vias BER e NER estão desativadas durante a divisão nuclear, os danos não podem ser reparados. Logo, com os possíveis surgimentos de danos na divisão nuclear, há o aparecimento de micronúcleos.

No presente estudo a partir dos valores encontrados na quantificação da presença e ausência de BUD e pontes em 2.000 células binucleadas, percebe-se que prevalece a presença de pontes em CHO e BUD em fibroblastos. Dessa forma, esse valores sugerem que em CHO as NPs causam efeitos clastogênico, já que a perda de cromossômicos acêntricos estão relacionadas com a formação de pontes (KIRALY et. al., 2017). No entanto, em fibroblasto bovino as TiO₂NPs parecem estimular a ocorrência de outro efeito, o efeito aneugênico, em razão do surgimento dos BUD estarem relacionados com a perda ou ganho de cromossomos inteiros (KIRALY et. al., 2017).

Em fibroblastos bovinos apenas no tratamento longo, na concentração de 10 µg/mL de TiO₂NP, observou-se uma diminuição da frequência de micronúcleos. Isto, possivelmente, deve-se pelo fato de nessa concentração o citoplasma e o micronúcleo serem mais difíceis de visualizar por estarem mais cobertos por agregados de NPs. No presente estudo, as TiO₂NPs na concentração de 10 µg/mL quando em meio de cultivo suplementado apresentaram alto tamanho hidrodinâmico, bem como a presença de agregados pela microscopia de luz. Do mesmo modo o estudo de Di Virgilio et. al. (2010), apresentou redução no número de micronúcleos nessa concentração em razão da dificuldade de visualizar o citoplasma por apresentar agregados de TiO₂NP. Por outro lado, o potencial de aglomeração das NPs é uma característica que pode influenciar no seu comportamento nos sistemas biológicos e impactar na genotoxicidade. Geralmente, as NPs altamente aglomeradas não podem entrar no núcleo e na mitocôndria, enquanto as NPs que não se aglomeram podem ser distribuídos por toda a célula,

além de apresentarem maior área superficial e reatividade (MAGDOLENOVA et. al., 2014). Acredita-se que nas concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ as TiO_2NP não foram genotóxicas devido a aglomeração.

No presente estudo, ambas as células testadas mostraram diferentes resultados após exposição às TiO_2NPs . Diferentes tipos de células (epiteliais, conectivas, neurais, macrófagos, entre outros) variam em suas atividades metabólicas, receptores da superfície celular, capacidade antioxidante e de reparação do DNA, presença de diferentes enzimas e hormônios (VEVERS & JHA, 2008). Ainda diferentes linhagens celulares variam enquanto as propriedades de internalização, fagocitose e receptores de membrana (DUSINSKA et. al., 2011; MAGDOLENOVA et. al., 2014). Portanto, a resposta toxicológica às NPs depende do tipo de célula estudado.

8 CONCLUSÃO

De acordo com as condições experimentais do presente estudo, as TiO_2NP não induziram toxicidade (cito e genotoxicidade) em fibroblastos bovinos cultivados *in vitro*. Contudo, para as células CHO apenas a menor concentração (0,1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) alterou a viabilidade celular e aumentou a frequência de micronúcleos (no tratamento longo e curto), bem como a concentração de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induziu o aumento do número de micronúcleo no tratamento longo.

REFERÊNCIAS

- AFONSO, V., CHAMPY, R., MITROVIC, D., COLLIN, P., & LOMRI, A. Reactive Oxygen Species And Superoxide Dismutases: Role In Joint Diseases. *Joint Bone Spine*, V. 74, N. 4, P. 324-329, 2007.
- AGOSTINIS, P.; BERG, K.; CENGEL, K.A.; FOSTER, T.H.; GIROTTI, A.W.; GOLLNICK, S.O.; HAHNN, S.M.; HAMBLIN, M.R.; JUZENIENE, A.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; MROZ, P.; NOWIS, D.; PIETTE, JACQUES; WILSON, B.C. GOLAB, J. Photodynamic therapy of cancer: an update. *CA Cancer J. Clin.* 61, 250–281, 2011.
- AITKEN, R. J., CHAUDHRY, M. Q., BOXALL, A. B., HULL, M. Manufacture and use of nanomaterials: Current status in the UK and global trends. *Occup. Med.* v.56, p. 300–306, 2006.
- AKBARI, A.; AMINI, M.; TARASSOLI, A.; EFTEKHARI-SIS, B.; GHASEMIAN, N.; JABBARI, E. Transition metal oxide nanoparticles as efficient catalysts in oxidation reactions. *Nano-Structures & Nano-Objects*, v. 14, p. 19-48, 2018.
- ARAJ, Y., MIYAYAMA, T., HIRANO, S. Hirano, Difference in the toxicity mechanism between ion and nanoparticle forms of silver in the mouse lung and in macrophages, *Toxicology*. v.328 p.84- 92, 2015.
- ARMAND, L., A. TARANTINI, D. BEAL, M. BIOLA-CLIER, L. BOBYK, S. SORIEUL, K. PERNET-GALLAY, ET AL. Long-Term Exposure of A549 Cells to Titanium Dioxide Nanoparticles Induces DNA Damage and Sensitizes Cells towards Genotoxic Agents. *Nanotoxicology* v.10 (7), pp. 913–923, 2016.
- ARSOV, L.D.; KORMANN, C.; PLIETH, W. Electrochemical synthesis and in situ Raman spectroscopy of thin films of titanium dioxide. *Journal of Raman spectroscopy*, v. 22, n. 10, p. 573-575, 1991.
- ATKINS, P. & DE PAULA, J. *Physical chemistry for the life sciences*. Oxford University Press, USA, 2011.
- AZEVEDO, Cláudia; MACEDO, Maria Helena; SARMENTO, Bruno. Strategies for the enhanced intracellular delivery of nanomaterials. *Drug discovery today*, v. 23, n. 5, p. 944-959, 2018.
- BAAN, R., STRAIF, K., GROSSE Y. Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *Lancet Oncol.* v. 7, 2006.
- BAI, Y.; MORA-SERÓ, I.; DE ANGELIS, F.; BISQUERT, J. WANG, P. Titanium dioxide nanomaterials for photocatalytic applications, *Chem. Rev.*, pp. 10131–10176, 2014.
- BALASUBRAMANYAM, A.; SAILAJA, N.; MAHBOB, M.; RAHAMAN, M.F.; MISRA, S.; HUSSAIN, S.M.; GROVER, P. Evaluation of genotoxic effects of oral exposure to aluminum oxide nanomaterials in rat bone marrow. *Mutat. Res.* 676 41-47, 2009.
- BAYAT, N., LOPES, V. R., SCHOLERMANN, J., JENSEN, L. D., CRISTOBAL, S. Vascular toxicity of ultra-small TiO₂ nanoparticles and single walled carbon nanotubes in vitro and in vivo. *Biomaterials* 63, 1–13, 2015.
- BEEDANAGARI, S., VULIMIRI, S. V., BHATIA, S., & MAHADEVAN, B. Genotoxicity Biomarkers: Molecular Basis Of Genetic Variability And Susceptibility. In: *Biomarkers In Toxicology*. 2014. P. 729-742.
- BHATTACHARYA, K.; DEVOREN, M.; BOERTZ, J. SCHINS, R.P.F.; HOFFMANN, E.; DOPP, E. Titanium dioxide nanoparticles induce oxidative stress and DNA-adduct formation but not DNA-breakage in human lung cells. *Particle and Fibre Toxicology*, v. 6, n. 1, p. 17, 2009.

- CABALLERO-DÍAZ, E. & CASES, M.V. Analytical methodologies for nanotoxicity assessment. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 84, p. 160-171, 2016.
- CELLI, Jonathan P.; SPRING, B.Q.; RIZVI, I.; EVANS, C.L.; SAMKOE, K.S.; VERMA, S.; POGUE, B.W.; HASAN, T. Imaging and photodynamic therapy: mechanisms, monitoring, and optimization. *Chemical reviews*, v. 110, n. 5, p. 2795-2838, 2010.
- CHE, M., WANG, R., LI, X., WANG, H.-Y., & ZHENG, X. F. S. Expanding Roles Of Superoxide Dismutases In Cell Regulation And Cancer. *Drug Discovery Today*, V. 21, N. 1, P. 143-149, 2016.
- CHEN, J.L. & FAYERWEATHER, W.E. Epidemiologic study of workers exposed to titanium dioxide. *J Occup Med*, v.30, p. 937-942, 1988.
- CHEN, T.; YAN, J.; LI Y. Genotoxicity of titanium dioxide nanoparticles. *Journal of Food and Drug Analysis*, v. 22, p. 95-104, 2014.
- CLARK, D.P. & PAZDERNIK, N. J. *Biotechnology*. Newnes, 2015.
- DAMOISEAUX, R.; GEORGE, S.; LI, M.; POKHREL, S.; JI, Z.; FRANCE, B. XIA, T.; SUAREZ, E; RALLO, R.; MADLER, L. COHEN, Y.; HOEK, E.M.V.; NEL, A. No time to lose—high throughput screening to assess nanomaterial safety. *Nanoscale*, v. 3, n. 4, p. 1345-1360, 2011.
- DEKKERS, S. OOMEN, A.G.; BLEEKER, E.A.J.; VANDEBRIEL, R.J.; MICHELETTI, C.; CABELLOS, J.; JANER, G.; FUENTES, N.; VÁZQUEZ-CAMPOS, S.; BORGES, T.; SILVA, M.J.; PRINA-MELLO, A.; MOVIA, D.; NESSLANY, F.; RIBEIRO, A.R.; LEITE, O.E.; GROENEWOLD, M.; CASSEE, F.R.; WIJNHOFEN, S.W.P. Towards a nanospecific approach for risk assessment. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 80, p. 46-59, 2016.
- DENDISOVÁ, M., JENIŠTOVÁ, A., PARCHAŇSKÁ-KOKAISLOVÁ, A., MATĚJKA, P., PROKOPEC, V., ŠVECOVÁ, M. The use of infrared spectroscopic techniques to characterize nanomaterials and nanostructures: A review. *Analytica chimica acta*, 2018.
- DI VIRGILIO, A. L., REIGOSA, M., ARNAL, P. M., & FERNÁNDEZ LORENZO DE MELE, M. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Journal of hazardous materials*, v. 177, n. 1-3, p. 711-718, 2010.
- DIAMOND, S. A.; KENNEDY, A.J.; MELBY, N.L.; MOSER, R.D.; PODA, A.R.; WEISS, J.; BRAME, J.A. Assessment of the potential hazard of nano-scale TiO₂ in photocatalytic cement: application of a tiered assessment framework. *NanoImpact*, v. 8, p. 11-19, 2017.
- DRASLER, B.; SAYRE, P.; STEINHAUSER, K.G.; PETRI-FINK, A.; ROTHENRUTISHAUSER, B. 'In vitro approaches to assess the hazard of nanomaterials', *NanoImpact*. Elsevier, 8, p. 99–116, 2017.
- DUAN, J.; YU, Y.; LI, Y.; YU, Y.; LI, Y. ZHOU, X. HUANG, P. SUN, Z. Toxic Effect of Silica Nanoparticles on Endothelial Cells through DNA Damage Response via Chk1-Dependent G2/M Checkpoint. *PLoS ONE*, v. 8, n. 4, 2013.
- DUSINSKA M, RUNDÉN-PRAN E, CARREIRA SC, SAUNDERS M. *In vitro* and *in vivo* toxicity test methods. In *Adverse Effects of Engineered nanomaterials. Toxicology and Impact on Human Health*. Chap.4, 2011.
- EKWALL B. Screening of toxic compounds in mammalian cell cultures. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.407, p. 64-77, 1983.
- ELSABAHY, M. & WOLEY, K.L. Cytokines as biomarkers of nanoparticle immunotoxicity, *Chem. Soc. Rev.*, v.42, p.5552-5576, 2013.
- EMERICH, D.F. & THANOS, C.G. Nanotechnology and medicine. *Expert Opin Biol Ther.* v.3, p.655–663, 2003.

- FAKRUDDIN, M.; HOSSAIN, Z.; AFROZ, H. Prospects and applications of nanobiotechnology: a medical perspective. *Journal of nanobiotechnology*, v. 10, n. 1, p. 31, 2012.
- FARD, J. K.; JAFARI, S.; EGHBAL, M. A. A Review of Molecular Mechanisms Involved in Toxicity of Nanoparticles. *Adv Pharm Bull*, v. 5(4), p. 447-454, 2015.
- FENECH, M., KIRSCH-VOLDERS, M., NATARAJAN, A. T., SURRALLE, J., CROTT, J. W., PARRY, J., THOMAS, P. Molecular Mechanisms Of Micronucleus, Nucleoplasmic Bridge And Nuclear Bud Formation In Mammalian And Human Cells. *Mutagenesis*, V. 26, N. 1, P. 125-132, 2011.
- FENECH, Michael. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 455, n. 1, p. 81-95, 2000.
- FISCHER, S. HANDRICK, R.; OTTE, K. The art of CHO cell engineering: a comprehensive retrospect and future perspectives. *Biotechnology advances*, v. 33, n. 8, p. 1878-1896, 2015.
- FOLEY, S.; CROWLEY, C.; SMAIHI, M.; BONFILS, C.; ERLANGER, B.; SETA, P.; LARROQUE, C. Cellular localization of a water-soluble fullerene derivative. *Biochemical and biophysical research communications*, v. 294, n. 1, p. 116-119, 2002.
- FRESHNEY, R.I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. John Wiley & Sons, 2015.
- FU, P. P., XIA, Q., HWANG, H-M., RAY, P. C., & YU, H. Mechanisms Of Nanotoxicity: Generation Of Reactive Oxygen Species. *Journal Of Food And Drug Analysis*, V. 22, N. 1, P. 64-75, 2014.
- GACZYNSKA, M. & OSMULSKI, P. A. AFM of biological complexes: what can we learn? *Current opinion in colloid & interface science*, v. 13, n. 5, p. 351-367, 2008.
- GATOO, M. A., NASEEM, S., ARFAT, M. Y., MAHMOOD DAR, A., QASIM, K., & ZUBAIR, S. Physicochemical Properties Of Nanomaterials: Implication In Associated Toxic Manifestations. *Biomed Research International*, V. 2014, 2014.
- GIESSIBL, F.J. Advances in atomic force microscopy. *Reviews of modern physics*, v. 75, n. 3, p. 949, 2003.
- GILBERT, B., HUANG, F., ZHANG, H., WAYCHUNAS, G. A., BANFIELD, J. F. Nanoparticles: Strained and stiff. *Science* 305, 651–654, 2004.
- GILMARTIN, Niamh; O'KENNEDY, Richard. Nanobiotechnologies for the detection and reduction of pathogens. *Enzyme and microbial technology*, v. 50, n. 2, p. 87-95, 2012.
- GIOVANNI, M., YUE, J.Q., ZHANG, L.F., XIE, J.P., ONG, C.N., LENG, D.T. Pro-inflammatory responses of RAW264.7 macrophages when treated with ultralow concentrations of silver titanium dioxide, and zinc oxide nanoparticles. *J. Hazard. Mater*, v.297, p.146–152, 2015.
- GUMULEC, J., RAUDENSKA, M., HLAVNA, M., STRACINA, T., SZTALMACHOVA, M., TANHAUSEROVA, V., MASARIK, M. Determination of oxidative stress and activities of antioxidant enzymes in guinea pigs treated with haloperidol. *Experimental and therapeutic medicine*, v. 5, n. 2, p. 479-484, 2013.
- GUNSOLUS, Ian L.; HAYNES, Christy L. Analytical aspects of nanotoxicology. *Analytical Chemistry*, v. 88, n. 1, p. 451-479, 2015.
- HAVRDOVA, M.; HOLA, K.; SKOPALIK, J.; TOMANKOVA, K. PETR, M.; CEPE, K. POLAKOVA, K.; TUCEK, J.; BOURLINOS, A. B.; ZBORIL, R. Toxicity of carbon dots-Effect of surface functionalization on the cell viability, reactive oxygen species generation and cell cycle. *Carbon*, [s. l.], v. 99, p. 238–248, 2016.

- HINTZSCHE, H.; HEMMANN, U.; POTH, A.; UTESCH, D.; LOTT, J.; STOPPER, H. Fate of micronuclei and micronucleated cells. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 771, p. 85-98, 2017.
- HIRAKAWA, K., MORI, M., YOSHIDA, S., OIKAWA, S., KAWANISHI, S. Photo-irradiated titanium dioxide catalyzes site specific DNA damage via generation of hydrogen peroxide. *Free Radic. Res.*, v.38, p.439–447, 2004.
- HORIE, M.; NISHIO, K. FUJITA, K.; ENDOH, S. MIYAUCHI, A.; SAITO, Y.; IWAHASHI, H.; YAMAMOTO, K.; MURAYAMA, H.; NAKANO, H.; NANASHIMA, N.; NIKI, E.; YOSHIDA, Y. Protein Adsorption of Ultrafine Metal Oxide and Its Influence on Cytotoxicity Toward Cultured Cells. *Chem. Res. Toxicol.* v. 22, p. 543-553, 2009.
- HOU, J.; WANG, L.; WANG, C.; ZHANG, S.; LIU, H.; LI, S. WANG, X. Toxicity and mechanisms of action of titanium dioxide nanoparticles in living organisms. *Journal of Environmental Sciences*, 2018.
- HU, H.L., GUO, Q., WANG, C.L., MA, X., HE, H.J., OH, Y.R., FENG, Y.J., WU, Q., GU, N. Titanium dioxide nanoparticles increase plasma glucose via reactive oxygen species-induced insulin resistance in mice. *J. Appl. Toxicol.*, v.35, p.1122–1132, 2015.
- HUANG, S., CHUEH, P. J., LIN, Y.-W., SHIH, T.-S., & CHUANG, S.-M. Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO₂ long-term exposure. *Toxicology and applied pharmacology*, v. 241, n. 2, p. 182-194, 2009.
- HUANG, S., CHUEH, P.J , LIN, Y.W. Disturbed mitotic progression and genome segregation are involved in cell transformation mediated by nano-TiO₂ long-term exposure. *Toxicol Appl Pharmacol*, v. 241, p. 182-194, 2009.
- HUANG, Y. W.; WU, C. H.; ARONSTAM, R. S. Toxicity of transition metal oxide nanoparticles: recent insights from in vitro studies. *Materials*, v. 3, n. 10, p. 4842-4859, 2010.
- HUSSAIN, S. M.; WARHEIT, D. B.; NG, S.P.; COMFORT, K.K.; GRABINSKI, C.M.; BRAYDICH-STOLLE, L.K. At the crossroads of nanotoxicology in vitro: Past achievements and current challenges. *Toxicological Sciences*, [s. l.], v. 147, n. 1, p. 5–16, 2015.
- IARC. Identification of research needs to resolve the carcinogenicity of high-priority IARC carcinogens. Disponível em: <www.monographs.iarc.fr/ENG/Publications/techrep42/>, acesso em 2014.
- JAIN, Kewal K. & JAIN, Kewal K. *The handbook of nanomedicine*. NY, USA: Humana Press, 2017.
- JEMEC, A.; MESARIC, T.; SOPOTNIK, M. SEPCIC, K. DROBNE, D. Biological Characterization of Nanomaterials. *Nanomaterial Characterization: Introduction*, cap. 12, p. 253-268, 2016.
- JIANG, X. ; MICLAUS, T.; WANG, L.; FOLDBJERG, R.; SUTHERLAND, D. S.; AUTRUP, H.; CHEN, C.; BEER, C. Fast intracellular dissolution and persistent cellular uptake of silver nanoparticles in CHO-K1 cells: implication for cytotoxicity. *Nanotoxicology*, v. 9, n. 2, p. 181-189, 2015.
- JIN, H. ; PI, J.; YANG, F.; JIANG, J. ; WANG, X.; BAI, H.; SHAO, M.; HUANG, L.; ZHU, Z.; YANG, P.; LI, L.; LI, T.; CAI, J.; CHEN, Z.W. Folate-chitosan nanoparticles loaded with ursolic acid confer anti-breast cancer activities in vitro and in vivo. *Scientific Reports*, v. 6, p. 30782, 2016.
- JRC Nanomaterials Repository, Titanium dioxide, NM-100, NM-101, NM-102, NM-103, NM-104, NM-105. Publications Office of the European Union, 2014, disponível em: <[www. publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC86291](http://www.publications.jrc.ec.europa.eu/repository/handle/JRC86291)>

- JUGAN, M.L., BARILLET, S., SIMON-DECKERS, A., HERLIN-BOIME, N., SAUVAIGO, S., DOUKI, T., CARRIERE, M. Titanium dioxide nanoparticles exhibit genotoxicity and impair DNA repair activity in A549 cells. *Nanotoxicology*, v. 6, n. 5, p. 501-513, 2012.
- KAKINOKI, K., YAMANE, K., TERAOKA, R., OTSUKA, M, MATSUDA, Y. Effect of relative humidity on the photocatalytic activity of titanium dioxide and photostability of famotidine. *J. Pharm. Sci.* 93, 582–589 (2004).
- KAMATA, H., ZINCHENKO, A., MURATA, S. Effects of cationic and anionic nanoparticles on the stability of the secondary structure of DNA. *Colloid Polym Sci.* v. 289, pp.1329–1335, 2011.
- KANSARA, K.; PATEL, P.; SHAH, D. ; SHUKLA, R.K.; SINGH, S.; KUMAR, A.; DHAWAN, A. TiO₂ nanoparticles induce DNA double strand Breaks and cell cycle arrest in human alveolar cells. *Environ. Mol. Mutagen.* v.56, p.204–217, 2015.
- KIM, H.; SOFO, J.O.; VELEGOL, D.; COLE, M.W.; LUCAS, A.A. Van der Waals dispersion forces between dielectric nanoclusters. *Langmuir*, v. 23, n. 4, p. 1735-1740, 2007.
- KIM, K.M.; SONG, J. H.; KIM, M.K.; CHUNG, S.T.; JEONG, J.; YANG, J.Y.; CHOI, A.J.; CHOI, H.J.; OH, J.M. Physicochemical analysis methods for nanomaterials considering their toxicological evaluations, *Mol. Cell. Toxicol.*, v.10,p.347-360, 2014.
- KIRALY, G., SIMONYI, A. S., TURANI, M., JUHASZ, I., NAGY, G., & BANFALVI, G. Micronucleus Formation During Chromatin Condensation And Under Apoptotic Conditions. *Apoptosis*, V. 22, N. 2, P. 207-219, 2017.
- KIRSCH-VOLDERS, M. Towards a validation of the micronucleus test. *Mutation Research*, v. 392, p. 1-4, 1997.
- KUSHIBIKI, T., TU, Y., ABU-YOUSIF, A. O., HASAN, T. Photodynamic activation as a molecular switch to promote osteoblast cell differentiation via AP-1 activation. *Sci. Rep.* v.5, p.13114, 2015.
- LABILLE, J. & BRANT, J. Stability of nanoparticles in water. *Nanomedicine*, v. 5, n. 6, p. 985-998, 2010.
- LAGOPATI, N.; TSILIBARY, E.P.; FALARAS, P.; PAPAZAFIRI, P.; PAVLATOU, E.A.; KOTSOPOULOU, E.; KITSIOU, P. Effect of nanostructured TiO₂ crystal phase on photoinduced apoptosis of breast cancer epithelial cells. *Int. J. Nanomedicine*, v.9, p.3219–3230, 2014.
- LANG, X. J., CHEN, X. D., ZHAO, J. C. Heterogeneous visible light photocatalysis for selective organic transformations. *Chem. Soc. Rev.* v.43, p.473–486, 2016.
- LEWINSKI, N.; COLVIN, V.; DREZEK, R. Cytotoxicity of nanoparticles. *Small*, v. 4, n. 1, p. 26-49, 2008.
- LI, L.; YAN, J.; WANG, T.; ZHAO, Z.J.; ZHANG, J.; GONG, J.; GUAN, N. Sub-10 nm rutile titanium dioxide nanoparticles for efficient visible-light-driven photocatalytic hydrogen production. *Nat. Commun.* v.6, p.5881-91, 2015.
- LOPES, V.R.; LOITTO, V.; AUDINOT, J.N.; BAYAT, N.; GUTLEB, A.C.; CRISTOBAL, S. Dose-dependent autophagic effect of titanium dioxide nanoparticles in human HaCaT cells at non-cytotoxic levels. *J. Nanobiotechnology* v.14, n.1, p.22, 2016.
- MAGDOLENOVA, Z., COLLINS, A., KUMAR, A., DHAWAN, A., STONE, V., & DUSINSKA, M. Mechanisms Of Genotoxicity. A Review Of In Vitro And In Vivo Studies With Engineered Nanoparticles. *Nanotoxicology*, V. 8, N. 3, P. 233-278, 2014.
- MAO, Z.; XU, B.; JI, X.; ZHOU, K. ZHANG, X.; CHEN, M.; HAN, X.; TANG, Q.; WANG, X.; XIA, Y. Titanium dioxide nanoparticles alter cellular morphology via disturbing the microtubule dynamics. *Nanoscale*, v. 7, n. 18, p. 8466-8475, 2015.
- MÁRQUEZ-RAMÍREZ, G.S.; DELGADO-BUENROSTRO, N.L.; CHIRINO, Y.I.; IGLESIAS, G.G.; LÓPEZ-MARURE, R. Titanium dioxide nanoparticles inhibit proliferation and

- induce morphological changes and apoptosis in glial cells. *Toxicology*, v. 302, n. 2-3, p. 146-156, 2012.
- MENDES, R.G.; BACHMATIUK, K.B.; EL-GENDY, A.A.; KRUPSKAYA, Y.; SPRINGER, A.; KLINGELER, R.; SCHMIDT, O.; BUCHNER, B.; SANCHEZ, S.; RUMMELI, M.H. Synthesis and toxicity characterization of carbon coated iron oxide nanoparticles with highly defined size distributions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, v. 1840, n. 1, p. 160-169, 2014.
- MIN, Y.; AKBULUT, M.; KRISTIANSEN, K.; GOLAN, Y.; ISRAELACHVILI, J. The role of interparticle and external forces in nanoparticle assembly. *Nature materials*, v. 7, n. 7, p. 527, 2008.
- Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, Projero NANOREG. Disponível em: <www.mcti.gov.br/projeto-nanoreg> acesso em julho de 2017.
- MORAIS, M.G.; MARTINS, V.G.; STEFFENS, D.; COSTA, J.A.V. Biological applications of nanobiotechnology. *Journal of nanoscience and nanotechnology*, v. 14, n. 1, p. 1007-1017, 2014.
- MURDOCK, R.C.; BRAYDICH-STOLLE, L.; SCHRAND, A.M.; SCHALER, J.J.; HUSSAIN, S.M. Characterization of nanomaterial dispersion in solution prior to in vitro exposure using dynamic light scattering technique. *Toxicological sciences*, v. 101, n. 2, p. 239-253, 2008.
- NANOREG – A Common European approach to the regulatory testing of nanomaterials, Disponível em: <www.nanoreg.eu> acesso em julho de 2017.
- NEACSU, P.; MAZARE, A.; SCHMUKI, P.; CIMPEAN, A. Attenuation of the macrophage inflammatory activity by TiO₂ nanotubes via inhibition of MAPK and NF- κ B pathways. *International journal of nanomedicine*, v. 10, p. 6455, 2015.
- NEL, A. E.; MADLER, L.; VELEGOL, D.; XIAN, T.; HOEK, E.M.; SOMASUNDARAN, P.; KLAESSING, F.; CASTRANOVA, V.; THOMPSON, M. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. *Nature materials*, v. 8, n. 7, p. 543, 2009.
- NEL, A.; XIA, T.; MADLER, L.; LI, N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *science*, v. 311, n. 5761, p. 622-627, 2006.
- NIEMEYER, C. M. & MIRKIN, C. A. *Nanobiotechnology: concepts, applications and perspectives*. John Wiley & Sons, 2004.
- NINOMIYA, K.; FUKUDA, A.; OGINO, C.; SHIMIZU, N. Targeted sonocatalytic cancer cell injury using avidin-conjugated titanium dioxide nanoparticles. *Ultrasonics sonochemistry*, v. 21, n. 5, p. 1624-1628, 2014.
- OH, N. & PARK, J. H. Endocytosis and exocytosis of nanoparticles in mammalian cells. *International Journal of Nanomedicine*, [s. l.], v. 9, n. SUPPL.1, p. 51–63, 2014.
- ORGANISATION DE COOPÉRATION ET DE DÉVELOPPEMENT ÉCONOMIQUES. Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test. OECD Publishing, 2016.
- ORGANISATION DE COOPÉRATION ET DE DÉVELOPPEMENT ÉCONOMIQUES. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OecD Publishing, 2016.
- OZKAN, A.D., TOPAL, A.E., DANA, A., GULER, M.O., TEKINAY, A.B. Atomic Force Microscopy For The Investigation Of Molecular And Cellular Behavior. *Micron*, V. 89, P. 60-76, 2016.
- PAN, X.; XIE, J.; LI, Z.; CHEN, M.; WANG, M.; WANG, P.N.; CHEN, L.; MI, L. Enhancement of the photokilling effect of aluminum phthalocyanine in photodynamic therapy by conjugating with nitrogen-doped TiO₂ nanoparticles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 130, p. 292-298, 2015.
- PANDEY, R.K., & PRAJAPATI, V.K. Molecular and immunological toxic effects of nanoparticles. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017.

- PARRY, J.M.; & SORS, A. The detection and assessment of the aneugenic potential of environmental chemicals: the European Community aneuploidy project, *Mutation Research*, v. 287, n.1, p. 3-15, 1993.
- PRASAD, R.Y., WALLACE, K., DANIEL, K.M., TENNANT, A.H., ZUCKER, R.M., STRICKLAND, J., DREHER, K., KLIGERMAN, A.D., BLACKMAN, C.F., DEMARINI, D.M. Effect of treatment media on the agglomeration of titanium dioxide nanoparticles: impact on genotoxicity, cellular interaction, and cell cycle. *ACS Nano* v.7, pp. 1929–1942, 2013.
- QIN, Y.; SUN, L.; XIXUAN, L.; QINGQING, C.; WANG, H.; TANG, X.; YE, L. Highly water-dispersible TiO₂ nanoparticles for doxorubicin delivery: Effect of loading mode on therapeutic efficacy. *Journal of Materials Chemistry*, v. 21, n. 44, p. 18003-18010, 2011.
- RAMACHARYULU, P. V. R. K.; KUMAR, J. P.; PRASAD, G. K.; SRIVASTAVA, A.R. Synthesis, characterization and photocatalytic activity of Ag–TiO₂ nanoparticulate film. *RSC Advances*, v. 5, n. 2, p. 1309-1314, 2015.
- REGISTRE, M. & PROUDLOCK, R. The In Vitro Chromosome Aberration Test. In: *Genetic Toxicology Testing*. 2016. p. 207-267.
- RISS, T. L. Assay Guidance Manual. Eli Lilly & Company and the Nacional Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- ROBLES-GARCÍA, M. A., RODRÍGUEZ-FÉLIX, F., MÁRQUEZ-RÍOS, E., AGUILAR, J. A., BARRERA-RODRÍGUEZ, A., AGUILAR, J., DEL-TORO-SÁNCHEZ, C. L. Applications of nanotechnology in the agriculture, food, and pharmaceuticals. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 16, n. 8, p. 8188-8207, 2016.
- RODRIGUES, A. G. & GALZERANI, J. C. Espectroscopias de infravermelho, Raman e de fotoluminescência: potencialidades e complementaridades. *Revista Brasileira de Ensino de Física*, v. 34, n. 4, p. 4309-1, 2012.
- SAPSFORD, K. E.; TYNER, K.N.; DAIR, B.J.; DESCHAMPS, J.R.; MEDINTZ, I.L. Analyzing nanomaterial bioconjugates: A review of current and emerging purification and characterization techniques. *Analytical Chemistry*, [s. l.], v. 83, n. 12, p. 4453–4488, 2011.
- SCHEUERMANN, A. G.; LAWRENCE, J.P.; MENG, A.C.; TANG, K.; HENDRICKS, O.L.; CHIDSEY, C.E.D.; MCINTYRE, P.C. Titanium Oxide Crystallization and Interface Defect Passivation for High Performance Insulator-Protected Schottky Junction MIS Photoanodes. *ACS applied materials & interfaces*, v. 8, n. 23, p. 14596-14603, 2016.
- SCHNEIDER, J.; MATSUOKA, M.; TAKEUCHI, M.; ZHANG, J. HORIUCHI, Y.; ANPO, M.; BAHNEMANN, D.W. Understanding TiO₂ photocatalysis: mechanisms and materials. *Chemical reviews*, v. 114, n. 19, p. 9919-9986, 2014.
- SHALIGRAM, S.; & CAMPBELL, A. Toxicity of copper salts is dependent on solubility profile and cell type tested. *Toxicology in Vitro*, v. 27, n. 2, p. 844-851, 2013.
- SHUKLA, R. K.; SHARMA, V.; PANDEY, A.K.; SINGH, S.; SULTANA, S.; DHAWAN, A. ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicology in vitro*, v. 25, n. 1, p. 231-241, 2011.
- SIGMUND, W.; PYRGIOTAKIS, G.; DAGA, A. 11 Theory and Applications of Colloidal Processing. *Chemical Processing of Ceramics*, p. 269, 2005.
- SOENEN, S. J.; MANSHIAN, B. B.; HIMMELREICH, U.; DEMEESTER, J.; BRAECKMANS, K.; SMEDT, S. C. The performance of gradient alloy quantum dots in cell labeling. *Biomaterials*, [s. l.], v. 35, n. 26, p. 7249–7258, 2014.
- SONG, B.; ZHANG, Y.; LIU, J.; FENG, X.; ZHOU, T.; SHAO, L. Unraveling the neurotoxicity of titanium dioxide nanoparticles: focusing on molecular mechanisms. *Beilstein J. Nanotechnol*, v. 7, p. 645–654, 2016.

- TAKHAR, P.; & MAHANT, S. In vitro methods for nanotoxicity assessment: advantages and applications. *Archives of Applied Science Research*, v. 3, p. 389-403, 2011
- TEEGUARDEN, J.; DORMAN, D. C.; COVINGTON, T.R.; CLEWELL, H.J.; ANDERSEN, M. E. Pharmacokinetic modeling of manganese. I. Dose dependencies of uptake and elimination. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, v. 70, n. 18, p. 1493-1504, 2007.
- THIMIRI, G. R., DEEPAK B.; KHAN, N. A. Designer nanoparticle: nanobiotechnology tool for cell biology. *Nano Convergence*, [s. l.], v. 3, n. 1, p. 22, 2016.
- TROUILLER, B.; RELIENE, R.; WESTBROOK, A.; SOLAIMANI, P.; SCHIESTL, R. H. Titanium dioxide nanoparticles induce DNA damage and genetic instability in vivo in mice. *Cancer research*, v. 69, n. 22, p. 8784-8789, 2009.
- VELEGOL, D. Assembling colloidal devices by controlling interparticle forces. *Journal of Nanophotonics*, v. 1, n. 1, p. 012502, 2007.
- VEVERS, W.F.; & JHA, AWADHESH N. Genotoxic and cytotoxic potential of titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles on fish cells in vitro. *Ecotoxicology*, v. 17, n. 5, p. 410-420, 2008.
- VIRGILIO, A.L.; REIGOSA, M.; ARNAL, P.M.; MELE, M.F.L. Comparative study of the cytotoxic and genotoxic effects of titanium oxide and aluminium oxide nanoparticles in Chinese hamster ovary (CHO-K1) cells. *Journal of Hazardous Materials*, v. 177, p. 711-718, 2010.
- WAENY, P. de O. Cultivo e isolamento de células destinadas a transferência nuclear em bovinos: revisão de literatura. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) – Universidade de Brasília, Brasília.
- WANG, D.; LIN, Z; WANG, T.; YAO, Z.; QIN, M.; ZHENG, S.; LU, W. Where does the toxicity of metal oxide nanoparticles come from: the nanoparticles, the ions, or a combination of both? *J. Hazard. Mater*, v. 308, p. 328-334, 2016.
- WANG, Y.; CUI, H.; ZHOU, J.; LI, F. ; WANG, J.; CHEN, M.; LIU, Q. Cytotoxicity, DNA damage, and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in human non-small cell lung cancer A549 cells. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* v. 22, p.5519–5530, 2015.
- WESTERINK, W. M. A.; SCHIRRI, T. J.; HORBACH, G. J.; SCHOONEM, W. G. Development and validation of a high-content screening in vitro micronucleus assay in CHO-k1 and HepG2 cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 724, n. 1, p. 7-21, 2011.
- WHALLEY, P. M.; BARTELS, M.; BENTLEY, K. S.; CORVARO, M.; FUNK, D.; HIMMELSTEIN, M. W.; NEUMANN, B.; STRUPP, C.; ZHANG, F.; MEHTA, J. An in vitro approach for comparative interspecies metabolism of agrochemicals. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, v. 88, p. 322-327, 2017.
- WOLFGANG, G.; HOLZWARTH, U.; HABERL, N; KOPEMPEL, J.; HIRN, S.; WENK, A.; SCHLEH, C.; SCHAFFLER, M.; LIPKA, J.; SEMMLER-BEHNKE, M.; GIBSON, N. Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intravenous injection in rats: Part 1, *Nanotoxicology*, 11:4, 434-442, 2017.
- WU, J.; LIU, W.; XUE, C.; ZHOU, S.; LAN, F.; BI, L.; XU, H.; YANG, X.; ZENG, F. D. Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure. *Toxicology letters*. v. 191, n. 1, p. 1-8, 2009.
- WU, K. C.; YAMAUCHI, Y.; HONG, C. Y.; YANG, Y. H.; LIANG, Y. H.; FUNATSU, T.; TSUNODA, M. Biocompatible, surface functionalized mesoporous titania nanoparticles for intracellular imaging and anticancer drug delivery. *Chem Commun (Camb)*. v.47, p.5232–5234, 2011.

- XIE, Q.; ZHAO, Y.; CHEN, X.; LIU, H.; EVANS, D. G. YANG, W. Nanosheet-based titania microspheres with hollow core-shell structure encapsulating horseradish peroxidase for a mediator-free biosensor. *Biomaterials* 32, 6588–6594, 2011.
- YAMAGUCHI, S.; KOBAYASHI, H.; NARITA, T.; KANEHIRA, K.; SONOEZAKI, S.; KUDO, N.; KUBOTA, Y.; TERASAKA, S.; HOUKIN, K. Sonodynamic therapy using water-dispersed TiO₂-polyethylene glycol compound on glioma cells: Comparison of cytotoxic mechanism with photodynamic therapy. *Ultrason. Sonochem.* v.18, p.1197–1204, 2011.
- YEOW, N., TABOR, R. F., GARNIER, G. Atomic force microscopy: From red blood cells to immunohaematology. *Advances in colloid and interface science*, 2017.
- YIN, Z. F.; WU, L.; YANG, H. G.; SU, Y. H. Recent progress in biomedical applications of titanium dioxide. *Physical chemistry chemical physics*, v. 15, n. 14, p. 4844-4858, 2013.
- YOU, D. G. DEEPAGAN, V.G., UM, W., JEON, S., SON, S., CHANG, H., YOON, H.I., CHO, Y.W., SWIERCZEWSKA, M., LEE, S. POMPER, M.G., KWON, I.C., KIM, K. PARK, J.H. ROS-generating TiO₂ nanoparticles for non-invasive sonodynamic therapy of cancer. *Scientific Reports*, v. 6, p. 23200, 2016.
- ZINCHENKO, A.; TSUMOTO, K.; MURATA, S.; YOSHIKAWA, K. Crowding by Anionic Nanoparticles Causes DNA Double-Strand Instability and Compaction. *J. Phys. Chem. B*, 118 (5), pp 1256–1262, 2014.

ANEXO

Publicações no Período

Anexo A – Apresentação de pôster na XXIII Mostra de Produção Científica da XL Semana de Biologia DA UFJF, intitulado “Estudo *in vitro* do Efeito das Nanopartículas de Dióxido de Titânio em Cultura de Células CHO”, 2017, página 69.

Anexo B – Apresentação de pôster no IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, intitulado “Estudo da Biocompatibilidade das Nanopartículas de Dióxido de Titânio em Fibroblasto Bovino”, 2017, página 70.

Anexo C – Apresentação de pôster no Gene Time Conference UFMG, intitulado “*In vitro* genotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticle in CHO cells”, 2018., página 71.

Anexo D – Apresentação de pôster na XLI Semana de Biologia e XXIV Mostra de Produção Científica da UFJF “Ensaio do Micronúcleo como Indicador de Genotoxicidade em Células de Mamíferos Expostas à Nanopartículas de TiO₂”, 2018, página 72

Anexo E – Prêmio de Melhor Pôster na área de Genética e Biotecnologia da XLI Semana de Biologia e XXIV Mostra de Produção Científica da UFJF do pôster intitulado “Ensaio do Micronúcleo como Indicador de Genotoxicidade em Células de Mamíferos Expostas à Nanopartículas de TiO₂”, 2018, página 73.

CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho científico intitulado “Estudo In Vitro do Efeito das Nanopartículas de Dióxido de Titânio em Cultura de Células CHO” com os autores Leonara Beatriz Fayer de Almeida; Rafaela de Souza Salomão Zanette; Geovana Onorato; Jocarla Fregulia Santos; Humberto de Mello Brandão & Michele Munk Pereira, foi apresentado como pôster na XXIII Mostra de Produção Científica da XI Semana de Biologia da UFPA, sob a área Genética & Biotecnologia.

Juiz de Fora, 10 de novembro de 2017.


ANA PAULA FERREIRA
DIRETORA DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS


NAVARA RODRIGUES DE ALMEIDA
PRESIDENTE DA XI SEMEIO

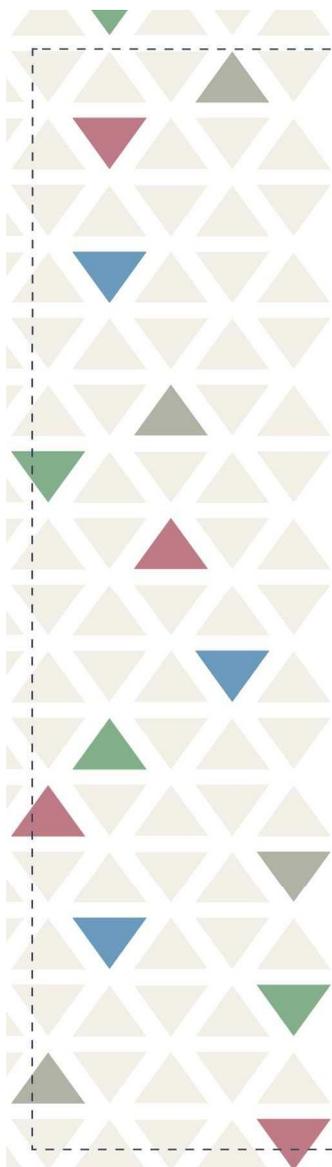
**CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho “ESTUDO DA BIOCOMPATIBILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE DIÓXIDO DE TITÂNIO EM FIBROBLASTOS BOVINOS”, dos autores Leonara Beatriz Fayer de Almeida; Rafaella de Souza Salomão Zanette; Geovana Onorato; Jocarla Fregulia Santos; Humberto de Mello Brandão; Michele Munk Pereira, foi apresentado no formato de pôster, no dia 22 de novembro, durante o IX Workshop de Nanotecnologia Aplicada ao Agronegócio, realizado nos 21 e 22 de novembro de 2017 na Embrapa Instrumentação.

São Carlos, 23 de novembro de 2017

João de Mendonça Naime
Chefe Geral
Embrapa Instrumentação

Certificamos que o trabalho **“In vitro genotoxicity of Titanium Dioxide Nanoparticle in CHO cells”** de autoria de **Leonara Beatriz Fayer de Almeida, Rafaella de Souza Salomão Zanette, Juliana Tatiara da Costa Siqueira, Humberto de Mello Brandão, Michele Munk** foi apresentado na forma de PÔSTER no **“Gene Time Conference 2018”** promovido pelo Programa de Pós Graduação em Genética da Universidade Federal de Minas Gerais, nos dias 23 e 24 de agosto de 2018.



CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho científico intitulado “**Ensaio do Micronúcleo como Indicador de Genotoxicidade em Células de Mamíferos Expostas à Nanopartículas de TiO₂**” com os autores **Leonara Beatriz Fayer de Almeida; Juliana Tatiara da Costa Siqueira; Rafaella de Souza Salomão Zanette; Juliana Carine Gern; Humberto de Mello Brandão; Michele Munk**, foi apresentado como pôster na **XLI Semana de Biologia e XXIV Mostra de Produção Científica da UFJF** no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, realizada entre 22 a 26 de outubro de 2018, sob a área de **Genética e Biotecnologia**.

Juiz de Fora, 26 de outubro de 2018.

LYDERSON FACIO VICCINI
DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RINALDO COUTO GARCIA JÚNIOR
PRESIDENTE DA XLI SEMBIO

CERTIFICADO



Certificamos que o trabalho científico intitulado **“Ensaio do Micronúcleo como Indicador de Genotoxicidade em Células de Mamíferos Expostas à Nanopartículas de TiO₂”** com os autores **Leonara Beatriz Fayer de Almeida; Juliana Tatiara da Costa Siqueira; Rafaella de Souza Salomão Zanette; Juliana Carine Gern; Humberto de Mello Brandão; Michele Munk**, ganhou como **melhor pôster** na **XLI Semana de Biologia e XXIV Mostra de Produção Científica da UFJF** no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora, realizada entre 22 a 26 de outubro de 2018, sob a área de **Genética e Biotecnologia**.

Juiz de Fora, 26 de outubro de 2018.

Handwritten signature of Lyderson Facio Viccini in blue ink.

LYDERSON FACIO VICCINI

DIRETOR DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Handwritten signature of Rinaldo Couto Garcia Júnior in blue ink.

RINALDO COUTO GARCIA JÚNIOR

PRESIDENTE DA XLI SEMBIO